

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGÔ ĐIỂM NGỌC

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, KIỂU GEN
CỦA BỆNH HBH VÀ CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH
BỆNH α THALASSEMIA**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2018

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGÔ ĐIỂM NGỌC

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, KIỂU GEN
CỦA BỆNH HBH VÀ CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH
BỆNH α THALASSEMIA**

Chuyên ngành: Y sinh học - Di truyền

Mã số: 62.72.01.11

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Trần Thị Thanh Hương
2. TS. Dương Bá Trục

HÀ NỘI - 2018

LỜI CẢM ƠN

Sau một quá trình dài, cho đến ngày hôm nay, nhìn lại, tôi đã trân trọng tất cả những gì cuộc đời đã cho tôi, không chỉ riêng ở một khía cạnh nào. Tôi đã chọn một lối đi, một lĩnh vực chuyên môn, mà từ đó tôi có thể thực hiện được tâm nguyện của mình. Hôm nay, với kết quả luận án này, một kết quả có được không chỉ từ riêng cá nhân mình, tôi thật trân trọng và chân thành cảm ơn tất cả.

Lời đầu tiên, xin được cảm ơn những con bệnh ngặt nghèo, những số phận, những gia đình đang nghiệt ngã vì bệnh tật giữa cuộc đời thương. HỌ, đã hun đúc trong tôi một tâm huyết, để tôi có thể mang tâm huyết này vào đời, vào chuyên môn, và đặc biệt hơn là quay vào lại được với tâm tôi, mà đồng cảm, chia sẻ cùng với HỌ.

Xin được cảm ơn hai người THẦY khoa học, PGS.TS. Trần Thị Thanh Hương và TS. Dương Bá Trục, đã dìu dắt và động viên tôi không ngừng trên suốt chặng đường lâu dài này, để có được sản phẩm khoa học ngày hôm nay.

Xin được cảm ơn các vị LÃNH ĐẠO, các ĐỒNG NGHIỆP, tại Bệnh Viện Nhi Trung Ương nơi tôi đang công tác, tại Bộ Môn Y sinh học - Di truyền, Trường Đại Học Y Hà Nội nơi tôi đang học tập, tại Trung tâm chẩn đoán trước sinh Bệnh viện Phụ Sản Trung Ương và Phụ Sản Hà Nội, đã giúp đỡ tôi hoàn thành nhiệm vụ, cũng là một vinh dự này.

Xin được cảm ơn những người BẠN yêu quý đã luôn ở bên tôi.

Xin được cảm ơn GIA ĐÌNH, bố mẹ, chồng và hai con gái của tôi, những người mà tất cả những gì họ dành cho tôi đều là tình yêu thương vô bờ bến.

Cuối cùng, và là tất cả, xin được cảm ơn NGƯỜI, đã khai sáng, dẫn đường, chỉ lối, để tôi nhìn lại được chính TÔI, ngay đây, trong từng lời nói này, và trên chính con đường tôi đang đi, bây giờ và mãi mãi.

Ngô Diễm Ngọc

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là: Ngô Diễm Ngọc, nghiên cứu sinh khóa 30, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Y sinh học - Di truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của thầy: PGS.TS. Trần Thị Thanh Hương và TS. Dương Bá Trục.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2018

NGƯỜI CAM ĐOAN

Ngô Diễm Ngọc

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng kéo dài chuỗi
C-ARMS-PCR	Combine-Amplification Refractory Mutation System-PCR	Hệ thống khuếch đại đột biến có tính trợ
RT-PCR	Reverse transcrip PCR	PCR sao mã ngược
MLPA	Multiplex ligation dependent probe amplification	Khuếch đại nhiều đoạn dò phụ thuộc kết nối
RDB	Reserve dot blot	Lai điểm ngược
DB	Dot blot	Lai điểm
RE - PCR	Restriction enzyme - PCR	PCR cắt enzyme
Hb	Hemoglobin	Huyết sắc tố
α	Alpha chain	Chuỗi alpha
β	Beta chain	Chuỗi beta
γ	Gamma chain	Chuỗi gamma
δ	Delta chain	Chuỗi delta
ϵ	Epsilon chain	Chuỗi epsilon
ζ	Zeta chainchain	Chuỗi zeta
$(\alpha_2\beta_2)$	Hemoglobin A	HbA
$(\alpha_2\delta_2)$	Hemoglobin A ₂	HbA ₂
$(\zeta_2\epsilon_2)$	Hemoglobin Gower1	Hb Gower1
$(\alpha_2\epsilon_2)$	Hemoglobin Gower2	Hb Gower2
$(\zeta_2\gamma_2)$	Hemoglobin Porland	Hb Porland
$(\alpha_2\gamma_2)$	Hemoglobin F	HbF
β_4	Hemoglobin H	HbH
γ_4	Hemoglobin Bart's	Hb Bart's
HPFH	Hereditary Persistence of fetal Hemoglobin	Hội chứng tồn dư huyết sắc tố bào thai di truyền
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Điện di hemoglobin bằng sắc ký lỏng cao áp
MCS	Multispicies Conserved Sequence	Trình tự bảo tồn đa loài
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Normal	Người bình thường

$-\alpha/\alpha\alpha$	Silent Carrier	Dị hợp tử α^+ -thal, người mang gen α^+ -thalassemia
$--/\alpha\alpha$	α^0 -thalassemia (Cis) - (α -thalassemia trait)	Dị hợp tử α^0 -thal, người mang gen α^0 -thalassemia
$-\alpha/-\alpha$	α^0 -thalassemia (Trans) - (α -thalassemia trait)	Đồng hợp tử α^+ -thal, người mang gen α^0 -thalassemia
$--/-\alpha$	HbH deletional type	Bệnh HbH thể mất đoạn
$--/\alpha^T\alpha$	HbH non deletional type	Bệnh HbH thể không mất đoạn
$--/--$	Hb Bart's	Bệnh Hb Bart's
$-\alpha^{3.7}$	Rightward deletion of 3.7kb	Đột biến mất đoạn 1 gen lệch phải 3.7kb
$-\alpha^{4.2}$	Leftward deletion of 4.2kb	Đột biến mất đoạn 1 gen lệch trái 4.2kb
$--^{SEA}$	South East Asia deletion	Đột biến mất đoạn 2 gen Đông Nam Á
$--^{FIL}$	Filipine deletion	Đột biến mất đoạn 2 gen Filipine
$--^{THAI}$	Thailand deletion	Đột biến mất đoạn 2 gen Thailand
$\alpha 1$	$\alpha 1$ globin gene	Gen $\alpha 1$ globin
$\alpha 2$	$\alpha 2$ globin gene	Gen $\alpha 2$ globin
$-\alpha 1$	Deletion of $\alpha 1$ gene	Đột biến mất đoạn gen $\alpha 1$
$-\alpha^{HbCs}$	TAA>CAA codon 142 gen $\alpha 2$	Hemoglobin Constant Spring
$-\alpha^{HbQs}$	CTG>CCG codon 125 gen $\alpha 2$	Hemoglobin Quong Sze
$-\alpha^{c.2delT}$	ATG>A-G codon ATG gen $\alpha 2$	
$-\alpha^{c.92 G>A}$	AGG>AAG codon 31 gen $\alpha 2$	
$-\alpha^{c.426 A>T}$	TAA>TAT codon TAA gen $\alpha 2$ ($-\alpha^{c.426 A>T}$)	Hemoglobin Parkse
$-\alpha^{c.81G>T}$	GAG>GAT codon 27 gen $\alpha 1$ ($-\alpha^{c.81G>T}$)	Hemoglobin Hekinan
α/β	α and β thalassemia carrier	Người mang gen α và β thalassemia
α/β^E	α and HbE carrier	Người mang gen α và HbE

RBC ($10^{12}/L$)	Red Blood Cells	Số lượng hồng cầu
Hb (g/dL)	Hemoglobin	Khối lượng hemoglobin
HCT (%)	Hematocrit	
MCV (fL)	Mean Corpuscular Volume	Thể tích trung bình hồng cầu
MCH (pg)	Mean Corpuscular Hemoglobin	Số lượng hemoglobin trung bình hồng cầu
MCHC (%)	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	Nồng độ hemoglobin trung bình hồng cầu
cffDNA	Cell free fetal DNA	DNA thai tự do trong máu mẹ
NIPD	No invasive Prenatal Diagnosis.	Chẩn đoán trước sinh không xâm lấn.
PGD	Pre-implantation genetic diagnosis	Chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi.
IVF	In vitro fertilization	Thụ tinh ống nghiệm
EQA	External Quality Assessment	Mẫu ngoại kiểm
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới
TIF	Thalassemia International Fondation	Hiệp hội Thalassemia quốc tế
BV Nhi TƯ	National Hospital of Pediatrics	Bệnh Viện Nhi Trung Ương
DT-SHPT	Human Genetics Department	Khoa Di truyền - Sinh Học Phân Tử

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Cấu trúc và các dạng phân tử hemoglobin.....	3
1.1.1. Cấu trúc phân tử Hb ở người bình thường.....	3
1.1.2. Các dạng phân tử hemoglobin	4
1.2. Bệnh α -thalassemia.....	5
1.2.1. Khái niệm.....	5
1.2.2. Dịch tế học bệnh α -thalassemia	5
1.2.3. Gen α globin	6
1.2.4. Cơ chế bệnh sinh của bệnh thalassemia.....	8
1.2.5. Cơ chế bệnh sinh của bệnh α -thalassemia	9
1.2.6. Cơ chế phân tử bệnh α -thalassemia	10
1.3. Đặc điểm lâm sàng bệnh α -thalassemia	13
1.3.1. Người mang gen α^+ -thalassemia	14
1.3.2. Người mang gen α^0 -thalassemia	14
1.3.3. Bệnh HbH	14
1.3.4. Hội chứng phù thai do Hb Bart's	15
1.4. Đặc điểm cận lâm sàng bệnh α -thalassemia	16
1.4.1. Xét nghiệm công thức máu	16
1.4.2. Phân tích thành phần hemoglobin.....	16
1.4.3. Xét nghiệm di truyền phân tử phân tích gen α globin.....	17
1.4.4. Vai trò của phát hiện đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia.....	22
1.5. Chẩn đoán bệnh α thalassemia.....	24
1.5.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh α -thalassemia	24
1.5.2. Chẩn đoán phân biệt bệnh α -thalassemia.....	24
1.6. Giá trị tiên lượng về kiểu hình dựa trên kiểu gen của bệnh HbH....	25
1.7. Sàng lọc người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia.....	27
1.7.1. Sàng lọc người mang gen bệnh.....	27
1.7.2. Chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia.....	28
1.7.3. Chẩn đoán tiền phôi	33
1.8. Tình hình nghiên cứu bệnh α -thalassemia	34

1.8.1. Thế giới	34
1.8.2. Việt Nam	35
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	37
2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	37
2.2. Đối tượng nghiên cứu	37
2.2.1. Nhóm đối tượng cho mục tiêu 1 phát hiện một số đột biến gen α -thalassemia bằng kỹ thuật sinh học phân tử	37
2.2.2. Nhóm đối tượng cho mục tiêu 2 nhận xét biểu hiện lâm sàng và kiểu gen của bệnh nhân HbH.....	37
2.2.3. Nhóm đối tượng cho mục tiêu 3 chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia	37
2.3. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân	38
2.3.1. Tiêu chuẩn chọn đối tượng cho mục tiêu 1 phát hiện một số đột biến gen α -thalassemia bằng kỹ thuật sinh học phân tử.....	38
2.3.2. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng cho mục tiêu 2 nhận xét biểu hiện lâm sàng và kiểu gen của bệnh nhân HbH.....	38
2.3.3. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng cho mục tiêu 3 chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia	38
2.3.4. Tiêu chuẩn loại trừ	39
2.4. Thiết kế nghiên cứu.....	39
2.4.1. Mục tiêu 1	39
2.4.2. Mục tiêu 2	40
2.4.3. Mục tiêu 3	40
2.5. Cỡ mẫu	41
2.6. Mẫu bệnh phẩm.....	41
2.7. Nội dung nghiên cứu.....	42
2.7.1. Đặc điểm lâm sàng và huyết học của các bệnh nhân HbH.....	42
2.7.2. Quy trình phát hiện đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia.....	42
2.7.3. Nuôi cấy tế bào ồi	55
2.7.4. Phân tích gen α thalassemia, xác định kiểu gen của thai nhi....	55
2.8. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu	56
2.9. Sơ đồ nghiên cứu.....	56

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	57
3.1. Kết quả phát hiện đột biến gen α globin của người mắc α -thalassemia bằng kỹ thuật PCR, MLPA và giải trình tự gen Sanger	57
3.1.1. Xác định các đột biến mất đoạn thường gặp trên bệnh nhân HbH bằng kỹ thuật GAP-PCR.....	57
3.1.2. Kết quả xác định các đột biến điểm thường gặp trên bệnh nhân HbH bằng kỹ thuật ARMS-PCR.....	58
3.1.3. Đối chiếu kết quả phân tích gen α globin của kỹ thuật PCR với kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen Sanger.....	58
3.1.4. Kết quả xác định đột biến mất đoạn hiếm gặp trên bệnh nhân HbH đoạn bằng kỹ thuật MLPA.....	60
3.1.5. Kết quả xác định đột biến điểm hiếm gặp trên bệnh nhân HbH bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger.....	61
3.1.6. Kết quả xác định đột biến gen α globin của bệnh nhân mắc Hb Bart's còn sống sau sinh bằng kỹ thuật PCR, MLPA.....	64
3.1.7. Tổng hợp kết quả đột biến gen α globin của người mắc α -thalassemia	65
3.2. Mối liên hệ giữa đặc điểm lâm sàng và kiểu gen của bệnh HbH	67
3.2.1. Đặc điểm chung của bệnh HbH	67
3.2.2. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh HbH	70
3.2.3. Một số đặc điểm huyết học của bệnh nhân HbH	73
3.2.4. Tổng hợp một số mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng, đặc điểm huyết học và kiểu gen của bệnh HbH.....	85
3.3. Chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia	87
3.3.1. Sàng lọc và chẩn đoán xác định người mang gen bệnh α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có thai bị phù.....	87
3.3.2. Kết quả xác định người mang gen α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc bệnh HbH	94
3.3.3. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia	95
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	98
4.1. Về đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia phát hiện bằng kỹ thuật PCR, MLPA và giải trình tự gen	98

4.1.1. Ứng dụng kỹ thuật PCR, MLPA, giải trình tự gen Sanger xác định đột biến gen α globin.....	98
4.1.2. Về đột biến gen α globin trên người nghi ngờ mắc α -thalassemia	102
4.1.3. Về tỷ lệ các đột biến gen α globin trên bệnh nhân HbH	103
4.1.4. Ý nghĩa phát hiện đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia bằng kỹ thuật PCR, MLPA, giải trình tự gen	114
4.2. Về mối quan hệ kiểu gen, đặc điểm lâm sàng và huyết học của bệnh HbH	115
4.2.1. Đặc điểm chung của bệnh HbH	115
4.2.2. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân HbH	117
4.2.3. Về một số đặc điểm huyết học của bệnh nhân HbH.....	121
4.2.4. Mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh HbH	129
4.2.5. Mối liên quan giữa biểu hiện lâm sàng và kiểu gen của bệnh nhân mắc Hb Bart's còn sống sau sinh.....	134
4.3. Về chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia	137
4.3.1. Quy trình sàng lọc người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia	137
4.3.2. Ý nghĩa việc xác định người mang gen bệnh trên các cặp vợ chồng có thai bị phù.....	138
4.3.3. Về xác định người mang gen α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc bệnh HbH, có thai lần tiếp theo	146
4.3.4. Về chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia	148
4.3.5. Đối chiếu kết quả chẩn đoán trước sinh.....	149
KẾT LUẬN	151
KIẾN NGHỊ	153
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các loại allele đột biến của bệnh α -thalassemia	11
Bảng 1.2.	Các kiểu gen và kiểu hình của bệnh α -thalassemia	13
Bảng 2.1.	Trình tự môi và kích thước của 5 đột biến thường gặp	43
Bảng 2.2.	Các thông số của phản ứng GAP-PCR của 5 đột biến thường gặp .	44
Bảng 2.3.	Trình tự môi và kích thước của 2 đột biến hiếm thường gặp	46
Bảng 2.4.	Các thông số của phản ứng ARMS-PCR	47
Bảng 2.5.	Trình tự môi của kỹ thuật giải trình tự gen HbA1 và HbA2	49
Bảng 2.6.	Các thông số phản ứng PCR của kỹ thuật giải trình tự gen	49
Bảng 2.7.	Các thông số của phản ứng PCR môi đơn.....	51
Bảng 3.1.	Các đột biến hiếm gặp gen α globin.....	63
Bảng 3.2.	Đột biến gen α globin của người nghi ngờ mắc α -thalassemia	65
Bảng 3.3.	Tỷ lệ allele đột biến của bệnh nhân HbH	66
Bảng 3.4.	Tuổi vào viện trung bình của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh	67
Bảng 3.5.	Phân nhóm tuổi của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh	68
Bảng 3.6.	Tỷ lệ về giới của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh	68
Bảng 3.7.	Phân bố bệnh nhân HbH theo địa phương cư trú	69
Bảng 3.8.	Đặc điểm truyền máu của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh .	70
Bảng 3.9.	Số lần truyền máu trung bình/năm của bệnh nhân HbH	70
Bảng 3.10.	Phân loại mức độ thiếu máu của bệnh nhân HbH	71
Bảng 3.11.	Phân loại thiếu máu của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh	71
Bảng 3.12.	Mức độ gan lách to của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh.....	72
Bảng 3.13.	Bộ mặt thalassemia của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh	72
Bảng 3.14.	Hemoglobin trung bình ở từng nhóm tuổi theo nhóm bệnh.....	73
Bảng 3.15.	Hb trung bình của bệnh nhân HbH so với người bình thường..	73
Bảng 3.16.	HCT trung bình của bệnh nhân HbH so với người bình thường	74
Bảng 3.17.	HCT trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH ..	75
Bảng 3.18.	RBC trung bình của bệnh nhân HbH so với người bình thường ...	76
Bảng 3.19.	RBC trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH ..	76
Bảng 3.20.	MCV trung bình của bệnh nhân HbH so với người bình thường ..	77
Bảng 3.21.	MCV trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH	78

Bảng 3.22.	Sự phân nhóm chỉ số MCV của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh..	78
Bảng 3.23.	MCH trung bình ở từng nhóm tuổi so với người bình thường..	79
Bảng 3.24.	MCH trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH80	
Bảng 3.25.	Phân nhóm MCH của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh	80
Bảng 3.26.	MCHC trung bình ở từng nhóm tuổi so với người bình thường	81
Bảng 3.27.	MCHC trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH ...	82
Bảng 3.28.	Phân nhóm MCHC của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh	82
Bảng 3.29.	Tổng hợp thành phần hemoglobin trên bệnh nhân HbH	83
Bảng 3.30.	Tổng hợp thành phần hemoglobin theo nhóm bệnh.....	83
Bảng 3.31.	Một số đặc điểm lâm sàng và huyết học của từng nhóm bệnh HbH...	85
Bảng 3.32.	Một số biểu hiện lâm sàng và huyết học của từng loại đột biến gây bệnh HbH.....	86
Bảng 3.33.	Kết quả sàng lọc và chẩn đoán xác định người mang gen α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có thai bị phù	87
Bảng 3.34.	Đặc điểm huyết học của người mang gen α^0 -thalassemia	88
Bảng 3.35.	Đặc điểm về chỉ số MCV ở người mang gen α^0 -thalassemia ...	89
Bảng 3.36.	Đặc điểm về chỉ số MCH ở người mang gen α^0 -thalassemia ...	89
Bảng 3.37.	Phân tích thành phần Hemoglobin ở người mang gen α^0 -thalassemia..	90
Bảng 3.38.	Tỷ lệ người mang gen α^0 -thalassemia theo địa phương.....	91
Bảng 3.39.	Tình trạng thai hiện tại và tiền sử phù thai của sản phụ	92
Bảng 3.40.	Đặc điểm về tuổi của gia đình mang gen α^0 -thalassemia.....	93
Bảng 3.41.	Kiểu gen của gia đình có con HbH chẩn đoán trước sinh	94
Bảng 3.42.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh Hb Bart's.....	95
Bảng 3.43.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh HbH.....	95
Bảng 3.44.	Tổng hợp kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia	96
Bảng 4.1.	So sánh tỷ lệ HbH mất đoạn và không mất đoạn ở các quần thể...	103
Bảng 4.2.	Đột biến tại codon mở đầu gen α globin gây bệnh α -thalassemia.....	110
Bảng 4.3.	So sánh tỷ lệ kiểu gen của bệnh nhân HbH	113
Bảng 4.4.	So sánh mức độ gan lách to trên bệnh nhân HbH	120
Bảng 4.5.	So sánh thành phần hemoglobin trên bệnh nhân HbH	127
Bảng 4.6.	Thành phần thành phần hemoglobin ở từng nhóm của bệnh HbH	129
Bảng 4.7.	Các dạng hemoglobin qua các giai đoạn phát triển	135
Bảng 4.8.	So sánh tuổi thai mắc Hb Bart's tại thời điểm chẩn đoán	140

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1.	Tỷ lệ các loại kiểu gen của 97 bệnh nhân HbH	66
Biểu đồ 3.2.	Tỷ lệ bệnh nhân ở từng nhóm bệnh HbH.....	67
Biểu đồ 3.3.	Phân bố bệnh nhân mắc HbH theo dân tộc	69
Biểu đồ 3.4.	Phân bố về Hematocrit (%) trên bệnh nhân HbH	74
Biểu đồ 3.5.	Phân bố RBC ($\times 10^{12}/L$) của bệnh nhân HbH.....	75
Biểu đồ 3.6.	Phân bố về MCV (fL) của bệnh nhân HbH	77
Biểu đồ 3.7.	Phân bố về MCH (pg) của bệnh nhân HbH	79
Biểu đồ 3.8.	Phân bố MCHC (%) của bệnh nhân HbH.....	81
Biểu đồ 3.9.	Tỷ lệ HbA2 trong thành phần hemoglobin của bệnh HbH...	84
Biểu đồ 3.10.	Đặc điểm HbA2 của người mang gen α^0 -thalassemia.....	90
Biểu đồ 3.11.	Tỷ lệ người mang gen α^0 -thalassemia theo dân tộc.....	92
Biểu đồ 3.12.	Tuần thai của các sản phụ mang gen α^0 -thalassemia	93

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Sơ đồ cấu tạo phân tử Hb.....	3
Hình 1.2.	Tế bào hồng cầu vận chuyển oxy	4
Hình 1.3.	Nhóm gen globin α và β và sự tổng hợp globin, hemoglobin ở các giai đoạn phát triển	7
Hình 1.4.	Cấu trúc gen α globin.....	7
Hình 1.5.	Thành phần chuỗi α và β globin trong phân tử hemoglobin	8
Hình 1.6.	Dạng mất đoạn một gen α globin tạo allen α^+ -thalassemia	11
Hình 1.7.	Các loại mất đoạn hai gen α globin tạo allen α^0 -thalassemia	12
Hình 1.8.	Người mang gen α^+ -thalassemia.....	14
Hình 1.9.	Người mang gen α^0 -thalassemia (a) Cis; (b) Trans	14
Hình 1.10.	Bệnh HbH (a) Thở mất đoạn (b) Thở không mất đoạn.....	14
Hình 1.11.	Hội chứng phù thai do Hb Bart's.....	15
Hình 1.12.	Hội chứng phù thai do hemoglobin Bart's	16
Hình 1.13.	Nguyên lý của kỹ thuật ARMS-PCR.....	18
Hình 1.14.	Nguyên lý của kỹ thuật GAP-PCR.....	19
Hình 1.15.	Nguyên lý của kỹ thuật giải trình tự gen Sanger	20
Hình 1.16.	Nguyên lý của kỹ thuật MLPA.....	21
Hình 1.17.	Nguyên lý của kỹ thuật StripAssay	22
Hình 1.18.	Các thủ thuật lấy bệnh phẩm trong chẩn đoán trước sinh	31
Hình 1.19.	(A) DNA thai tự do trong máu mẹ. (B) Nguyên lý chẩn đoán tiền phôi... ..	34
Hình 2.1.	Sơ đồ phân tích gen α globin bằng kỹ thuật sinh học phân tử ...	39
Hình 2.2.	Cặp môi cho đột biến 5 đột biến mất đoạn thường gặp trên gen α globin.....	42
Hình 2.3.	Hình ảnh điện di GAP-PCR phân tích đột biến gen α globin.....	45
Hình 2.4.	Hình ảnh điện di ARMS - PCR phân tích đột biến gen α globin	48

Hình 2.5.	Giải trình tự gen α globin phát hiện đột biến điểm c.2delT (p.Met1Argfs)	51
Hình 2.6.	Sơ đồ vị trí các probe trên vùng gen HBA của Kit MLPA P140.....	53
Hình 2.7.	Hình ảnh MLPA phân tích đột biến gen α globin	54
Hình 2.8.	Sơ đồ nghiên cứu	56
Hình 3.1.	Điện di sản phẩm GAP-PCR của các bệnh nhân HbH.....	57
Hình 3.2.	Điện di sản phẩm ARMS-PCR của đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ và $-\alpha^{\text{HbQs}}$ trên gen α globin của các bệnh nhân HbH.....	58
Hình 3.3.	Kết quả MLPA cho: (A) Người bình thường, (B) Kiểu gen ($--^{\text{SEA}}/\alpha\alpha$), (C) Kiểu gen ($--^{\text{SEA}}/\alpha^{3.7}$), (D) Kiểu gen ($--^{\text{SEA}}/\alpha^{4.2}$) của bệnh α -thalassemia.....	59
Hình 3.4.	Đột biến Hb Constant Spring (HbCs) c.424T>C (p.Tyr142Gln)....	59
Hình 3.5.	Đột biến Hb Quang Sze (HbQs) c.374T>C (p.Leu125Pro)	60
Hình 3.6.	Kết quả MLPA của gia đình bệnh nhân mang đột biến $--^{\text{SEA}}/\alpha 1$..	60
Hình 3.7.	Điện di sản phẩm PCR gen $\alpha 1$ và gen $\alpha 2$	61
Hình 3.8.	Đột biến điểm c.2delT (p.Met1Argfs)	61
Hình 3.9.	Đột biến điểm c.81G>T (p.Glu27Asp) - Hb Hekinan	62
Hình 3.10.	Đột biến điểm c.92G>A (p.Arg31Lys).....	62
Hình 3.11.	Đột biến điểm c.426 A>T (p.Term142Tyr) - Hb Parkse.....	63
Hình 3.12.	(A) GAP-PCR, (B) ARMS-PCR sàng lọc 7 đột biến trên gen α globin	64
Hình 3.13.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR cho kỹ thuật giải trình tự gen $\alpha 1, \alpha 2$.	64
Hình 3.14.	Kết quả MLPA của bệnh nhân 4 tuổi mắc Hb Bart's.....	65
Hình 3.15.	Chẩn đoán trước sinh bệnh HbH và Hb Bart's.....	96
Hình 3.16.	Máu cuống rốn thu thập từ thai bị phù mắc Hb Bart's.....	97
Hình 4.1.	Phả hệ của gia đình có con mắc Hb Bart's còn sống sau sinh..	135

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh α -thalassemia là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, đặc trưng bởi sự suy giảm hoặc thiếu hụt tổng hợp chuỗi α globin trong phân tử Hemoglobin. Bệnh thuộc nhóm bệnh di truyền phổ biến nhất, là nguyên nhân gây thiếu máu tan máu hàng đầu ở trẻ em [1].

Bệnh α -thalassemia xuất hiện ở tất cả các chủng tộc trên thế giới, rất phổ biến ở các nước Đông Nam Á. Hiện có khoảng 5% dân số thế giới là người mang gen bệnh α -thalassemia, bao gồm dạng α^+ -thalassemia, α^0 -thalassemia, phân bố khác nhau ở từng khu vực, quốc gia, chủng tộc khác nhau [1]. Tại Trung Quốc, người mang gen α -thalassemia chiếm 5-15% dân số [2], Hong Kong 4% [3], Thailand 15-30% [4], Lào 43% [5], Việt Nam 5% [6].

Người bình thường có hai gen α globin nằm trên mỗi NST 16, và có tổng số bốn gen α globin trên hai NST 16 tương đồng ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Tùy theo số lượng gen α bị đột biến, và tùy theo sự kết hợp đa dạng giữa các dạng allele đột biến khác nhau của bệnh α -thalassemia, gây ra các biểu hiện lâm sàng ở nhiều mức độ khác nhau. Bệnh Hemoglobin H (HbH) là thể trung gian của α -thalassemia, trong đó ba trên bốn gen α globin bị đột biến [7].

Trẻ mắc bệnh HbH thường có thiếu máu tan máu, có thể phải phụ thuộc truyền máu, gây hậu quả nghiêm trọng cho hàng loạt các cơ quan trong cơ thể. Nếu không được điều trị, trẻ mắc HbH thể nặng thường tử vong sớm, hoặc muộn hơn vì các biến chứng của bệnh.

Hội chứng phù thai do Hb Bart's là thể nặng nhất của bệnh α -thalassemia, do đột biến mất hoàn toàn bốn gen α globin, gây thiếu máu nặng, dẫn đến suy tim, tràn dịch đa màng, phù toàn thân, thường chết lưu trong khoảng từ 28-40 tuần, hoặc tử vong ngay trong vài giờ đầu sau khi sinh. Ngoài ra, hội chứng phù thai do Hb Bart's còn làm tăng nguy cơ nhiễm độc thai nghén và tiền sản giật cũng như các biến chứng sản khoa khác cho sản phụ.

Tại Việt Nam, từ năm 1985, bệnh α -thalassemia mới bắt đầu được quan tâm nghiên cứu [8]. Từ năm 2008 đến 2010, kỹ thuật phân tích kiểu đột biến gen bệnh α -thalassemia mới bắt đầu được tiến hành tại Việt Nam [9, 10].

Việc nghiên cứu một cách sâu rộng về đặc điểm gen α globin, xác định các đột biến gây bệnh, mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh α -thalassemia, đóng vai trò quan trọng trong vấn đề tiên lượng mức độ nặng của bệnh và đưa ra các quyết định điều trị, theo dõi phù hợp. Ngoài ra, việc nghiên cứu các đột biến trên gen α globin sẽ bước đầu cung cấp các thông tin về đột biến trên gen α globin của người Việt Nam.

Đặc biệt, phân tích kiểu gen là cơ sở thiết yếu cho thực hành tư vấn tiên hôn nhân, tư vấn di truyền cho các cặp vợ chồng là người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia. Đây được xem là biện pháp hiệu quả và cần thiết để phòng bệnh.

Xuất phát từ các lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: ***“Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, kiểu gen của người mắc bệnh HbH và chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia”*** với các mục tiêu sau đây:

- 1. Phát hiện một số đột biến trên gen α globin của bệnh nhân α -thalassemia bằng các kỹ thuật PCR, MLPA và giải trình tự gen Sanger.*
- 2. Nhận xét biểu hiện lâm sàng và kiểu gen của bệnh nhân mắc HbH.*
- 3. Chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia bằng kỹ thuật sinh học phân tử từ tế bào ói.*

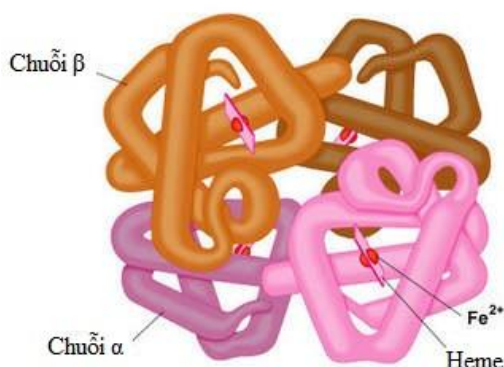
CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Cấu trúc và các dạng phân tử hemoglobin

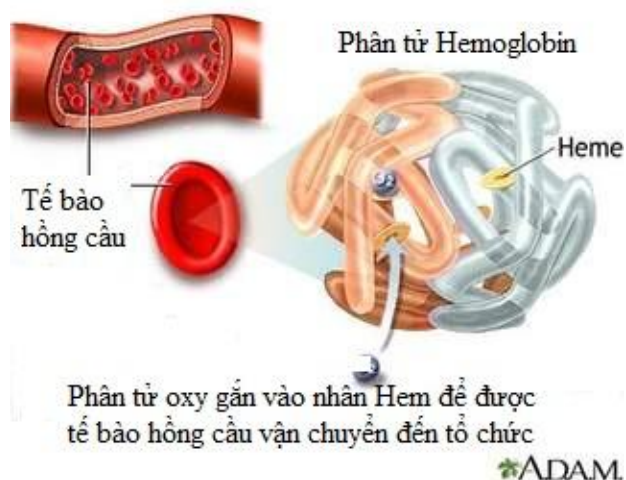
1.1.1. Cấu trúc phân tử Hb ở người bình thường

Phân tử hemoglobin (Hb) ở người là một phân tử protein được cấu tạo từ hai cặp chuỗi dimer polypeptide, α và β globin, tạo thành cấu trúc tetramere. Phân tử $\alpha_2\beta_2$ là cấu trúc của phân tử Hb ở người trưởng thành. Chức năng chính của phân tử này là vận chuyển oxygen (O_2) từ phổi đến các tổ chức, và vận chuyển carbon dioxide (CO_2), carbon monoxide (CO), nitric oxide (NO) theo chiều ngược lại. Cấu trúc phân tử Hb gồm hai phần: phần globin và phần HEM [11].



Hình 1.1. Sơ đồ cấu tạo phân tử Hb

Phần HEM là phần tạo nên màu đỏ của chất Hb, có cấu trúc chung cho nhiều loài. Phần này là một vòng protoporphyrin và một nguyên tử sắt hóa trị II nằm ở trung tâm (Hình 1.1). Ở người những rối loạn bệnh lý trong phần HEM ít xảy ra hơn hẳn so với những rối loạn bệnh lý trong phần globin [11]. Phần globin có bản chất là protein. Phần này đặc hiệu cho từng loài. Ở người, phần globin được cấu tạo bởi 4 chuỗi polypeptide giống nhau từng đôi một, gắn với nhau. Mỗi chuỗi polypeptide gắn với 1 HEM. Do đó, mỗi phân tử Hb có 2 đôi chuỗi polypeptide và 4 HEM, có khả năng vận chuyển 4 phân tử oxy [11].



Hình 1.2. Tế bào hồng cầu vận chuyển oxy

1.1.2. Các dạng phân tử hemoglobin

Trong quá trình phát triển cá thể ở người, các loại chuỗi polypeptide có sự chuyển đổi, loại chuỗi này thay thế chuỗi kia ở từng giai đoạn của cuộc sống. Phân tích cấu trúc của các loại Hb khác nhau ở người, các tác giả chia chuỗi polypeptide thành các loại như sau: Chuỗi alpha (α), chuỗi beta (β), chuỗi gamma (γ), chuỗi delta (δ), chuỗi epsilon (ϵ), chuỗi zeta (ζ) [12].

Bình thường mỗi phân tử Hb có 2 cặp chuỗi polypeptide ở phần globin. Các loại Hb khác nhau có các thành phần chuỗi polypeptide khác nhau. Trong hồng cầu của người bình thường trưởng thành, HbA ($\alpha_2\beta_2$) chiếm khoảng 97% trong tổng số Hb của cơ thể, HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) chiếm ~2% và HbF - hemoglobin bào thai ($\alpha_2\gamma_2$) chiếm ~ 1% [12].

2 gen ζ và ϵ chỉ biểu hiện trong giai đoạn sớm của phôi, sau đó giảm dần và thay bằng sự biểu hiện của 2 gen α và 2 gen γ , hình thành nên Hb Gower1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower2 ($\alpha_2\epsilon_2$) và Porland ($\zeta_2\gamma_2$). 2 gen α và γ dần dần biểu hiện tạo thành HbF ($\alpha_2\gamma_2$), là loại Hb chiếm ưu thế ở 3 tháng giữa của thai kỳ và có ái lực với oxy tăng nhẹ so với Hb ở người trưởng thành. Tại thời điểm sinh, gen α globin đã đạt đến mức độ hoạt động đầy đủ, gen γ giảm hoạt động, nhóm gen β (δ và β) dần dần tăng hoạt động. Do đó ở người bình thường, khi

được 1 tuổi, loại Hb chiếm ưu thế là Hb của người trưởng thành HbA và HbA₂. Tuy nhiên trong một vài trường hợp, gen γ globin vẫn tiếp tục được biểu hiện trong tế bào hồng cầu trưởng thành, gây hội chứng tồn dư huyết sắc tố bào thai có tính chất di truyền (HPFH) [12].

1.2. Bệnh α -thalassemia

1.2.1. Khái niệm

Bệnh α -thalassemia là bệnh thiếu máu tan máu di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, do giảm hoặc mất hẳn sự tổng hợp của chuỗi α globin trong phân tử Hb. Sự suy giảm tổng hợp này dẫn đến sự tăng tổng hợp quá mức của chuỗi β globin tạo phân tử γ_4 , gọi là Hb Bart's (trong thời kỳ bào thai), và β_4 , gọi là HbH (trong thời kỳ trưởng thành) [13].

1.2.2. Dịch tễ học bệnh α -thalassemia

Bệnh α -thalassemia gặp phổ biến ở tất cả các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Ở một số vùng, người mang gen α -thalassemia có thể chiếm 80-90% dân số [14]. Dịch tễ của bệnh α -thalassemia liên quan đến các khu vực lưu hành bệnh sốt rét, tuy nhiên cơ chế về vấn đề này vẫn chưa được làm sáng tỏ [15].

Trong tất cả các bệnh về rối loạn gen globin, bệnh α -thalassemia là bệnh có sự phân bố rộng rãi nhất. Với sự kết hợp giữa các dạng allel đột biến khác nhau của bệnh α -thalassemia, cũng như giữa bệnh α và β thalassemia, đã tạo ra nhiều kiểu hình phong phú của bệnh. Bệnh HbH, là α -thalassemia thể trung gian được tìm thấy chủ yếu ở Đông Nam Á, Trung Đông và Địa Trung Hải.

Hiện nay, có khoảng 5% dân số thế giới là người mang gen bệnh α -thalassemia, phân bố khác nhau ở từng quốc gia, chủng tộc [1]. Trung Quốc, người mang gen α -thalassemia chiếm 5-15% dân số [2], Hong Kong 4% [3], Thailand 15-30% [4], Lào 43% [5], Việt Nam 5% [6].

Thalassemia là một vấn đề toàn cầu. Trong khoảng 20 năm tới, ước tính sẽ có khoảng 900,000 trẻ sinh ra mắc bệnh thalassemia, trong đó 95% số trẻ này thuộc về các nước Châu Á, Ấn Độ, và Trung Đông. Ngày nay, dịch tễ học của bệnh thalassemia đã thay đổi một cách đáng kể so với trước đây. Thalassemia hiện nay là nhóm bệnh không thuần nhất với sự khác nhau về tính chủng tộc, kiểu hình, kiểu gen, và cách thức điều trị [16, 17].

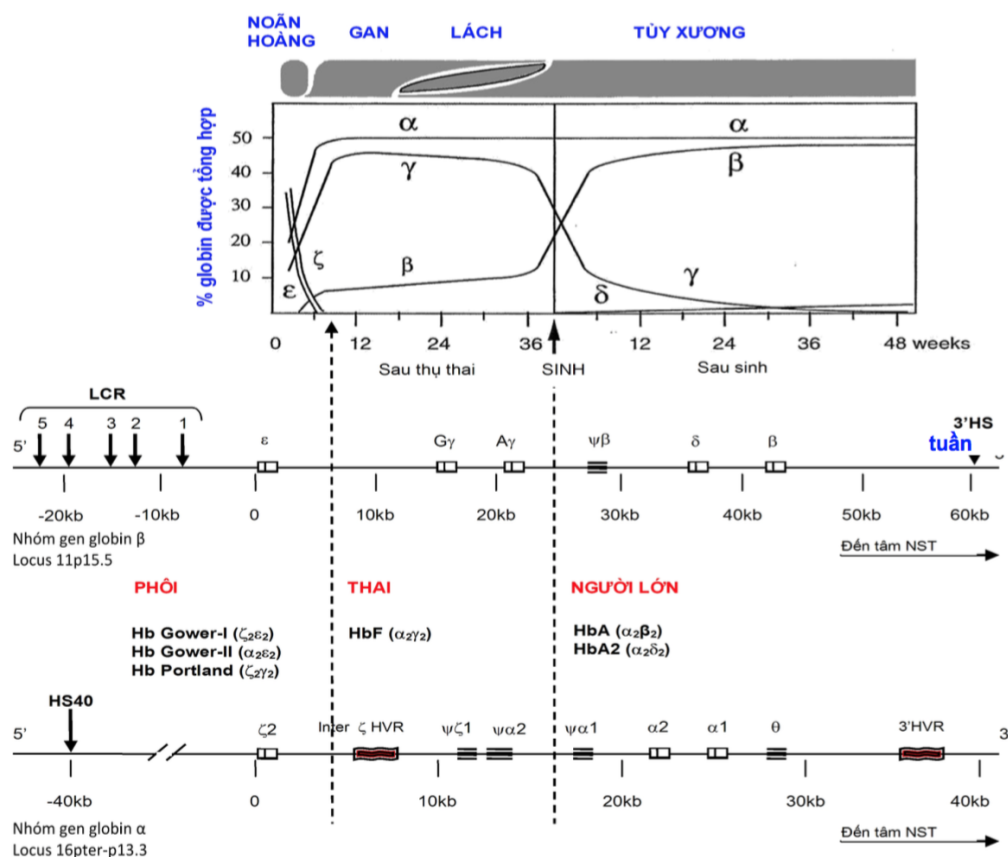
1.2.3. Gen α globin

1.2.3.1. Cụm gen α globin

Cụm gen α globin bao gồm các gen chức năng là hai gen α (α_2 , α_1) và một gen phôi (ζ_2), 3 giả gen ($\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$), và 1 gen chưa xác định được chức năng (θ_1). Các gen này sắp xếp theo trình tự từ đầu 5' đến đầu 3' như sau: 5' - ζ_2 - $\psi\zeta_1$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ_1 - 3' [18].

Cụm gen bình thường được ký hiệu là $\alpha\alpha$, có chiều dài khoảng 25-65 kb. Phía đầu nguồn của cụm gen có 4 trình tự không mã hóa có tính bảo tồn cao, hay còn gọi là trình tự bảo tồn đa loài (Multispicies conserved sequence - MCS), gọi là MCS-R1 đến -R4, là những trình tự tham gia vào quá trình điều hòa gen α globin. Cho đến nay, chỉ có MCS-R2, hay còn được biết đến với tên gọi HS-40 là được chứng minh rằng có vai trò quan trọng cho sự biểu hiện của gen α globin [19].

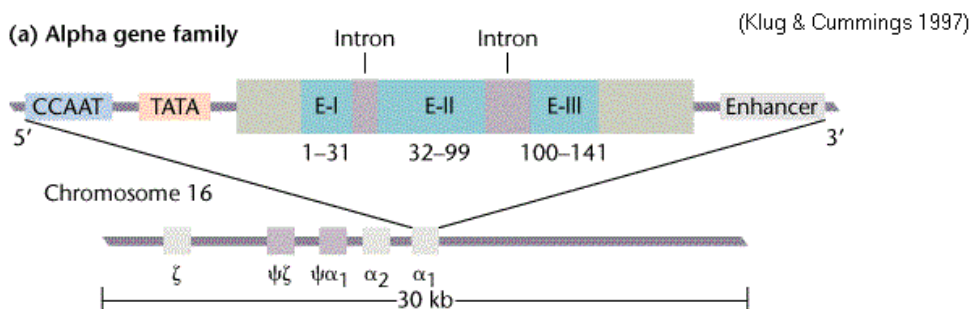
HS-40 là một đoạn trình tự DNA có chiều dài khoảng 40kb nằm ở đầu nguồn của cụm gen α globin, là một vùng DNA có tính nhạy cảm cao và là vị trí gắn với các yếu tố trong quá trình sao mã. Sự toàn vẹn của vùng HS-40 là yếu tố cần thiết cho sự biểu hiện của gen α globin, nhiều bằng chứng đầy đủ đã chỉ ra rằng mất đoạn vùng HS-40 làm mất hoàn toàn khả năng biểu hiện của cụm gen α globin phía hạ nguồn, và có biểu hiện như một người mang gen α -thalassemia [19].



Hình 1.3. Nhóm gen globin α và β và sự tổng hợp hemoglobin ở các giai đoạn phát triển [20, 21]

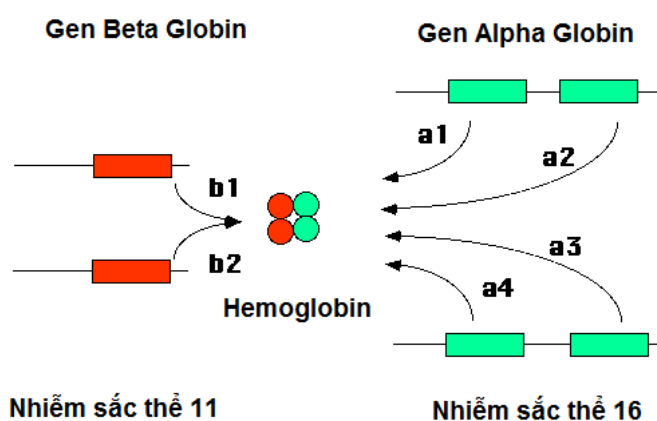
1.2.3.2. Gen α globin

Có 2 gen α globin, $\alpha 1$ và $\alpha 2$, với tổng chiều dài khoảng từ 1 đến 2kb. Mỗi gen gồm 3 exon (vùng mã hóa protein), và 2 introns - IVS (vùng không mã hóa) [15]. Gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$ có chiều dài 850bp, cùng mã hóa cho chuỗi α globin gồm 141 acid amin, là thành phần cấu tạo nên phân tử Hb của cơ thể.



Hình 1.4. Cấu trúc gen α globin

Như vậy, mỗi người bình thường có 2 NST số 16 thì sẽ có tổng số 4 gen α globin mang chức năng. Về tổng số, sản phẩm chuỗi α globin được sản xuất từ 4 gen α globin này tương đương với sản phẩm chuỗi β globin được sản xuất từ 2 gen β globin nằm trên NST số 11, tạo ra phân tử Hb có 4 chuỗi globin, trong đó có 2 chuỗi α -like (α - hoặc ζ -) và 2 chuỗi β -like (β -, γ -, δ -, ϵ -)



Hình 1.5. Thành phần chuỗi α và β globin trong phân tử hemoglobin

1.2.4. Cơ chế bệnh sinh của bệnh thalassemia

Trong hội chứng Thalassemia, có sự thiếu hụt ở các mức độ khác nhau của một loại chuỗi polypeptid trong thành phần globin, dẫn đến dư thừa tương đối loại chuỗi còn lại, gây ra hậu quả là hai quá trình sau [22]:

- Giảm tổng hợp Hb do thiếu phần globin.
- Mất cân bằng giữa các chuỗi globin.

1.2.4.1. Giảm tổng hợp Hb

Hiện tượng này là hậu quả thứ nhất của việc thiếu một loại chuỗi polypeptid nào đó, dẫn đến giảm tổng hợp globin, do đó làm giảm tổng hợp Hb. Biểu hiện thành hồng cầu nhỏ nhược sắc và tăng sinh các hồng cầu non trong tuỷ. Ở người dị hợp tử của bệnh α và β thalassemia, máu ngoại vi thường không có sự khác biệt: đều có hồng cầu nhỏ nhược sắc và thiếu máu nhẹ, tăng sinh hồng cầu non trong tuỷ thường nhẹ, ít có ý nghĩa lâm sàng [12].

1.2.4.2. Mất cân bằng giữa các chuỗi globin

Hiện tượng này là hậu quả thứ hai của việc thiếu hụt một loại chuỗi polypeptid nào đó, gây ra dư thừa tương đối loại chuỗi còn lại. Trong β thalassemia, do thiếu hụt chuỗi β gây ra dư thừa chuỗi α . Trong α thalassemia, do thiếu hụt chuỗi α , gây ra dư thừa các chuỗi γ , β , δ . Do tính chất lý hoá của các chuỗi họ α và họ β khác nhau, nên những rối loạn do các chuỗi dư thừa gây ra cũng khác nhau [22].

Các chuỗi α dư thừa tạo thành các hạt tủa xuống màng hồng cầu và nguyên sinh chất của các hồng cầu trưởng thành và hồng cầu non trong tuỷ, làm màng hồng cầu mất độ mềm dẻo, khó vượt qua các “màng lọc” ở lách. Mặt khác, các hạt tủa này làm màng hồng cầu tăng diện tích tiếp xúc, dễ bị oxy hoá, và bị phá huỷ. Và làm thay đổi tính thấm màng hồng cầu, gây mất kali ở bên trong tế bào ra huyết tương. Tất cả những thay đổi trên làm hồng cầu bị vỡ sớm, gây nên hiện tượng tan máu [11]. Trong tuỷ xương, các hạt tủa gắn lên màng nguyên sinh chất của các hồng cầu non, làm cho các hồng cầu này chết trước khi trưởng thành, gọi là hiện tượng sinh hồng cầu không hiệu quả. Điều này dẫn đến làm tăng sinh hồng cầu non trong tuỷ, gây nên biến dạng xương, tăng hấp thu sắt gây nhiễm sắt cho cơ thể. Gặp phổ biến ở những bệnh nhi mắc β thalassemia thể nặng [11].

1.2.5. Cơ chế bệnh sinh của bệnh α -thalassemia

Bệnh α -thalassemia có sự giảm hoặc thiếu hụt tổng hợp chuỗi α globin và dư thừa chuỗi còn lại. Mức độ thiếu hụt và dư thừa này khác nhau ở từng thể bệnh. Khác với chuỗi α , các chuỗi còn lại là γ , β , δ thay đổi từ chuỗi này thành chuỗi khác trong một số giai đoạn của cuộc sống. Ở thời kỳ bào thai, chủ yếu là chuỗi γ . Sau khi sinh, chuỗi γ giảm, thay thế dần bằng chuỗi β , δ . Vì vậy, với bệnh α -thalassemia, trong thời kỳ bào thai có sự dư thừa chuỗi γ , tạo γ_4 là Hb Bart's. Trong giai đoạn trưởng thành, sự dư thừa chuỗi γ được chuyển thành sự dư thừa của chuỗi β , tạo β_4 là HbH [23].

Hb Bart's và HbH có khả năng vận chuyển oxy kém hơn so với HbA1. Hb Bart's có ái lực cao với oxy, nhưng lại không có hiệu ứng Bohr, do sự tương tác giữa các chuỗi polypeptid γ làm cho khả năng chuyển nhượng điện tích với phần HEM bị mất, khó khăn trong quá trình trao đổi oxy tổ chức. Do đó, các thai nhi mắc bệnh Hb Bart's thường tử vong ngay trong giai đoạn cuối của thai kỳ hoặc ngay sau đẻ, khi nhu cầu về oxy của cơ thể tăng lên [24].

Trong khi đó, HbH chỉ chiếm khoảng 5-40% thành phần Hb, nên bệnh nhi có thể sống đến tuổi trưởng thành. Nhưng HbH (β_4) không bền vững. Các chuỗi β tạo hạt tựa khi bị các tác nhân gây oxy hoá tác động, gọi là hạt tựa muện và có thể hoà tan lại được. Tuy nhiên, trong quá trình sống, các hạt tựa này luôn được tạo ra, gây giảm đời sống hồng cầu và biến đổi ở các cơ quan tạo hồng cầu trong tuỷ [22]. Toàn bộ cơ chế này tác động ở các mức độ khác nhau gây nên bệnh cảnh lâm sàng và huyết học khá đa dạng trong bệnh HbH.

Bệnh HbH tuy có nhiều điểm chung của một bệnh thiếu máu tan máu mức độ vừa và mãn tính, nhưng tính chất tan máu từng đợt xảy ra khá rõ ràng, liên quan đến tình trạng thay đổi sinh lý và các bệnh kèm theo của người bệnh. Trong đó, biểu hiện tan máu ngoại vi rõ rệt hơn so với những biểu hiện rối loạn sinh hồng cầu trong tuỷ, bao gồm hồng cầu nhỏ, nhược sắc, tan máu, hạt tựa ở hồng cầu chứa HbH. Tuy nhiên, biểu hiện lâm sàng của bệnh HbH thường không nặng nề như ở bệnh β thalassemia đồng hợp tử: mức độ tan máu vừa, gan lách to ở mức vừa, biến dạng xương muện, không có nhiễm sắt nặng. Biến đổi đặc hiệu nhất của bệnh là sự xuất hiện HbH và Hb Bart's, giúp chẩn đoán bệnh và chẩn đoán phân biệt các thể bệnh Thalassemia và bệnh Hb bất thường khác [25].

1.2.6. Cơ chế phân tử bệnh α -thalassemia

Bệnh α -thalassemia do đột biến gen α globin gây nên. 90% bệnh α -thalassemia do đột biến mất đoạn trên một gen hoặc cả hai gen α globin, hoặc toàn bộ cả cụm gen α globin bao gồm cả gen ζ globin [13]. Ngoài ra, có 10% không do đột biến mất đoạn gen, mà thường là các đột biến điểm trên gen α

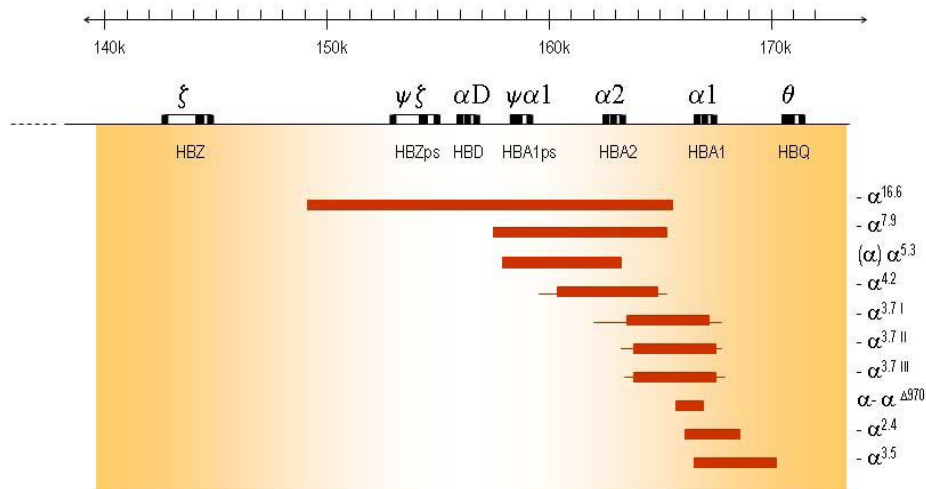
globin gây nên. Các đột biến mất đoạn hoặc không mất đoạn này sẽ tạo ra các allen đột biến dạng α^0 và α^+ -thalassemia [1].

Bảng 1.1. Các loại allen đột biến của bệnh α -thalassemia

Loại allen	Mô tả	Đột biến thường gặp
Allen α^0 -thalassemia (--)	Mất cả 2 gen α trên cùng 1 nhiễm sắc thể dẫn đến không tổng hợp chuỗi α globin	--SEA, --MED, --THAI, --FIL [26, 27]
Allen α^+ -thalassemia (- α) hoặc ($\alpha^T\alpha$)	Mất hoặc bất hoạt 1 gen α trên 1 nhiễm sắc thể dẫn đến giảm tổng hợp chuỗi α globin	- $\alpha^{3.7}$, - $\alpha^{4.2}$, - α^{HbCs} , - α^{HbQs} [13]

1.2.6.1. α^+ -thalassemia do đột biến mất đoạn gây nên

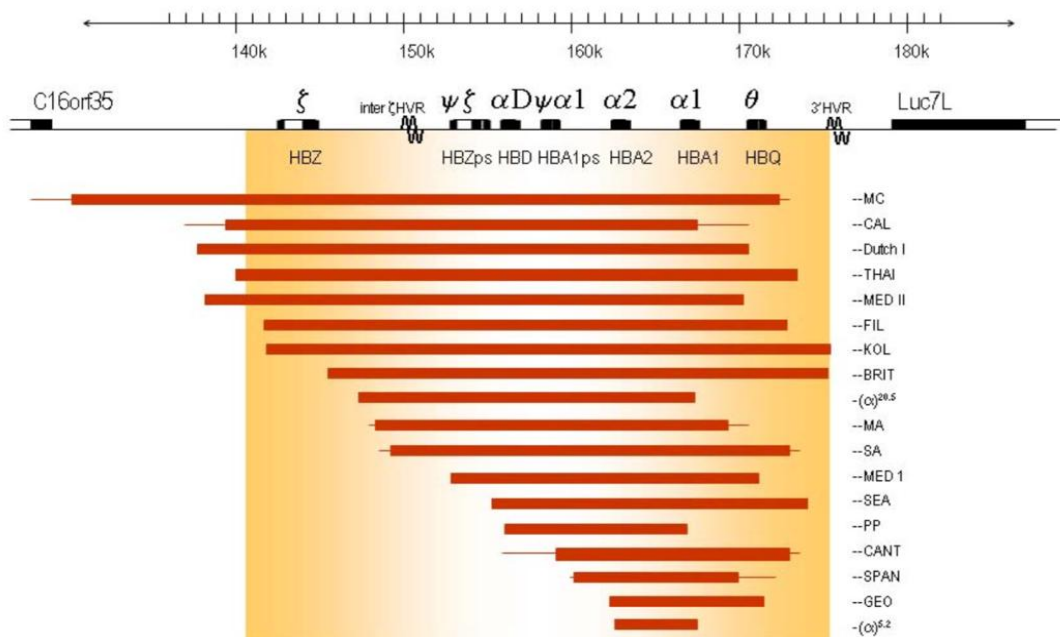
Đây là loại mất đoạn một gen α globin, tạo allen α^+ -thalassemia. Trong đó, đột biến phổ biến nhất là - $\alpha^{4.2}$, - $\alpha^{3.7}$. Đột biến này xảy ra do sự tái tổ hợp giữa phân đoạn Z, có chiều dài 3.7 kb, tạo ra một NST chỉ với một gen α globin (- $\alpha^{3.7}$, mất đoạn lệch về phía bên phải), và sự tái tổ hợp giữa phân đoạn X, có chiều dài 4.2 kb, tạo một NST mang một gen α globin (- $\alpha^{4.2}$, mất đoạn lệch về phía bên trái). Ngoài ra, còn có thể có nhiều loại đột biến mất đoạn 1 gen khác hiếm gặp hơn.



Hình 1.6. Dạng mất đoạn một gen α globin tạo allen α^+ -thalassemia [13]

1.2.6.2. α^0 -thalassemia do đột biến mất đoạn gây nên

Đây là loại đột biến mất đoạn hai gen α globin, tạo nên α^0 -thalassemia. Hiện nay có khoảng 50 loại đột biến mất đoạn cụm gen α globin gây mất toàn bộ hoặc một phần của hai gen α globin, dẫn đến không có sự tổng hợp chuỗi α globin trong cơ thể sống. Đồng hợp tử dạng đột biến này là --/-- gây hội chứng phù thai do Hb Bart's. Dị hợp tử kép cho loại đột biến này và loại mất đoạn một gen là --/- α , gây bệnh HbH.



Hình 1.7. Các loại mất đoạn hai gen α globin tạo nên α^0 -thalassemia [13]

1.2.6.3. α^+ thalassemia do đột biến không mất đoạn gây nên

Ngoài đột biến mất đoạn, bệnh α -thalassemia còn do một số loại đột biến điểm gây nên. Những đột biến này có thể làm thay đổi trình tự chuẩn của gen α globin, gây ảnh hưởng tới quá trình kiểm soát hoạt động và biểu hiện của gen α globin, còn được gọi là đột biến không mất đoạn, ký hiệu là $-\alpha^T$, tạo nên α^+ -thalassemia [20, 28]. Đột biến dạng không mất đoạn gen gây bệnh α -thalassemia lần đầu tiên được mô tả vào năm 1977 [29], đã được chứng minh là hậu quả của một loạt các cơ chế khác nhau. Hầu hết các đột biến này đều xảy ra trên gen $\alpha 2$, và không gây ra sự thay đổi nào với những gen còn lại. Do

gen $\alpha 2$ có vai trò gấp đôi gen $\alpha 1$ trong quá trình sản xuất chuỗi α globin, nên các đột biến trên gen $\alpha 2$ globin thường dẫn đến các hậu quả nghiêm trọng hơn so với cùng đột biến đó nếu nằm trên gen $\alpha 1$ globin [15].

Cơ chế gây bệnh của các đột biến này có thể ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp RNA, hoặc làm ngăn cản quá trình ghép nối RNA từ vị trí 5' bình thường, trong khi lại hoạt hóa quá trình này từ một vị trí mới, làm khởi động quá trình ghép nối mới, tạo ra phân tử mRNA bị lỗi. Hoặc tác động vào vị trí gắn đuôi poly (A), làm ảnh hưởng tới quá trình kết thúc tại đầu 3' [30], [20]. Một vài đột biến không mất đoạn khác xảy ra tại mã mở đầu ATG gây ảnh hưởng tới quá trình dịch mã mRNA, làm giảm mức độ tổng hợp mRNA xuống khoảng từ 30-50% [31], hoặc gây dừng quá trình dịch mã sớm [32]. Một vài đột biến xảy ra tại mã kết thúc TAA [33], tạo chuỗi globin bị kéo dài. Mặc dù những chuỗi globin này có khả năng tạo thành các phân tử Hb, như Hb Constant Spring, nhưng phân tử mRNA bất thường này bị giảm bền vững rõ rệt [34].

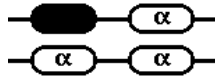
1.3. Đặc điểm lâm sàng bệnh α -thalassemia

Tùy vào sự kết hợp khác nhau giữa hai dạng allele đột biến α^0 và α^+ -thalassemia, sẽ tạo ra các kiểu hình α -thalassemia khác nhau. Bệnh α -thalassemia được chia thành 4 thể tùy theo số lượng gen α globin bị đột biến, với biểu hiện lâm sàng phong phú và khác nhau ở mỗi thể bệnh (Bảng 1.2) [13].

Bảng 1.2. Các kiểu gen và kiểu hình của bệnh α -thalassemia [13]

Kiểu hình	Gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$	Kiểu gen
Bình thường	4 gen hoạt động	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
Người mang gen α^+ -thalassemia	Dị hợp tử α^+ -thal	($-\alpha/\alpha\alpha$)
Người mang gen α^0 -thalassemia (Cis)	Dị hợp tử α^0 -thal	($--/\alpha\alpha$)
Người mang gen α^0 -thalassemia (Trans)	Đồng hợp tử α^+ -thal	($-\alpha/-\alpha$)
HbH thể mất đoạn	Dị hợp tử kép α^0 - α^+ thal	($--/-\alpha$)
HbH thể không mất đoạn	Dị hợp tử kép α^0 - α^+ thal	($--/\alpha^T$)
Hb Bart's	Đồng hợp tử α^0 -thal	($--/--$)

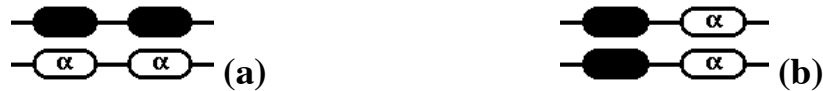
1.3.1. Người mang gen α^+ -thalassemia (Silent Carrier)



Hình 1.8. Người mang gen α^+ -thalassemia

Người mang gen α^+ -thalassemia (dị hợp tử α^+ -thalassemia) là người mất một gen trên một NST ($-\alpha/\alpha\alpha$), không có triệu chứng lâm sàng, không có biểu hiện thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc trên xét nghiệm công thức máu, nên không thể phân biệt với người bình thường nếu chỉ dựa vào các dấu hiệu trên. Phân tích gen α globin mới cho phép chẩn đoán xác định.

1.3.2. Người mang gen α^0 -thalassemia (α -thalassemia trait)



Hình 1.9. Người mang gen α^0 -thalassemia (a) Cis; (b) Trans

Người mang gen α^0 -thalassemia (dị hợp tử α^0 -thalassemia), có 2 thể: Thể Cis là mất đoạn hai gen trên một NST ($--/\alpha\alpha$). Thể Trans là hai mất đoạn một gen trên hai NST tương đồng ($-\alpha/-\alpha$). Đây là α -thalassemia thể nhẹ, thường không có triệu chứng lâm sàng, chỉ được phát hiện qua xét nghiệm công thức máu, có thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc mức độ từ nhẹ đến trung bình. Các dấu hiệu khác liên quan đến tình trạng thiếu máu như xanh xao, mệt mỏi, thở nhanh, ngắn thường rất hiếm gặp, hoặc nếu có thì thường liên quan đến các bệnh lý khác kèm theo.

1.3.3. Bệnh HbH



Hình 1.10. Bệnh HbH (a) Thể mất đoạn (b) Thể không mất đoạn

Bệnh HbH là thể α -thalassemia có triệu chứng (dị hợp tử kép α^0 và α^+), bao gồm một đột biến mất đoạn hai gen và một đột biến mất đoạn một gen.

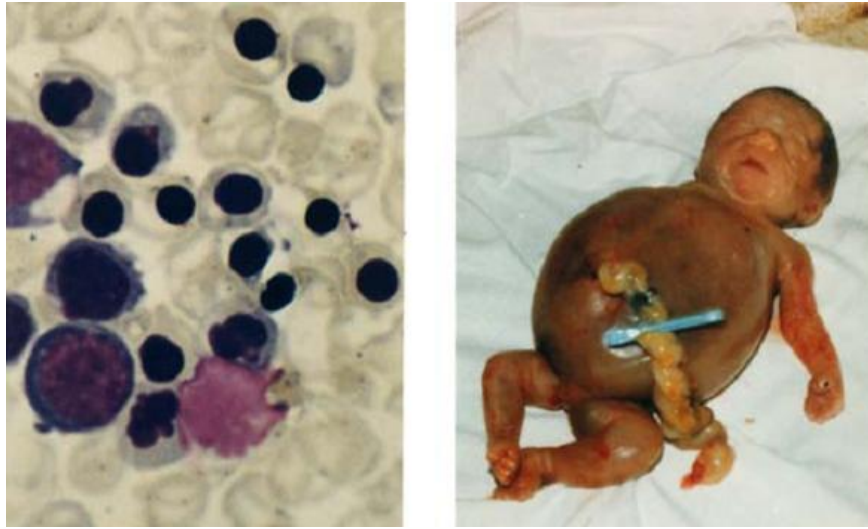
Bệnh HbH có 2 thể: HbH thể mất đoạn ($--/\alpha$) và HbH thể không mất đoạn ($--/\alpha^T$). Ở những bệnh nhân này, chuỗi α globin chỉ được tổng hợp bằng khoảng 30% so với bình thường. Triệu chứng lâm sàng thường gặp nhất ở bệnh nhân HbH là tình trạng thiếu máu (2,6-13,3g/dl) với lượng HbH thay đổi từ 0,8-40%, đôi khi còn có kèm theo Hb Bart's ở một vài trường hợp. Bệnh nhân thường có lách to. Vàng da có thể xuất hiện ở nhiều mức độ khác nhau. Trẻ mắc HbH có thể có biểu hiện chậm lớn. Ngoài ra còn có thể có các dấu hiệu do biến chứng khác của bệnh như: nhiễm trùng, các vết loét ở chi dưới, sỏi mật, giảm acid folic và có thể có các cơn tan máu cấp sau khi điều trị thuốc hoặc sau các đợt nhiễm trùng nặng. Bệnh nhân lớn tuổi hơn có thể có biểu hiện thừa sắt ở nhiều mức độ khác nhau [35, 36].

1.3.4. Hội chứng phù thai do Hb Bart's



Hình 1.11. Hội chứng phù thai do Hb Bart's

Hội chứng phù thai do Hb Bart's (đồng hợp tử α^0 -thalassemia) là thể bệnh nặng nhất của α -thalassemia, do mất hoàn toàn 4 gen α globin, gây nên tình trạng suy giảm hoàn toàn khả năng sản xuất chuỗi α globin. Trẻ mắc Hb Bart's có thành phần Hb trong hồng cầu chủ yếu là loại Hb không có chức năng γ_4 và β_4 . Tuy nhiên, vẫn còn một lượng Hb bào thai Portland ($\zeta_2\gamma_2$) tồn tại, là loại Hb duy nhất có chức năng vận chuyển oxy để duy trì sự sống cho bào thai. Thai mắc Hb Bart's có phù nề, suy tim và thiếu máu kéo dài từ giai đoạn thai trong tử cung. Ngoài ra còn biểu hiện gan lách to, não chậm phát triển, hệ xương và hệ tim mạch phát triển bất thường, bánh rau dày. Trẻ mắc Hb Bart's hầu hết thường tử vong ngay trong giai đoạn thai (23-38 tuần) hoặc ngay sau khi sinh. Chỉ có một vài trường hợp báo cáo là sống sót nhờ được điều trị tích cực và truyền máu ngay trong giai đoạn sơ sinh [37].



Hình 1.12. Hội chứng phù thai do hemoglobin Bart's

1.4. Đặc điểm cận lâm sàng bệnh α -thalassemia

1.4.1. Xét nghiệm công thức máu

Xét nghiệm huyết học được coi là xét nghiệm ban đầu để phát hiện người bệnh và sàng lọc người mang gen bệnh α -thalassemia, cho phép đánh giá tình trạng thiếu máu (Hb giảm), hồng cầu nhỏ (MCV giảm), nhược sắc (MCH giảm), mức độ giảm tùy thuộc vào số lượng gen bị đột biến và loại đột biến ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp chuỗi α globin [35]. Tuy nhiên những xét nghiệm này không đặc hiệu và không có giá trị chẩn đoán xác định.

1.4.2. Phân tích thành phần hemoglobin (Hb)

Phương pháp phân tích thành phần Hb được sử dụng để phân tích các thành phần Hb bất thường. Đây là loại xét nghiệm quan trọng, đặc biệt đối với người mắc HbH và khi sàng lọc Hb Bart's trong thời kỳ sơ sinh để phát hiện người lành mang gen α -thalassemia, hoặc được dùng để phát hiện bất kỳ loại Hb bất thường nào khác kết hợp với α -thalassemia. Ở người α -thalassemia thể nhẹ, HbA₂ có thể giảm hoặc bình thường. Ở người mắc HbH, HbA₂ thường giảm rõ rệt, ngoài ra còn có thể thấy xuất hiện HbH [17].

Phân tích thành phần Hb có thể phát hiện HbH. Tuy nhiên HbH là loại huyết sắc tố không bền vững vì vậy có thể bị bỏ qua, đặc biệt trên các mẫu

bệnh phảm máu đã qua lưu trữ lạnh hoặc do các dung môi hòa tan được sử dụng để điện di huyết sắc tố. Điện di huyết sắc tố bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) là một phương pháp lý để khắc phục các nhược điểm trên, và cũng là phương pháp đã được nhiều nơi sử dụng trong các chương trình sàng lọc người mang gen trong cộng đồng cũng như sàng lọc sơ sinh [38, 39]. Trong thời kỳ sơ sinh, Hb Bart's cũng có thể được phát hiện bằng phương pháp HPLC hoặc theo phương pháp truyền thống. Hb Bart's phản ánh tình trạng hemoglobin bào thai tăng cao trong giai đoạn sơ sinh, mất đi nhanh chóng vào khoảng thời gian sau đó. Nồng độ Hb Bart's có liên quan đến mức độ nặng nhẹ của bệnh α -thalassemia. Nếu nồng độ Hb Bart's trong giai đoạn sơ sinh lớn hơn 25%, là một chỉ điểm cho bệnh hemoglobin H. Khi đó, xét nghiệm di truyền phân tử cần được thực hiện để khẳng định chẩn đoán.

1.4.3. Xét nghiệm di truyền phân tử phân tích gen α globin

Tùy theo loại đột biến gây bệnh thuộc dạng đã biết hay chưa biết, tùy theo đặc điểm của từng trung tâm chẩn đoán, mà có các lựa chọn kỹ thuật phân tích đột biến gen α globin phù hợp. Chúng tôi trình bày một số kỹ thuật sinh học phân tử chính được sử dụng.

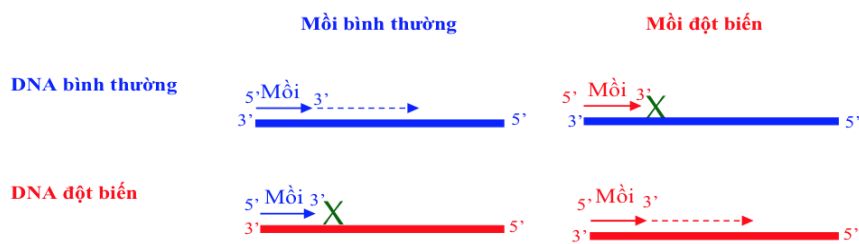
1.4.3.1. Kỹ thuật Allen specific oligonucleotide (ASO) dot blot

Kỹ thuật dot blot (DB) hoặc reserve dot blot (RDB) lần lượt được Kaftos và Saiki mô tả [40], sử dụng một mạch đơn trong phân tử DNA của trình tự đã được xác định (oligoprobe) để lai với phân tử DNA thứ hai chứa trình tự đích theo nguyên tắc bổ sung (target) với mức độ ổn định tùy thuộc vào chiều dài của các cặp base tham gia vào phản ứng. Cả hai phương pháp DB và RDB có điểm chung là đều cần khuếch đại đặc hiệu một đoạn DNA, là đoạn cần được lai với ASO probe đã được cố định sẵn trên màng (RDB) hoặc probe đã được đánh dấu phóng xạ được cố định trên màng dạng dot blots có sẵn (DB). Tuy nhiên hai phương pháp này có những điểm khác nhau. Đối với DB, mỗi

một probe trong một phản ứng cần được lai và rửa trong một điều kiện khác nhau, và có thể phát hiện một loại đột biến của nhiều mẫu trên cùng một màng. Ngược lại đối với RDB sử dụng probe không đánh dấu phóng xạ, thì các đột biến khác nhau chỉ cần lai và rửa tại cùng một điều kiện, và cho phép phát hiện nhiều đột biến của cùng một mẫu trên cùng một màng.

1.4.3.2. Amplification refractory mutation system (ARMS-PCR)

Kỹ thuật ARMS-PCR sử dụng để phát hiện sự có mặt của allel mang đột biến điểm đã biết. Mỗi phản ứng sử dụng các môi đặc hiệu có trình tự đầu 3' bổ sung với allel đột biến và một môi chung ngược chiều với môi đặc hiệu allel. Như vậy, trong mỗi phản ứng cho một đột biến điểm đã biết sẽ bao gồm hai phản ứng khuếch đại, sử dụng cùng một khuôn DNA. Trong đó, một sản phẩm sẽ được khuếch đại từ môi đặc hiệu có trình tự đầu 3' bổ sung với allel đột biến (môi đột biến) hoặc allel bình thường (bình thường), và sản phẩm còn lại được khuếch đại từ một môi chung ngược chiều với môi đặc hiệu allel. Sự hiện diện của các allel đột biến được biểu hiện bằng sản phẩm DNA khuếch đại với các kích thước khác nhau đã biết trước. Đây là một phương pháp nhanh, đơn giản, không cần gắn phóng xạ, sử dụng để sàng lọc nhiều đột biến khác nhau trên cùng một bệnh nhân. Nhiều y văn đã công bố các nghiên cứu sử dụng kỹ thuật này trong chẩn đoán bệnh α -thalassemia [41-43].



Hình 1.13. Nguyên lý của kỹ thuật ARMS-PCR

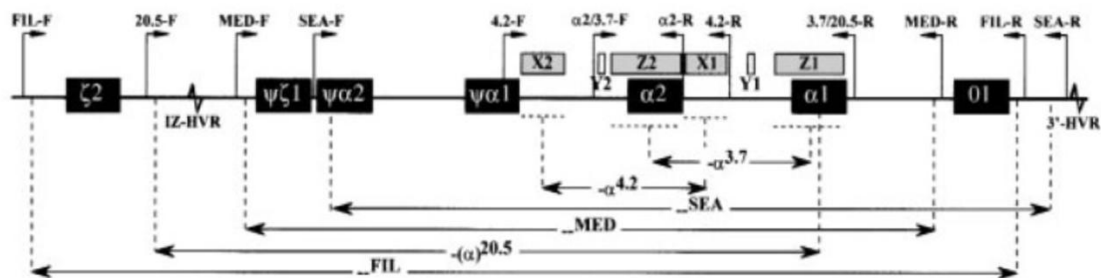
1.4.3.3. Restriction enzyme (RE-PCR)

Đây là một phương pháp không phóng xạ, được sử dụng nếu đột biến tạo ra hoặc xóa đi một vị trí giới hạn nào đó. Sản phẩm PCR được cắt bằng enzym giới hạn có thể bị cắt hoặc không bị cắt tùy vào vị trí đó có xuất

hiện đột biến hay không. Hạn chế của phương pháp này là hầu hết các đột biến trên gen globin nói chung và gen α -thalassemia nói riêng đều không tạo ra hay xóa bỏ một vị trí enzyme giới hạn nào, số còn lại thì cần sử dụng những enzyme cắt có giá thành rất cao.

1.4.3.4. GAP-PCR

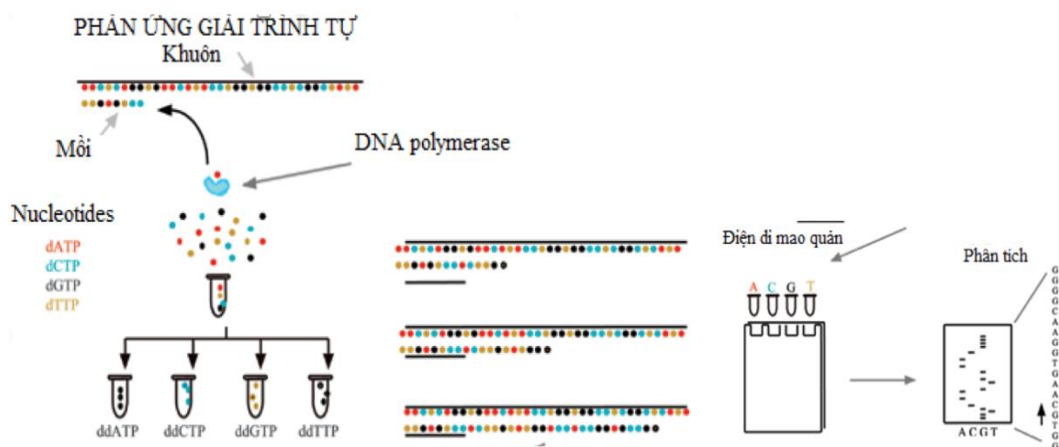
Đột biến mất đoạn trên gen α globin được phát hiện GAP-PCR, hay còn gọi là PCR khoảng cách. Kỹ thuật sử dụng hai mồi theo nguyên tắc bổ sung với mạch xuôi và mạch ngược trong vùng DNA chứa đoạn gen bị mất. Với các đột biến mất đoạn có kích thước nhỏ hơn 1 kb, cặp mồi sẽ tạo ra hai sản phẩm, đoạn nhỏ hơn là sản phẩm từ allen bị mất đoạn. Với những đột biến mất đoạn lớn, khoảng cách giữa hai mồi quá lớn để có thể khuếch đại được allen bình thường, mà chỉ có thể khuếch đại sản phẩm từ allen mang đột biến mất đoạn. Trong trường hợp này allen bình thường sẽ được khuếch đại thông qua một điểm đứt gãy của đột biến, sử dụng một mồi theo nguyên tắc bổ sung với trình tự bị mất và một mồi khác theo nguyên tắc bổ sung với đoạn DNA còn lại. Đây là kỹ thuật nhanh, đơn giản, tuy nhiên hạn chế của kỹ thuật này là cần phải biết được điểm đứt gãy mới thiết kế được cặp mồi tương ứng [1]. Hiện nay, các cặp mồi dùng trong phản ứng GAP-PCR cho bệnh α -thalassemia đã được thiết kế dưới dạng đa mồi. Trong đó, đột biến mất đoạn $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$ gây α^+ -thalassemia được phát hiện trong cùng một phản ứng, đột biến, $--\alpha^{FIL}$, $--\alpha^{THAI}$, $--\alpha^{SEA}$ gây α^0 -thalassemia được phát hiện trong các phản ứng tiếp theo.



Hình 1.14. Nguyên lý của kỹ thuật GAP-PCR

1.4.3.5. Giải trình tự gen Sanger

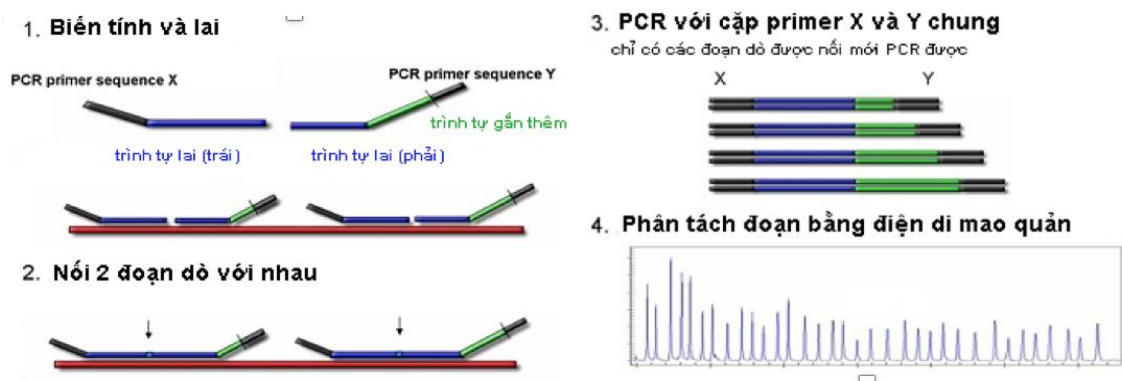
Giải trình tự DNA là phương pháp cho phép phân tích một cách chính xác trình tự nucleotid của từng gen hoặc của một vùng gen được quan tâm, được mô tả lần đầu tiên bởi Sanger và cộng sự vào năm 1977 [44]. Nguyên lý của phương pháp dựa trên sự nhân lên của các sợi DNA từ sợi DNA khuôn bằng phương pháp PCR, trong đó sự tổng hợp của mỗi sợi DNA mới được dừng lại tại mọi điểm dọc theo chuỗi. Chuỗi được liên tục kéo dài do sự kết hợp ngẫu nhiên của các ddNTP, kèm theo sự có mặt của DNA polymerase và mỗi là các chuỗi oligonucleotid dài khoảng 20bp được thiết kế theo nguyên tắc bổ sung với vùng DNA đích cần quan tâm. Thông thường các ddNTP được đánh dấu 4 màu huỳnh quang khác nhau. Đối với phương pháp này, hệ thống điện di thường sử dụng là điện di mao quản. Mỗi khi có một vạch điện di đi qua, phân tử ddNTP cuối cùng ở đầu 3' của đoạn DNA sẽ phát ra một màu huỳnh quang tương ứng, từ đó máy sẽ nhận diện được các nucleotid, từ đó biết được trình tự của DNA đích. Phương pháp này cho phép xác định hầu hết các đột biến điểm, đột biến mất đoạn nhỏ hoặc lặp đoạn của gen. Đối với bệnh α -thalassemia, chỉ có khoảng 10% trường hợp mắc bệnh cần phải giải trình tự gen HbA1 và HbA2 để phát hiện đột biến điểm chưa biết. Các vùng được giải trình tự bao gồm: các vùng mã hóa trên gen HbA1, HbA2, vùng ranh giới exon-intron, vùng cận promoter.



Hình 1.15. Nguyên lý của kỹ thuật giải trình tự gen Sanger

1.4.3.6. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)

Kỹ thuật MLPA dựa trên nguyên lý của sự kết nối đa môi-probe lai với vùng gen đích, mà vùng gen này thường có kích thước lớn, tiếp theo là chạy PCR định lượng sử dụng cặp môi PCR universal-tag cho tất cả các cặp probe, rồi sau đó là phân tích đoạn. Theo cách thức này MLPA có thể phát hiện các mất đoạn và nhân đoạn xảy ra trong vùng gen phân tích, là một phương pháp chẩn đoán thay thế có giá trị, hoặc là phương pháp bổ sung cho kỹ thuật GAP-PCR khi khảo sát các đột biến mất đoạn đã biết hoặc chưa biết của bệnh α -thalassemia. Đối với bệnh α -thalassemia, Probe MCR Holland SALSA P140B được thiết kế để phát hiện những thay đổi về số bản sao của 24 trình tự khác nhau trong vùng gen HbA, chủ yếu được sử dụng để phát hiện các đột biến xóa đoạn, lặp đoạn của một hoặc nhiều trình tự, trong hoặc gần vùng gen HbA1 và HbA2. Các đột biến mất đoạn dị hợp tử sẽ có các đầu tín hiệu giảm từ 35-50% so với mức bình thường. Đầu dò 142 và 166 phát hiện trình tự của exon 3 có mặt cả ở gen HbA1 và HbA2. Do đó, chúng sẽ chỉ thể hiện giảm tín hiệu ở mức độ 20-25% so với bình thường trong các mẫu bệnh nhân, với ba thay vì bốn bản sao HbA thông thường.



Hình 1.16. Nguyên lý của kỹ thuật MLPA

1.4.3.7. Kỹ thuật Reverse Hybridization StripAssay

Kỹ thuật dựa trên nguyên lý sản phẩm DNA sau khi được khuếch đại bằng phản ứng PCR đa môi, với các môi đã được biotinyln hoá tối ưu với ba hỗn

hợp khuếch đại. Bộ hỗn hợp A1 bao gồm môi đặc hiệu cho khuếch đại gen $\alpha 1$ và đột biến $-\alpha^{3.7}$. Hỗn hợp A2 bao gồm môi đặc hiệu cho khuếch đại các đột biến $-\alpha^{4.2}$, $--\alpha^{SEA}$, $--\alpha^{FIL}$, $--\alpha^{THAI}$, $--\alpha^{20.5}$, $--\alpha^{MED}$. Hỗn hợp B bao gồm môi đặc hiệu khuếch đại gen $\alpha 2$ và $\alpha\alpha^{anti3.7}$. Một hỗn hợp các đầu dò oligonucleotid cho phép phân biệt rõ ràng giữa allen đột biến và allen bình thường, hoặc vùng đứt gãy của đột biến mất đoạn, được cố định ở hai hàng song song trên hai test triple A và B. Sau đó, mỗi sản phẩm khuếch đại đã được biotinyli hoá của hỗn hợp A1, A2 được lai với test triple A, hỗn hợp B được lai với test triple B. Quá trình lai và phân tích kết quả diễn ra sau đó [45].



Hình 1.17. Nguyên lý của kỹ thuật StripAssay

1.4.4. Vai trò của phát hiện đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia

Bệnh α -thalassemia có biểu hiện lâm sàng nặng bao gồm bệnh HbH và hội chứng phù thai do Hb Bart's được phát hiện lần đầu từ những năm 1950 [46]. Tuy nhiên, vấn đề di truyền học của bệnh α -thalassemia gặp nhiều khó khăn hơn so với các bệnh thuộc nhóm hemoglobin khác đã được mô tả cùng thời điểm. Do người trưởng thành mang gen α -thalassemia không tổng hợp một lượng lớn HbH cũng như Hb Bart's để phát hiện được. Người mắc bệnh nếu chỉ dựa trên kiểu hình thì không có khác biệt so với các nhóm bệnh thiếu máu khác [47].

Sinh học phân tử đã mang lại những hiểu biết đầy đủ về bệnh. Tuy nhiên, giai đoạn đầu cũng gặp phải những vấn đề phức tạp, vì trên một người bình thường lại có nhiều gen α globin. Câu hỏi này được trả lời khi các chuỗi α -, β -, γ -cDNAs được phân lập, và đưa ra kết luận rằng mỗi một người bình thường đều có 4 gen α globin, và bệnh α -thalassemia là kết quả của việc được di truyền 3, 2, 1 hay 0 gen α globin [48]. Tuy nhiên, những phát hiện này

cũng chưa giải thích được vì sao tỷ lệ người mang gen α -thalassemia lại cao như vậy, trong khi nghiên cứu khảo sát về Hb Bart's từ máu cuống rốn ở khu vực như Châu Phi, Trung Đông, thì bệnh HbH rất không phổ biến và bệnh Hb Bart's thì gần như không xuất hiện [27]. Câu hỏi này được giải thích bằng những phát hiện về cấu trúc của gen α globin [49]. Mỗi người bình thường đều có 2 gen α globin nằm trên nhiễm sắc thể số 16 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Theo cách lý giải đó, kiểu gen của người mắc bệnh HbH sẽ là $(-/-\alpha)$ và mắc hội chứng Hb Bart's sẽ là $(-/-)$. Ở một số khu vực nếu chỉ có những người $(-\alpha)$ lưu hành, thì sẽ chỉ có những người $(-\alpha/\alpha\alpha$ và $-\alpha/-\alpha)$ là phổ biến, không có những người mắc bệnh HbH hoặc Hb Bart's xuất hiện [50].

Cho đến năm 1980, sinh học phân tử trong bệnh α -thalassemia mới được hoàn toàn hiểu rõ, và được công bố rộng rãi với các nghiên cứu của Higgs [15]. Tuy nhiên, những nghiên cứu tiếp theo lại chỉ ra rằng có rất nhiều loại đột biến khác nhau xung quanh mô hình bệnh α -thalassemia. Sau đó, các dạng đột biến đã được xác định là dạng α^+ và α^0 -thalassemia, dẫn đến việc giảm (α^+) hoặc ngừng (α^0) tổng hợp chuỗi α globin gây các kiểu hình bệnh khác nhau trên lâm sàng.

Hiện nay, có rất nhiều kỹ thuật sinh học phân tử đã được phát triển, cho phép xác định chính xác kiểu đột biến thường gặp hay hiếm gặp của bệnh α -thalassemia, giúp giải thích kiểu hình phong phú của bệnh. Mỗi kỹ thuật đều có các ưu nhược điểm khác nhau. Tùy theo năng lực, điều kiện hoạt động, mục đích và đối tượng khác nhau, mà mỗi trung tâm lựa chọn loại kỹ thuật phù hợp, hoặc kết hợp nhiều kỹ thuật để giúp có được kết quả chính xác nhất, trong một khoảng thời gian ngắn nhất, với chi phí hợp lý nhất. Đã có hơn 128 loại đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia được tìm thấy, và sự tương tác giữa các đột biến này với nhau tiềm ẩn khả năng ngày càng tạo ra nhiều kiểu hình khác nhau. Mức độ nặng nhẹ của bệnh có mối liên hệ chặt chẽ với mức độ suy giảm hoạt động của gen α globin [19].

1.5. Chẩn đoán bệnh α thalassemia

1.5.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh α -thalassemia

Theo tiêu chuẩn của hội Thalassemia quốc tế (TIF) 2003, chẩn đoán bệnh α -thalassemia ban đầu dựa vào các biểu hiện lâm sàng: tan máu, thiếu máu ở các mức độ nhẹ, trung bình và nặng. Có thể có vàng da, gan lách to, chậm lớn, biến dạng xương, trong đó có biểu hiện “bộ mặt thalassemia”. Có thể có tiền sử truyền máu hoặc chưa từng phải truyền máu.

Xét nghiệm công thức máu và điện di Hb đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán bệnh ban đầu. Tất cả các trường hợp mắc bệnh đều có biểu hiện thiếu máu ở các mức độ khác nhau: Hb 2,6-13,3g/dl; MCV<80fl, MCH<27pg. Trong thời kỳ bào thai, khi mức độ tổng hợp chuỗi α globin giảm xuống khoảng 70% mức bình thường thì có sự tăng tổng hợp quá mức chuỗi γ globin tạo nên Hb Bart's. Trong thời kỳ trưởng thành, sự tăng tổng hợp quá mức chuỗi β globin tạo nên HbH (β_4) 0,8-40%, có thể được phát hiện bằng phương pháp điện di Hb.

Trước đây, bệnh α -thalassemia được chẩn đoán xác định dựa vào đánh giá chỉ số chuỗi α/β globin, khi chỉ số này giảm dưới 0,8. Hiện nay chẩn đoán xác định bệnh α -thalassemia được chủ yếu dựa vào xét nghiệm di truyền phân tử phát hiện đột biến gen α globin.

1.5.2. Chẩn đoán phân biệt bệnh α -thalassemia

Người mang gen α^+ -thalassemia thường có công thức máu bình thường, thể tích hồng cầu bình thường, nhược sắc ở mức độ ranh giới và không có biểu hiện thiếu máu, đặc biệt là người mang gen đột biến loại $-\alpha^{3.7}$ và loại đột biến không mất đoạn gen. Trong trường hợp này, chỉ có thể sử dụng phương pháp phân tích gen α globin để phát hiện người mang gen bệnh.

Ở một số quốc gia mà bệnh α -thalassemia ít lưu hành, bệnh α -thalassemia còn có thể bị nhầm với tình trạng thiếu máu thiếu sắt, nhất là khi không đánh giá

tình trạng sắt huyết thanh. Các chỉ số huyết học trong nhóm bệnh thalassemia thường tương đối giống với thiếu máu thiếu sắt, do vậy ferritin là chỉ số nên được đánh giá cùng với các xét nghiệm huyết học. Nếu tình trạng hồng cầu nhỏ nhược sắc vẫn tồn tại khi chỉ số ferritin bình thường, HbA2 giảm hoặc bình thường, thì đây có thể là một người mang gen bệnh α -thalassemia. Khi đó, xét nghiệm phân tích gen α globin sẽ được thực hiện để chẩn đoán xác định.

Bệnh HbH có triệu chứng lâm sàng thay đổi từ nhẹ đến nặng. Bệnh HbH thể nhẹ thường chỉ được phát hiện sau khi đã xuất hiện các biến chứng, thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc nặng lên sau các đợt nhiễm khuẩn, hoặc tình trạng chậm lớn, lách to. Điện di Hb có thể có xuất hiện HbH. Đối với HbH thể nặng, bệnh thường được chẩn đoán sớm do thiếu máu nặng cần phải truyền máu [38, 51].

Phù thai là một hội chứng không đặc hiệu do nhiều nguyên nhân gây ra, như là miễn dịch, nhiễm trùng, bất đồng nhóm máu. Ở khu vực Đông Nam Á, nơi tỷ lệ người mang gen α^0 -thalassemia rất cao, thì tỷ lệ phù thai do Hb Bart's được xem là một trong các nguyên nhân chính. Ở những trường hợp này, bố và mẹ có thể được sàng lọc người mang gen α^0 -thalassemia, để xác định nguyên nhân gây phù thai do α -thalassemia gây nên [37].

1.6. Giá trị tiên lượng về kiểu hình dựa trên kiểu gen của bệnh HbH

Bệnh HbH có kiểu hình và kiểu gen đa dạng. Mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh HbH đã được khẳng định ở nhiều nghiên cứu ở nhiều quần thể khác nhau trên thế giới. Ở các nước ít có sự lưu hành của bệnh HbH như Bắc Âu, Bắc Mỹ, hoặc ở các quốc gia đang phát triển, khi chưa có đầy đủ các phương tiện chẩn đoán phân tử một cách thường quy thì việc tiên lượng bệnh HbH chưa được quan tâm một cách rõ ràng [13]. Ở các quốc gia có tỷ lệ bệnh lưu hành cao, nghiên cứu tiên cứu về mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh HbH liên tục qua các giai đoạn, từ mới sinh, trẻ nhỏ, trưởng thành, phụ nữ khi mang thai là rất cần thiết, tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa được thực hiện một cách hệ thống và rộng rãi.

Nhiều người bệnh HbH có cuộc sống bình thường ở mọi khía cạnh, và không được chẩn đoán phát hiện bệnh cho tới thời điểm trưởng thành. Tuy nhiên, có những trường hợp bệnh HbH xuất hiện triệu chứng từ rất sớm, và các biến chứng của bệnh có thể đe dọa đến tính mạng của người bệnh nếu không được điều trị [27, 35], [51], [52]. Sự khác biệt về mặt lâm sàng là do sự suy giảm hoạt động của chuỗi α globin trên nhóm bệnh HbH dạng không mất đoạn nhiều hơn so với bệnh HbH dạng mất đoạn. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hầu hết các đột biến dạng không mất đoạn đều xảy ra trên gen $\alpha 2$. Gen $\alpha 2$ tham gia vào việc tổng hợp ba phần tử chuỗi α globin, gen $\alpha 1$ chỉ kiểm soát một phần tử hoạt động [53]. Các dạng đột biến gen $\alpha 2$ vẫn giữ được hoạt động phiên mã, nhưng không có sản phẩm protein. Việc sao chép gen $\alpha 2$ bị đột biến gây trở ngại cho sự sao chép của gen $\alpha 1$ bình thường, dẫn đến sự giảm tổng hợp của toàn bộ chuỗi α globin [54].

Trước đây, bệnh HbH được phân loại là nhóm bệnh thể nhẹ, nhưng những nghiên cứu gần đây cho rằng bệnh HbH thường có những biểu hiện lâm sàng phức tạp hơn những mô tả trước đó [17, 38, 51, 55, 56]. Những nghiên cứu này cũng ghi nhận, loại đột biến gen α globin có ảnh hưởng đến mức độ nặng của bệnh. Đột biến mất đoạn thường gây nhóm HbH có biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn. Rất hiếm bệnh nhân thuộc nhóm này cần phụ thuộc truyền máu, hoặc cần truyền máu rải rác do thiếu máu do tan máu có thể xảy ra trong hoặc sau các đợt nhiễm trùng, hạ huyết áp, hoặc trong quá trình mang thai. Ngoài ra, nhóm bệnh này có thể dẫn đến những hậu quả như chậm lớn ở trẻ nhỏ, và thừa sắt ở nhóm bệnh nhân lớn tuổi (>45 tuổi), bất kể người đó có phải truyền máu hay không, dẫn đến các rối loạn chức năng của tim, gan và hệ nội tiết. Đột biến không mất đoạn thường gây nhóm HbH có biểu hiện lâm sàng nặng hơn, thiếu máu do tan máu xảy ra nhiều hơn, dẫn đến phải truyền máu thường xuyên hơn, và cuối cùng cần phải điều trị bằng cắt lách [20, 35, 56]. Trong một số nghiên cứu, gần một nửa số bệnh nhân HbH thuộc nhóm

này cần truyền máu lặp đi lặp lại nhiều lần, đặc biệt từ trong giai đoạn sớm và cả ở tuổi trưởng thành [20, 35, 37, 52, 57]. Tình trạng quá tải sắt không phổ biến ở bệnh nhân HbH so với bệnh β thalassemia, nhưng được ghi nhận khá phổ biến ở nhóm bệnh nhân phải truyền máu thường xuyên.

1.7. Sàng lọc người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

1.7.1. Sàng lọc người mang gen bệnh

Sàng lọc là quá trình phát hiện những người có nguy cơ cao về một tình trạng sức khỏe cụ thể nào đó. Qua kết quả sàng lọc, đối tượng nguy cơ cao sẽ được thực hiện thêm các xét nghiệm cần thiết để chẩn đoán xác định bệnh, và được sử dụng phương pháp điều trị phù hợp để giảm nguy cơ và biến chứng của bệnh.

Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), hội Thalassemia quốc tế (TIF), phương pháp sàng lọc bệnh thalassemia phổ biến và hiệu quả nhất là dựa trên 2 chỉ số $MCV < 80 \text{ fL}$ hoặc $MCH < 27 \text{ pg}$ trong xét nghiệm công thức máu và điện di Hemoglobin. Nhiều quốc gia có tỷ lệ bệnh lưu hành cao, hoặc ở các nước đang phát triển [58],[59],[60],[61], cũng như các nước đa chủng tộc như Mỹ, Canada, Úc, việc phát hiện người mang gen bệnh Hb, đặc biệt ở các phụ nữ mang thai thuộc nhóm chủng tộc có nguy cơ bệnh thalassemia, đã áp dụng thành công các chương trình sàng lọc sử dụng chỉ số MCV, MCH và điện di Hb [62]. Tuy nhiên, cách tiếp cận này có thể bỏ sót các trường hợp bệnh HbE, HbS, HbC, đặc biệt là người mang gen α^+ -thalassemia loại mất đoạn một gen, vì người dị hợp của những dạng bệnh này có MCV và MCH bình thường.

Mục tiêu của chương trình sàng lọc đối với bệnh α -thalassemia là hạn chế tỷ lệ sinh con mắc bệnh Hb Bart's, HbH thể nặng. Thời điểm sàng lọc tốt nhất là trước khi sinh hoặc trước khi mang thai [62]. Tất cả các sản phụ được sàng lọc bằng xét nghiệm công thức máu và điện di Hb, nếu có bất thường thì sàng lọc thêm người chồng.

Người có $MCV < 80\text{fL}$ hoặc $MCH < 27\text{pg}$ có thể có nguy cơ mắc α hoặc β hoặc kết hợp α/β thalassaemia. Người mang gen β thalassaemia có $HbA_2 > 3,5\%$. Nếu có MCV thấp nhưng điện di Hb bình thường thì cần chẩn đoán phân biệt thiếu máu thiếu sắt và α -thalassaemia bằng xét nghiệm ferritin huyết thanh. Nếu điện di hemoglobin có HbH, xác định là mang gen α -thalassaemia. Tuy nhiên, HbH có độ nhạy thấp và phụ thuộc vào kinh nghiệm của người đọc. Vì thế HbH âm tính cũng không thể loại trừ α -thalassaemia. Nếu thai phụ không thiếu sắt và HbH âm tính, chưa loại trừ khả năng là người mang gen α -thalassaemia, cần xét nghiệm người chồng để xác định nguy cơ sinh con mắc bệnh Hb Bart's.

Nếu cặp vợ chồng là người đã có tiền sử sinh con bệnh HbH, hoặc cặp vợ chồng có tiền sử, hoặc đang có thai bị phù, là cặp vợ chồng thuộc nhóm nguy cơ cao sinh con mắc α -thalassaemia. Trong những trường hợp này, đều cần xét nghiệm phân tích gen α globin cho cả hai vợ chồng để xác định tình trạng mang gen α -thalassaemia. Nếu cả hai vợ chồng đều là người mang gen thalassaemia thì cần được tư vấn để xét nghiệm tìm đột biến gây bệnh ở thai, gọi là chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassaemia.

1.7.2. Chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassaemia

Hiện nay chưa có biện pháp điều trị đặc hiệu bệnh α -thalassaemia. Hầu hết các thai mắc α -thalassaemia thể nặng (đồng hợp tử α^0 - Hb Bart's) đều phù, chết lưu trong giai đoạn 3 tháng cuối của thai kỳ, hoặc tử vong sớm sau sinh. Y văn có đề cập đến một số rất hiếm trường hợp thai Hb Bart's có thể sống sót sau sinh nếu được truyền máu ngay trong tử cung hoặc phụ thuộc vào các phương tiện điều trị tích cực sau khi sinh, nhưng đều phải phụ thuộc truyền máu sau sinh. Những trẻ mắc HbH thể nặng đều phải phụ thuộc truyền máu và thải sắt suốt đời, thường tử vong sớm vì các biến chứng của truyền máu. Bởi vậy, xác định người mang gen bệnh, và chẩn đoán trước sinh đóng vai trò

rất quan trọng và là cơ sở để đưa ra lời khuyên di truyền nhằm làm giảm tỷ lệ sinh con mắc bệnh thể nặng.

Bệnh thalassemia nói chung và bệnh α -thalassemia nói riêng là một trong những bệnh di truyền đơn gen đầu tiên được chẩn đoán ở mức độ phân tử từ cách đây hơn 30 năm. Cho tới nay, đã có rất nhiều kỹ thuật mới đã được phát triển để phát hiện các đột biến gây bệnh, và làm cơ sở cho các ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh bệnh lý này [3]. Chẩn đoán trước sinh bệnh thalassemia lần đầu tiên được thực hiện dựa trên kỹ thuật đo tỷ lệ chuỗi β và α -thalassemia mới tổng hợp trong máu bào thai. Kỹ thuật này được sử dụng rộng rãi từ năm 1975 đến năm 1980 với hơn 13,000 ca được chẩn đoán thành công trên toàn thế giới. Tuy nhiên kỹ thuật này có thể làm tăng nguy cơ sảy thai liên quan đến việc lấy mẫu bệnh phẩm không được thực hiện ở những trung tâm lớn có nhiều kinh nghiệm, và chỉ có thể thực hiện được khi thai khoảng 18 tuần tuổi [1]. Với sự phát minh ra phản ứng PCR vào khoảng những năm 90, các đột biến của bệnh thalassemia bắt đầu được xác định bằng kỹ thuật DNA và gen globin đã được giải trình tự, thì việc chẩn đoán trước sinh bệnh thalassemia được chuyển sang thực hiện bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

Hiện nay, đối với bệnh α -thalassemia, chẩn đoán trước sinh cho thai có nguy cơ mắc bệnh dựa trên các xét nghiệm phân tích DNA của thai để xác định các đột biến gây bệnh trên gen α globin. Nguồn DNA phổ biến được sử dụng trong chẩn đoán trước sinh được tách chiết từ mẫu dịch ối hoặc từ rau thai. Có hai phương pháp lấy mẫu để thực hiện xét nghiệm chẩn đoán trước sinh là phương pháp có can thiệp và phương pháp không can thiệp thai.

1.7.2.1. Các phương pháp chẩn đoán trước sinh có can thiệp

- *Dịch nước ối (Amniotic fluid sampling)*

Từ những năm 1960, kỹ thuật chọc hút dịch ối đã được áp dụng cho chẩn đoán trước sinh khi thai ở ba tháng giữa của thai kỳ (15-19 tuần). Hiện nay

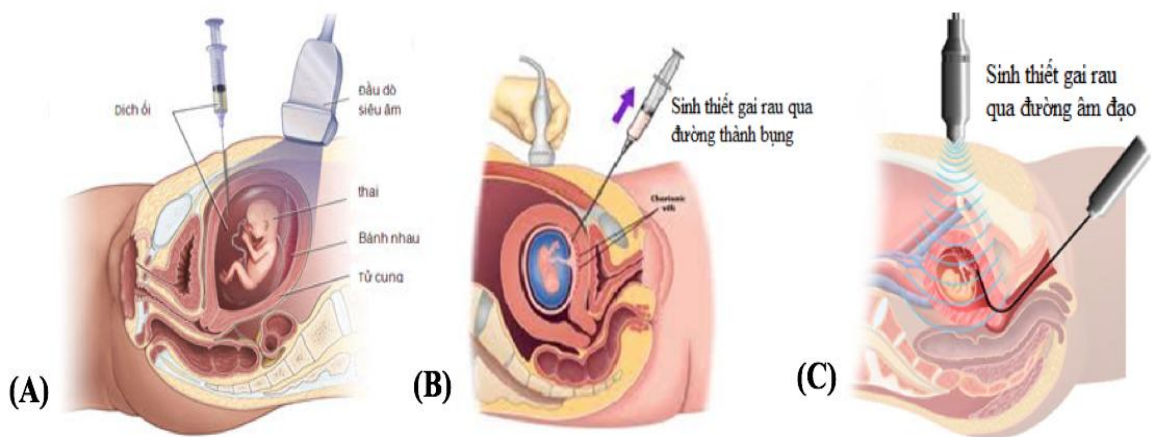
vẫn đang là kỹ thuật có xâm lấn phổ biến nhất được sử dụng để chẩn đoán trước sinh các thai nhi có nguy cơ mắc bệnh di truyền. Kỹ thuật này nhanh chóng được nhân rộng trên toàn thế giới với tính an toàn được cải thiện rõ rệt khi kết hợp dưới hướng dẫn của siêu âm. Chọc hút dịch ối trở thành thủ thuật được thực hiện thường quy bắt đầu từ tuần thai thứ 16. Khoảng 16-20ml được hút ra từ buồng ối bao xung quanh thai nhi, thông qua một kim nhỏ xuyên qua thành bụng dưới hướng dẫn của siêu âm (Hình 1.18A).

Tỷ lệ tai biến do thủ thuật chọc ối ở tuần thai thứ 16 được thông báo vào khoảng 0,5-1% [63], nhưng trên thực tế tỷ lệ này có thể thấp hơn nhiều ở các trung tâm lớn với nhiều kinh nghiệm. Chọc ối ở ba tháng đầu của thai kỳ được coi là có nguy cơ sảy thai cao hơn so với chọc ối ở ba tháng giữa. Bất lợi chính của thủ thuật chọc ối là thời điểm chẩn đoán muộn. Số lượng dịch ối đôi khi không đủ lượng DNA cần thiết cho chẩn đoán, cần phải nuôi cấy tế bào cho đến khi đủ lượng tế bào cần thiết, làm chậm thêm thời gian trả kết quả [64].

- *Mẫu gai rau (Chorionic villus sampling - CVS)*

Mục tiêu của sinh thiết gai rau (CVS) là để thu được một mẫu bệnh phẩm nhỏ từ bánh rau đang phát triển, nơi mang cùng một bản chất di truyền với thai nhi. Sinh thiết gai rau được thực hiện bằng một catheter đi qua cổ tử cung với những thai từ 10-11 tuần tuổi [65]. Gần đây, sinh thiết gai rau xuyên thành bụng được ứng dụng ngày càng rộng rãi. Phương pháp này sử dụng kim sinh thiết xuyên qua thành bụng dưới hướng dẫn của siêu âm, hút ra một mảnh gai rau nhỏ. Thủ thuật có thể được áp dụng cho thai ở bất kỳ thời điểm nào bắt đầu từ 11 tuần tuổi trở lên. Hiện nay, với sự phát triển của siêu âm với độ phân giải cao, thủ thuật sinh thiết gai rau qua thành bụng có thể được thực hiện cho thai từ 6 tuần tuổi, và ngày càng được ứng dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Mẫu bệnh phẩm gai rau có nhiều ưu thế, do có thể thực hiện ở ngay ba tháng đầu của thai kỳ. Điều này giải quyết được vấn đề tâm lý cho các sản phụ không phải chờ đợi kết quả chẩn đoán muộn, và nguy cơ về biến chứng

và tâm lý khi phải dùng thai ở tuần thai lớn. Kỹ thuật này cũng cho phép thu nhận được nhiều tế bào của thai nhi hơn so với những loại bệnh phẩm khác, và kết quả của chẩn đoán sẽ thu được cũng sẽ nhanh hơn, chỉ trong vài ngày. Nguy cơ gây sảy thai của thủ thuật CVS được thông báo nằm trong khoảng từ 0,5-4,5% [66]. Tuy nhiên, nguy cơ này thay đổi còn tùy thuộc vào mức độ thành thạo của người thực hiện, và số lần sinh thiết để có được đủ số lượng bệnh phẩm. Nếu thủ thuật được thực hiện bởi người có kinh nghiệm, tỷ lệ sảy thai có thể giảm xuống 0,5-1% [67] (Hình 1.18B - 1.18C).



Hình 1.18. Các thủ thuật lấy bệnh phẩm trong chẩn đoán trước sinh

(A) Chọc hút dịch ối. (B, (C) Sinh thiết gai rau qua đường thành bụng và âm đạo

1.7.2.2. Chẩn đoán trước sinh không can thiệp

- *Siêu âm*

Phương pháp chẩn đoán không can thiệp dựa trên các kỹ thuật siêu âm, với các chuyên gia có kinh nghiệm và thiết bị siêu âm tốt, được coi là một phương pháp hiệu quả để giảm bớt tỷ lệ cần phải thực hiện các đánh giá can thiệp trên các sản phụ có nguy cơ sinh con mắc bệnh [68]. Một nghiên cứu thực hiện trên 832 sản phụ có nguy cơ với bệnh phù thai do Hb Bart's, có 168 thai (20.2%) được xác định là mắc bệnh. Các dấu hiệu của thai như tim to, và/hoặc gan lách to đều gặp trên những sản phụ này [68]. Lợi ích lớn nhất của việc áp dụng phương pháp không xâm lấn này là tránh được khoảng 75% các

trường hợp khỏi các phương pháp chẩn đoán có xâm lấn [68]. Nguyên tắc của phương pháp này là phát hiện các hình thái về tình trạng thiếu máu của thai nhi trên siêu âm. Vì chuỗi α globin tạo nên phân tử HbF, là loại Hb chủ yếu của thai nhi bắt đầu từ tuần thai thứ 8, nên khi có sự suy giảm hoặc dừng tổng hợp chuỗi α globin thì tình trạng thiếu máu xảy ra trên thai nhi có thể bắt đầu từ sau khoảng thời gian này [14].

• *Phương pháp tách DNA thai nhi tự do lưu hành trong máu mẹ*

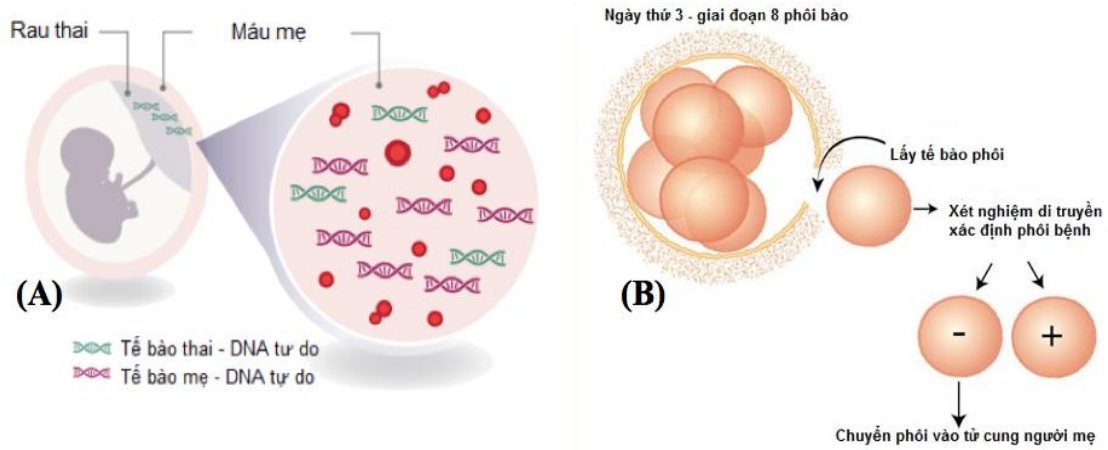
Năm 1997, Lo và cộng sự đã chứng minh rằng có sự hiện diện của DNA thai nhi tự do (cell free fetal DNA-cffDNA) lưu hành trong huyết tương và huyết thanh của phụ nữ có thai [84]. Lượng cffDNA trong máu mẹ chiếm khoảng 10% tổng số DNA tự do (3-19%) [31]. Nguồn gốc của cff DNA trong máu mẹ cho đến nay vẫn chưa được xác định một cách chắc chắn. Có thể chúng có nguồn gốc từ các tế bào thai nhi bị phá hủy và giải phóng ra trong máu mẹ, hoặc cffDNA được vận chuyển qua rau thai, hoặc các nhung mao màng nuôi bị phá hủy nằm sát với các khoang gian nhung mao trong rau thai. cffDNA lưu hành ổn định trong máu mẹ, có thể do chúng có mối liên kết với các vi phân tử có nguồn gốc từ rau thai để bảo vệ chúng khỏi sự giáng hóa nhân [103]. cffDNA tăng dần lên trong thai kỳ, với mức tăng khoảng 21% hàng tuần trong ba tháng đầu, chậm hơn ở ba tháng giữa, và gia tăng mạnh vào tám tuần cuối của thai kỳ, và biến mất nhanh trong tuần hoàn của người mẹ sau khi sinh [57]. cffDNA trong máu mẹ được công bố có thể giữ ở $< -20^{\circ}\text{C}$ trong vòng 4 năm, tuy nhiên cũng có nhiều tài liệu cho rằng, thời gian lưu trữ có thể làm ảnh hưởng đến nồng độ cffDNA được tách ra từ huyết thanh của người mẹ lưu trữ [69]. Gần đây, một công bố về việc áp dụng NIPD để chẩn đoán bệnh α -thalassemia, trong đó đặc biệt là bệnh Hb Bart's, bằng kỹ thuật PCR trên cffDNA, đã chứng minh sự cần thiết phải tiếp tục nghiên cứu để cải thiện độ nhạy và độ chính xác của kỹ thuật [70] (Hình 1.19A).

1.7.3. Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ (*Pre-implantation genetic diagnosis - PGD*)

Chẩn đoán trước sinh thông thường, dù bằng phương pháp phân tích DNA hay bằng siêu âm, thì cũng chỉ thực hiện được khi thai khoảng 11-18 tuần. Quyết định phải đình chỉ thai trong trường hợp thai bệnh thường rất khó khăn cho gia đình, đặc biệt khi thai đã ở vào kỳ giữa của thai kỳ. Ngoài ra, các cặp vợ chồng khi có vấn đề về sinh sản, hoặc đã có tiền sử phải đình chỉ thai sau khi chẩn đoán trước sinh phát hiện thai bệnh, có thể muốn cân nhắc về khả năng làm chẩn đoán tiền phôi và chỉ những phôi được chẩn đoán không mắc bệnh mới được lựa chọn để đưa vào tử cung của người mẹ. Người mẹ có nhu cầu làm PGD sẽ cần trải qua một đợt điều trị nội tiết để kích thích có được nhiều trứng, sau đó trứng sẽ được thu hoạch để đưa vào làm thụ tinh ống nghiệm (*in vitro fertilization - IVF*). Phôi được nuôi cấy trong 60h đến giai đoạn 8 phôi bào. Sau đó 2 tế bào blastocytes được sinh thiết khỏi từng phôi và được đưa vào từng tube eppendorf riêng biệt cho chẩn đoán di truyền [143] (Hình 1.19B).

Trường hợp ứng dụng PGD thành công vào chẩn đoán bệnh α -thalassemia đầu tiên là Li và cộng sự năm 2000. Sau đó có các công bố khác cho các trường hợp mang gen α^0 --^{SEA} [146]. Năm 2006, Chan và cộng sự đã công bố một nghiên cứu thực hiện PGD trên 9 cặp vợ chồng có nguy cơ để loại trừ nguy cơ thai đồng hợp từ α^0 -thalassemia [14]. Kết quả có 126 tế bào phôi được sinh thiết từ 82 phôi, chọn được 58 phôi có ít nhất 1 allele bình thường, có 31 phôi được chuyển cho 13 chu kỳ chuẩn bị và một sản phụ sinh ba. Cả 3 thai này đều có biểu hiện bình thường vào tuần thai 18, và người mẹ đã sinh cả 3 em bé an toàn khi thai được 34 tuần. Kiểu gen của 3 em bé được so sánh phù hợp khi thực hiện trên máu cuống rốn [71]. Năm 2009, Xu YW và cộng sự đã công bố nghiên cứu PGD cho 43 cặp vợ chồng là người mang gen α^0 -thalassemia dạng -- α^{SEA} . Tổng số có 472 phôi đã được sinh thiết. Phản

ứng khuếch đại được thực hiện trên 390 tế bào phôi, chọn được 144 phôi chuyển vào tử cung người mẹ, 25 sản phụ mang thai khỏe mạnh thành công, chiếm 24% [72].



Hình 1.19. (A) DNA thai tự do trong máu mẹ. (B) Nguyên lý chẩn đoán tiền phôi

1.8. Tình hình nghiên cứu bệnh α -thalassemia

1.8.1. Thế giới

Năm 1954 Minnich lần đầu tiên mô tả một bệnh nhân thiếu máu có nhiều thể vùi trong hồng cầu, gọi là thiếu máu có thể vùi trong hồng cầu [73].

Năm 1955 Rigarras [74], và năm 1956 Goutass [75] đều độc lập công bố tìm được HbH trong thành phần Hb của một số bệnh nhi. Tuy nhiên, bệnh HbH còn là một bệnh Hb riêng biệt, chưa thấy mối liên quan giữa bệnh HbH với bệnh α -thalassemia.

Năm 1959 Ramot [76] tách được Hb Bart's trong máu của bệnh nhân HbH. Những phát hiện này giúp các nhà nghiên cứu hướng tới mối liên hệ giữa bệnh HbH và các thể của bệnh α -thalassemia. Điều này được di truyền phân tử xác minh và những năm sau này.

Năm 1963 Dance phát hiện cơ chế tạo thành HbH nhờ phát hiện được phần globin của HbH gồm 4 chuỗi β . Do khi chuỗi α bị giảm, các chuỗi β tăng tổng hợp tạo các chuỗi β thừa dư. Các chuỗi này kết hợp với nhau tạo

thành phân tử β_4 , là phần globin của HbH [77]. Tương tự cơ chế như vậy với phân tử Hb Bart's γ_4 . Nhờ đó, bản chất globin của HbH và Hb Bart's đã được phát hiện, từ đó các nhà nghiên cứu đi sâu vào bản chất của bệnh.

Năm 1964, Weatherall lần đầu tiên đưa ra giả thuyết có 2 cặp gen α globin. Mô hình này giải thích được các biểu hiện phong phú của các thể bệnh α -thalassemia, và biểu hiện lâm sàng đa dạng của bệnh HbH [23]. Cùng thời gian này, Wasi và cộng sự cũng tiến hành một nghiên cứu trên các bệnh nhân mắc HbH tại Thailand, kết quả cho thấy: Điện di máu cuống rốn của 30 trẻ sơ sinh được sinh ra từ các cha mẹ mắc bệnh HbH, đã phát hiện 29/30 trường hợp có Hb Bart's. Điều đó chứng tỏ hầu như tất cả các trẻ sơ sinh sinh ra từ các cha mẹ mắc bệnh HbH đều là người mang gen α -thalassemia [78].

Cho đến năm 1980, sinh học phân tử trong bệnh α -thalassemia mới được hoàn toàn hiểu rõ, được công bố rộng rãi với các nghiên cứu của Higgs [15].

1.8.2. Việt Nam

Tại Việt Nam, bệnh lý về huyết sắc tố được bắt đầu nghiên cứu từ những năm 1960, tuy nhiên hầu hết đều tập trung vào β thalassemia và HbE [79]. Đối với bệnh α -thalassemia, từ trước năm 1985, bệnh này chưa được phát hiện ở Việt Nam do chưa áp dụng các kỹ thuật chẩn đoán. Dựa vào điều kiện địa lý ở vùng Đông Nam Á, một số nhà nghiên cứu về huyết học ở nước ta lúc đó dự đoán có thể có bệnh α -thalassemia tại Việt Nam. Đến năm 1985, dự đoán ấy mới được chứng minh nhờ sự phát hiện bệnh HbH, là một thể bệnh của α -thalassemia [8].

Năm 1996, Dương Bá Trục tiến hành nghiên cứu: “Đặc điểm lâm sàng và huyết học bệnh HbH ở trẻ em Việt Nam. Bước đầu tìm hiểu tần suất bệnh alpha thalassemia ở Hà Nội”. Đây là nghiên cứu đầu tiên trên đối tượng bệnh nhân HbH. Tuy nhiên, tại thời điểm nghiên cứu, chưa có sự ứng dụng của sinh học phân tử để xác định kiểu gen của bệnh [8].

Năm 2005, Trần Thủy Ngân đã ứng dụng kỹ thuật PCR để xác định kiểu gen α -thalassemia trong vùng dịch tễ sốt rét của tỉnh Bình Phước [80].

Từ năm 2008 đến 2013, Nguyễn Khắc Hân Hoan đã tiến hành nghiên cứu: “Nghiên cứu tầm soát và chẩn đoán trước sinh bệnh α và β thalassemia”. Nghiên cứu tiến hành trên đối tượng là các phụ nữ mang thai. Khi người vợ và người chồng có kết quả tầm soát huyết đồ nghi ngờ là người mang gen bệnh thalassemia, được thực hiện xét nghiệm di truyền phân tử để khẳng định, tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh [81].

Năm 2010, Lý Thị Thanh Hà và cộng sự đã tiến hành ứng dụng kỹ thuật GAP PCR và ARMS PCR trong phát hiện đột biến gen α globin trên các bệnh nhân mắc HbH tại Bệnh Viện Nhi Trung Ương, và chẩn đoán trước sinh [82].

Từ năm 2013 đến 2015, Ngô Diễm Ngọc và cộng sự đã ứng dụng các kỹ thuật MLPA, giải trình tự gen Sanger để phát hiện các đột biến hiếm gặp trên gen α globin, nghiên cứu về mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh α -thalassemia trên các bệnh nhân đến khám và điều trị tại Bệnh Viện Nhi Trung Ương, tiến tới sàng lọc người mang gen bệnh, tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia, bao gồm bệnh phù thai Hb Bart's và HbH thể nặng trên các cặp vợ chồng nguy cơ cao sinh con mắc bệnh [10, 83].

Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào đề cập đến mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình trên bệnh nhân HbH. Với kiểu hình đa dạng ở cùng thể bệnh, hoặc ở cùng một kiểu gen, là một khó khăn cho tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh. Thông tin từ nghiên cứu này sẽ góp phần có được những hiểu biết, những bằng chứng rõ hơn về mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình, giúp đưa ra các can thiệp y tế, điều trị, tư vấn và phòng bệnh hiệu quả hơn.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại Bệnh Viện Nhi Trung Ương trong thời gian từ 01/2012 đến tháng 12/2016.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Nhóm đối tượng cho mục tiêu 1 phát hiện một số đột biến gen α -thalassemia bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Bệnh nhân trẻ em và người lớn có biểu hiện lâm sàng nghi ngờ mắc bệnh α -thalassemia, hoặc người nghi ngờ mang gen bệnh α -thalassemia, đến khám và xét nghiệm tại Bệnh Viện Nhi Trung Ương.

2.2.2. Nhóm đối tượng cho mục tiêu 2 nhận xét biểu hiện lâm sàng và kiểu gen của bệnh nhân HbH

Bệnh nhân trẻ em và người lớn có biểu hiện lâm sàng nghi ngờ mắc α -thalassemia đã được chẩn đoán xác định mắc HbH bằng kỹ thuật sinh học phân tử, phát hiện đột biến gây bệnh trên gen α globin.

2.2.3. Nhóm đối tượng cho mục tiêu 3 chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

Các cặp vợ chồng có:

- Phù thai hoặc đã từng có tiền sử phù thai được chẩn đoán bằng siêu âm tại các Bệnh Viện Phụ Sản.

- Có con trước đó đã được chẩn đoán mắc bệnh HbH.

Đã được chẩn đoán xác định là người mang gen α -thalassemia bằng kỹ thuật sinh học phân tử PCR, MLPA và giải trình tự gen Sanger.

2.3. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân

Theo tiêu chuẩn của tổ chức Thalassemia quốc tế TIF 2003 [61].

2.3.1. Tiêu chuẩn chọn đối tượng cho mục tiêu 1 phát hiện một số đột biến gen α -thalassemia bằng kỹ thuật sinh học phân tử

- Có thể có tan máu, thiếu máu ở các mức độ: nhẹ, trung bình và nặng.
- Hồng cầu nhỏ nhược sắc. Hb 2,6-13,3g/dl; MCV<80fl, MCH<27pg.
- Điện di Hemoglobin có HbA2 giảm nhẹ hoặc bình thường, có HbH 0,8-40%, đôi khi kèm theo Hb Bart's.
- Có thể có gan lách to.
- Vàng da xuất hiện ở nhiều mức độ khác nhau.
- Có thể có bộ mặt thalassemia: mũi tẹt, trán dô, hàm vẩu.
- Có thể có tiền sử truyền máu hoặc chưa từng phải truyền máu.

2.3.2. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng cho mục tiêu 2 nhận xét biểu hiện lâm sàng và kiểu gen của bệnh nhân HbH.

Bệnh nhân trẻ em và người lớn có biểu hiện lâm sàng nghi ngờ mắc α -thalassemia đã được chẩn đoán xác định mắc HbH bằng xét nghiệm di truyền, phát hiện đột biến gây bệnh trên gen α globin.

2.3.3. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng cho mục tiêu 3 chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

- *Sàng lọc và chẩn đoán xác định người mang gen bệnh:*
 - Cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc HbH, có thai lần tiếp theo có nguyện vọng chẩn đoán trước sinh.
 - Cặp vợ chồng có thai bị phù hoặc đã có tiền sử phù thai được chẩn đoán bằng siêu âm tại Bệnh Viện Phụ Sản.
 - Vợ và chồng được chẩn đoán xác định có đột biến gen α -thalassemia.
- *Chẩn đoán trước sinh bệnh Hb Bart's và HbH:*

Sản phụ có thai từ 16 tuần trở lên, không có nguy cơ sảy thai, được tư vấn về thủ thuật và chẩn đoán thalassemia, chấp thuận và ký cam kết chọn lọc.

2.3.4. Tiêu chuẩn loại trừ

Mục tiêu 1: Bệnh nhân thiếu máu do các nguyên nhân khác như thiếu máu thiếu sắt, bệnh β thalassemia.

Mục tiêu 2: Bệnh nhân không phát hiện có đột biến gen gây bệnh trên gen α globin.

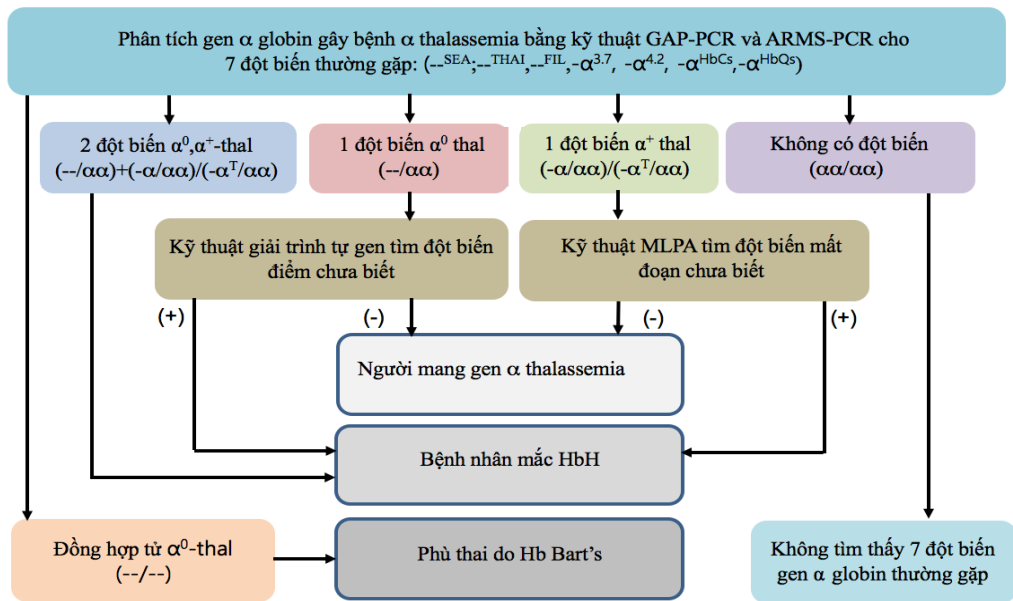
Mục tiêu 3: Cặp vợ chồng chưa chẩn đoán xác định là người mang gen bệnh α -thalassemia. Cặp vợ chồng từ chối tham gia sàng lọc và chẩn đoán trước sinh. Sản phụ có thai dưới 16 tuần hoặc có các nguy cơ sản khoa có thể ảnh hưởng tới sự an toàn của thủ thuật chọc ối.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

2.4.1. Mục tiêu 1

2.4.1.1. Ứng dụng quy trình kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện một số đột biến gen α globin gây bệnh α thalassemia

Bệnh nhân nghi ngờ mắc α -thalassemia trên lâm sàng sẽ được tiến hành phân tích gen α globin tại Khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh Viện Nhi Trung Ương theo các bước như sau:



Hình 2.1. Sơ đồ phân tích gen α globin bằng kỹ thuật sinh học phân tử

2.4.1.2. Đối chiếu kết quả phân tích gen α globin bằng kỹ thuật PCR với kỹ thuật giải trình tự gen và MLPA

- Chọn ngẫu nhiên 1 mẫu bình thường không có đột biến và 3 mẫu dương tính với các đột biến mất đoạn lần lượt là ($-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$), ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) đã được phát hiện bằng kỹ thuật GAP-PCR để đối chiếu với kỹ thuật MLPA.

- Chọn ngẫu nhiên 1 mẫu bình thường không có đột biến và 2 mẫu dương tính với các đột biến điểm ($-\alpha^{HbQs}/\alpha\alpha$), ($-\alpha^{HbCs}/\alpha\alpha$) đã được phát hiện bằng kỹ thuật ARMS-PCR để đối chiếu kết quả bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

2.4.1.3. Nhận xét về tỷ lệ đột biến gen α globin trên bệnh nhân HbH trong nghiên cứu

- Tỷ lệ các đột biến thường gặp và hiếm gặp trên bệnh nhân HbH trong nghiên cứu.

- Tỷ lệ các allel đột biến thường gặp và hiếm gặp trên bệnh nhân HbH trong nghiên cứu.

2.4.2. Mục tiêu 2

Nghiên cứu cắt ngang và mô tả. So sánh một số đặc điểm lâm sàng và huyết học của các kiểu gen của bệnh HbH.

2.4.3. Mục tiêu 3

2.4.3.1. *Nghiên cứu cắt ngang*: Nghiên cứu trên các cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc bệnh HbH, có thai lần tiếp theo có nhu cầu chẩn đoán trước sinh.

2.4.3.2. *Nghiên cứu tiến cứu*:

Nghiên cứu trên các cặp vợ chồng có tiền sử phù thai hoặc đang có thai bị phù, chưa xác định được nguyên nhân phù thai, được tư vấn và tiếp tục quá trình sàng lọc và chẩn đoán bệnh thalassemia:

- Các cặp vợ chồng này được lấy mẫu xét nghiệm công thức máu và điện di huyết sắc tố, nếu cả hai vợ chồng cùng có $MCV < 80\text{fL}$ và $MCH < 27\text{pg}$, HbA2 giảm nhẹ hoặc bình thường, thì cặp vợ chồng được tư vấn làm xét nghiệm di truyền xác định đột biến gen α globin, và được đưa vào nhóm đối tượng nguy cơ cao cho chẩn đoán trước sinh.

- Các cặp vợ chồng có thai bị phù hoặc có tiền sử phù thai mà không có thay đổi về huyết học, cũng được làm xét nghiệm di truyền xác định đột biến gen α -thalassemia để khẳng định tình trạng không mang gen bệnh.

2.5. Cỡ mẫu

Thu thập tất cả các bệnh nhân trẻ em và người lớn, có đủ tiêu chuẩn nghiên cứu trong thời gian nghiên cứu được tiến hành tại Bệnh Viện Nhi Trung Ương, bao gồm:

- 299 bệnh nhân trẻ em và người lớn nghi ngờ mắc α thalassemia trên lâm sàng, được phân tích gen α globin bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

- 97 bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc bệnh HbH bằng phân tích đột biến gen α globin, trong đó có 86 bệnh nhi và 11 bệnh nhân là người trưởng thành.

- 341 cặp vợ chồng có thai bị phù và 56 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc HbH được sàng lọc, xác định người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh α thalassemia.

2.6. Mẫu bệnh phẩm

•Nhóm mục tiêu 1 và 2:

- Bệnh nhân được lấy 2ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA.

- Người nhà bệnh nhân gồm bố, mẹ trong trường hợp bệnh nhân là trẻ em được lấy 2ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA. Quy trình đảm bảo vô trùng.

•Nhóm mục tiêu 3:

- *Sàng lọc bệnh thalassemia:* Mẫu bệnh phẩm là 2 ống máu ngoại vi, mỗi ống gồm 2ml máu tĩnh mạch chống đông EDTA: ống 1 được thực hiện các xét nghiệm huyết học, ống 2 được thực hiện xét nghiệm phân tích gen α -thalassemia.

- *Chẩn đoán trước sinh:* 12-15ml dịch ối được chọc hút từ buồng ối của sản phụ mang thai >16 tuần. Quy trình được thực hiện tại các cơ sở Sản Khoa, dưới hướng dẫn của siêu âm. Quy trình đảm bảo vô trùng.

2.7. Nội dung nghiên cứu

2.7.1. Đặc điểm lâm sàng và huyết học của các bệnh nhân HbH

2.7.1.1. Lâm sàng

- Hỏi bệnh sử và tiền sử gia đình: Tuổi vào viện, tuổi bắt đầu truyền máu, số lần truyền máu, tiền sử gia đình, số anh chị em bị bệnh

- Thu thập các dấu hiệu lâm sàng: Tuổi, giới, các dấu hiệu da niêm mạc, gan lách to, bộ mặt thalassemia.

2.7.1.2. Các xét nghiệm huyết học

- Bao gồm các xét nghiệm huyết học thông thường và một số xét nghiệm đặc hiệu cho thiếu máu tan máu do bệnh Hb, được thực hiện trên máy đếm tự động K4000, tại Khoa Xét nghiệm huyết học, Bệnh Viện Nhi TU.

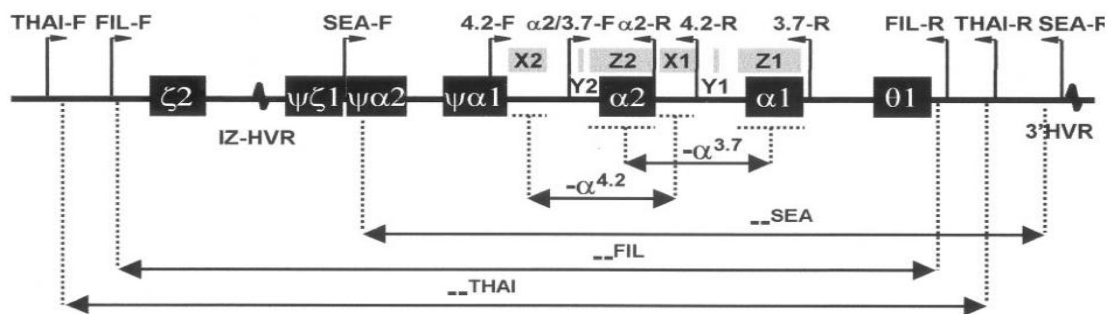
- Các chỉ số thu thập: RBCx10¹²/dL, HGB(g/dL), HCT(%), MCV(fL), MCH(pg), MCHC(%), HbA1(%), HbA2(%), các Hb khác nếu có.

2.7.2. Quy trình phát hiện đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia

2.7.2.1. Kỹ thuật GAP-PCR phát hiện 5 đột biến --^{SEA}, - α ^{3.7}, - α ^{4.2}, --^{FIL}, --^{THAI}

• Nguyên lý kỹ thuật

GAP-PCR là phương pháp được thiết lập để xác định các mất đoạn lớn, sử dụng hai môi theo nguyên tắc bổ sung với mạch xuôi và mạch ngược trong vùng DNA chứa đoạn gen bị mất. Đối với bệnh α -thalassemia, 5 loại đột biến mất đoạn lớn thường gặp được phát hiện bằng kỹ thuật này là --^{SEA}, - α ^{3.7}, - α ^{4.2}, -- α ^{FIL}, --^{THAI}.



Hình 2.2. Cặp môi cho đột biến 5 đột biến mất đoạn thường gặp trên gen α globin

- *Quy trình kỹ thuật*

Bằng kỹ thuật GAP-PCR đa môi, với việc sử dụng năm cặp môi khác nhau (SEA-F; SEA-R); (FIL-F; FIL-R), (THAI-F; THAI-R), ($\alpha^{3.7}$ -F; $\alpha^{3.7}$ -R); ($\alpha^{4.2}$ -F; $\alpha^{4.2}$ -R), được thiết kế theo nguyên tắc bổ sung với mạch xuôi và mạch ngược trong vùng DNA chứa đoạn gen bị mất, để phát hiện các đột biến trên ở các kích thước tương ứng là 1349bp, 1166bp, 1024bp, 2022bp, 1628bp, theo nghiên cứu của Samuel Chong [43]. Ngoài ra, gen $\alpha 2$ cũng được khuếch đại bằng cặp môi ($\alpha 2$ -R; $\alpha 2/3.7$ -F) có kích thước 1800bp để sử dụng làm đoạn chứng gen $\alpha 2$ bình thường.

Bảng 2.1. Trình tự môi và kích thước của 5 đột biến thường gặp [43]

Tên môi	Trình tự 5'-3'	Kích thước
$\alpha 2/3.7$ -F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	2022bp
3.7-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	
$\alpha 2/3.7$ -F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	1800bp
$\alpha 2$ -R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	1628bp
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTCC	
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	1349bp
SEA-R	AGCCCACGTTGTGTTTCATGGC	
FIL-F	TGCAAATATGTTTCTCTCATTCTGTG	1166bp
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	
THAI-F	GGCACTGAGAGCCCTTCACG	1024bp
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	

Bảng 2.2. Các thông số của phản ứng GAP-PCR của 5 đột biến thường gặp

Thành phần phản ứng		Thể tích (ul)	
PCR Multiplex master mix 2X		12.5	
Primer 10X		2.5	
dH ₂ O		7.5	
DMSO (10%)		1.5	
DNA		1	
Tổng		25	
Chu trình nhiệt			
1.	95 ⁰ C	x 15 phút	x 1 chu kỳ
2.	95 ⁰ C	x 40 giây	} x 36 chu kỳ
	65 ⁰ C	x 1 phút 30 giây	
	72 ⁰ C	x 2 phút 30 giây	
3.	72 ⁰ C	x 10 phút	x 1 chu kỳ
4.	4 ⁰ C	x giữ vô hạn	

• Điện di sản phẩm PCR và phân tích kết quả

Quy trình phân tích gen HbA1 và HbA2 của gen α globin được thực hiện theo phương pháp của Samuel S. Chong [43], trong đó, đột biến $--\alpha^{\text{THAI}}$ được mô tả bởi Winichagoon [84] lần đầu tiên trên quần thể của người Thailand.

- Người bình thường không có đột biến, hình ảnh điện di có 1 băng tương ứng với đồng hợp tử gen $\alpha 2$ ở kích thước 1800 bp.

- Nếu bệnh nhân dị hợp tử với 1 đột biến, hình ảnh điện di sẽ có 2 băng, trong đó một băng tương ứng với dị hợp tử gen $\alpha 2$ ở kích thước 1800bp, băng còn lại tương ứng với loại đột biến dị hợp tử mà bệnh nhân có, ở các kích thước tương ứng:

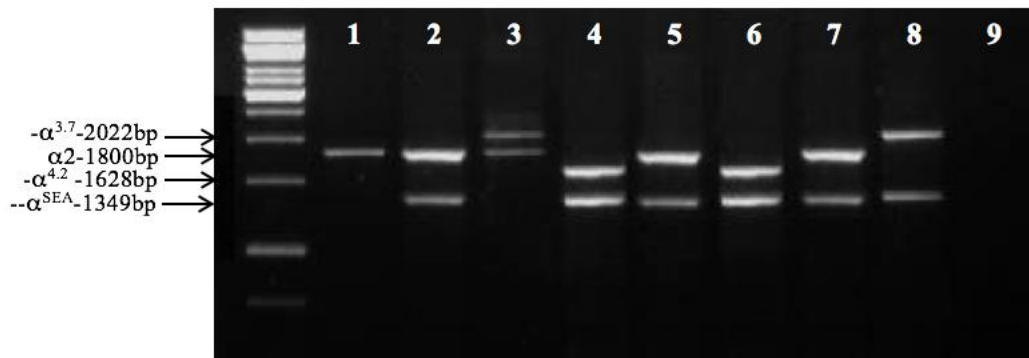
- 1394 bp, tương ứng với đột biến mất đoạn $--\alpha^{\text{SEA}}$.
- 2022 bp, tương ứng với đột biến mất đoạn $-\alpha^{3.7}$.

- 1628 bp, tương ứng với đột biến mất đoạn $-\alpha^{4.2}$.
- 1166 bp, tương ứng với đột biến mất đoạn $--\alpha^{\text{THAI}}$.
- 1024 bp, tương ứng với đột biến mất đoạn $--\alpha^{\text{FIL}}$.

- Nếu bệnh nhân dị hợp tử kép với 2 đột biến, hình ảnh điện di sẽ có 2 băng tương ứng với 2 loại đột biến khác nhau.

- Nếu bệnh nhân đồng hợp tử đột biến mất đoạn 2 gen, hình ảnh điện di sẽ không có băng.

- Nếu bệnh nhân đồng hợp tử đột biến mất đoạn 1 gen, hình ảnh điện di sẽ có 1 băng ở kích thước tương ứng với vị trí của đột biến đó.



Hình 2.3. Hình ảnh điện di GAP-PCR phân tích đột biến gen α globin

Hình 2.3 là hình ảnh điện di sản phẩm Multiplex - GAP - PCR đa môi cho 5 đột biến mất đoạn thường gặp. Trong đó:

- M là Maker 1kp.

- Giếng số 1: Mẫu chứng bình thường, có 1 băng ở vị trí gen $\alpha 2$.

- Giếng số 2: Mẫu chứng dị hợp tử đột biến $--\alpha^{\text{SEA}}$. Có 2 băng, trong đó 1 băng ở vị trí gen $\alpha 2$ bình thường (1800bp), 1 băng ở vị trí gen $\alpha 2$ bị đột biến mất đoạn (1349bp) tạo đột biến $--\alpha^{\text{SEA}}$.

- Giếng số 3: Mẫu chứng dị hợp tử đột biến $-\alpha^{3.7}$. Có 2 băng, trong đó 1 băng ở vị trí gen $\alpha 2$ bình thường (1800bp), 1 băng ở vị trí gen $\alpha 2$ bị đột biến mất đoạn (2022bp) tạo đột biến $-\alpha^{3.7}$.

- Giếng số 4: Mẫu chứng bệnh $--\alpha^{SEA}/-\alpha^{4.2}$. Có 2 băng, trong đó 1 băng ở vị trí đột biến $--\alpha^{SEA}$ (1349bp), 1 băng ở vị trí đột biến $-\alpha^{4.2}$ (1628bp).

- Giếng số 5, 7: Bệnh nhân dị hợp tử đột biến $--\alpha^{SEA}$.

- Giếng số 6: Bệnh nhân HbH đột biến $--\alpha^{SEA}/-\alpha^{4.2}$.

- Giếng số 8: Bệnh nhân HbH đột biến đột biến $--\alpha^{SEA}/-\alpha^{3.7}$.

- Giếng số 9: Mẫu không chứa DNA.

2.7.2.2. Kỹ thuật ARMS-PCR phát hiện 2 đột biến điểm $-\alpha^{HbCs}$ và $-\alpha^{HbQs}$

• Nguyên lý kỹ thuật

Kỹ thuật ARMS-PCR được sử dụng để phát hiện các đột biến điểm đã biết, dựa trên nguyên lý của kỹ thuật PCR cổ điển, trong đó allen đột biến và allen bình thường được phân biệt bằng các cặp mồi được thiết kế chọn lọc. Đối với bệnh α -thalassemia, 2 loại đột biến điểm thường gặp được phát hiện bằng kỹ thuật này là $-\alpha^{HbCs}$ và $-\alpha^{HbQs}$.

Bảng 2.3. Trình tự mồi và kích thước của 2 đột biến điểm thường gặp [43]

Tên	Trình tự mồi	Kích thước
CS-1	5'-CCT-GGGCCGCACTGACCCTATT-3'	
CS-M	5'-AGGAG-GAACGGCTACCGAGGCTCCAGATTG-3'	183 bp
QS-M	5'-CGGTGCTCACAGAAGCCAGGAACTT-GGCCG-3'	
CS-N	5'-AGGAGGAACGGCTACCGAG-GCTCCAGATTA-3'	138bp
QS-N	5'-CGGTGCT-CACAGAAGCCAGGAACTTGGCCA-3'	

- Quy trình kỹ thuật

Bảng 2.4. Các thông số của phản ứng ARMS-PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích (ul)	
dH ₂ O	8,8	
PCR Multiplex master mix 2X	12,5	
DMSO 10%	1,5	
Môi xuôi CS-1 (10uM)	0,4	
Môi ngược CS-N/QS-N (10uM)	0,6	
Môi ngược QS-M/CS-M (10uM)	0,2	
DNA	1	
Tổng thể tích	25	
Chu trình nhiệt		
1. 94 ⁰ C	x 4 phút	x 1 chu kỳ
2. 94 ⁰ C	x 1 phút	} x 36 chu kỳ
66 ⁰ C	x 1 phút	
72 ⁰ C	x 2 phút	
3. 72 ⁰ C	x 7 phút	x 1 chu kỳ
4. 4 ⁰ C	x giữ vô hạn	

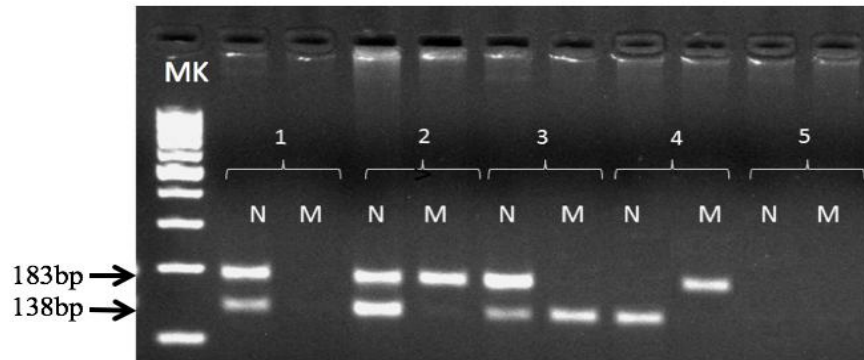
- Điện di sản phẩm ARMS - PCR và phân tích kết quả

Quy trình phân tích được thực hiện theo phương pháp của Samuel S. Chong [43]. Trên hình ảnh điện di sản phẩm ARMS - PCR, mỗi mẫu bao gồm 2 giếng: N là giếng bình thường và M là giếng đột biến. Dựa trên sự có mặt của băng ở vị trí tương ứng với đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ (183bp) hoặc $-\alpha^{\text{HbQs}}$ (138bp), ở giếng bình thường hay giếng đột biến, có các dạng như sau:

- Ở người bình thường, tại giếng bình thường sẽ xuất hiện cả 2 băng ở vị trí đột biến ($-\alpha^{\text{HbCs}}$) hoặc ($-\alpha^{\text{HbQs}}$). Ở giếng đột biến không xuất hiện băng.

- Ở người dị hợp tử với đột biến ($-\alpha^{\text{HbCs}}$) hoặc ($-\alpha^{\text{HbQs}}$), ở giếng bình thường và giếng đột biến đều xuất hiện băng ở vị trí đột biến ($-\alpha^{\text{HbCs}}$) hoặc ($-\alpha^{\text{HbQs}}$).

- Ở người bệnh HbH dị hợp tử kép với đột biến ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$) hoặc ($--\alpha^{SEA}/-\alpha^{HbQs}$), ở giếng bình thường không xuất hiện băng, ở giếng đột biến xuất hiện băng ở vị trí đột biến ($-\alpha^{HbCs}$) hoặc ($-\alpha^{HbQs}$).



Hình 2.4. Hình ảnh điện di ARMS - PCR phân tích đột biến gen α globin

Hình 2.4 là hình ảnh điện di sản phẩm ARMS-PCR cho 2 đột biến điểm thường gặp. Trong đó:

- M: Marker 100bp.
- Mẫu số 1: Mẫu chứng bình thường. Giếng bình thường có 2 băng ở vị trí đột biến $-\alpha^{HbCs}$ (183bp) và $-\alpha^{HbQs}$ (138bp), giếng đột biến không có băng.
- Mẫu số 2: Mẫu chứng dị hợp đột biến $-\alpha^{HbCs}$. Giếng bình thường có hai băng ở vị trí đột biến $-\alpha^{HbCs}$ (183bp) và $-\alpha^{HbQs}$ (138bp), giếng đột biến có một băng ở vị trí đột biến $-\alpha^{HbCs}$ (183bp).
- Mẫu số 3: Chứng dị hợp $-\alpha^{HbQs}$. Giếng bình thường có hai băng ở vị trí đột biến $-\alpha^{HbCs}$ (183bp) và $-\alpha^{HbQs}$ (138bp), giếng đột biến có một băng ở vị trí đột biến $-\alpha^{HbQs}$ (138bp).
- Mẫu số 4: DNA thai dị hợp tử $-\alpha^{HbQs}$.
- Mẫu số 5: Mẫu không chứa DNA.

2.7.2.3. Kỹ thuật giải trình tự gen Sanger xác định đột biến điểm trên gen α globin

• Nguyên lý kỹ thuật

Phương pháp này cho phép xác định hầu hết các đột biến điểm, đột biến mất đoạn nhỏ hoặc lặp đoạn của gen. Đối với bệnh α -thalassemia, các vùng được giải trình tự bao gồm: các vùng mã hóa trên gen HbA1, HbA2, vùng ranh giới exon-intron, vùng cận promoter.

• *Phản ứng PCR môi đôi khuếch đại toàn bộ gen HbA1 và HbA2.*

- Phản ứng khuếch đại toàn bộ gen HbA1 sẽ sử dụng cặp môi AT-C1F và AT-C9R để bắt cặp toàn bộ gen HbA1 (1084bp).

- Phản ứng khuếch đại toàn bộ gen HbA2 sẽ sử dụng cặp môi AT-C1F và AT-C3R để bắt cặp toàn bộ gen HbA2 (1078bp).

Bảng 2.5. Trình tự môi của kỹ thuật giải trình tự gen HbA1 và HbA2 [85]

Tên môi	Trình tự 5'-3'
AT - C1 (F):	5' - TGGAGGGTGGAGACGTCCTG -3'
AT - C7 (F):	5' - GATGTTCCTGTCCTTCCCCA-3'
AT - R4 (F):	5' - AGCCACTGCCTGCTGGTGAC -3'
AT - C9 (R):	5' - CCATGCCTGGCACGTTCTCTGAGG -3'
AT - C3 (R):	5' - CCATTGTTGGCACATTCCGG - 3'
AT - IP3 (R):	5' - ACCATACTCGCCAGCGTGCGC -3'
AT - C5 (R):	5' - CGCGTCGGCCACCTTCTTGC-3'
AT - IP2 (R):	5' -TGTGCGCGTGCAGGTCGCTCA -3'

Bảng 2.6. Các thông số phản ứng PCR của kỹ thuật giải trình tự gen

Thành phần phản ứng	Thể tích (ul)	
2X PCR master mix	25	
DMSO 10%	2,5	
Môi xuôi (10µl)	1	
Môi ngược (10µl)	1	
dH ₂ O	19,5	
DNA	1	
Tổng	50	
Chu trình nhiệt		
1. 94 ⁰ C	x 15 phút	x 1 chu kỳ
2. 94 ⁰ C	x 40 giây	} x 32 chu kỳ
59 ⁰ C	x 1 phút 30 giây	
72 ⁰ C	x 2 phút 30 giây	
3. 72 ⁰ C	x 10 phút	x 1 chu kỳ
4. 4 ⁰ C	x giữ vô hạn	

- *Tinh sạch sản phẩm PCR*

- Nhỏ 200µl dung dịch PBI vào mẫu PCR và trộn đều. Chuyển toàn bộ dung dịch trên sang cột lọc 2ml. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Bỏ dịch nổi phía dưới ống lọc.

- Nhỏ 0.75ml dung dịch PE vào cột lọc, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Bỏ dịch nổi ở phía dưới ống lọc. Ly tâm ống 8000 vòng/phút trong 1 phút

- Chuyển cột lọc sang ống eppendorf 1.5ml vô trùng. Thêm 50 µl dung dịch đệm EB, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút.

- *PCR mỗi đơn*

Trình tự đoạn gene quan tâm được xác định dựa trên nguyên tắc của phương pháp Sanger: tạo ra các đoạn DNA một sợi hơn kém nhau một nucleotide, kết thúc bởi các ddNTP đã được đánh dấu huỳnh quang. Để tạo ra các đoạn kết thúc bằng các loại ddNTP khác nhau, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR sử dụng hoá chất BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Do đó chỉ cần bổ sung thêm DNA khuôn (là sản phẩm PCR tinh sạch) và môi phù hợp. Phản ứng được thực hiện trong một ống vì bốn loại ddNTP được đánh dấu bằng các màu khác nhau.

- *Tủa cặn*

Phản ứng PCR mỗi đơn sau khi được tiến hành xong sẽ được tủa cặn để chạy giải trình tự gen.

- Nhỏ 5µl dung dịch EDTA 125mM vào mỗi ống. Thêm 60µl dung dịch EtOH 100% rồi trộn đều. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Ly tâm 14000 vòng/ phút trong 30 phút. Bỏ dịch nổi.

- Thêm 60µl dung dịch EtOH 70% rồi trộn đều. Ly tâm 14000 vòng/ phút trong 15 phút. Bỏ dịch nổi. Để các mẫu khô, tránh ánh sáng. Nhỏ 20µl dung dịch Hidi. Cho mẫu vào máy PCR, gia nhiệt đến 95⁰C trong 5 phút.

- Tra 20µl mẫu vào từng giếng trên khay điện di. Đặt chương trình chạy máy

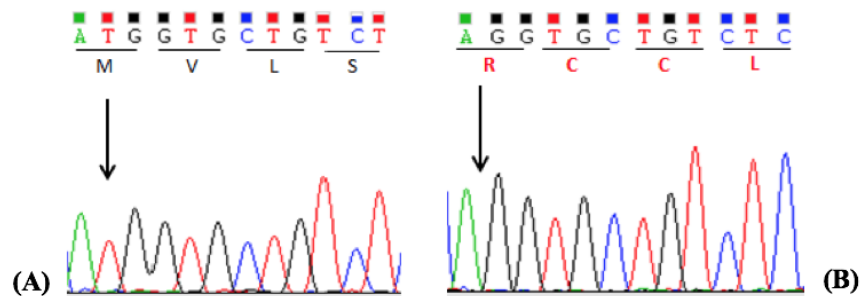
Bảng 2.7. Các thông số của phản ứng PCR môi đơn

Thành phần phản ứng		Thể tích (ul)
BigDye v3.1		2
5X BigDye Sequencing buffer		5
Primer 10 μ M		1
dH ₂ O		16
Sản phẩm PCR (10-40ng)		1
Tổng		25
Chu trình nhiệt		
1.	96 ⁰ C	x 15 phút
2.	96 ⁰ C	x 40 giây
	50 ⁰ C	x 1 phút 30 giây
	60 ⁰ C	x 2 phút 30 giây
3.	4 ⁰ C	x giữ vô hạn
		x 1 chu kỳ
		x 25 chu kỳ

• Phân tích trình tự gen

- Các mẫu giải trình tự gene được phân tích trên phần mềm Chromas để ghép nối các trình tự nhỏ thành trình tự của gen HBA1 và HBA2

- Sau đó, trình tự này sẽ được đưa lên chương trình Blast để so sánh với trình tự chuẩn trên ngân hàng gen.



Hình 2.5. Giải trình tự gen α globin phát hiện đột biến điểm c.2delT (p.Met1Argfs)

- Hình 2.5 (A) là trình tự của người bình thường.

- Hình 2.5 (B) là trình tự của người mang đột biến mất nucleotid T tại mã mở đầu exon exon 1 gen $\alpha 2$ (Init ATG>A-T), tạo đột biến dịch khung (p.Met1Argfs).

2.7.2.4. Kỹ thuật MLPA xác định đột biến mất đoạn trên gen α globin

• Nguyên lý kỹ thuật

Trong phản ứng MLPA, các probe được thiết kế gắn đặc hiệu với các đoạn DNA đích. Thông thường, mỗi probe chứa hai phân tử oligonucleotid có kích thước khác nhau.

- Phân tử oligonucleotid ngắn gồm 2 đoạn:

- Đoạn 1 có trình tự nucleotid đặc hiệu với đoạn DNA đích, sẽ lai với DNA đích trong phản ứng lai. Đoạn này có khoảng 21-30 nucleotid nằm ở đầu 3' của probe
- Đoạn 2 chứa khoảng 19 nucleotid, nằm ở đầu 5' của probe. Trình tự nucleotid của đoạn này giống nhau cho tất cả các probe. Đây là vị trí gắn với môi Y để khuếch đại probe khi tiến hành phản ứng PCR.

- Phân tử oligonucleotid dài gồm 3 đoạn:

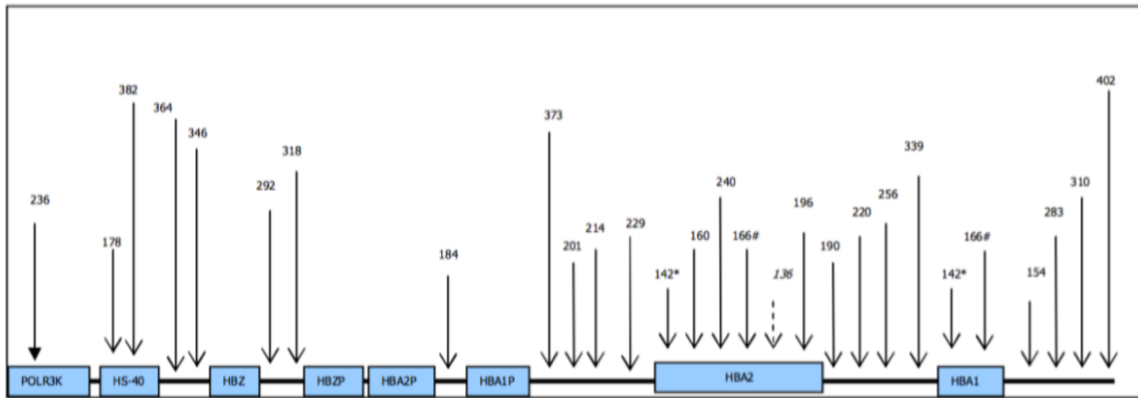
- Đoạn 1' chứa 25-43 nucleotid gắn đặc hiệu với DNA đích ở đầu tận 5'
- Đoạn 2' chứa 36 nucleotid ở đầu 3', trình tự nucleotid giống nhau cho tất cả các probe. Đây là vị trí gắn với môi X đặc hiệu để khuếch đại probe.

- Đoạn 3' còn gọi là đoạn nucleotid đệm (stuffer) nằm giữa hai đoạn 1' và 2', cấu tạo từ 19-370 nucleotid, không đặc hiệu với DNA đích nên nó không bắt cặp với DNA đích. Chiều dài đoạn stuffer khác nhau ở các probe vì vậy các probe sẽ có chiều dài khác nhau, và sẽ phân tách được khi điện di.

Trong mỗi phản ứng chứa các probe nội chuẩn. Khi probe nội chuẩn lên đỉnh tương ứng là điều kiện đảm bảo độ tin cậy khi nhận định kết quả. Ngoài ra, DNA của người bình thường được chạy song song cùng mẫu DNA của bệnh nhân để so sánh đối chứng.

Sau phản ứng PCR, mỗi probe sẽ được khuếch đại thành nhiều bản sao. Các probe khác nhau sẽ có kích thước khác nhau do độ dài đoạn đệm của chúng khác nhau. Do vậy, chúng sẽ được phân tách bằng phương pháp điện di mao quản. Số lượng sản phẩm khuếch đại của mỗi probe sẽ tỷ lệ thuận với số bản sao của đoạn DNA đích đặc hiệu với probe đó.

Hỗn hợp đầu dò trong kit MLPA P140-B3 HBA gồm 27 trình tự khác nhau, nhằm phát hiện các đột biến mất đoạn, lặp đoạn trong vùng gen HBA bao gồm gen HBA1, HBA2 và vùng HS40, có chiều dài khoảng 30kb. Sự mất đoạn sẽ được biểu hiện bằng hình ảnh các đỉnh thấp chỉ bằng 35-50% so với mẫu đối chứng bình thường.



Hình 2.6. Sơ đồ vị trí các probe trên vùng gen HBA của Kit MLPA P140

• **Biến tính và lai các đầu dò:**

- Lấy 5 μ l DNA (50- 200ng DNA) cho vào ống PCR 0,2ml.
- Ủ mẫu theo chu trình 98°Cx5 phút, đợi mẫu giảm nhiệt độ xuống 25°C.
- Thêm 1,5 μ l dung dịch SALSA probemix, 1,5 μ l dung dịch MLPA buffer vào mỗi tube, trộn đều. Ủ mẫu theo chu trình: 95°C x 1 phút; 60°C x 16 giờ.

• **Phản ứng ghép nối:**

- Giảm nhiệt độ mẫu xuống 54°C, ở nhiệt độ này thêm 32 μ l dung dịch Ligase-65 và trộn đều. Ủ mẫu ở 54°C x 15 phút, và 98°C x 5 phút.

- Pha dung dịch Ligation: Pha 3 μ l dung dịch Ligase-65 buffer A, 3 μ l dung dịch Ligase-65 buffer B, 25 μ l dH₂O, 1 μ l dung dịch Ligase-65, trộn đều.

• **Phản ứng PCR:**

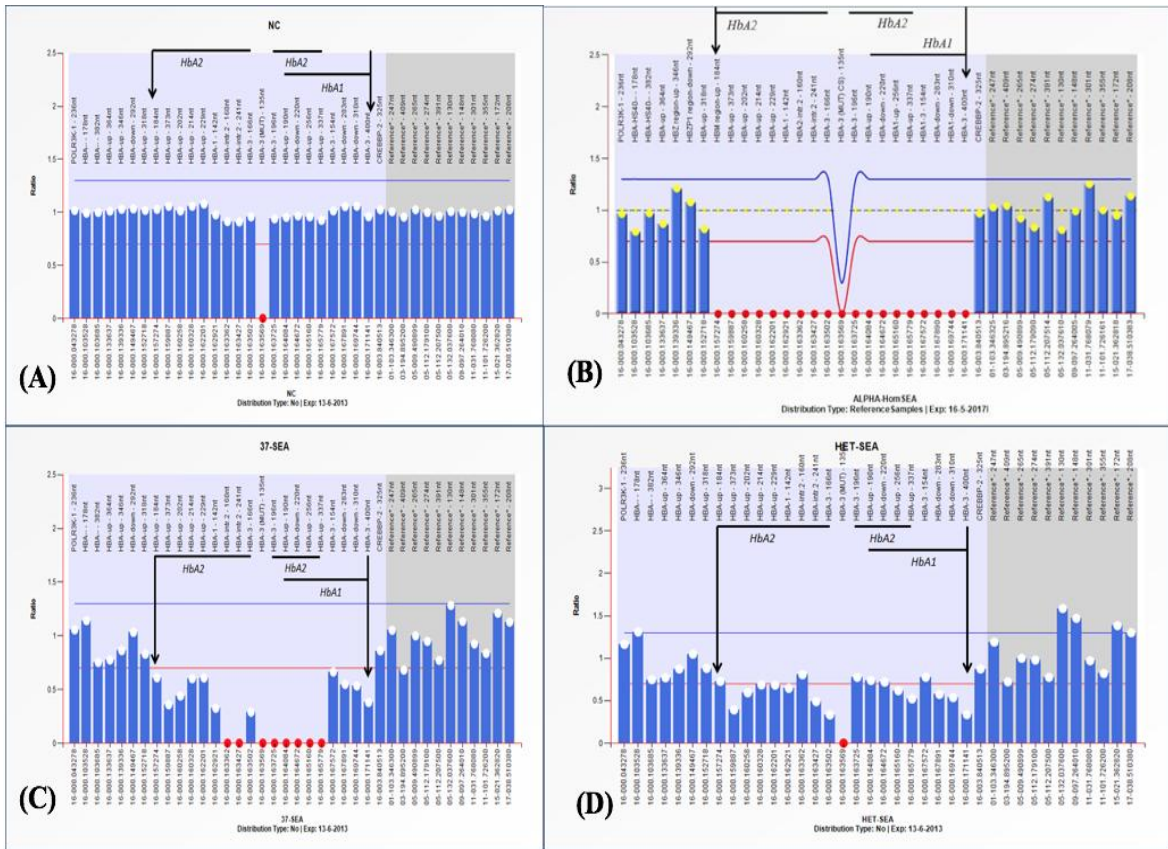
- Trộn hỗn hợp mới: 4 μ l dung dịch SALSA PCR buffer + 26 μ l water + 10 μ l sản phẩm của phản ứng ghép nối trên.

- Pha hỗn hợp dung dịch Polymerase: 2 μ l dung dịch SALSA PCR-primers + 2 μ l dung dịch SALSA Enzyme Dilution buffer + 5,5 μ l dH₂O+ 0,5 μ l SALSA Polymerase.

- Đặt mẫu vào máy gia nhiệt ở nhiệt độ 60°C, thêm 10 μ l hỗn hợp Polymerase vào mỗi tube, sau đó trộn đều và thực hiện phản ứng PCR.

- Chuyển các mẫu vào rack 96 giếng dùng cho máy 3130 Genetic Analyser và phân tích kết quả MLPA bằng phần mềm Coffalyser.

• Phân tích kết quả



Hình 2.7. Hình ảnh MLPA phân tích đột biến gen α globin

- Hình 2.7 (A) là mẫu của người bình thường, các đỉnh của toàn bộ gen α globin đều đạt trên ngưỡng 1.
- Hình 2.7 (B) là mẫu của người đồng hợp tử đột biến mất đoạn hai gen $--\alpha^{SEA}$, các đỉnh trong vùng của hai gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$ ở ngưỡng 0.
- Hình 2.7 (C) là mẫu của người HbH dạng $--\alpha^{SEA}/-\alpha^{3.7}$, bao gồm 2 allen đột biến. Một allen dị hợp tử đột biến mất đoạn 2 gen $--\alpha^{SEA}$, các đỉnh trong vùng đột biến này ở ngưỡng từ 0,5 - 1. Một allen dị hợp tử đột biến mất đoạn 1 gen lệch phải $-\alpha^{3.7}$, tuy nhiên khi kết hợp với allen đột biến mất đoạn 2 gen $--\alpha^{SEA}$, thì đột biến $-\alpha^{3.7}$ xuất hiện ở cả 2 allen, do đó các đỉnh trong vùng đột biến này ở ngưỡng 0.
- Hình 2.7 (D): là mẫu dị hợp tử đột biến mất đoạn 2 gen $--\alpha^{SEA}$, các đỉnh trong vùng đột biến ở ngưỡng 0,5-1.

2.7.3. Nuôi cấy tế bào ối

- *Nguyên lý kỹ thuật*

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào ối có hai mục đích chính: làm tăng số lượng tế bào ối để đáp ứng cho nhu cầu xét nghiệm chẩn đoán, và giúp loại bỏ các tế bào máu mẹ lẫn trong dịch ối, để có được dòng tế bào ối tinh sạch.

- *Nuôi cấy tế bào ối trong chai nuôi cấy*

- Ly tâm ống đựng dịch ối ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 5 phút. Bỏ phần dịch nổi, kiểm tra lại phần cặn tế bào.

- Chuyển toàn bộ dung dịch chứa cặn tế bào ối từ ống vào trong chai có 3ml môi trường nuôi cấy. Đặt chai nuôi cấy vào trong tủ ấm, 5% CO₂, 37°C.

- Thay môi trường lần 1 sau 72h - 96h tùy vào tình trạng bám dính và phát triển của tế bào nuôi cấy qua kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược. Kiểm tra sự phát triển của các cụm tế bào ối để quyết định thời điểm thu hoạch.

- *Thu hoạch tế bào ối từ flask*

- Thông thường thời điểm thu hoạch là sau 8-10 ngày nuôi cấy.

- Hút hết dịch nổi bằng pipet Pasteur nhựa trong chai nuôi cấy và chuyển vào ống ly tâm vô trùng 15ml.

- Cho 2ml Trypsin EDTA 1x vào trong chai nuôi cấy, ủ ở 37°C trong 3 phút.

- Kiểm tra lượng tế bào đã tách khỏi bề mặt chai nuôi cấy dưới kính hiển vi.

- Thêm 1,5ml môi trường nuôi cấy vào để tráng đều bề mặt chai nuôi cấy, và chuyển hết dịch nổi vào ống dịch tế bào ở trên. Ly tâm ống dịch tế bào ở 1800 vòng/phút trong 5 phút. Lặp lại thêm 01 lần nữa.

- Loại bỏ phần dịch nổi đến 200 μ l, chuyển sang bước tách chiết DNA.

2.7.4. Phân tích gen α thalassemia, xác định kiểu gen của thai nhi

Trên cơ sở các đột biến gen đã biết sau khi phân tích gen α globin ở bố và mẹ của thai nhi, DNA của thai nhi sẽ được tiến hành phân tích gen α globin bằng các kỹ thuật sinh học phân tử tương ứng. Nếu thai nhi chỉ mang một trong hai đột biến của bố hoặc mẹ, thì kiểu gen của thai là dị hợp tử một

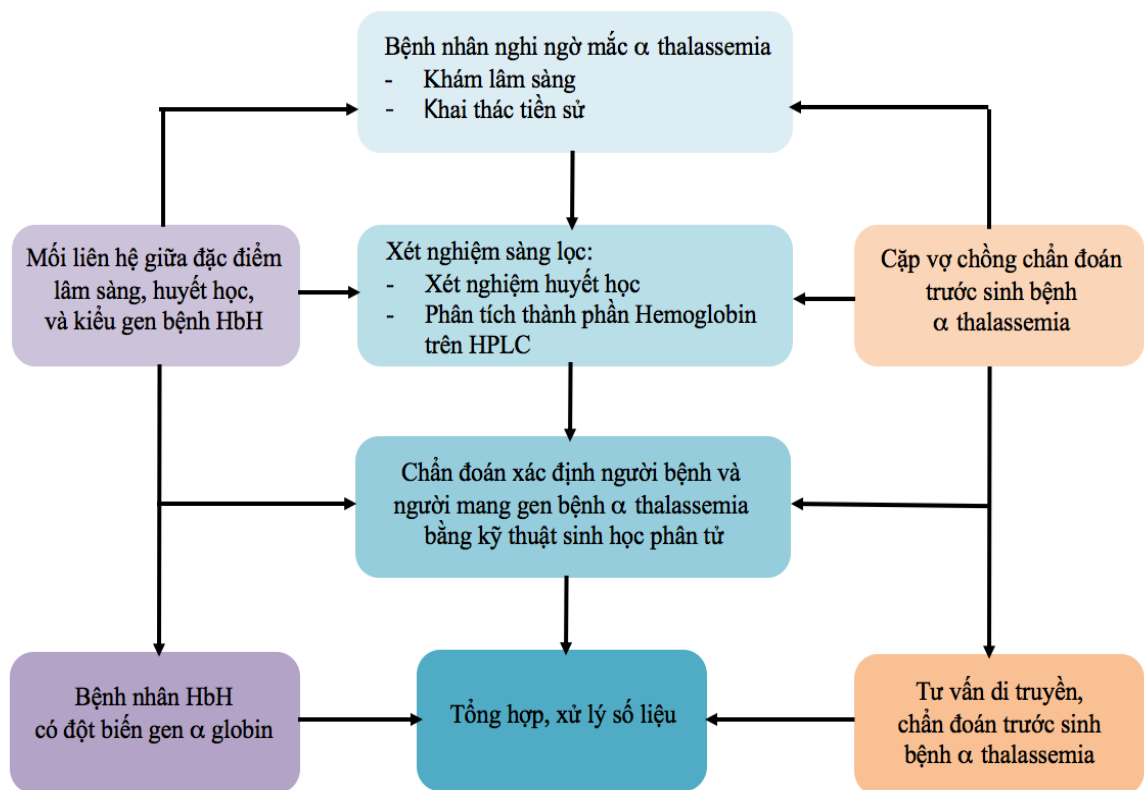
đột biến, hay còn gọi là người mang gen bệnh. Nếu thai nhi không mang đột biến nào của bố hoặc mẹ, thì kiểu gen của thai nhi hoàn toàn bình thường. Nếu thai nhi mang cả hai đột biến của cả bố và mẹ thì thai nhi là thai mắc bệnh. Quy trình phân tích đột biến gen α globin được tiến hành tùy theo loại đột biến đã được phát hiện ở gia đình.

2.8. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành dựa trên sự tự nguyện tham gia của các gia đình có bệnh nhân nghi ngờ mắc α -thalassemia trên lâm sàng, các cặp vợ chồng được xác định là người mang gen bệnh α -thalassemia.

Các xét nghiệm phân tích gen chỉ thực hiện khi có sự đồng ý của bệnh nhân và gia đình bệnh nhân. Các thông tin về bệnh nhân và gia đình bệnh nhân, kết quả chẩn đoán hoàn toàn được bảo mật.

2.9. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.8. Sơ đồ nghiên cứu

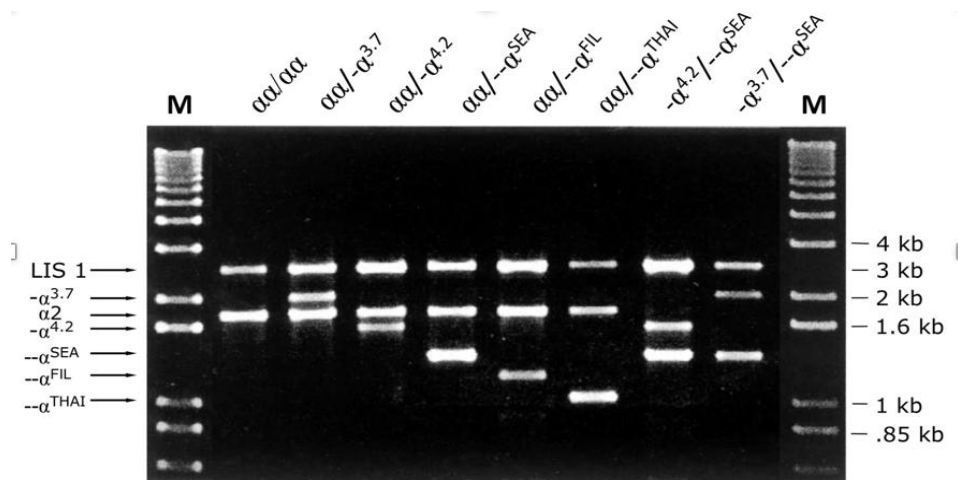
CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phát hiện đột biến gen α globin của người mắc α -thalassemia bằng kỹ thuật PCR, MLPA và giải trình tự gen Sanger

3.1.1. Xác định các đột biến mất đoạn thường gặp trên bệnh nhân HbH bằng kỹ thuật GAP-PCR

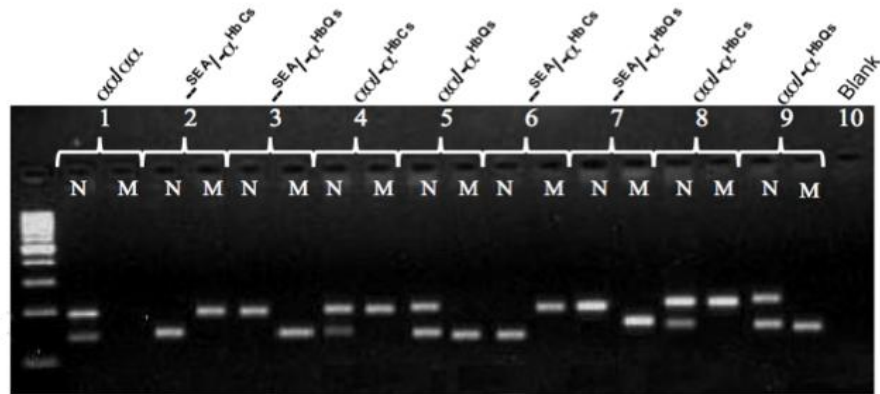
Trong nghiên cứu này, kỹ thuật GAP-PCR được sử dụng để phát hiện 5 đột biến mất đoạn thường gặp của khu vực Đông Nam Á, trong đó có 3 loại đột biến mất đoạn α^0 -thalassemia (mất 2 gen) bao gồm: $--^{SEA}$, $--^{FIL}$, $--^{THAI}$, và 2 loại đột biến mất đoạn α^+ -thalassemia (mất 1 gen) là: $-\alpha^{3.7}$ và $-\alpha^{4.2}$.



Hình 3.1. Điện di sản phẩm GAP-PCR của các bệnh nhân HbH

Nhận xét: M là marker 1 kb. LIS 1 là băng chứng nội kiểm. Mẫu số 1 thể hiện 1 băng tại vị trí 1800 bp tương ứng với gen $\alpha 2$. Mẫu số 2, 3, 4, 5, 6 là mẫu chứng dị hợp tử: $-\alpha^{3.7}$ (2022bp), $-\alpha^{4.2}$ (1628bp), $--\alpha^{SEA}$ (1349bp), $--\alpha^{FIL}$ (1166bp), $--\alpha^{THAI}$ (1024bp), đều có một băng 1800 bp tương ứng với gen $\alpha 2$ bình thường, và một băng ở kích thước tương ứng với từng loại đột biến. Mẫu 7, 8 là của bệnh nhân HbH, lần lượt là $(--\alpha^{SEA}/-\alpha^{4.2})$ và $(--\alpha^{SEA}/-\alpha^{3.7})$, đều có một băng $--\alpha^{SEA}$, và 1 băng còn lại là $-\alpha^{4.2}$, và là $-\alpha^{3.7}$.

3.1.2. Xác định các đột biến điểm thường gặp trên bệnh nhân HbH bằng kỹ thuật ARMS-PCR



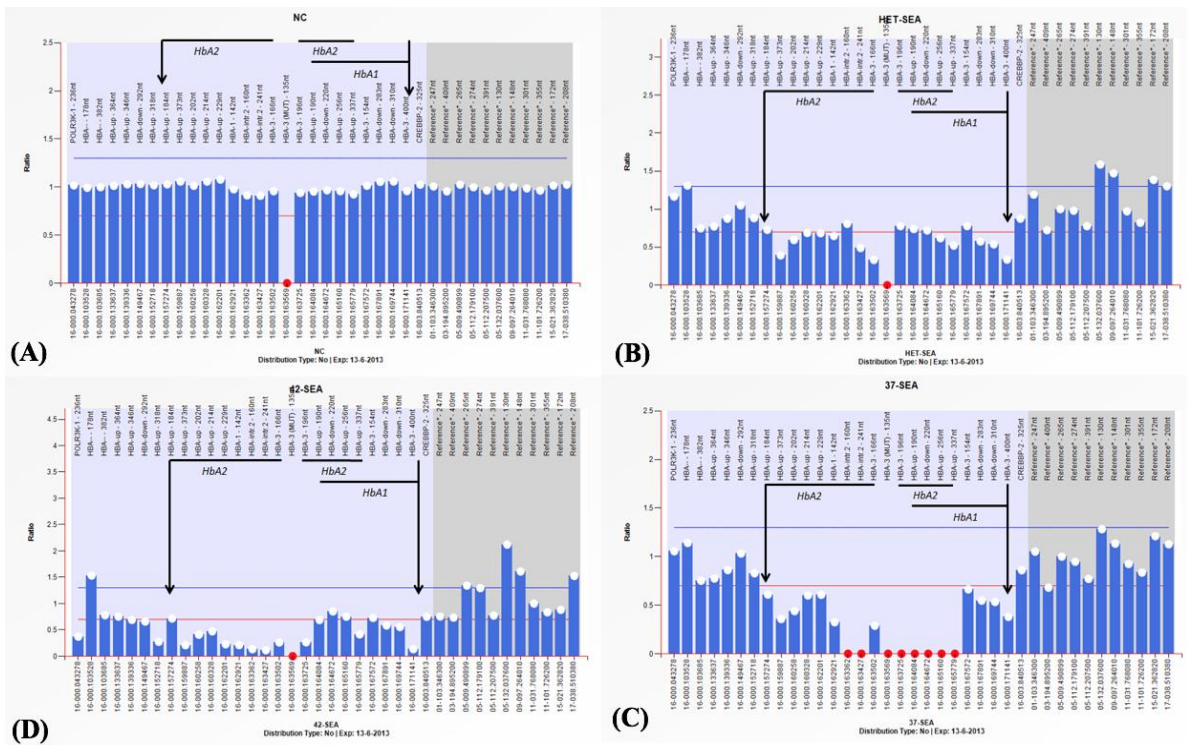
Hình 3.2. Điện di sản phẩm ARMS-PCR của đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ và $-\alpha^{\text{HbQs}}$ trên gen α globin của các bệnh nhân HbH

Nhận xét: (N): Bình thường. (M): Đột biến. Mẫu số 1 là mẫu chứng của người bình thường không mang đột biến, ở giếng bình thường có băng của đột biến HbCs (183bp) và HbQs (138bp), ở giếng đột biến không xuất hiện băng. Mẫu số 2, 3 lần lượt là mẫu chứng của người bệnh HbH ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{HbCs}}$) và ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{HbQs}}$), băng HbCs và HbQs không xuất hiện ở giếng (N), mà chỉ xuất hiện ở giếng (M). Mẫu số 4, 5 lần lượt là mẫu chứng dị hợp tử ($-\alpha^{\text{HbCs}}$) và ($-\alpha^{\text{HbQs}}$), băng của 2 đột biến này xuất hiện ở cả giếng (N) và (M). Mẫu số 6, 7, 8, 9 lần lượt là DNA của bệnh nhân HbH ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{HbCs}}$), ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{HbQs}}$), người dị hợp tử ($-\alpha^{\text{HbCs}}$), và ($-\alpha^{\text{HbQs}}$), tương ứng với các mẫu chứng đã phân tích.

3.1.3. Đối chiếu kết quả phân tích gen α globin của kỹ thuật PCR với kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen Sanger

3.1.3.1. Đối chiếu kết quả giữa kỹ thuật GAP-PCR với kỹ thuật MLPA

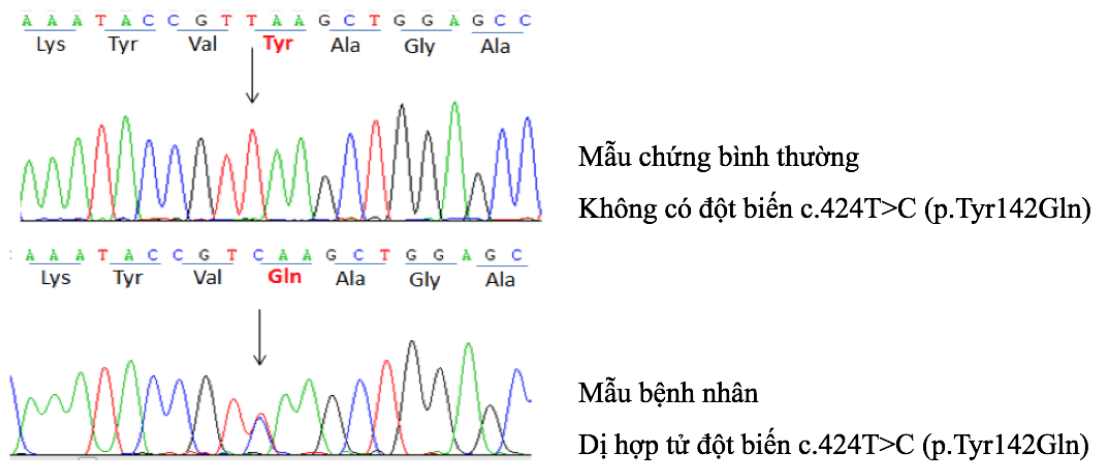
Lựa chọn ngẫu nhiên 1 mẫu bình thường không có đột biến và 3 mẫu dương tính với các đột biến mất đoạn lần lượt là $--^{\text{SEA}}$, $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$ để đối chiếu với cả hai kỹ thuật GAP-PCR và MLPA. Kết quả hoàn toàn phù hợp.



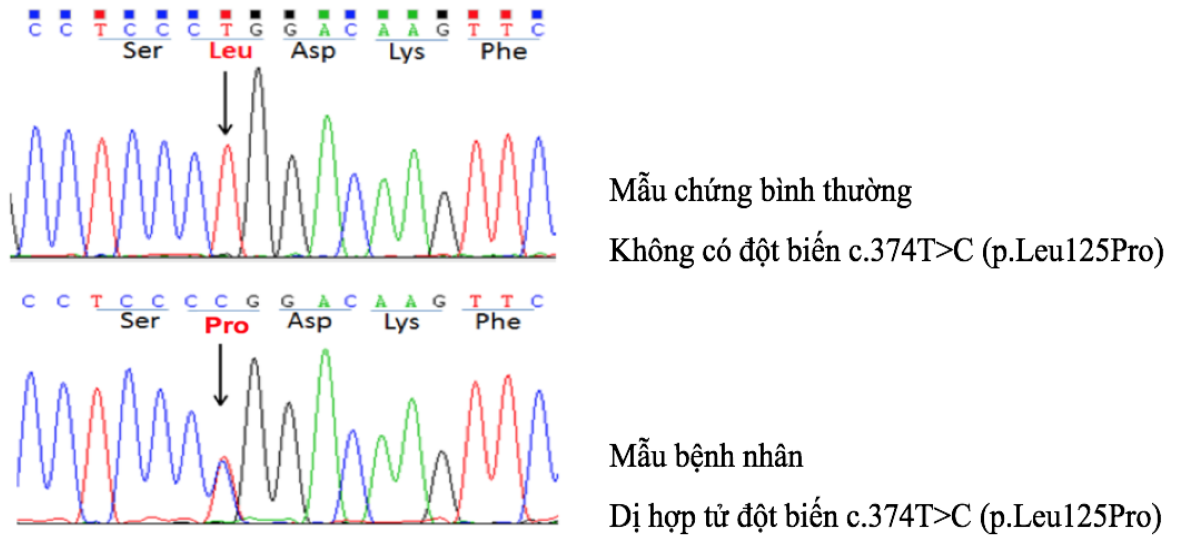
Hình 3.3. Kết quả MLPA cho: (A) Người bình thường, (B) Kiểu gen ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), (C) Kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$), (D) Kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) của bệnh α -thalassemia.

3.1.3.2. Giữa kỹ thuật ARMS-PCR với kỹ thuật giải trình tự gen Sanger

Lựa chọn ngẫu nhiên 1 mẫu bình thường không có đột biến và 2 mẫu dương tính với các đột biến điểm lần lượt là $-\alpha^{HbQs}$, $-\alpha^{HbCs}$ để đối chiếu giữa 2 kỹ thuật ARMS-PCR và giải trình tự gen Sanger. Kết quả hoàn toàn phù hợp.



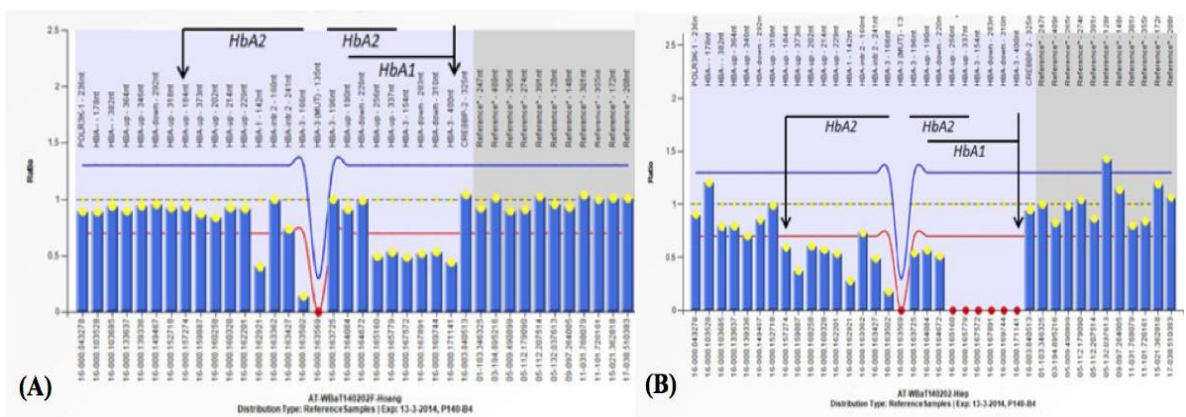
Hình 3.4. Đột biến Hb Constant Spring (HbCs) c.424T>C (p.Tyr142Gln)



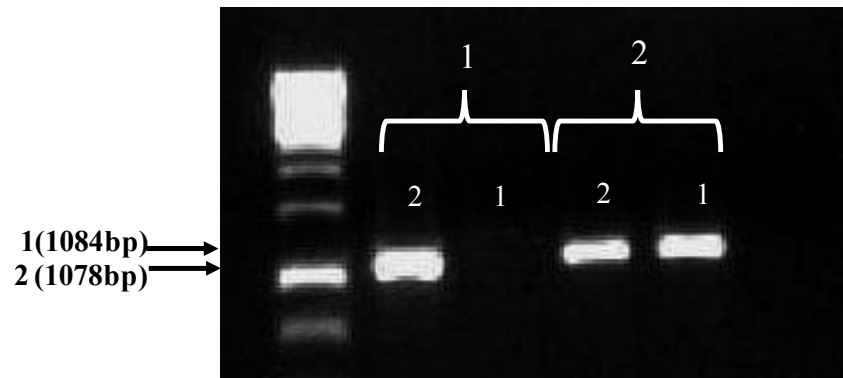
Hình 3.5. Đột biến Hb Quang Sze (HbQs) c.374T>C (p.Leu125Pro)

3.1.4. Kết quả xác định đột biến mất đoạn hiếm gặp trên bệnh nhân HbH đoạn bằng kỹ thuật MLPA

Nghiên cứu phát hiện 1/97 (1,03%) bệnh nhân mắc HbH mang kiểu gen mất đoạn hiếm gặp, bao gồm dị hợp kép đột biến mất đoạn 2 gen --^{SEA}, kết hợp với một đột biến mất đoạn 1 gen - α 1. Kết quả MLPA cho thấy, bệnh nhân và bố bệnh nhân đều mang đột biến dị hợp tử mất đoạn toàn bộ gen α 1. Đây là loại mất đoạn 1 gen α globin trên 1 NST số 16.



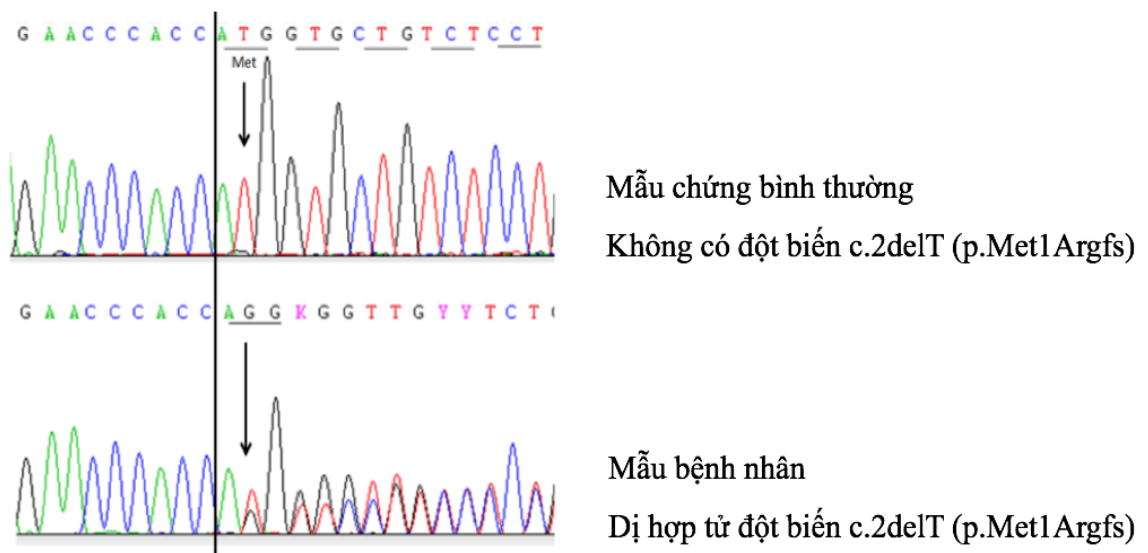
Hình 3.6. Kết quả MLPA của gia đình bệnh nhân mang đột biến --^{SEA}/ α 1.
(A): Mẫu mất đoạn dị hợp tử gen α 1 của bố bệnh nhân. (B): Mẫu mất đoạn đồng hợp tử gen α 1 của bệnh nhân.



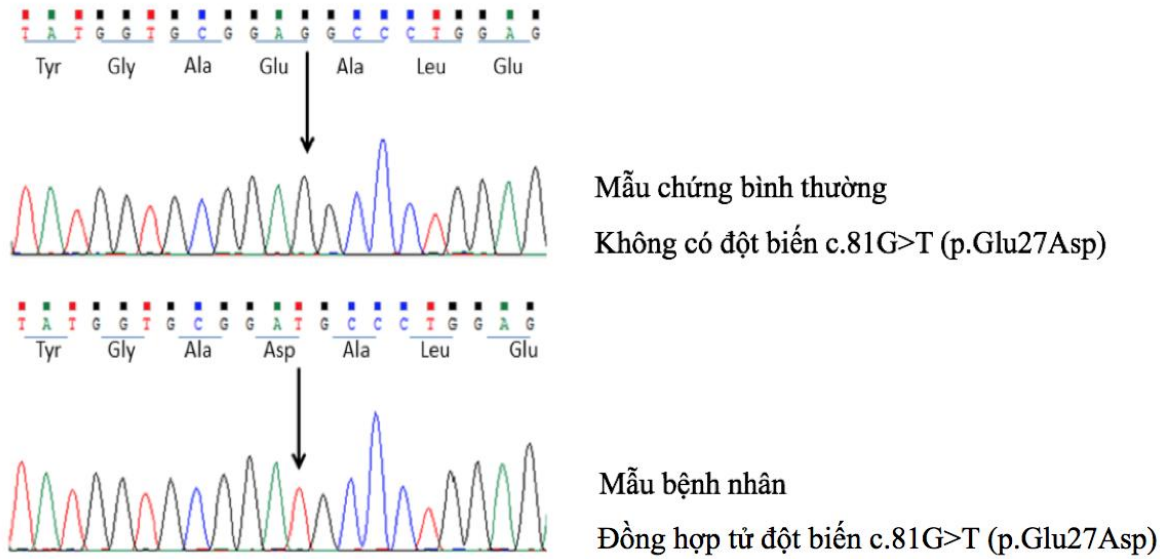
Hình 3.7. Điện di sản phẩm PCR gen $\alpha 1$ và gen $\alpha 2$

Nhận xét: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen $\alpha 1$, $\alpha 2$ cho kỹ thuật giải trình tự gen Sanger. Có 2 nhóm, nhóm 1 là mẫu của bệnh nhân, không có gen $\alpha 1$, chỉ có gen $\alpha 2$. Nhóm 2 là mẫu chứng của người bình thường, có gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$. Như vậy, có sự phù hợp về kết quả MLPA và PCR cho giải trình tự gen Sanger.

3.1.5. Kết quả xác định đột biến điểm hiếm gặp trên bệnh nhân HbH bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger

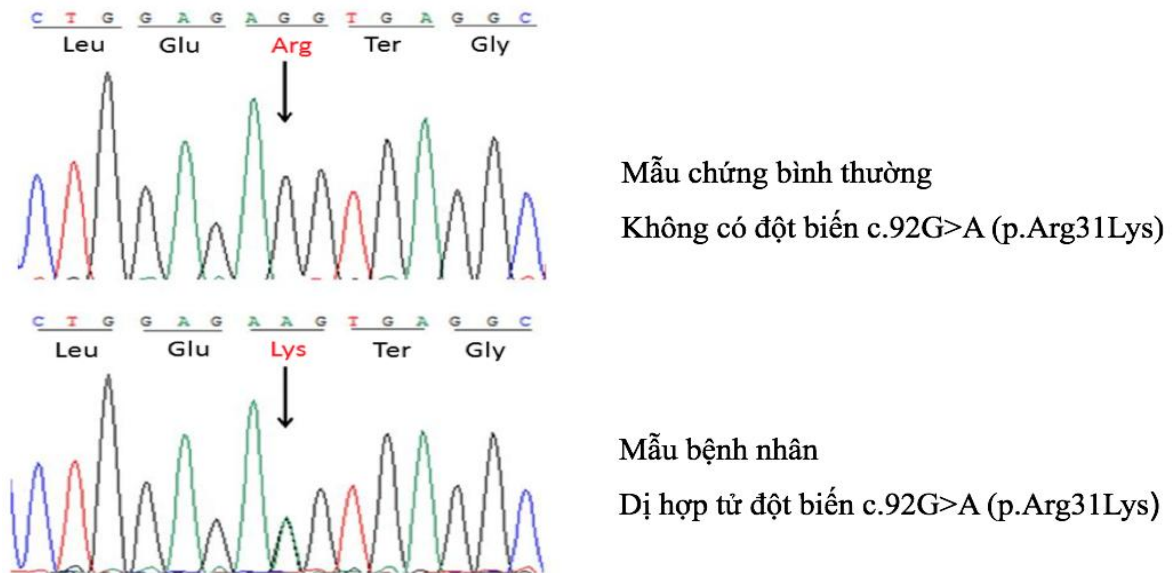


Hình 3.8. Đột biến điểm c.2delT (p.Met1Argfs)

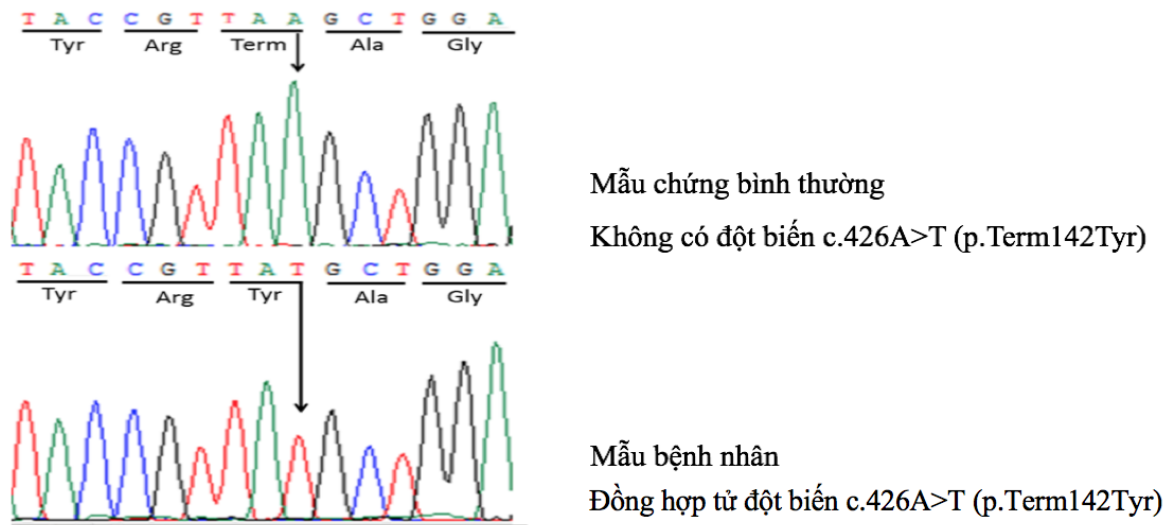


Hình 3.9. Đột biến điểm c.81G>T (p.Glu27Asp) - Hb Hekinan

Nhận xét: Bệnh nhân HbH mang hai đột biến dị hợp tử kép --^{SEA}/- $\alpha^{c.81G>T}$. Trên 1 allen đã mất đoạn toàn bộ gen $\alpha 1$, $\alpha 2$. Đột biến c.81G>T là đột biến điểm của gen $\alpha 1$ trên allen còn lại. Nên hình ảnh trình tự chỉ thể hiện 1 đỉnh (pick) trên 1 allen, như một đột biến đồng hợp tử.



Hình 3.10. Đột biến điểm c.92G>A (p.Arg31Lys)



Hình 3.11. Đột biến điểm c.426 A>T (p.Term142Tyr) - Hb Parkse

Nhận xét: Bệnh nhân HbH mang hai đột biến dị hợp tử kép $--^{SEA}/-\alpha^{c.426A>T}$. Trên 1 allen đã mất đoạn toàn bộ gen $\alpha 1$, $\alpha 2$. Đột biến c.426A>T là đột biến điểm của gen $\alpha 2$ trên allen còn lại. Nên hình ảnh trình tự chỉ thể hiện 1 đỉnh (pick) trên 1 allen, như một đột biến đồng hợp tử.

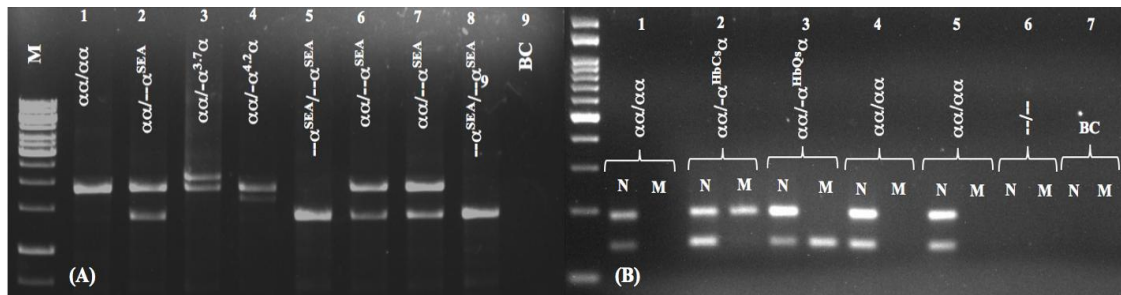
Các vùng được giải trình tự bao gồm: các vùng mã hóa trên gen $\alpha 1$, $\alpha 2$, vùng ranh giới exon-intron, vùng cận promoter. Sau khi phát hiện đột biến điểm trên bệnh nhân HbH, chúng tôi đã phát hiện thấy đột biến này trên bố hoặc mẹ bệnh nhân để khẳng định tính chất di truyền của đột biến, và để chẩn đoán trước sinh. Chúng tôi phát hiện 4 loại đột biến điểm hiếm gặp trên gen α globin. Chúng tôi mô tả chi tiết từng đột biến này trong phần bàn luận.

Bảng 3.1. Các đột biến điểm hiếm gặp gen α globin

Gen	Exon	c.DNA	Acid amin	Phân bố
$\alpha 2$	Init	Init ATG>A-T	c.2delT p.Met1Argfs	Việt Nam
$\alpha 2$	Exon1	Cd31 G>A	c.95G>A p.Arg31Lys	Trung Quốc
$\alpha 2$	Term	Term TAA>TAT	c.426A>T p.Term142Tyr	Lào, Thái
$\alpha 1$	Exon	Cd27 G>T	c.81G>T p.Glu27Asp	Nhật, T.Quốc

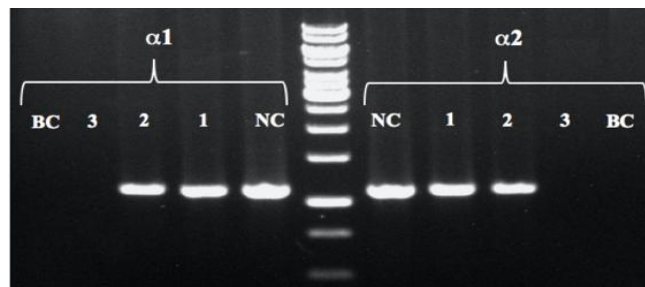
3.1.6. Kết quả xác định đột biến gen α globin của bệnh nhân mắc Hb Bart's còn sống sau sinh bằng kỹ thuật PCR, MLPA

Chúng tôi phát hiện một gia đình có một con gái mang kiểu gen đồng hợp tử ($--^{SEA}/--^{SEA}$), mắc Hb Bart's hiện đang 4 tuổi. Bố và mẹ bệnh nhân đều mang kiểu gen dị hợp tử ($--^{SEA}/\alpha\alpha$). Kiểu gen của cả gia đình đã được phát hiện bằng kỹ thuật GAP-PCR và ARMS-PCR. Sau đó được đối chiếu bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen Sanger.



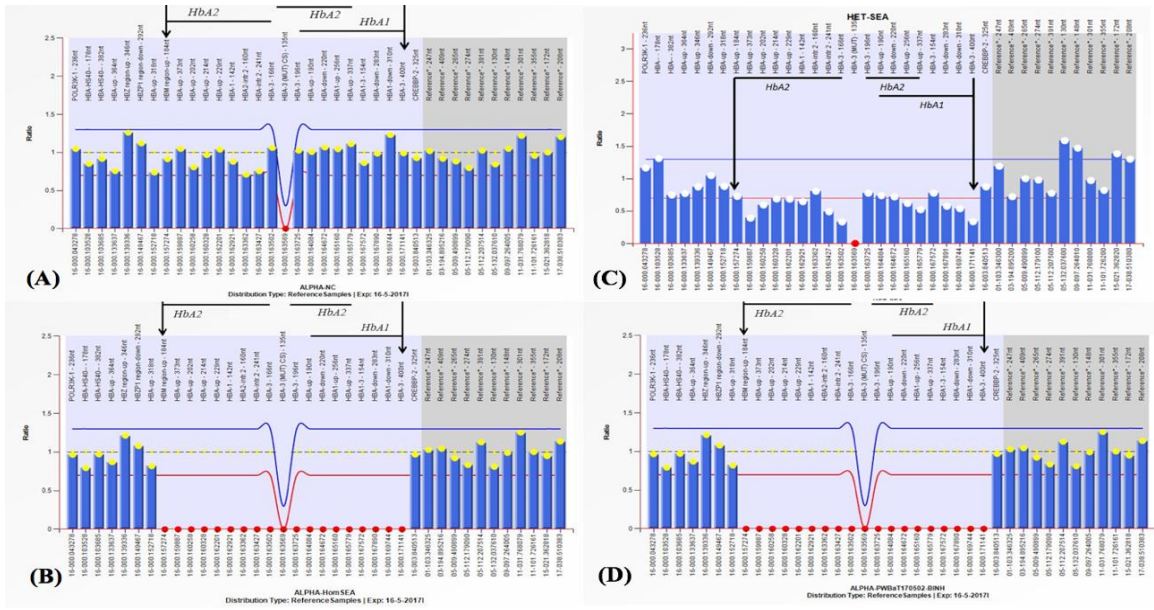
Hình 3.12. (A) GAP-PCR, (B) ARMS-PCR sàng lọc 7 đột biến trên gen α globin

Nhận xét: (A): Hình ảnh điện di sản phẩm GAP-PCR cho 3 đột biến $--\alpha^{SEA}$, $-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$. Mẫu 1, 2, 3, 4, 5 là các mẫu chứng như hình 3.14 (A). Mẫu 6, 7 lần lượt là của bố, mẹ bệnh nhân, dị hợp tử $--^{SEA}$. Mẫu 8 là của bệnh nhân, đồng hợp tử $--^{SEA}/--^{SEA}$, mắc Hb Bart's. (B): Hình ảnh điện di sản phẩm ARMS-PCR cho 2 đột biến $-\alpha^{HbCs}$, $-\alpha^{HbQs}$. Mẫu 1, 2, 3 là các mẫu chứng như hình 3.14 (B). Mẫu 4, 5 là của bố, mẹ bệnh nhân, bình thường với 2 đột biến này. Mẫu 6 là của bệnh nhân, không có 2 đột biến này. BC là mẫu không có DNA.



Hình 3.13. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR cho kỹ thuật giải trình tự gen $\alpha 1, \alpha 2$

Nhận xét: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của gen $\alpha 1, \alpha 2$. Ở mỗi gen đều có mẫu NC là mẫu chứng bình thường, mẫu 1, 2 là bố, mẹ bệnh nhân, đều có gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$, mẫu số 3 là mẫu của bệnh nhân, hoàn toàn không có gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$.



Hình 3.14. Kết quả MLPA của bệnh nhân 4 tuổi mắc Hb Bart's

Nhận xét: (A): Mẫu chứng bình thường, (B): Mẫu chứng đồng hợp tử đột biến $--^{SEA}/--^{SEA}$, (C): Mẫu của bố/mẹ bệnh nhân đều là người dị hợp tử đột biến $--^{SEA}/\alpha\alpha$. (D) Bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử $--^{SEA}/--^{SEA}$.

3.1.7. Tổng hợp kết quả đột biến gen α globin của người mắc α -thalassemia

Bảng 3.2. Đột biến gen α globin của người nghi ngờ mắc α -thalassemia

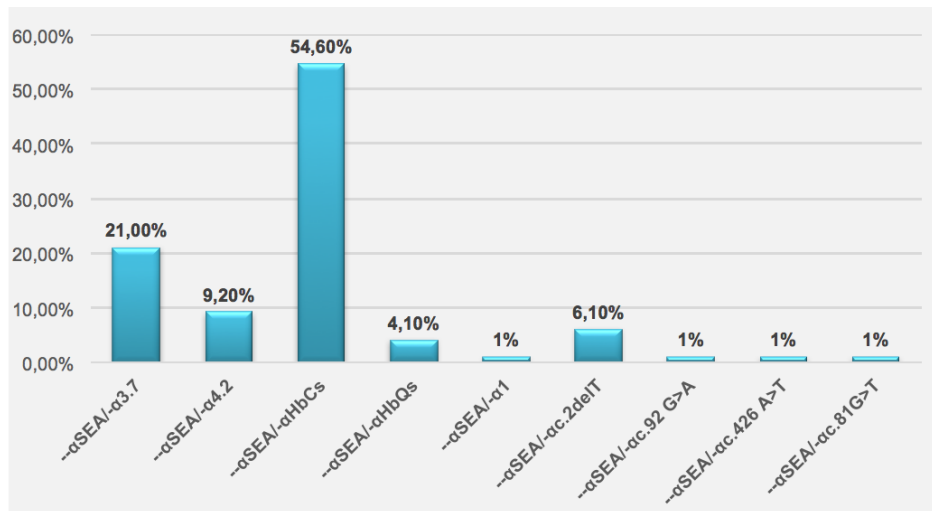
Loại bệnh nhân	Số BN	(%)
Bệnh nhân mắc bệnh HbH ($--/\alpha$) hoặc ($--/\alpha^T$)	97	32,4
Bệnh nhân mắc Hb Bart's ($--/--$)	1	0,33
Bệnh nhân không có đột biến gen α globin ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	114	38,1
Bệnh nhân có đột biến dị hợp tử gen α globin	87	29,1
Dị hợp tử dạng $--^{SEA}$	80	
Dị hợp tử dạng $-\alpha^{3.7}$	7	
Tổng số bệnh nhân phân tích đột biến gen α globin	299	100

Nhận xét: Phát hiện 97/299 (32,4%) bệnh nhân mắc HbH, 114/299 (38,1%) người không phát hiện thấy đột biến trong các đột biến thường gặp, 87/299 (29,1%), bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử, với 2 loại đột biến là $--^{SEA}$ (91,9%) và $-\alpha^{3.7}$ (9,1%). Đặc biệt chúng tôi phát hiện 1 bệnh nhân mắc Hb Bart's (0,33%) còn sống sau sinh.

Bảng 3.3. Tỷ lệ allen đột biến của bệnh nhân HbH

Tên đột biến	Kiểu đột biến	Số allen	%
Đột biến mất đoạn 2 gen	-- ^{SEA} /αα	194	50
Đột biến mất đoạn 1 gen lệch phải	-α ^{3.7} /αα	42	10,8
Đột biến mất đoạn 1 gen lệch trái	-α ^{4.2} /αα	18	4,6
Đột biến mất đoạn 1 gen α1	-α1/αα	2	0,5
TAA>CAA codon142 gen α2	-α ^{HbCs} /αα	106	27,3
CTG>CCG codon 125 gen α2	-α ^{HbQs} /αα	8	2,1
ATG>A-G codon ATG gen α2	-α ^{c.2delT} /αα	12	3,1
AGG>AAG codon 31 gen α2	-α ^{c.92 G>A} /αα	2	0,5
TAA>TAT codon TAA gen α2	-α ^{c.426 A>T} /αα	2	0,5
GAG>GAT codon 27 gen α1	-α ^{c.81G>T} /αα	2	0,5
Tổng số		388	100

Nhận xét: Allen --^{SEA}/αα chiếm tỷ lệ cao nhất là 50%. Tiếp theo đến allen -α^{HbCs}/αα là 27,8% và allen -α^{3.7}/αα là 10,8%



Biểu đồ 3.1. Tỷ lệ các loại kiểu gen của 97 bệnh nhân HbH

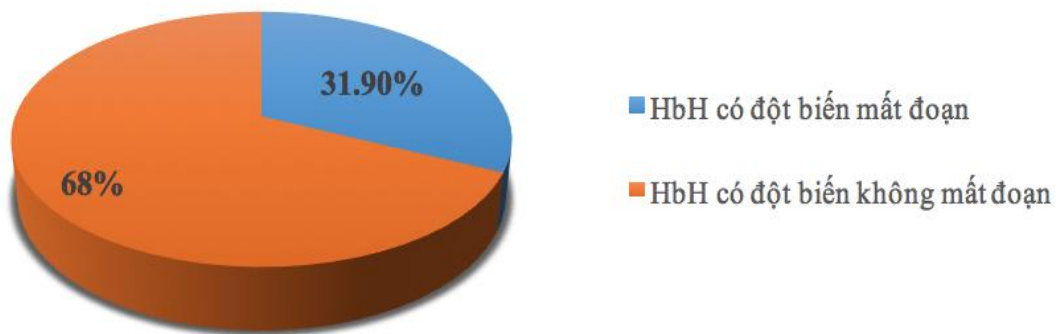
Nhận xét: Bệnh nhân HbH có kiểu gen (--^{SEA}/-α^{HbCs}) chiếm tỷ lệ cao nhất 54,6%. Tiếp theo là kiểu gen (--^{SEA}/-α^{3.7}) chiếm 21,6%, (--^{SEA}/-α^{4.2}) chiếm 9,2%. Các kiểu gen khác chiếm tỷ lệ thấp hơn.

3.2. Mối liên hệ giữa đặc điểm lâm sàng và kiểu gen của bệnh HbH

3.2.1. Đặc điểm chung của bệnh HbH

Chúng tôi đã chẩn đoán xác định 97 bệnh nhân mắc bệnh HbH bằng kỹ thuật sinh học phân tử đã mô tả ở phần 3.1. Dựa vào kết quả phân tích đột biến gen α globin, các bệnh nhân HbH được chia thành 2 nhóm nghiên cứu.

- Nhóm HbH có đột biến mất đoạn ($--/-\alpha$): 31/97 (31.9%) bệnh nhân
- Nhóm HbH có đột biến không mất đoạn ($--/-\alpha^T$): 66/97 (68,1%) bệnh nhân



Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ bệnh nhân ở từng nhóm bệnh HbH

3.2.1.1. Đặc điểm về tuổi

- Tuổi vào viện trung bình

Bảng 3.4. Tuổi vào viện trung bình của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh

Tuổi trung bình	n	Mean \pm SD	Min-max	p
Nhóm ($--/-\alpha$)	31	10,58 \pm 12,3	1,0 - 53	0,048
Nhóm ($--/-\alpha^T$)	66	6,1 \pm 5,8	0,3 - 31	
Tổng	97	7,6 \pm 8,84	0,3 - 53	

Nhận xét: Tuổi trung bình khi nhập viện của nhóm ($--/-\alpha^T$) là 6,1 \pm 5,8 sớm hơn của nhóm ($--/-\alpha$) là 10,58 \pm 12,3. Tuổi nhập viện trung bình của cả 2 nhóm tuổi là 7,6 \pm 8,84. Ở cả hai nhóm đều có bệnh nhân là trẻ em và bệnh nhân là người trưởng thành. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$).

- Phân nhóm tuổi vào viện

Bảng 3.5. Phân nhóm tuổi của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh

Nhóm tuổi	Bệnh HbH		Tổng	p
	(--/- α)	(--/- α^T)		
< 1 tuổi	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	
1 - < 4 tuổi	11 (32,4%)	23 (67,6%)	34 (100%)	
4 - < 7 tuổi	8 (29,6%)	19 (70,4%)	27 (100%)	
7 - < 10 tuổi	3 (27,3%)	8 (72,7%)	11 (100%)	
10 - < 13 tuổi	1 (9,1%)	10 (90,9)	11 (100%)	0,351
13 - < 16 tuổi	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
16 - < 18 tuổi	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	
≥ 18 tuổi	7 (63,6%)	4 (36,4%)	11(100%)	
Tổng	31 (32,0%)	66 (68,0%)	97 (100%)	

Nhận xét: Bệnh nhân HbH trong nghiên cứu bao gồm bệnh nhân trẻ em (< 18 tuổi) chiếm 88.6%, và bệnh nhân là người trưởng thành (≥ 18 tuổi) chiếm 11.3%. Trong nhóm bệnh nhân trẻ em, tất cả các bệnh nhân < 1 tuổi đều thuộc nhóm (--/- α^T), và trong nhóm từ 1 - < 18 tuổi, bệnh nhân thuộc nhóm (--/- α^T) luôn cao hơn nhóm (--/- α). Trong nhóm bệnh nhân trưởng thành ≥ 18 tuổi, có 7 bệnh nhân thuộc nhóm (--/- α) cao hơn nhóm (--/- α^T) có 4 bệnh nhân. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p=0,351>0,05$).

3.2.1.2. Đặc điểm về giới

Bảng 3.6. Tỷ lệ về giới của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh

Giới	Nhóm bệnh HbH (%)		Tổng (%)	p
	(--/- α)	(--/- α^T)		
Nam (%)	19 (61,3%)	32 (48,5%)	51 (52,5%)	
Nữ (%)	12 (38,7%)	34 (51,5%)	46 (47,4%)	0,239
Tổng	31 (100%)	66 (100)	97 (100)	

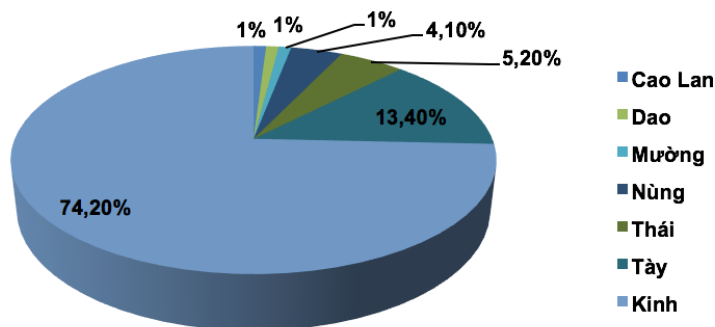
Nhận xét: Có 51 bệnh nhân nam (51,5%) và 46 bệnh nhân nữ (48,5%). Tỷ lệ nam nữ trong nghiên cứu: Nam/Nữ = 1.06 lần. Ở nhóm (--/- α), giới nam (61,3%) gặp nhiều hơn giới nữ (38,7%). Ở nhóm (--/- α^T), giới nam (48,5%) gặp ít hơn giới nữ (51,5%). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

3.2.1.3. Đặc điểm về dịch tễ

Bảng 3.7. Phân bố bệnh nhân HbH theo địa phương cư trú

Địa chỉ	N	Tỷ lệ (%)	Địa chỉ	N	Tỷ lệ (%)
Bắc Giang	9	9,3	Nam Định	3	3,1
Cao Bằng	4	4,1	Nghệ An	4	4,1
Hà Giang	1	1	Ninh Bình	4	4,1
Hà Nam	2	2,1	Phú Thọ	2	2,1
Hà Nội	25	25,8	Quảng Ninh	2	2,1
Hà Tây	1	1	Sơn La	1	1
Hà Tĩnh	1	1	Thái Bình	3	3,1
Hải Dương	5	5,2	Thái Nguyên	2	2,1
Hải Phòng	3	3,1	Thanh Hoá	1	1
Hoà Bình	4	4,1	Tuyên Quang	4	4,1
Hưng Yên	2	2,1	Vĩnh Phúc	1	1
Lạng Sơn	6	6,2	Yên Bái	5	5,2
Lào Cai	2	2,1			

Nhận xét: Các bệnh nhân HbH trong nghiên cứu đến từ Hà Nội có tỷ lệ cao nhất 25,8%, tiếp theo là Bắc Giang (9,3%), Lạng Sơn (6,2%).



Biểu đồ 3.3. Phân bố bệnh nhân mắc HbH theo dân tộc

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân mắc HbH gặp phổ biến nhất ở nhóm dân tộc Kinh 74,2%. Ở nhóm dân tộc ít người, dân tộc Tày chiếm tỷ lệ cao nhất 13,4%.

3.2.2. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh HbH

3.2.2.1. Số lần truyền máu trung bình trong một năm

Số lần truyền máu trung bình trong một năm của bệnh nhân được tính bằng tổng số lần truyền máu của bệnh nhân tính đến thời điểm nghiên cứu, chia cho số tuổi của bệnh nhân tính theo năm.

Bảng 3.8. Đặc điểm truyền máu của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh

Mức độ truyền máu	Nhóm bệnh HbH (%)		Tổng (%)	p
	(--/- α)	(--/- α^T)		
Chưa truyền máu (=0)	18 (58,1%)	15 (22,7%)	33 (34,0%)	
Đã từng truyền máu (≥ 1)	13 (41,9%)	51 (77,2%)	64 (65,9%)	0,004
Tổng	31 (100%)	66 (100%)	97 (100%)	

Nhận xét: Trong 97 bệnh nhân HbH, có 34,0% bệnh nhân chưa từng truyền máu (số lần truyền máu=0), và 65,9% bệnh nhân đã từng phải truyền máu ít nhất 1 lần (số lần truyền máu ≥ 1). Ở nhóm (--/- α), số bệnh nhân chưa từng truyền máu (58,1%) nhiều hơn số đã từng truyền máu (41,9%). Trong khi ở nhóm (--/- α^T), số bệnh nhân đã từng phải truyền máu chiếm đa số (77,2%), nhiều hơn nhóm chưa từng phải truyền máu (22,7%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 3.9. Số lần truyền máu trung bình/năm của bệnh nhân HbH

Số lần truyền máu/năm	n	Mean \pm SD	Min-max	p
Nhóm (--/- α)	31	0,27 \pm 0,76	0 - 4	< 0,014
Nhóm (--/- α^T)	66	3,2 \pm 4,0	0 - 12	
Tổng	97	2,1 \pm 3,4	0 - 12	

Nhận xét: Ở cả hai nhóm bệnh, đều có bệnh nhân chưa từng phải truyền máu và truyền máu rải rác. Nhóm (--/- α^T) có bệnh nhân phụ thuộc truyền máu 1 tháng/lần. Số lần truyền máu trung bình/năm ở nhóm (--/- α^T) cao hơn nhóm (--/- α). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p = 0,014 < 0,05$).

3.2.2.2. *Mức độ thiếu máu**Bảng 3.10. Phân loại mức độ thiếu máu của bệnh nhân HbH*

Mức độ thiếu máu	Hb máu	BN HbH	(%)
Thiếu máu rất nặng	< 30 g/dL	0	0
Thiếu máu nặng	30 - 59 g/dL	8	8,2
Thiếu máu trung bình	60 - 89 g/dL	66	68
Thiếu máu nhẹ - không thiếu máu	≥ 90 g/dL	23	23,7
Tổng		97	100

Nhận xét: Bệnh nhân có biểu hiện thiếu máu trung bình chiếm tỷ lệ cao nhất 68%. Bệnh nhân có biểu hiện máu nhẹ hoặc không thiếu máu đứng thứ hai 23,7%. Bệnh nhân có biểu hiện thiếu máu nặng chiếm 8,2%.

Bảng 3.11. Phân loại thiếu máu của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh

Hemoglobin (g/dL)	Nhóm bệnh HbH (%)		Tổng (%)	p
	(--/-α)	(--/-α^T)		
Hb ≥ 90	13 (41,9%)	10 (15,1%)	23 (23,7%)	0,004
Hb < 90	18 (58,0%)	56 (84,8%)	74 (76,2%)	
Tổng	31 (100%)	66 (100%)	97 (100%)	

Nhận xét: Trong 97 bệnh nhân HbH, bệnh nhân có Hb < 90g/dL chiếm 76,2%, nhiều hơn số bệnh nhân có Hb ≥ 90g/dL chiếm 23,7%. Ở cả 2 nhóm bệnh, đặc biệt ở nhóm (--/- α^T), số bệnh nhân có Hb < 90g/dL chiếm 84,8% cao hơn rõ rệt so với nhóm bệnh nhân có Hb > 90g/dL chiếm 15,1%. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p=0,004 < 0,05$).

3.2.2.3. Gan lách to

Bảng 3.12. Mức độ gan lách to của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh

Gan lách to	Nhóm bệnh HbH (%)		Tổng (%)	p
	(--/- α)	(--/- α^T)		
Gan to				
Không sờ thấy	22 (70,9%)	19 (28,7%)	41 (42,2%)	0,001
1 - 2 cm dưới bờ sườn	7 (22,5%)	26 (39,3%)	33 (34%)	
≥ 3 cm dưới bờ sườn	2 (6,4%)	21 (31,8%)	23 (23,7%)	
Tổng	31 (100)	66 (100)	97 (100)	
Lách to				
Không sờ thấy	25 (80,8%)	21 (31,8%)	46 (47,4%)	<0.001
1 - 2 cm dưới bờ sườn	4 (12,9%)	23 (34,8%)	27 (27,8%)	
≥ 3 cm dưới bờ sườn	2 (6,4%)	22 (33,3%)	24 (24,7%)	
Tổng	31 (100)	66 (100)	97 (100)	

Nhận xét: Số bệnh nhân HbH có gan to là 57,7%, cao hơn nhóm gan không sờ thấy là 42,2%. Tỷ lệ bệnh nhân có gan to ở nhóm (--/- α^T) là 71,1%, cao hơn ở nhóm (--/- α) là 28,9%. Số bệnh nhân HbH đều có lách to chiếm 52,5%, cao hơn nhóm lách không sờ thấy là 47,4%. Tỷ lệ bệnh nhân có lách to ở nhóm (--/- α^T) là 68,1%, cao hơn ở nhóm (--/- α) là 19,3%. Sự khác biệt ở cả hai nhóm gan lách to đều có ý nghĩa thống kê, $p < 0,001$.

3.2.2.4. Bộ mặt Thalassemia

Bảng 3.13. Bộ mặt thalassemia của bệnh nhân HbH ở từng nhóm bệnh

Bộ mặt thalassemia	Nhóm bệnh HbH		Tổng	p
	(--/- α)	(--/- α^T)		
Có	2 (6,4%)	40 (60,6%)	41 (42,2%)	<0,001
Không có	29 (93,5%)	26 (39,3%)	56 (57,7%)	
Tổng	31 (100)	66 (100)	97 (100)	

Nhận xét: Hầu hết bệnh nhân ở nhóm (--/- α^T) đều có bộ mặt Thalassemia, chiếm 60,6%, và hầu hết bệnh nhân ở nhóm (--/- α) không có bộ mặt Thalassemia, chiếm 93,5%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,001$.

3.2.3. Một số đặc điểm huyết học của bệnh nhân HbH

3.2.3.1. Phân bố Hemoglobin

Bảng 3.14. Hemoglobin trung bình ở từng nhóm tuổi theo nhóm bệnh

Hb (g/dL)	N	Mean \pm SD		p
		(--/- α) (31)	(--/- α^T) (66)	
< 2 tuổi	15	78,67 \pm 4,73	71,5 \pm 8,97	
2 - < 6 tuổi	40	82,5 \pm 8,55	78,55 \pm 5,46	
6 - < 12 tuổi	27	85,86 \pm 25,08	75,15 \pm 11,43	0,004
12 - < 18 tuổi	3	90,5 \pm 10,88	87,32 \pm 20,89	
\geq 18 tuổi	12	96,75 \pm 22,04	89 \pm 19	
Tổng	97	86,46 \pm 14,93	74,92 \pm 12,75	

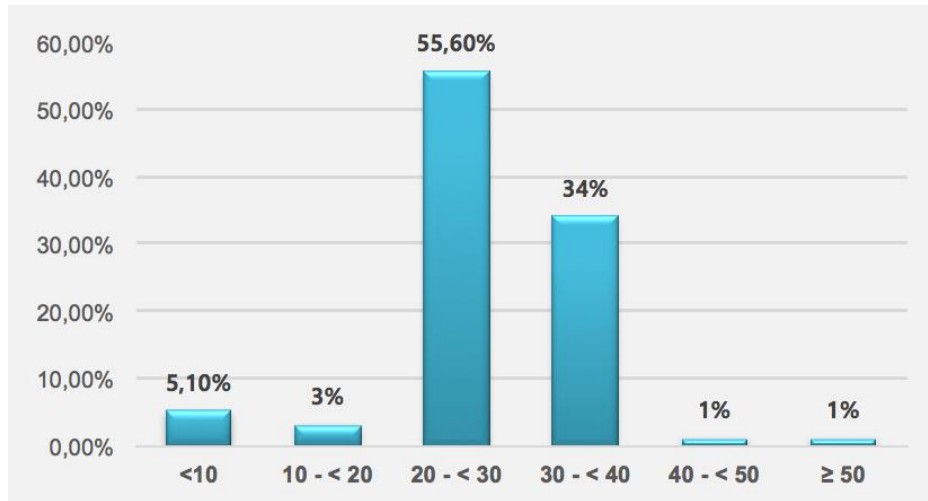
Nhận xét: Hb trung bình ở nhóm (--/- α) luôn cao hơn so với nhóm (--/- α^T) ở các nhóm tuổi. Hb trung bình ở nhóm (--/- α) tăng dần rõ rệt theo lứa tuổi, nhưng Hb ở nhóm (--/- α^T) không thay đổi đáng kể theo lứa tuổi. Trung bình Hb giữa các nhóm tuổi và nhóm bệnh có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,004 < 0,05$).

Bảng 3.15. Hb trung bình của bệnh nhân HbH so với người bình thường

Hb (g/dL)	N	Bệnh HbH		p
		Mean \pm SD	Min - Max	
< 2 tuổi	15	72,93 \pm 17,17	42 - 108	0,001
2 - < 6 tuổi	40	81,11 \pm 19,37	50 - 127	0,017
6 - < 12 tuổi	27	76,79 \pm 11,15	45 - 92	0,003
12 - < 18 tuổi	3	89,00 \pm 19,00	70 - 108	0,607
\geq 18 tuổi	12	94,67 \pm 18,73	71 - 136	
Nữ	8	88,75 \pm 14,78	82 - 136	
Nam	4	106,5 \pm 22,3	71 - 120	0,217
Tổng	97	80,56 \pm 17,81	42 - 136	0,013

Nhận xét: Hb trung bình, và giới hạn Hb của bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi đều nằm dưới khoảng giá trị bình thường. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm < 12 tuổi ($p < 0,05$).

3.2.3.2. Phân bố Hematocrit HCT (%)



Biểu đồ 3.4. Phân bố về Hematocrit (%) trên bệnh nhân HbH

Nhận xét: HCT của bệnh nhân HbH nằm phổ biến nhất trong khoảng 20-29%, tiếp theo là khoảng 30-39%. Có 5,1% bệnh nhân có HCT < 10%.

Bảng 3.16. HCT trung bình của bệnh nhân HbH so với người bình thường

HCT(%)	N	Bệnh HbH		p
		Mean ± SD	Min-Max	
< 2 tuổi	15	25,67 ± 6,06	14,6 - 34,5	0,091
2 - < 6 tuổi	40	27,89 ± 4,0	17,0 - 37,0	0,238
6 - < 12 tuổi	27	27,69 ± 3,02	21,4 - 35,0	0,210
12 - < 18 tuổi	3	32,50 ± 3,5	28,9 - 35,9	0,999
≥ 18 tuổi	12	34,54 ± 9,29		
Nữ	8	30,75 ± 3,95	24,9 - 37,5	0,038
Nam	4	40,13 ± 8,84	30 - 50,9	
Tổng	97	28,45 ± 5,58	14,6 - 50,9	

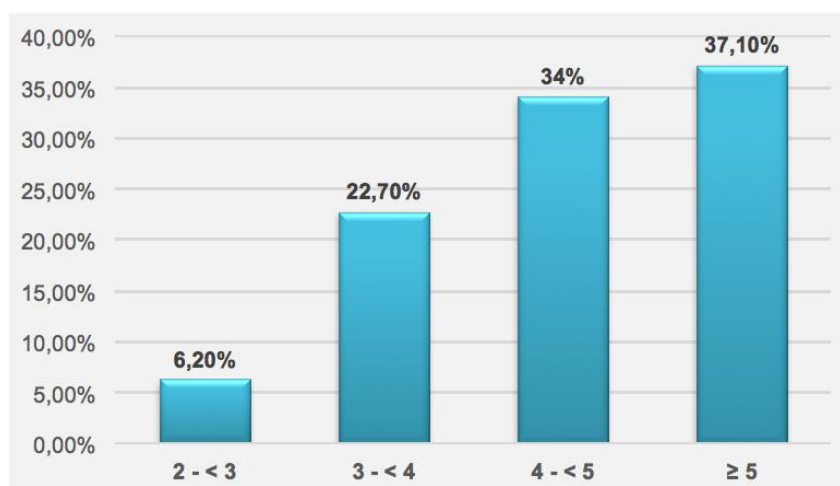
Nhận xét: HCT trung bình, và giới hạn HCT của bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi đều nằm dưới khoảng giá trị bình thường. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm ≥ 18 tuổi ($p < 0,05$).

Bảng 3.17. HCT trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH

Nhóm tuổi	N	Mean \pm SD		p
		(--/- α) (31)	(--/- α^T) (66)	
< 2 tuổi	15	26,6 \pm 2,62	25,43 \pm 6,72	0,13
2 - < 6 tuổi	40	29,39 \pm 3,31	27,08 \pm 4,16	
6 - < 12 tuổi	27	28,35 \pm 1,85	27,50 \pm 3,29	
12 - < 18 tuổi	3	0	30,50 \pm 3,50	
\geq 18 tuổi	12	32,46 \pm 6,2	31,70 \pm 13,86	
Tổng	97	29,71 \pm 4,26	27,87 \pm 6,04	

Nhận xét: HCT trung bình chung của nhóm (--/- α) cao hơn nhóm (--/- α^T), lần lượt là 29,71% và 27,87%. HCT trung bình ở nhóm (--/- α) luôn cao hơn so với nhóm (--/- α^T) ở mọi lứa tuổi, và tăng dần theo lứa tuổi. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.3.3. Phân bố về số lượng hồng cầu (RBC) $\times 10^{12}/L$

Biểu đồ 3.5. Phân bố RBC ($\times 10^{12}/L$) của bệnh nhân HbH

Nhận xét: RBC của bệnh nhân HbH trong nghiên cứu nằm phổ biến nhất trong khoảng $\geq 5 \times 10^{12}/L$, tiếp theo là 4 - $4,9 \times 10^{12}/L$. Có 6.2% bệnh nhân có RBC rất thấp trong khoảng 2 - $2,9 \times 10^{12}/lit$.

Bảng 3.18. RBC trung bình của bệnh nhân HbH so với người bình thường

RBCx10 ¹² /L	N	Bệnh HbH		p
		Mean ± SD	Min - Max	
< 2 tuổi	15	4,06 ± 0,83	2,25 - 5,49	0,006
2 - < 6 tuổi	40	4,18 ± 1,00	2,24 - 5,69	0,069
6 - < 12 tuổi	27	4,63 ± 0,97	2,12 - 5,98	0,001
12 - < 18 tuổi	3	4,75 ± 1,52	3,00 - 5,76	0,470
≥ 18 tuổi	12	5,20 ± 0,81	4,00 - 6,39	0,041
Nữ	8	4,83 ± 0,6	4,00 - 5,60	
Nam	4	5,93 ± 0,7	4,90 - 6,38	
Tổng	97	4,47 ± 0,99	2,12 - 6,39	

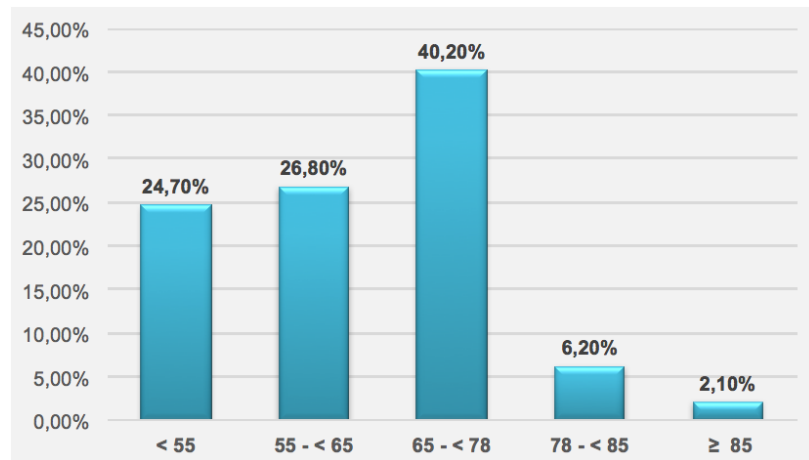
Nhận xét: Ở các độ tuổi tương ứng, RBC nhỏ nhất của bệnh nhân HbH thấp hơn giá trị nhỏ nhất của người bình thường. Tuy nhiên, RBC trung bình và lớn nhất nằm trong giới hạn của người bình thường.

Bảng 3.19. RBC trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH

RBC (x10 ¹² /L)	N	Mean ± SD		p
		(--/-α) (31)	(--/-α ^T) (66)	
< 2 tuổi	15	4,99 ± 0,59	3,79 ± 0,69	0,049
2 - < 6 tuổi	40	5,18 ± 0,16	3,93 ± 0,97	< 0,001
6 - < 12 tuổi	27	5,34 ± 0,36	4,19 ± 0,92	0,002
12 - < 18 tuổi	3	0	4,75 ± 1,52	
≥ 18 tuổi	12	5,43 ± 0,82	4,90 ± 0,83	0,426
Tổng	97	5,3 ± 0,55	4,08 ± 0,91	<0,001

Nhận xét: RBC trung bình chung của nhóm (--/-α) cao hơn nhóm (--/-α^T), lần lượt là 5,3±0,55 và 4,08±0,9. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (p<0,001). RBC trung bình ở mọi lứa tuổi của nhóm (--/-α) luôn cao hơn so với nhóm (--/-α^T), và tăng dần theo lứa tuổi. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê, trừ nhóm ≥18 tuổi (p>0,05).

3.2.3.4. Phân bố về thể tích trung bình hồng cầu (MCV) fL



Biểu đồ 3.6. Phân bố về MCV (fL) của bệnh nhân HbH

Nhận xét: Có 91,7% bệnh nhân HbH trong nghiên cứu có thiếu máu hồng cầu nhỏ, với MCV <78fL. MCV phổ biến nhất nằm trong khoảng từ 65-77 fL.

Bảng 3.20. MCV trung bình của bệnh nhân HbH so với người bình thường

MCV (fL)	N	HbH		p
		Mean ± SD	Min - Max	
< 2 tuổi	15	60,80 ± 10,94	34,0 - 78,8	0,019
2 - <6 tuổi	40	61,93 ± 10,31	55,2 - 73,8	0,002
6 - <12 tuổi	27	62,44 ± 10,23	47,7 - 79,9	0,246
12 - <18 tuổi	3	67,96 ± 9,85	49,8 - 86,5	0,137
≥ 18 tuổi	12	72,28 ± 12,22	54,0 - 100,6	
Nữ	8	70,56 ± 8,25	54,0 - 78,7	0,636
Nam	4	75,73 ± 19,10	55,2 - 100,6	
Tổng	97	64,50 ± 11,23	34,0 - 100,6	

Nhận, xét: MCV trung bình, giới hạn của MCV ở bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi đều nằm dưới khoảng giá trị bình thường. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm < 6 tuổi ($p < 0,05$).

Bảng 3.21. MCV trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH

MCV (g/L)	N	Mean \pm SD		p
		(--/- α) (31)	(--/- α^T) (66)	
< 2 tuổi	15	51,2 \pm 3,66	65,25 \pm 9,36	0,002
2 - <6 tuổi	40	54,66 \pm 7,2	64,1 \pm 11,3	0,007
6 - <12 tuổi	27	57,45 \pm 8,14	70,96 \pm 8,19	0,007
12 - <18 tuổi	3	0	61,9 \pm 10,3	
\geq 18 tuổi	12	67,05 \pm 8,85	82,75 \pm 12,06	0,072
Tổng	97	58,06 \pm 9,19	67,53 \pm 10,93	0,019

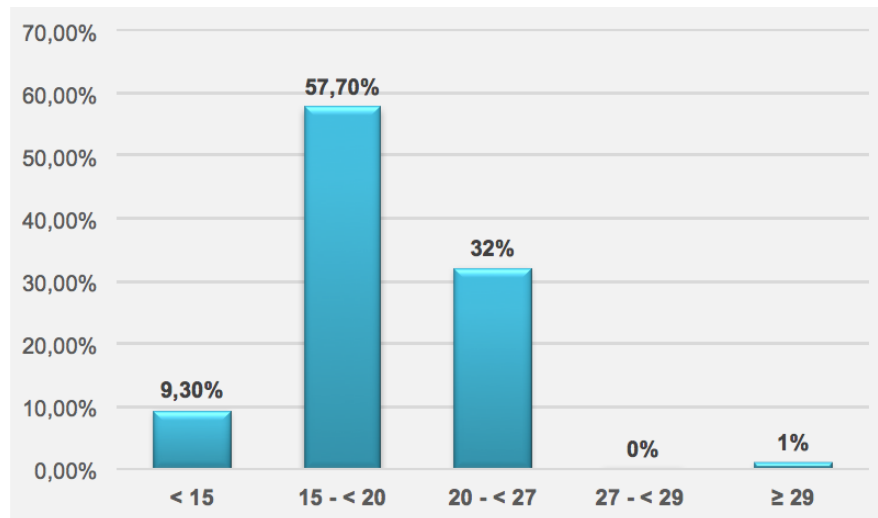
Nhận xét: MCV trung bình chung của nhóm (--/- α) thấp hơn của nhóm (--/- α^T), lần lượt là 58,06 fl và 67,53 fl. MCV trung bình ở mọi lứa tuổi của nhóm (--/- α^T) luôn cao hơn so với nhóm (--/- α) và tăng dần theo lứa tuổi. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê, trừ nhóm 2-5,9 tuổi và nhóm >18 tuổi có $p > 0,05$.

Bảng 3.22. Sự phân nhóm chỉ số MCV của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh

MCV (fL)	Nhóm bệnh HbH (%)		Tổng (%)	p
	(--/- α)	(--/- α^T)		
MCV \leq 70	26 (83,7)	30 (45,4)	56 (57,7)	
MCV > 70	5 (16,1)	36 (54,5)	41 (42,2)	<0,001
Tổng	31 (100)	66 (100)	97 (100)	

Nhận xét: 57,7% bệnh nhân HbH có MCV \leq 70, 42,3% bệnh nhân HbH có MCV > 70. Ở nhóm (--/- α), số bệnh nhân có MCV \leq 70 (83,9%) nhiều hơn số có MCV > 70 (16,1%), còn ở nhóm (--/- α^T), số bệnh nhân có MCV \leq 70 (45,5%) ít hơn số có MCV > 70 (54,5%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

3.2.3.5. Phân bố về huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) pg



Biểu đồ 3.7. Phân bố về MCH (pg) của bệnh nhân HbH

Nhận xét: Có 90% bệnh nhân HbH trong nghiên cứu có hồng cầu nhược sắc, MCH < 27 pg. MCH phổ biến nhất nằm trong khoảng từ 15-19,9%.

Bảng 3.23. MCH trung bình ở từng nhóm tuổi so với người bình thường

MCH (pg)	N	Bệnh HbH		p
		Mean ± SD	Min - Max	
< 2 tuổi	15	17,49 ± 3,15	13,90 - 24,70	0,005
2 - < 6 tuổi	40	18,03 ± 3,12	13,90 - 26,50	0,005
6 - < 12 tuổi	27	19,15 ± 2,87	14,30 - 25,50	0,082
12 - < 18 tuổi	3	16,70 ± 1,25	15,50 - 18,00	0,039
≥ 18 tuổi	12	21,17 ± 4,98	15,10 - 34,20	
Nữ	8	20,20 ± 3,10	15,10 - 24,80	0,519
Nam	4	23,10 ± 7,80	15,90 - 34,00	
Tổng	97	18,61 ± 3,44	13,90 - 34,00	

Nhận xét: MCH trung bình chung, giới hạn MCH của bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi đều nằm dưới khoảng giá trị bình thường. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm < 6 tuổi, và nhóm 12 - < 18 tuổi (p < 0,05).

Bảng 3.24. MCH trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH

MCH (g/L)	N	Mean \pm SD		p
		(--/- α) (31)	(--/- α^T) (66)	
< 2 tuổi	15	15,23 \pm 0,78	18,06 \pm 3,28	0,019
2 - <6 tuổi	40	16,92 \pm 3,07	18,63 \pm 3,04	0,105
6 - <12 tuổi	27	16,56 \pm 2,26	19,89 \pm 2,61	0,013
12 - <18 tuổi	3	0	16,70 \pm 1,25	
\geq 18 tuổi	12	19,24 \pm 2,9	25,03 \pm 6,4	0,169
Tổng	97	17,28 \pm 2,93	19,23 \pm 3,51	0,009

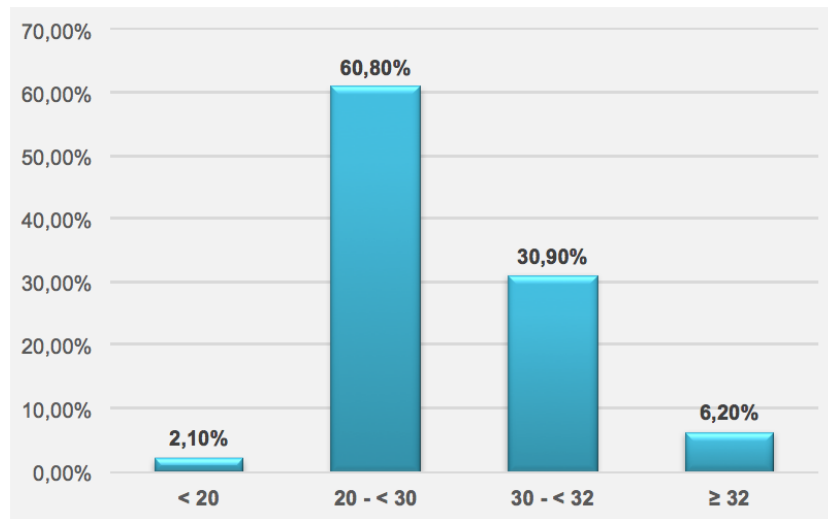
Nhận xét: MCH trung bình của nhóm (--/- α) là 17,28 \pm 2,93 pg thấp hơn của nhóm (--/- α^T) là 19,23 \pm 3,51 pg. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (p=0,009<0,05). MCH trung bình chung, MCH trung bình ở từng nhóm tuổi của nhóm (--/- α) đều thấp hơn nhóm (--/- α^T). Sự khác biệt này có nghĩa thống kê p<0,05, trừ nhóm từ 2-5,9 tuổi và nhóm >18 tuổi (p>0,05).

Bảng 3.25. Phân nhóm MCH của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh

MCH (pg)	Nhóm bệnh HbH (%)		Tổng (%)	p
	(--/- α)	(--/- α^T)		
MCH \leq 19	24 (77,4)	37 (56,0)	61 (62,8)	<0,001
MCH > 19	7 (22,5)	29 (43,9)	36 (37,1)	
Tổng	31 (100)	66 (100)	97 (100)	

Nhận xét: 62,8% bệnh nhân HbH có MCH \leq 19, 37,1% bệnh nhân HbH có MCH>19. Ở nhóm (--/- α), số bệnh nhân có MCH \leq 19 (77,4%) nhiều hơn số có MCH>19 (22,5%), còn ở nhóm (--/- α^T), số bệnh nhân có MCH \leq 19 (56,0%) ít hơn số có MCH>19 (43,9%). Ở ngưỡng cắt MCH=19pg, sự khác biệt giữa các nhóm bệnh HbH có ý nghĩa thống kê (p<0,001).

3.2.3.6. Phân bố về chỉ số nồng độ Hemoglobin trung bình hồng cầu



Biểu đồ 3.8. Phân bố MCHC (%) của bệnh nhân HbH

Nhận xét: Có 62,9% bệnh nhân HbH có MCHC<30%. MCHC phổ biến nhất nằm trong khoảng từ 20-29,9%. Có 37,1% bệnh nhân HbH có MCHC>30%.

Bảng 3.26. MCHC trung bình ở từng nhóm tuổi so với người bình thường

MCHC (%)	N	Bệnh HbH		p
		Mean ± SD	Min - Max	
< 2 tuổi	15	17,49 ± 3,15	13,90 - 24,70	1,000
2 - <6 tuổi	40	18,03 ± 3,12	13,90 - 26,50	0,999
6 - <12 tuổi	27	19,15 ± 2,87	14,30 - 25,50	1,000
12 - <18 tuổi	3	16,70 ± 1,25	15,50 - 18,00	0,986
≥ 18 tuổi	12	21,17 ± 4,98	15,10 - 34,20	
Tổng	97	28,89 ± 2,63	18,90 - 35,20	0,644

Nhận xét: MCHC trung bình chung, giới hạn MCHC của bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi đều nằm dưới khoảng giá trị bình thường. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.27. MCHC trung bình ở từng nhóm tuổi trong từng nhóm bệnh HbH

MCHC (%)	N	Mean \pm SD		p
		(--/- α) (31)	(--/- α^T) (66)	
< 2 tuổi	15	30,06 \pm 2,65	28,09 \pm 2,91	0,019
2 - <6 tuổi	40	30,57 \pm 2,34	28,37 \pm 2,13	0,105
6 - <12 tuổi	27	29,00 \pm 1,72	28,58 \pm 2,26	0,013
12 - <18 tuổi	3	0	28,80 \pm 2,15	
\geq 18 tuổi	12	28,41 \pm 4,32	28,95 \pm 3,90	0,046
Tổng	97	29,66 \pm 2,93	28,51 \pm 2,42	0,009

Nhận xét: MCHC trung bình của nhóm (--/- α) cao hơn của nhóm (--/- α^T), lần lượt là 29,66% và 28,51%. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p=0,009<0,05$). MCHC trung bình chung và trung bình ở từng nhóm tuổi của nhóm (--/- α) cao hơn nhóm (--/- α^T).

Bảng 3.28. Phân nhóm MCHC của bệnh nhân HbH theo nhóm bệnh

MCHC (%)	Nhóm bệnh HbH (%)		Tổng (%)	p
	(--/- $\alpha\alpha$)	(--/- $\alpha^T\alpha$)		
MCHC \geq 30	18 (58,0%)	19 (28,7%)	37 (38,1%)	0,006
MCHC < 30	13 (41,9%)	47 (71,2%)	60 (61,8%)	
Tổng	31 (100%)	66 (100%)	97 (100%)	

Nhận xét: Nhóm có MCHC<30% chiếm 61,8%, cao hơn nhóm có MCHC \geq 30% chiếm 38,1%. Ở nhóm (--/- α), số bệnh nhân có MCHC \geq 30 là 58.0% cao hơn số có MCHC<30 là 41,9%, còn ở nhóm (--/- α^T), số bệnh nhân có MCHC<30% là 71,2% cao hơn số có MCHC \geq 30% là 28,7%. Ở ngưỡng cắt MCHC=30%, sự khác biệt về MCHC giữa các nhóm bệnh này có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

3.2.3.7. Phân tích thành phần hemoglobin bằng kỹ thuật HPLC

Bảng 3.29. Tổng hợp thành phần hemoglobin trên bệnh nhân HbH

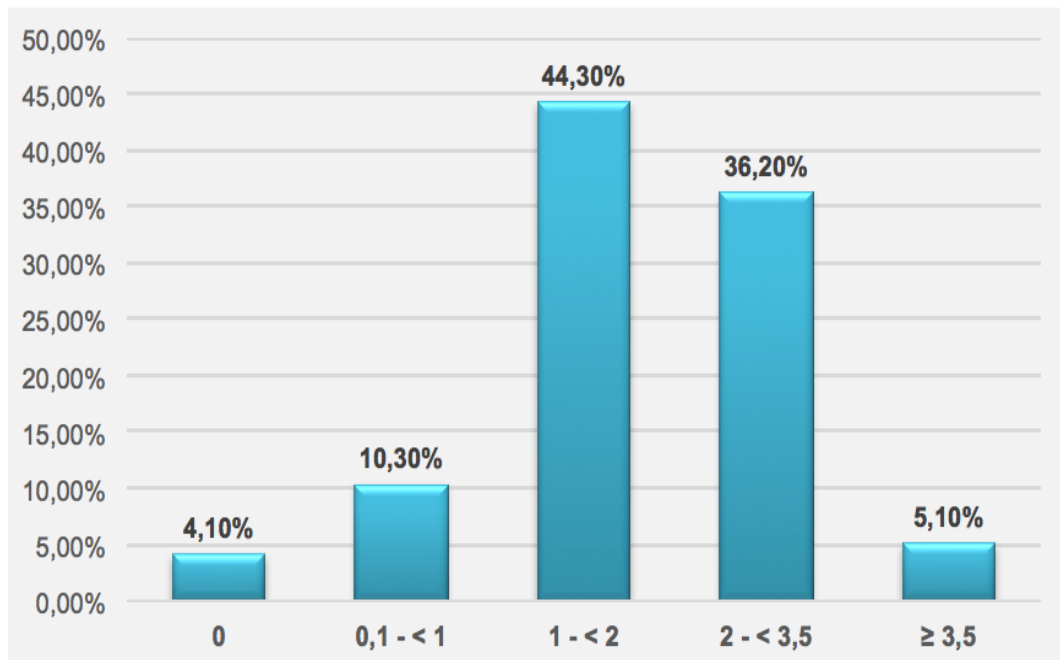
Thành phần Hemoglobin (%)	Mean \pm SD	Min - Max
HbA1	88,44 \pm 6,29	70,2 - 99,0
HbA2	1,86 \pm 1,27	0 - 5,3
HbH	8,29 \pm 5,65	0 - 26,9
Hb Bart's	0,23 \pm 1,32	0 - 8,3
Hb F	0,97 \pm 2,92	0,3 - 21,8

Nhận xét: Ngoài thành phần HbA1, HbA2, thấy có sự xuất hiện của các loại Hemoglobin khác như HbH, Hb Bart's và HbF. Tuy nhiên, sự có mặt và nồng độ của các loại hemoglobin này khác nhau ở từng bệnh nhân.

Bảng 3.30. Tổng hợp thành phần hemoglobin theo nhóm bệnh

Loại Hb	N	Bệnh HbH				p
		(--/- α) (31)		(--/- α^T) (66)		
		Mean \pm SD	Min-max	Mean \pm SD	Min-max	
HbA1	97	90,6 \pm 6,71	73,1 - 98,4	87,42 \pm 5,87	70,2 - 99	0,001
HbA2=0	4	0	0,0	0	0,0	0,09
HbA2>0	93	1,92 \pm 1,38	0,6 - 5,2	1,96 \pm 1,17	0,4 - 5,3	
HbH=0	16	0	0,0	0	0,0	<0,001
HbH>0	81	9,02 \pm 6,0	4,0 - 26,9	10,28 \pm 4,08	5,0 - 22,0	

Nhận xét: Trung bình HbA2, HbH ở nhóm (--/- α) thấp hơn ở nhóm (--/- α^T). Ở cả 2 nhóm bệnh, đều có bệnh nhân có HbA2=0, HbA2>3%. Có 16/97 (16,49%) số bệnh nhân không thấy có HbH (=0) trong thành phần Hb.



Biểu đồ 3.9. Tỷ lệ HbA2 trong thành phần hemoglobin của bệnh HbH

Nhận xét: Hầu hết bệnh nhân HbH đều có HbA2 giảm. HbA2 phổ biến nhất nằm trong khoảng từ 1 - < 2% (44,3%). Có 5,1% số bệnh nhân có HbA2 $\geq 3,5\%$, trường hợp này thường kết hợp với đột biến gen β globin.

3.2.4. Tổng hợp một số mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng, đặc điểm huyết học và kiểu gen của bệnh HbH

Bảng 3.31. Một số đặc điểm lâm sàng và huyết học của từng nhóm bệnh HbH

Đặc điểm (N=97)	Bệnh HbH		P
	(--/- α)(31)	(--/- α^T)(66)	
Số lần truyền máu/năm	0,27 \pm 0,76	3,2 \pm 4,0	< 0,001
Tuổi vào viện	10,58 \pm 12,3	6,1 \pm 5,8	0,048
Mức độ thiếu máu	24,3%	75,7%	0,004
Gan 1 - 2 cm dưới bờ sườn	22,5%	39,3%	0,001
Gan \geq 3 cm dưới bờ sườn	6,4%	31,8%	
Lách 1 - 2 cm dưới bờ sườn	12,9%	34,8%	<0,001
Lách \geq 3 cm dưới bờ sườn	6,4%	33,3%	
Biến dạng xương	6,4%	60,6%	<0,001
Hb (g/dL)	86,46 \pm 14,93	74,92 \pm 12,75	0,004
RBCx10 ¹² /L	5,3 \pm 0,55	4,08 \pm 0,91	< 0,001
HCT (%)	29,71 \pm 4,26	27,87 \pm 6,04	0,13
MCV (fL)	58,06 \pm 9,19	67,53 \pm 10,93	< 0,001
MCH (pg)	17,28 \pm 2,93	19,23 \pm 3,51	0,009
MCHC (%)	29,66 \pm 2,93	28,51 \pm 2,42	0,046
HbA1 (%)	90,6 \pm 6,71	87,42 \pm 5,87	0,001
HbA2 (%)	1,85 \pm 1,4	1,87 \pm 1,22	0,09
HbH (%)	6,4 \pm 6,53	9,19 \pm 5,0	<0,001

Nhận xét: Nhóm bệnh HbH (--/- α^T) có biểu hiện lâm sàng và huyết học nặng hơn nhóm (--/- α): truyền máu nhiều hơn, tuổi vào viện sớm hơn, thiếu máu, gan lách to, biến dạng xương nhiều hơn. Hb, HCT, MCHC thấp hơn, trong khi MCV, MCH và HbH cao hơn, với $p < 0,05$. HCT và HbA2 có $p > 0,05$.

3.2.4.1. Mối liên quan giữa từng nhóm đột biến gây bệnh và các biểu hiện lâm sàng và huyết học

Bảng 3.32. Một số biểu hiện lâm sàng và huyết học của từng loại đột biến gây bệnh HbH

Đặc điểm	--SEA/- α ^{3.7}	--SEA/- α ^{4.2}	--SEA/- α ^{HbQs}	--SEA/- α ^{c.2delT}	--SEA/- α ^{HbCs}	p
N	21	9	4	6	53	
TM = 0	17 (80%)	7 (77,7%)	1 (25%)	3 (50%)	3 (5,6%)	< 0,001
TM rải rác	4 (19%)	2 (22,2%)	3 (75%)	2 (33,3%)	40 (75,4%)	< 0,001
Phụ thuộc TM	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (16,6%)	10 (18,9%)	< 0,001
TM/năm (lần)	0,24 ± 0,39	1,49 ± 3,61	1,38 ± 1,38	3,0 ± 5,13	3,32 ± 3,77	0,034
Tuổi vào viện	11,24 ± 13,65	9,2 ± 9,48	6,42 ± 8,92	5,75 ± 4,49	5,8 ± 5,85	0,045
Thiếu máu	11,10%	13,90%	50,0%	66,60%	68,10%	0,002
Hb (g/dl)	93,22 ± 17,03	95,6 ± 15,29	84,93 ± 12,01	84,0 ± 18,25	75,37 ± 14,46	< 0,001
RBCx10 ¹² /L	5,33 ± 0,62	5,23 ± 0,38	4,8 ± 0,87	4,51 ± 0,78	3,96 ± 0,89	< 0,001
HCT(%)	38,28 ± 14,3	30,69 ± 4,47	27,66 ± 3,04	28,58 ± 6,16	27,03 ± 4,56	< 0,001
MCV(fL)	67,9 ± 10,46	54,12 ± 5,13	59,94 ± 10,17	59,42 ± 2,69	77,75 ± 16,77	< 0,001
MCH(pg)	19,06 ± 2,9	16,22 ± 1,5	17,79 ± 3,32	17,04 ± 0,57	25,6 ± 6,72	< 0,001
MCHC(%)	32,3 ± 2,06	30,4 ± 2,35	29,3 ± 3,16	29,5 ± 1,43	28,1 ± 23,2	0,003
HbA1(%)	91,69 ± 6,83	88,33 ± 6,16	89,78 ± 2,16	85,08 ± 4,8	87,26 ± 6,11	0,056
HbA2(%)	1,79 ± 0,75	2,21 ± 2,31	1,72 ± 0,5	2,18 ± 1,58	1,98 ± 1,2	0,909
HbH(%)	8,15 ± 5,39	10,27 ± 6,95	8,5 ± 2,65	9,48 ± 3,15	10,7 ± 4,22	0,469

Nhận xét: (TM: truyền máu). Các kiểu gen được xếp theo thứ tự từ trái sang phải, tăng dần về độ nặng của các biểu hiện lâm sàng và cận lâm sàng, biểu hiện ở hầu hết các chỉ số nghiên cứu, với $p < 0,05$. HbA1, HbA2, HbH có $p > 0,05$.

3.3. Chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

3.3.1. Sàng lọc và chẩn đoán xác định người mang gen bệnh α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có thai bị phù

Chúng tôi sử dụng chỉ số $MCV < 80fL$, $MCH < 27pg$, điện di hemoglobin để sàng lọc (test sàng lọc) người mang gen bệnh thalassemia, đồng thời sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử phân tích gen α globin, đối chiếu và chẩn đoán xác định tình trạng mang gen bệnh α -thalassemia cho 341 cặp vợ chồng có thai bị phù.

Bảng 3.33. Kết quả sàng lọc và chẩn đoán xác định người mang gen α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có thai bị phù

Đối tượng	N	%	Kiểu gen
Tổng số cặp vợ chồng có thai bị phù	341	100	
Cặp vợ chồng dương tính với test sàng lọc	275	80,6	
Cặp vợ chồng có đột biến gen α globin	292	85,6	-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$
Cặp vợ chồng không mang gen α thalassemia	49	14,3	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

Nhận xét: Có 341 cặp vợ chồng có thai bị phù được sàng lọc bằng phương pháp trên, phát hiện 275/341 (80,6%) cặp vợ chồng, trong đó cả vợ và chồng đều có $MCV < 80fL$, $MCH < 27pg$. Phân tích gen α globin bằng kỹ thuật PCR cho 341 cặp vợ chồng có thai bị phù, đối chiếu với chỉ số MCV , MCH và $HbA2$, phát hiện 292/341 (85,6%) cặp vợ chồng là người mang gen α^0 -thalassemia, 100% đều có kiểu gen --^{SEA}/ $\alpha\alpha$. Có 49 (14,3%) cặp vợ chồng có thai bị phù không phải là người mang gen α -thalassemia, có kiểu gen $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Như vậy, tỷ lệ phát hiện người mang gen α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có thai bị phù bằng chỉ số “ $MCV < 80fL$ và $MCH < 27pg$ ” là 275/292 (94,1%). Có 17 (4,98%) cặp vợ chồng có thai bị phù được chẩn đoán xác định là người mang gen α^0 -thalassemia bằng phân tích gen α globin, mà có vợ hoặc chồng có $MCV > 80fL$ hoặc $MCH > 27pg$.

3.3.1.1. Đặc điểm huyết học của người mang gen α^0 -thalassemia

Chúng tôi phân tích đặc điểm huyết học của 292 cặp vợ chồng đã được chẩn đoán xác định là mang gen α^0 -thalassemia như sau:

- Tổng hợp về đặc điểm huyết học của người mang gen α^0 -thalassemia

Bảng 3.34. Đặc điểm huyết học của người mang gen α^0 -thalassemia

Đặc điểm Huyết học	Giới	Mean \pm SD		Giới hạn bình thường	P
		Vợ chồng có phù thai (341)			
		Mang gen (292)	Không mang gen (49)		
RBC $\times 10^{12}/L$	Nam	6,18 \pm 0,64	5,32 \pm 0,51	5,9 - 4,5	< 0,001
	Nữ	4,67 \pm 0,54	4,6 \pm 0,45	5,2 - 4,0	0,022
HGB (g/dl)	Nam	13,16 \pm 1,20	15,60 \pm 1,03	13,5 - 17,5	< 0,001
	Nữ	9,88 \pm 1,14	13,17 \pm 1,97	12,0 - 16,0	<0,001
HCT (%)	Nam	41,75 \pm 7,21	47,82 \pm 4,77	41 - 53	< 0,001
	Nữ	31,7 \pm 3,52	41,05 \pm 3,48	36 - 46	<0,001
MCV (fL)	Nam	66,59 \pm 5,28	89,91 \pm 5,0	80 - 100	< 0,001
	Nữ	67,85 \pm 4,68	90,55 \pm 5,92	80 - 100	<0,001
MCH (pg)	Nam	21,27 \pm 1,6	29,27 \pm 1,49	26 - 34	< 0,001
	Nữ	21,22 \pm 1,67	27,99 \pm 4,27	26 - 34	<0,001
MCHC (%)	Nam	31,65 \pm 1,65	32,55 \pm 1,45	31 - 37	< 0,05
	Nữ	31,14 \pm 1,67	31,94 \pm 4,24	31 - 37	<0,05

Nhận xét: Cặp vợ chồng có thai bị phù trong nghiên cứu là người mang gen α^0 -thalassemia, có giá trị trung bình của các chỉ số RBC, HGB, HCT, MCHC giảm nhẹ, hoặc nằm trong giới hạn bình thường, giá trị trung bình của các chỉ số MCV, MCH giảm rõ rệt so với người không mang gen bệnh. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê $p < 0,001$ và $p < 0,05$.

- *Chỉ số MCV(fL)*

Bảng 3.35. Đặc điểm về chỉ số MCV ở người mang gen α^0 -thalassemia

Nhóm MCV (fL)	Số người mang gen α^0 -thalassemia			
	Nam	(%)	Nữ	(%)
< 65	103	35,3	75	25,7
65 - < 80	183	62,7	212	72,6
≥ 80	6	2,05	5	1,71
Tổng	292	100	292	100

Nhận xét: Người mang gen α^0 -thalassemia trong nghiên cứu hầu hết đều có MCV thấp, phân bố chủ yếu trong khoảng từ 65-79,9fl, chiếm 72,6% ở giới nữ và 62,7% ở giới nam. Tiếp theo là nhóm có MCV<65fL, ở nam (35,3%) và nữ (25,7%). Số người mang gen α^0 -thalassemia có MCV \geq 80fL chiếm 2,05% ở nam và 1,71% ở nữ.

- *Chỉ số MCH (pg)*

Bảng 3.36. Đặc điểm về chỉ số MCH ở người mang gen α^0 -thalassemia

Nhóm MCH (pg)	Số người mang gen α^0 -thalassemia			
	Nam	(%)	Nữ	(%)
< 15	1	0,3	1	0,3
15 - < 27	288	98,6	288	98,6
≥ 27	3	1,02	3	1,02
Tổng	292	100	292	100

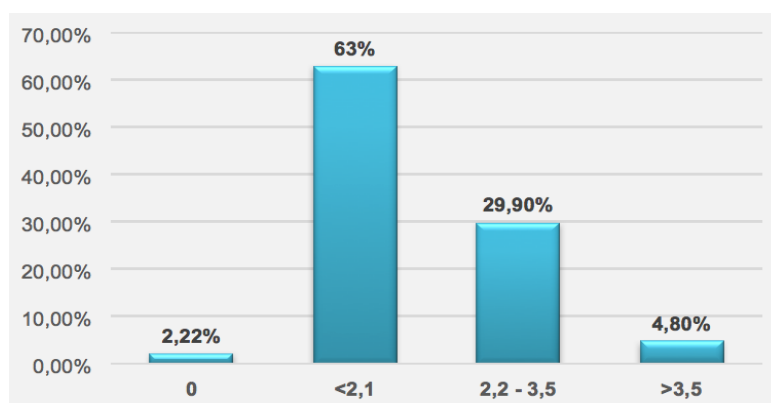
Nhận xét: Người mang gen α^0 -thalassemia trong nghiên cứu chủ yếu có MCH thấp, chủ yếu trong khoảng từ 15 - 26pg, chiếm 98,6% ở cả hai giới. Nhóm có MCH < 15pg chiếm tỷ lệ thấp 0,3%. Số người mang gen α^0 -thalassemia có MCH \geq 27pg chiếm 1,02% ở cả 2 giới nam và nữ.

• Đặc điểm về thành phần Hemoglobin

Bảng 3.37. Phân tích thành phần Hemoglobin ở người mang gen α^0 -thalassemia

Hb (%)	Số người	Mean \pm SD		Giới hạn bình thường	p
		Số người vợ và chồng phù thai			
		Mang gen (584)	Không mang gen (98)		
HbA1	584	96,66 \pm 4,27	95,99 \pm 6,00		<0,001
HbA2	571	2,13 \pm 0,89	2,56 \pm 1,11	2,5 - 3,5	<0,001
HbH	17	12,52 \pm 3,37	0	0	<0,001
HbE	22	14,89 \pm 3,44	0	0	<0,001
HbF	6	14,83 \pm 13,57	<1,5	<1,5	<0,001

Nhận xét: Thành phần HbA1, HbA2 của vợ và chồng là người mang gen α^0 -thalassemia giảm nhẹ, hoặc nằm trong giới hạn bình thường, so với cặp vợ chồng có phù thai nhưng không mang gen và so với cặp vợ chồng hoàn toàn bình thường. Có 17/584 (2,9%) người mang gen α^0 -thalassemia có kèm theo HbH. Có 22/584 (3,76%) người mang gen α^0 -thalassemia có kèm theo HbE (α^0 /HbE). Sử dụng điện di Hemoglobin trong sàng lọc người mang gen bệnh α -thalassemia giúp tăng tỷ lệ phát hiện người mang HbH và HbE.



Biểu đồ 3.10. Đặc điểm HbA2 của người mang gen α^0 -thalassemia

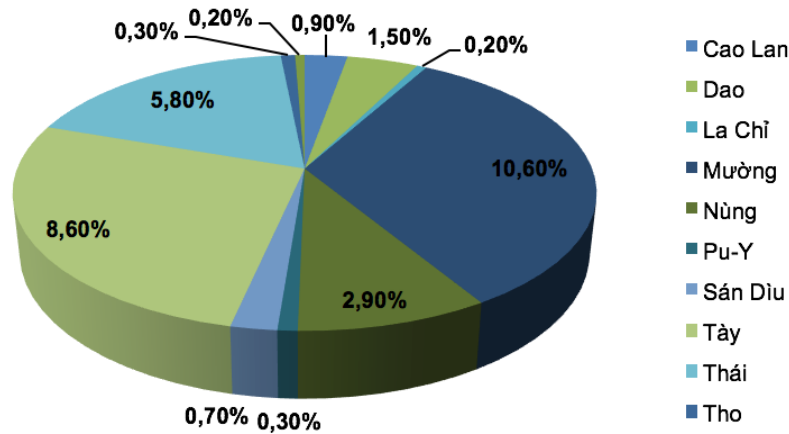
Nhận xét: Có 571/584 người mang gen α^0 -thalassemia được sàng lọc có HbA2>0, chia thành 3 nhóm: Nhóm có HbA2 giảm <2.1 (63,0%), nhóm có HbA2 bình thường 2,2-3,5% (29,9%), nhóm có HbA2 tăng >3,5% (4,8%), là nhóm người mang gen α -thalassemia kết hợp với mang gen β -thalassemia (α^0/β).

3.3.1.3. Đặc điểm dịch tễ của các cặp vợ chồng là người mang gen α^0 -thalassemia có thai bị phù.

Bảng 3.38. Tỷ lệ người mang gen α^0 -thalassemia theo địa phương

Địa chỉ	N	Tỷ lệ (%)	Địa chỉ	N	Tỷ lệ (%)
Bắc Giang	42	7,2	Lào Cai	4	0,7
Bắc Kạn	8	1,3	Nam Định	20	3,4
Bắc Ninh	6	1	Nghệ An	8	1,4
Cao Bằng	12	2,1	Ninh Bình	18	3,1
Hà Giang	18	3,1	Phú Thọ	22	3,8
Hà Nam	10	1,7	Quảng Bình	2	0,3
Hà Nội	110	18,8	Quảng Ninh	30	5,2
Hà Tĩnh	6	1	Sơn La	28	4,8
Hải Dương	6	1	Sơn Tây	2	0,3
Hải Phòng	12	2,1	Thái Bình	22	3,8
Hoà Bình	34	5,8	Thái Nguyên	30	5,1
Hung Yên	6	1	Thanh Hoá	46	7,9
Lai Châu	6	1	Tuyên Quang	26	4,5
Lạng Sơn	12	2,1	Vĩnh Phúc	16	2,7
Yên Bái	22	3,8			

Nhận xét: Người mang gen bệnh α^0 -thalassemia trong nghiên cứu đến từ Hà Nội có tỷ lệ là 18,8%, tiếp theo là Thanh Hoá 7,9%, Bắc Giang 7,2%, Hoà Bình 5,8%.



Biểu đồ 3.11. Tỷ lệ người mang gen α^0 -thalassemia theo dân tộc

Nhận xét: Số người Kinh mang gen α^0 -thalassemia trong nghiên cứu có tỷ lệ cao nhất, chiếm 68%. Tiếp theo là dân tộc Mường 10,6%, và dân tộc Tày 8,6%.

3.3.1.4. Đặc điểm chung về sản phụ là người mang gen α^0 -thalassemia

- *Tương quan giữa tiền sử phù thai và tình trạng phù thai hiện tại của sản phụ*

Bảng 3.39. Tình trạng thai hiện tại và tiền sử phù thai của sản phụ

Tình trạng thai hiện tại		Tiền sử phù thai		Tổng
		Có	Không	
Đang có thai	Có phù	98 (40,1%)	146 (59,8%)	244 (83,5%)
	Không phù	29 (69,1%)	13 (30,9%)	42 (14,3%)
Hiện chưa có thai		6	0	6 (2,05%)
Tổng		133	159	292

Nhận xét: Có 286/292 sản phụ hiện đang có thai, trong đó có 244 sản phụ đang phù thai, và 42 sản phụ chưa có phù thai tại thời điểm sàng lọc. Trong số 244 sản phụ đang phù thai, có 98 (40,1%) sản phụ đã từng có ít nhất 1 lần bị phù thai trước đó, và có 146 (59,8%) sản phụ có biểu hiện phù thai lần đầu. Trong số 42 sản phụ chưa có phù thai tại thời điểm sàng lọc, có 29 (69,1%) sản phụ đã từng có ít nhất 1 lần phù thai, còn lại 13 (30,9%) sản phụ không có tiền sử phù thai. Có 6/292 đối tượng hiện chưa có thai, nhưng đã có tiền sử phù thai.

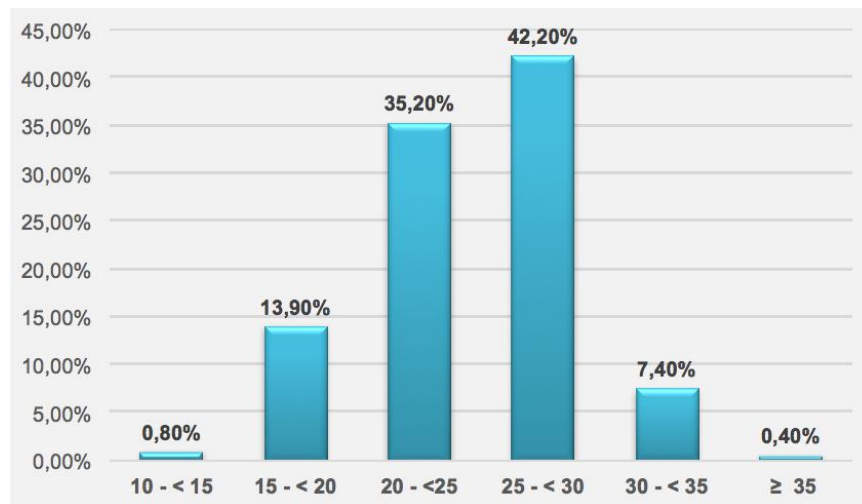
- Đặc điểm về tuổi người mang gen α^0 -thalassemia và tuổi thai

Bảng 3.40. Đặc điểm về tuổi của gia đình mang gen α^0 -thalassemia

Tuổi	N	Mean \pm SD	Min	Max
Tuổi bố (năm)	292	31,17 \pm 5,24	20	47
Tuổi mẹ (năm)	292	28,17 \pm 5,33	17	43
Tuổi thai đang phù (tuần)	244	24,89 \pm 4,2	10	38

Nhận xét: Có 244 thai đang bị phù tại thời điểm chẩn đoán, tuổi thai bị phù trung bình là 24,89 tuần. Thai bị phù nhỏ nhất là 10 tuần, lớn nhất là 38 tuần.

- Phân bố về tuần thai tại thời điểm được phát hiện phù thai của sản phụ



Biểu đồ 3.12. Tuần thai của các sản phụ mang gen α^0 -thalassemia

Nhận xét: Trong tổng số các 244 sản phụ có thai bị phù, thời điểm phát hiện thai bị phù phổ biến nhất nằm khoảng từ 25 - 30 tuần thai, chiếm 42,2%, tiếp theo là từ 21-24 tuần, chiếm 35,2%. Có 14,7% thai bị phù được phát hiện sớm dưới 20 tuần. Thời điểm phát hiện sớm nhất là 10 tuần, và muộn nhất là 38 tuần.

3.3.2. Kết quả xác định người mang gen α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc bệnh HbH

Bảng 3.41. Kiểu gen của gia đình có con HbH chẩn đoán trước sinh

Kiểu gen của gia đình	Các gia đình		n/N (%)
	Có tiền sử sinh con HbH (N)	Chẩn đoán trước sinh (n)	
$(--^{SEA}/\alpha\alpha)/(-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha)$	21 (21,6%)	5 (8,9%)	23,8
$(--^{SEA}/\alpha\alpha)/(-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha)$	9 (9,27%)	5 (8,9%)	55,5
$(--^{SEA}/\alpha\alpha)/(-\alpha^{HbQs}/\alpha\alpha)$	4 (4,12%)	3 (4,6%)	75,0
$(--^{SEA}/\alpha\alpha)/(-\alpha^{HbCs}/\alpha\alpha)$	54 (55,6%)	35 (62,5%)	64,8
$(--^{SEA}/\alpha\alpha)/(-\alpha^{c,2delT}/\alpha\alpha)$	6 (6,18%)	5 (8,9%)	83,3
$(--^{SEA}/\alpha\alpha)/(-\alpha^1/\alpha\alpha)$	1 (1,03%)	1 (1,7%)	100
$(--^{SEA}/\alpha\alpha)/(-\alpha^{c,92 G>A}/\alpha\alpha)$	1 (1,03%)	1 (1,7%)	100
$(--^{SEA}/\alpha\alpha)/(-\alpha^{3,7}/-\alpha^{HbCs})$	1 (1,03%)	1 (1,7%)	100
Tổng	97 (100%)	56 (100%)	57,7%

Nhận xét: Trong tổng số 97 gia đình có tiền sử sinh con mắc bệnh HbH đã được nghiên cứu ở nội dung 3.1, có 56/97 (57,7%) cặp vợ chồng có nguyện vọng sinh con tiếp theo, đã được tư vấn và tiến hành chẩn đoán trước sinh. Trong số các gia đình làm chẩn đoán trước sinh, kiểu gen $(--^{SEA}/-\alpha^{HbCs})$ chiếm tỷ lệ cao nhất 62,5%, tiếp theo là kiểu gen $(--^{SEA}/-\alpha^{c,2delT})$; $(--^{SEA}/-\alpha^{4,2})$; $(--^{SEA}/-\alpha^{3,7})$ cùng chiếm 8,9%. Các kiểu gen còn lại chiếm tỷ lệ thấp hơn. Tỷ lệ các gia đình làm chẩn đoán trước sinh ở từng kiểu gen tính trên số các gia đình có tiền sử sinh con mắc HbH, thấp nhất là $(--^{SEA}/-\alpha^{3,7})$, $(--^{SEA}/-\alpha^{4,2})$

3.3.3. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

3.3.3.1. Kết quả chẩn đoán trước sinh của bệnh Hb Bart's

Bảng 3.42. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh Hb Bart's

Kiểu gen của thai	Số thai	Tỷ lệ %
Bình thường ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	47	38,2
Dị hợp tử ($--^{SEA}/\alpha\alpha$)	32	26,0
Mắc Hb Bart's ($--^{SEA}/--^{SEA}$)	44	35,7
Tổng	123	100

Nhận xét: Chẩn đoán trước sinh cho 123 thai có nguy cơ mắc Hb Bart's, phát hiện 47/123 (38,2%) thai bình thường ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), 32/123 (26,0%) thai dị hợp tử ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), 44/123 (35,7%) thai mắc bệnh Hb Bart's.

3.3.3.2. Kết quả chẩn đoán trước sinh của bệnh HbH

Bảng 3.43. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh HbH

Kiểu gen của thai	Số thai	Tỷ lệ %
Bình thường ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	11	19,6
Dị hợp tử	36	64,2
($--^{SEA}/\alpha\alpha$)	25	44,6
($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$)	4	7,1
($-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$)	2	3,5
($-\alpha^{HbQs}/\alpha\alpha$)	1	1,7
($-\alpha^{HbCs}/\alpha\alpha$)	4	7,1
Mắc HbH	9	16,0
($--^{SEA}/-\alpha^{4,2}$)	1	1,7
($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$)	7	12,5
($--^{SEA}/-\alpha^{c,2delT}$)	1	1,7
Tổng	56	100

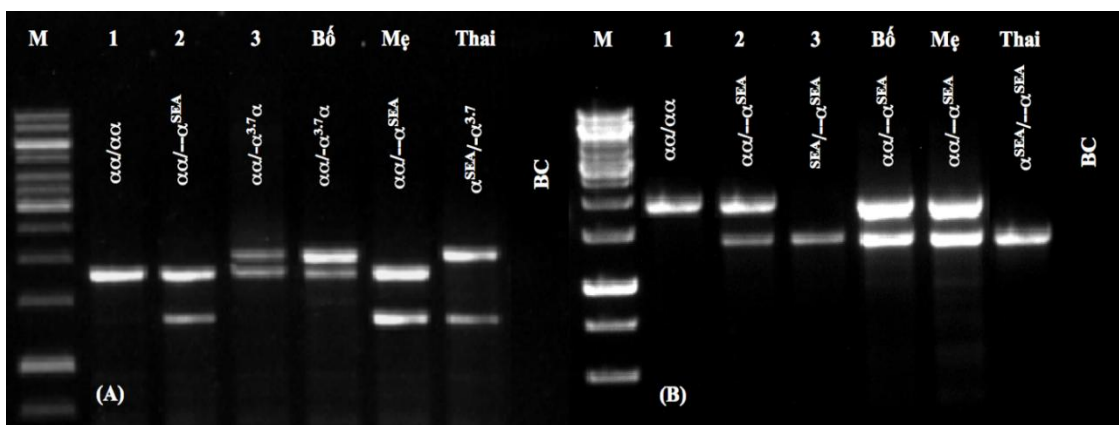
Nhận xét: Chẩn đoán trước sinh cho 56 thai có nguy cơ mắc HbH, phát hiện 11 thai bình thường (19,6%), 36 thai dị hợp tử (64,2%), và 9 thai mắc bệnh HbH (16,0%). Thai dị hợp tử đột biến ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) chiếm tỷ lệ cao nhất là 44,6%, tiếp theo là dị hợp tử đột biến ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) và ($-\alpha^{HbCs}/\alpha\alpha$) cùng chiếm 7,1%. Thai mắc HbH có kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$) cao nhất chiếm 12,5%.

3.3.3.3. Tổng hợp kết quả chẩn đoán trước sinh của bệnh Hb Bart's và HbH

Bảng 3.44. Tổng hợp kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

Nguy cơ bệnh	Số thai	Kết quả chẩn đoán trước sinh (%)		
		Bình thường	Dị hợp tử	Thai bệnh
Hb Bart's	123 (100%)	47 (38,2%)	32 (26,0%)	44 (35,7%)
HbH	56 (100%)	11 (19,6%)	36 (64,2%)	9 (16,0%)
Tổng	179 (100%)	58 (32,4%)	68 (38%)	53 (29,6%)

Nhận xét: Chẩn đoán trước sinh cho tổng số 179 sản phụ, trong đó có 123 sản phụ có nguy cơ sinh con phù thai do Hb Bart's, và 56 sản phụ có nguy cơ sinh con mắc HbH. Kết quả chẩn đoán trước sinh phát hiện tổng số 58/179 (32,4%) thai khoẻ mạnh, 68/179 (38%) thai dị hợp tử 68/179 (37,9%), 53/179 (29,6%) thai mắc bệnh.



Hình 3.15. Chẩn đoán trước sinh bệnh HbH và Hb Bart's

Nhận xét: (A) Hình ảnh điện di sản phẩm GAP-PCR chẩn đoán trước sinh bệnh HbH. Mẫu 1,2,3 là mẫu chứng của người bình thường, dị hợp --^{SEA}/αα, dị hợp -α^{3.7}/αα. Mẫu bốn là người dị hợp -α^{3.7}/αα. Mẫu mẹ là người dị hợp --^{SEA}/αα. Thai nhi mắc HbH --^{SEA}/-α^{3.7}. (B) Hình ảnh điện di sản phẩm GAP-PCR chẩn đoán trước sinh bệnh Hb Bart's. Mẫu 1,2,3 là mẫu chứng của người bình thường, dị hợp --^{SEA}/αα, đồng hợp --^{SEA}/--^{SEA}. Mẫu bố và mẹ đều là người dị hợp --^{SEA}/αα. Thai mắc hội chứng phù thai do Hb Bart's --^{SEA}/--^{SEA}.

3.3.3.4. *Đối chiếu kết quả chẩn đoán trước sinh*

Có 3/44 thai mắc Hb Bart's được thu thập máu cuống rốn trong quá trình đình chỉ thai, để đối chiếu với kết quả chẩn đoán trước sinh. Các kết quả chẩn đoán sau sinh và trước sinh đều hoàn toàn phù hợp.

KHOA HUYET HOC - BENH VIEN NHI TRUNG UONG 05/13/16
 POSITION:
 ID: LE.THI.HAI
 ADVIA2120I

TEST	RESULT	ABN	ORCOM: NORMALS	UNITS
WBC	109.6		(4.0 - 10.0)	10e9/L
%NEUT	3.9		(40 - 74)	%
%LYMPH	46.9		(17.0 - 48.0)	%
%MONO	1.3		(4.0 - 10.0)	%
%EOS	0.6		(0 - 7)	%
%BASO	0.1		(0 - 1.5)	%
%LUC	47.3		(0 - 4)	%
#NEUT	4.3		(1.9 - 8)	10e9/L
#LYMPH	51.4		(0.9 - 5.2)	10e9/L
#MONO	1.4		(0.16 - 1)	10e9/L
#EOS	0.6		(0 - 0.8)	10e9/L
#BASO	0.1		(0 - 0.2)	10e9/L
#LUC	51.9		(0 - 0.4)	10e9/L
LI	2.84		(1.90 - 3)	
MPXI	10.6		(-10 - 10)	
WBCP	39.1		(- -)	10e9/L
RBC	3.51		(3.90 - 5.80)	10e12/L
HGB	74		(123 - 157)	g/L
HCT	33.6		(31.5 - 50.0)	%
MCV	95.7		(80 - 97)	fL
MCH	20.9		(26.5 - 33.5)	pg
MCHC	219		(320 - 360)	g/L
CH	20.3		(- -)	pg
CHCM	215		(320 - 360)	g/L
RDW	19.6		(10.0 - 15.0)	%
HDW	31.2		(2.2 - 3.2)	g/dL
%NRBC	*****			
#NRBC	*****			



Hình 3.16. Máu cuống rốn thu thập từ thai bị phù mắc Hb Bart's

(A): Công thức máu, (B): Điện di hemoglobin có 100% là Hb Bart's

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Về đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia phát hiện bằng kỹ thuật PCR, MLPA và giải trình tự gen

Các đột biến gây bệnh α -thalassemia hầu hết là các đột biến đã biết, được xác định bằng nhiều loại kỹ thuật khác nhau dựa trên nền tảng của kỹ thuật PCR. Quyết định lựa chọn kỹ thuật nào ứng dụng vào chẩn đoán chủ yếu tùy thuộc vào việc xác định đặc điểm các đột biến gây bệnh phổ biến ở từng quần thể, và tùy theo năng lực của mỗi trung tâm chẩn đoán [61, 86]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn các kỹ thuật ARMS-PCR, GAP-PCR, MLPA và giải trình tự gen để phát hiện các đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia.

4.1.1. Ứng dụng kỹ thuật PCR, MLPA, giải trình tự gen Sanger xác định đột biến gen α globin

4.1.1.1. Ứng dụng kỹ thuật GAP-PCR xác định đột biến mất đoạn thường gặp trên gen α globin

GAP-PCR là kỹ thuật được sử dụng phổ biến để phát hiện hầu hết các đột biến mất đoạn thường gặp của cụm gen α globin, chứng tỏ là một trong các kỹ thuật hiệu quả nhất để phát hiện 7 đột biến thường gặp trên gen α globin, chiếm khoảng 80% các đột biến ở hầu hết các quần thể [87]. Tuy nhiên, kỹ thuật này chỉ cho phép phát hiện các đột biến đã xác định được chính xác điểm đứt gãy, và đôi khi phản ứng thất bại do có sự thay đổi ngẫu nhiên của các nucleotid trong vùng trình tự mà cặp mồi đã thiết kế tương ứng. Về mặt kỹ thuật, khuếch đại cụm gen α globin đòi hỏi các điều kiện trong phản ứng PCR phải nghiêm ngặt, do trình tự gen α globin mang hàm lượng GC nhiều hơn và có tính tương đồng cao, vì vậy các cặp mồi đôi lúc không đạt đến hoạt động tối ưu. Để khắc phục nhược điểm này, các cặp mồi được thiết kế với tính năng cao hơn, và bổ sung một số hoạt chất vào phản ứng. Các

cặp mồi chúng tôi sử dụng trong GAP-PCR cho bệnh α -thalassemia đã được thiết kế dưới dạng đa mồi, và được sàng lọc trong cùng một phản ứng, nhằm giảm bớt các thao tác và thời gian thực hiện kỹ thuật [1]. Các cặp mồi này được thiết kế đi qua điểm đứt gãy của mỗi một đột biến kể trên, mỗi đột biến này được nhận diện dựa trên kích thước tương ứng của mỗi loại. Do 5 loại đột biến này đều bao gồm sự mất đoạn của gen $\alpha 2$, do đó việc khuếch đại gen $\alpha 2$ sẽ cho phép xác định các đột biến này có kiểu gen đồng hợp hay dị hợp tử, dựa trên sự có mặt hay vắng mặt của gen $\alpha 2$.

Quy trình phân tích gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$ được thực hiện theo phương pháp của Samuel S. Chong [43], trong đó, đột biến $--\alpha^{\text{THAI}}$ được mô tả bởi Winichagoon [84] lần đầu tiên trên quần thể của người Thailand. Nếu bệnh nhân dị hợp tử với 1 đột biến, hình ảnh điện di sẽ có 2 băng, trong đó một băng tương ứng với gen $\alpha 2$ bình thường ở kích thước 1800bp, băng còn lại tương ứng với loại đột biến dị hợp tử mà bệnh nhân có, ở các kích thước tương ứng: $--^{\text{SEA}}$ (1394 bp); $-\alpha^{3.7}$ (2022 bp), $-\alpha^{4.2}$ (1628 bp); $--^{\text{THAI}}$ (1166 bp); $--^{\text{FIL}}$ (1024 bp). Nếu bệnh nhân dị hợp tử kép với hai đột biến, hình ảnh điện di sẽ có hai băng tương ứng với hai loại đột biến khác nhau. Nếu bệnh nhân đồng hợp tử đột biến mất đoạn hai gen, hình ảnh điện di sẽ có một băng ở vị trí của loại đột biến mất đoạn hai gen đó. Nếu bệnh nhân đồng hợp tử đột biến mất đoạn một gen, hình ảnh điện di sẽ có một băng ở kích thước tương ứng với vị trí của đột biến mất đoạn một gen đó.

4.1.1.2. Ứng dụng kỹ thuật MLPA xác định đột biến mất đoạn hiếm gặp trên gen α globin

MLPA được sử dụng để xác định các đột biến gây bệnh không nằm trong nhóm kỹ thuật PCR phát hiện được, hoặc trong một số trường hợp MLPA được sử dụng như một kỹ thuật thứ hai để đối chiếu. Kỹ thuật dựa trên các độ dài khác nhau được đánh dấu bằng các tín hiệu huỳnh quang, nên có thể phân tích được khoảng 50 cặp đầu dò khác nhau, trải trên một vùng gen rộng [88] [89].

Chúng tôi sử dụng bộ kit thương mại (SALSA MLPA kit P140B2 HBA, MRC-Holland, The Netherlands), với 26 cặp probe được sử dụng, gắn trên vùng gen dài 130 kb của cụm gen α globin, từ gen POLR3K đến đầu 3' của gen $\alpha 1$. Ngoài ra, còn bao gồm cả vùng HS-40 và tất cả các vùng gen mã hoá còn lại (ζ , $\alpha 1$, $\alpha 2$). Hỗn hợp đầu dò còn bao gồm 12 probes tham chiếu đánh dấu vào các vị trí khác ngoài 26 vị trí kể trên trên vùng gen 16p13.3, được sử dụng như bộ chứng nội kiểm cho mỗi mẫu. Tín hiệu của các đầu dò được xác định bằng cách chia chiều cao đỉnh của mỗi sản phẩm khuếch đại trên tổng chiều cao của đỉnh đầu dò đối chứng (reference probe) trong hỗn hợp đầu dò. Sau đó, mỗi đỉnh bình thường (normalized probe) lại được chia cho chiều cao trung bình của các đỉnh bình thường cho các mẫu chứng bình thường.

Trên các công bố của y văn thế giới, kỹ thuật MPLA được sử dụng phổ biến trong việc phát hiện các đột biến mất đoạn hiếm gặp của bệnh α -thalassemia. Nghiên cứu năm 2011 ở Brazil, MLPA được sử dụng để xác định kiểu gen của 8 bệnh nhân HbH có kiểu hình không tương ứng với kiểu gen đã được xác định bằng kỹ thuật PCR [90]. Ngoài ra, các nghiên cứu khác tại Phần Lan năm 2010 trên 48 có hồng cầu nhỏ, nhược sắc, HbA2 giảm [91], tại Nam Trung Quốc năm 2008 trên 118 mẫu DNA trong đó có 90 bệnh nhân α -thalassemia và 28 người bình thường khoẻ mạnh [92], tại Ý năm 2010 trên 25 bệnh nhân nghi ngờ mắc HbH nhưng chưa xác định được đột biến bằng các kỹ thuật thông thường, nghiên cứu có so sánh độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật MLPA với kỹ thuật Southern Blot và Realtime PCR [93]. Các nghiên cứu này khẳng định kỹ thuật MLPA là một kỹ thuật nhanh chóng, chính xác cho phép xác định đột biến gây bệnh α -thalassemia, đặc biệt đối với các đột biến mất đoạn lớn hiếm gặp.

4.1.1.3. Ứng dụng kỹ thuật ARMS-PCR xác định đột biến điểm thường gặp trên gen α globin

Kỹ thuật ARMS-PCR đã được nhiều y văn quốc tế [41-43] và trong nước [81] công bố là một trong các kỹ thuật phổ biến nhất được sử dụng để

phát hiện các đột biến điểm đã biết trong chẩn đoán bệnh α -thalassemia. Đây là kỹ thuật nhanh, đơn giản, không gây phóng xạ, cho phép sàng lọc nhiều đột biến khác nhau trên cùng một bệnh nhân. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn kỹ thuật này để phát hiện hai đột biến điểm thường gặp là $-\alpha^{\text{HbCs}}$ và $-\alpha^{\text{HbQs}}$.

Nhược điểm của kỹ thuật này là đòi hỏi các tiêu chuẩn nghiêm ngặt, cần tối ưu hoá các điều kiện phản ứng cho từng cặp mồi đặc hiệu với mỗi đột biến. Nếu không có thể xảy ra âm tính giả hoặc dương tính giả. Phản ứng PCR sẽ chỉ khuếch đại được đoạn DNA cần thiết khi có được sự bắt cặp hoàn chỉnh giữa trình tự đích và mồi. Ngoài ra, trong một quần thể đa dân tộc, với phổ đột biến rộng, thì ARMS-PCR không phải là kỹ thuật được khuyến cáo đầu tiên để xác định đột biến [94].

Quy trình phân tích được thực hiện theo phương pháp của Samuel S. Chong [43]. Dựa trên sự có mặt của băng tương ứng với đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ (183bp) hoặc $-\alpha^{\text{HbQs}}$ (138bp), có thể nhận định về đặc điểm của bệnh nhân mang các đột biến này ở dạng nào, đồng hợp tử, dị hợp tử hay dị hợp tử kép với hai đột biến khác nhau.

4.1.1.4. Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm hiếm gặp trên gen α globin

Gen α globin có chiều dài khoảng 1.2kb, gồm 2 gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$. Có hơn 50 loại đột biến điểm trên gen α globin đã được công bố, ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp protein, dẫn đến không hoặc suy giảm tổng hợp, hoặc tạo chuỗi α globin không bền vững. Các đột biến này phân bố với tần suất khác nhau ở các chủng tộc và khu vực khác nhau trên thế giới [61]. Đối với các đột biến điểm hiếm gặp, chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger để phát hiện. Nghiên cứu của chúng tôi có 9 bệnh nhân mang đột biến điểm hiếm gặp được phát hiện bằng kỹ thuật giải trình tự, chiếm 8,2% trên tổng số bệnh nhân HbH, gồm các kiểu gen ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{c.2delT}}$), ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{c.92 G}\rightarrow\text{A}}$), ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{c.426 A}\rightarrow\text{T}}$), ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{c.81G}\rightarrow\text{T}}$).

4.1.2. Về đột biến gen α globin trên người nghi ngờ mắc α -thalassemia

Do sự phối hợp giữa các allele α^0 -thalassemia và α^+ -thalassemia, tạo nhiều kiểu gen khác nhau, dẫn đến bệnh α -thalassemia có kiểu hình đa dạng. Việc chẩn đoán xác định bệnh và thể bệnh α -thalassemia dựa trên phân tích gen α globin có vai trò quan trọng trong điều trị, tiên lượng, tư vấn di truyền. Căn cứ trên các biểu hiện lâm sàng, bệnh nhân được nghi ngờ mắc α -thalassemia: tan máu, thiếu máu nhẹ, trung bình và nặng, gan lách to, vàng da, chậm lớn, có bộ mặt thalassemia, có tiền sử truyền máu hoặc chưa từng phải truyền máu. Tuy nhiên, các biểu hiện lâm sàng này đều không đặc hiệu. Nên việc chẩn đoán xác định bệnh α -thalassemia, đặc biệt với người mang gen bệnh và các thể bệnh không có triệu chứng cần dựa vào các xét nghiệm cận lâm sàng để khẳng định [87].

Cơ sở xét nghiệm đầu tiên là phân tích công thức máu. Hầu hết người mắc α -thalassemia đều có thiếu máu hồng cầu nhỏ, nhược sắc, MCV, MCH giảm, HbA2 giảm nhẹ hoặc bình thường. Khi mức tổng hợp chuỗi α globin giảm dưới 70%, thì chuỗi γ globin được tăng tổng hợp từ thời kỳ bào thai, tạo γ_4 là Hb Bart's, có thể được phát hiện khi điện di Hemoglobin ở giai đoạn ngay sau khi sinh [24]. Trong quá trình trưởng thành, chuỗi β globin tăng tổng hợp tạo β_4 là HbH, cũng có thể được phát hiện trên phân tích thành phần hemoglobin. Tất cả các thông số trên đều có vai trò trong chẩn đoán bệnh α -thalassemia, nhưng đều không có giá trị chẩn đoán xác định bệnh [95]. Chỉ có xét nghiệm phân tích gen α globin mới có giá trị khẳng định chẩn đoán bệnh và thể bệnh [13].

Có 299 bệnh nhân nghi ngờ mắc α -thalassemia trên lâm sàng được chỉ định làm xét nghiệm phân tích gen α globin. Tỷ lệ phát hiện đột biến của người mắc α -thalassemia là 61,5%. Trong đó 32,4% là người mắc HbH (97/299), 29,1% là người mang đột biến dị hợp tử (87/299), 38,1% không phát hiện thấy đột biến (114/299). Đặc biệt, chúng tôi phát hiện duy nhất một trường hợp bệnh nhân mắc Hb Bart's đồng hợp tử đột biến α^0 -thalassemia (0,33%) có kiểu gen

($--^{SEA}/--^{SEA}$), hiện 4 tuổi. Trong số 87 bệnh nhân dị hợp tử gen α globin, chỉ phát hiện 2 loại đột biến là dị hợp tử đột biến $--^{SEA}$ (91,9%) và $-\alpha^{3.7}$ (9,1%).

4.1.3. Về tỷ lệ các đột biến gen α globin trên bệnh nhân HbH

Có 97 bệnh nhân mắc bệnh HbH đã được chẩn đoán xác định bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Trong đó, 32% thuộc nhóm HbH dạng mất đoạn ($--/-\alpha$), 68% thuộc nhóm HbH dạng không mất đoạn ($--/\alpha^T$).

Bảng 4.1. So sánh tỷ lệ HbH mất đoạn và không mất đoạn ở các quần thể

Khu vực	HbH ($--/-\alpha$)	HbH ($--/\alpha^T$)	Ref.
Bắc Thái Lan	44/102 (43%)	58/102 (57%)	2005 [96]
Hồng Kong	87/114 (76%)	27/114 (24%)	2000 [51]
Sardina	130/154 (84%)	24/154 (16%)	1992 [97]
Ai Cập	41/61 (67%)	20/61 (33%)	2000 [98]
Thái Lan	83/147 (56%)	64/147 (44%)	2009 [36]
Cali, Mỹ	69/89 (77,5%)	20/89 (22,5%)	2001 [99]
Địa Trung Hải	216/251 (86%)	36/251 (14%)	2007 [97]
Việt Nam	31/97 (32%)	66/97 (68%)	2017

Tỷ lệ về kiểu gen của bệnh HbH rất khác nhau ở các nghiên cứu trên các chủng tộc khác nhau. Một nghiên cứu trên 595 bệnh nhi mắc HbH ở Guangxi Trung Quốc, tỷ lệ HbH dạng ($--/-\alpha$) là 59,5%, dạng ($--/\alpha^T$) là 40,5% [100]. Ở Thái Lan, tỷ lệ này có sự khác nhau giữa miền Bắc và miền Nam. Ở miền Bắc, 56% bệnh nhân thuộc nhóm ($--/-\alpha$) và 44% bệnh nhân thuộc nhóm ($--/\alpha^T$), trong khi ở miền Nam tỷ lệ này có xu hướng ngược lại, lần lượt là 47% và 53% [36] [96]. Ở Hong Kong, Cyprus, Sardina và Canada thì tỷ lệ ($--/\alpha^T$) lại thấp hơn hẳn, lần 24-30%, 15%, 14% và 12% [51], [97], [42, 101]. Như vậy, tỷ lệ bệnh nhân HbH dạng ($--/\alpha^T$) trong nghiên cứu của chúng tôi là cao nhất so với các nghiên cứu kể trên (Bảng 4.1). Nhóm HbH dạng ($--/\alpha^T$) thường có biểu hiện lâm sàng sớm và nặng, trong khi nhóm bệnh nhân HbH dạng ($--/-\alpha$)

thường có biểu hiện lâm sàng nhẹ hoặc không có biểu hiện lâm sàng có thể nhận thấy, thường do tình cờ phát hiện khi làm xét nghiệm công thức máu hoặc vì triệu chứng bệnh rõ lên khi mắc một bệnh lý khác kèm theo. Do đó, thực tế các bệnh nhân chỉ đến Viện khám khi có các dấu hiệu lâm sàng rõ, hoặc cần phải can thiệp điều trị. Điều này có thể giải thích số bệnh nhân HbH dạng ($--/\alpha^T$) trong nghiên cứu của chúng tôi gặp nhiều hơn dạng ($--/-\alpha$).

4.1.3.1. Về đột biến mất đoạn hai gen thường gặp ($--^{SEA}$, $--^{THAI}$, $--^{FIL}$)

Đột biến $--^{SEA}$ là đột biến mất hai gen trên cùng một NST phổ biến nhất Đông Nam Á, tạo allele α^0 -thalassemia. Tất cả các bệnh nhân HbH trong nghiên cứu đều có đột biến $--^{SEA}$, không có bệnh nhân nào có đột biến $--^{THAI}$ hoặc $--^{FIL}$. Tỷ lệ allele $--^{SEA}$ trong nghiên cứu của chúng tôi là 50%. Nghiên cứu ở miền Nam Trung Quốc năm 2014 trên 435 bệnh nhân HbH, kết luận tất cả đều mang đột biến $--^{SEA}$ [102]. Nghiên cứu của Thái Lan năm 2009 trên 147 bệnh nhân HbH, 98% có đột biến $--^{SEA}$, 2% có đột biến $--^{THAI}$ [36]. Như vậy, tỷ lệ bệnh nhân HbH mang đột biến $--^{SEA}$ trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các công bố khác trong khu vực.

4.1.3.2. Về đột biến mất đoạn 1 gen thường gặp ($-\alpha^{3.7}$), ($-\alpha^{4.2}$)

- Đột biến ($-\alpha^{3.7}$)

Đột biến 3.7-kb ($-\alpha^{3.7}$) là loại đột biến mất đoạn một gen phổ biến nhất, tạo allele α^+ thalassemeia. Đột biến này kết hợp với đột biến mất đoạn hai gen ($--^{SEA}$) gây bệnh HbH dạng mất đoạn ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). Tỷ lệ bệnh nhân HbH có kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$) trong nghiên cứu của chúng tôi chiếm 21,6%, thấp hơn so với các công bố trong khu vực. Ở Trung Quốc tỷ lệ này là 54%, Bắc Thái Lan là 56%, Hong Kong là 30% [36, 102, 103]. Do đột biến gặp ở nhóm bệnh nhân có biểu hiện lâm sàng nhẹ hoặc không có biểu hiện lâm sàng, nên bệnh nhân không hoặc ít phải đến khám tại Bệnh Viện. Một số trường hợp gặp ở người trưởng thành, tình cờ phát hiện khi làm xét nghiệm sàng lọc trong giai đoạn mang thai hoặc các dấu hiệu lâm sàng rõ lên vì một nguyên nhân bệnh lý khác kèm theo.

Tỷ lệ allen đột biến ($-\alpha^{3.7}$) trong nghiên cứu của chúng tôi là 10,8%. Một nghiên cứu ở Brazil năm 2009 trên 220 mẫu bệnh nhân, công bố 10,7% số bệnh nhân có thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc có đột biến ($-\alpha^{3.7}$), phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi [104]. Nghiên cứu chia 3 nhóm: 103 mẫu có thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc, 11 mẫu có hồng cầu nhỏ nhược sắc nhưng không có thiếu máu, và 106 mẫu có chỉ số huyết học bình thường. Các mẫu này được phân tích đột biến ($-\alpha^{3.7}$). Tỷ lệ đột biến ($-\alpha^{3.7}$) ở từng nhóm lần lượt như sau: Ở nhóm có thiếu máu, tỷ lệ dị hợp tử đột biến ($-\alpha^{3.7}$) là 19,4%, đồng hợp tử đột biến ($-\alpha^{3.7}$) là 1%. Ở nhóm không có thiếu máu, có 1 bệnh nhân dị hợp tử đột biến ($-\alpha^{3.7}$). Ở nhóm bình thường, tỷ lệ đột biến ($-\alpha^{3.7}$) là 6,6% và tất cả đều là đột biến dị hợp tử. Nghiên cứu kết luận tần suất của allen đột biến ($-\alpha^{3.7}$) ở 3 nhóm lần lượt là 10,7%, 4,5%, 3,3%, tần suất chung của tổng số 220 mẫu bệnh nhân này là 6,8%. Nghiên cứu này góp phần chỉ ra rằng đột biến ($-\alpha^{3.7}$) là loại đột biến có thể gây ra các biểu hiện lâm sàng rất khác nhau, và cũng có thể phân bố trong quần thể người có chỉ số huyết học hoàn toàn bình thường.

Trong một nghiên cứu năm 2013 trên 2567 bệnh nhân được chẩn đoán mắc α -thalassemia tại Malaysia, với các quần thể khác nhau ở bao gồm Malay (1571 người), Trung Quốc (220 người), Ấn Độ (217 người), Sabahm (165 người), Sarawark (22 người), Orang Asli (12 người), không rõ nguồn gốc (242 người), tỷ lệ allen ($-\alpha^{3.7}$) lần lượt là 13,4%, 6,2%, 10,5%, 29,0%, 13,4%, 13,5% và 12,5% [16]. Nghiên cứu kết luận rằng, allen đột biến ($-\alpha^{3.7}$) gặp hầu hết ở các quần thể khác nhau với tần suất tương tự nhau, đặc biệt ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới. Kết luận này cũng phù hợp với các kết luận của các nghiên cứu trước đó [16]. Tại Việt Nam, công bố của NKH Hoan về tỷ lệ xuất hiện allen đột biến ($-\alpha^{3.7}$) trên 924 cặp vợ chồng mang thai là 10,6% [81].

- *Đột biến ($-\alpha^{4.2}$)*

Loại đột biến mất đoạn một gen thường gặp tiếp theo là đột biến mất 4.2-kb ($-\alpha^{4.2}$). Đột biến này kết hợp với đột biến ($--^{SEA}$) gây bệnh HbH dạng mất đoạn ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$). Trong nghiên cứu của chúng tôi HbH ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) chiếm 9/97 (9,2%). Nghiên cứu ở Trung Quốc tỷ lệ này là 20,5%, ở Bắc Thái Lan là 4,8%, ở Hong Kong là 25% trên tổng số bệnh nhân HbH. Có sự chênh lệch về tỷ lệ của 2 loại kiểu gen ($-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$) và ($-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$), lần lượt là 21,36% và 10,3%. Sự chênh lệch này cũng gặp tương tự trên các quần thể khác, như ở Trung Quốc tỷ lệ này lần lượt là 54% và 21,6%, ở Thái Lan là 51% và 4,8%, ở Hong Kong là 30% và 25% [36], [102], [103].

Tỷ lệ allele đột biến ($-\alpha^{4.2}$) trong nghiên cứu của chúng tôi là 4,6%. Tỷ lệ này trong các nghiên cứu tương tự cũng thấp hơn nhiều so với tỷ lệ allele đột biến ($-\alpha^{3.7}$) trong cùng một quần thể. Nghiên cứu tại Malaysia năm 2013 trên các bệnh nhân được chẩn đoán mắc α -thalassemia, tỷ lệ của allele ($-\alpha^{4.2}$) gặp ở các quần thể bệnh nhân Malay là 1,3%, Trung Quốc là 1,1%, Ấn Độ là 1,0%, các quần thể còn lại là 0%. Nghiên cứu kết luận allele đột biến ($-\alpha^{4.2}$) xuất hiện với tỷ lệ rất thấp, và không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các quần thể nghiên cứu ($p=0,792$). Kết luận này cũng tương tự như một số kết luận ở các công bố khác trên các quần thể khác [16]. Chúng tôi chưa tìm thấy các công bố về kết quả nghiên cứu độc lập allele đột biến ($-\alpha^{4.2}$) trên y văn.

4.1.3.3. Về đột biến mất đoạn 1 gen hiếm gặp ($-\alpha 1$)

Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện một bệnh nhân mắc bệnh HbH mang kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha 1$). Đây là đột biến mất đoạn một gen hiếm gặp, gây mất toàn bộ gen $\alpha 1$, chưa từng được công bố trên y văn trong nước. Khi phân tích 7 đột biến thường gặp trên gen α globin của một bệnh nhân HbH, chúng tôi chỉ phát hiện một đột biến $--^{SEA}$. Do đó, bệnh nhân được giải trình tự gen α globin để tìm đột biến điểm còn lại. Tuy nhiên, trên hình ảnh điện di sản phẩm PCR cho sequencing, không thấy xuất hiện băng ở vị trí gen $\alpha 1$ (1084bp), mà chỉ thấy

xuất hiện băng ở vị trí gen $\alpha 2$ (1078bp). Mẫu chứng bình thường đều xuất hiện băng ở vị trí tương ứng của cả hai gen này (Hình 3.7). Giải trình tự gen $\alpha 2$, chúng tôi không phát hiện thấy đột biến điểm nào. Bệnh nhân được tiếp tục tìm bất thường của gen $\alpha 1$ bằng kỹ thuật MLPA, phát hiện đột biến dị hợp tử mất đoạn toàn bộ gen $\alpha 1$. Đột biến mất đoạn nằm trong khoảng từ điểm giữa gen $\alpha 2$ và $\alpha 1$, kéo dài về phía gen $\alpha 1$, gây mất toàn bộ gen $\alpha 1$, đến HbQ, ước tính khoảng 6.4kb. Do mang một allele dị hợp tử mất đoạn 2 gen ($--^{SEA}$) bao gồm cả gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$, allele còn lại dị hợp tử mất đoạn một gen ($-\alpha 1$), nên trên hình ảnh phân tích MLPA, đột biến mất đoạn ($-\alpha 1$) là đột biến đồng hợp tử, các đỉnh tín hiệu tại vùng đột biến này bằng 0 (Hình 3.6B).

Bố mẹ bệnh nhân được phân tích gen α globin để xác định người mang gen bệnh. Kết quả, người mẹ dị hợp tử đột biến ($--^{SEA}$) được phát hiện bằng GAP-PCR, người bố dị hợp tử đột biến ($-\alpha 1$) được phát hiện bằng kỹ thuật MLPA (Hình 3.6A), hoàn toàn phù hợp với kiểu gen của con mắc bệnh.

Các nghiên cứu sử dụng kỹ thuật MPLA trong việc phát hiện các đột biến mất đoạn hiếm gặp cho bệnh α -thalassemia khá phổ biến trên y văn thế giới tuy nhiên, chúng tôi chưa tìm thấy công bố nào mô tả về đột biến mất đoạn gen $\alpha 1$ như trong nghiên cứu này, mà chỉ có các mô tả mất đoạn gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$ nằm trong các đột biến mất đoạn lớn khác [91-93].

4.1.3.4. Về đột biến điểm thường gặp ($-\alpha^{HbCs}$)($-\alpha^{HbQs}$)

- Đột biến ($-\alpha^{HbCS}$)

Bệnh nhân HbH mang kiểu gen ($-\alpha^{HbCs}/--^{SEA}$) trong nghiên cứu của chúng tôi chiếm tỷ lệ cao nhất 53/97 (54,6%). Nghiên cứu ở miền Bắc Thái Lan, tỷ lệ bệnh nhân HbH có $-\alpha^{HbCs}$ là 53% [105], Trung Quốc là 17,9% [102], Canada nghiên cứu trên quần thể có 81% bệnh nhân có nguồn gốc châu Á, tỷ lệ này là 27% [106], California là 17% [52]. Như vậy, bệnh nhân HbH có kiểu gen ($-\alpha^{HbCs}/--^{SEA}$) trong nghiên cứu của chúng tôi gặp với tỷ lệ tương tự với ở miền bắc Thái Lan, và cao hơn so với các quần thể khác.

- α^{HbCs} xuất hiện ở rất nhiều khu vực như là Trung Á, Địa Trung Hải, Đông Nam Á và Nam Trung Quốc [14]. Ở Đông Nam Á, đặc biệt $-\alpha^{\text{HbCs}}$ phổ biến ở Đông Bắc Thái Lan và Lào [5]. Ở miền bắc Thái Lan, tần suất $-\alpha^{\text{HbCs}}$ trong quần thể lên đến 10%, ở Lào khoảng 5-6% trên nhóm sản phụ mang thai ở thủ đô Vientiane. Ở các nước khác trong khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam, số liệu về tỷ lệ người mang $-\alpha^{\text{HbCs}}$ trong quần thể còn hạn chế [107]. Theo nghiên cứu của N.K.H.Hoan về tầm soát bệnh thalassemia trên 924 cặp vợ chồng mang thai tại Bệnh Viện Từ Dũ, tỷ lệ người mang gen $-\alpha^{\text{HbCs}}$ là 4,5% [81]. Theo một nghiên cứu cộng đồng của N.V.Hoa tại một huyện miền núi cách thành phố Huế 60km, trên 289 phụ nữ dân tộc Cơ-Tu không có quan hệ huyết thống được chọn lọc ngẫu nhiên. Mẫu máu được thu thập để làm xét nghiệm công thức máu, và phân tích DNA cho các đột biến thường gặp α^0 -thal ($--^{\text{SEA}}$, $--^{\text{THAI}}$), α^+ -thal ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $-\alpha^{\text{HbCs}}$, $-\alpha^{\text{Pakse}}$). Nghiên cứu công bố tỷ lệ xuất hiện của allen $-\alpha^{\text{HbCs}}$ là 26,2%, trong đó dị hợp tử $-\alpha^{\text{HbCs}}$ chiếm 20,5% tổng số, đồng hợp tử $-\alpha^{\text{HbCs}}$ chiếm 2,4%, dị hợp tử kép của $-\alpha^{\text{HbCs}}$ với các đột biến khác như với HbE chiếm 2,4%, với β thal chiếm 0,34%. Tần số allen $-\alpha^{\text{HbCs}}$ trong nghiên cứu chiếm tỷ lệ cao nhất là 0,143, sau đó đến HbE là 0,072, α^+ thal là 0,057, β thal là 0,0034, Hb Pakse là 0,0017. Tác giả kết luận tần số gen $-\alpha^{\text{HbCs}}$ trong nghiên cứu là cao nhất so với các công bố trên các quần thể khác trên thế giới [107]. Trong một nghiên cứu tương tự ở Bắc Thái Lan và Lào, tần số lưu hành của $-\alpha^{\text{HbCs}}$ là 0,05-0,06 [108].

Allen đột biến ($-\alpha^{\text{HbCs}}$) trong nghiên cứu của chúng tôi đều ở dạng dị hợp tử. Chúng tôi chưa phát hiện trường hợp nào đồng hợp tử với đột biến ($-\alpha^{\text{HbCs}}$). Tuy nhiên, tỷ lệ này chỉ phản ánh sự lưu hành của allen đột biến trong quần thể bệnh nhân mắc bệnh HbH đến khám và điều trị tại Bệnh Viện. Chúng tôi đưa ra các nghiên cứu tham khảo, dù các nghiên cứu này thực hiện trên các đối tượng khác nhau, để chỉ ra rằng, đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ là loại đột biến

phổ biến trong quần thể người Việt Nam, khi kết hợp với allen --^{SEA} lưu hành với tỷ lệ cao, có nguy cơ gây bệnh HbH thể nặng, như trong nghiên cứu này, bệnh HbH có ($-\alpha^{\text{HbCs}}/--^{\text{SEA}}$) chiếm tỷ lệ cao nhất.

- *Đột biến ($-\alpha^{\text{HbQs}}$)*

Bệnh nhân HbH mang kiểu gen ($-\alpha^{\text{HbQs}}/--^{\text{SEA}}$) trong nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ 4/97 (4,1%). Các nghiên cứu ở Thái Lan, tỷ lệ bệnh nhân HbH mang đột biến này là 0,56% [105], ở Trung Quốc là 6,2% [102], ở California là 2% [52]. Bệnh nhân HbH ($-\alpha^{\text{HbQs}}/--^{\text{SEA}}$) gặp với tỷ lệ khác nhau giữa các quần thể nghiên cứu, và thấp hơn nhiều so với bệnh nhân HbH ($-\alpha^{\text{HbCs}}/--^{\text{SEA}}$).

Allen ($-\alpha^{\text{HbQs}}$) trong nghiên cứu của chúng tôi trên bệnh nhân HbH chiếm 2,1%. Tỷ lệ này trên quần thể cặp vợ chồng mang thai trong nghiên cứu của N.K.H. Hoan là 0,2% [81]. Nghiên cứu tại Malaysia trên 2567 bệnh nhân α -thalassemia, tỷ lệ allen ($-\alpha^{\text{HbQs}}$) ở người gốc Malay là 0,13%, gốc Trung Quốc là 0,92%, ở nhóm không rõ nguồn gốc là 0,5% và không gặp ở 4 quần thể còn lại trong nghiên cứu này [16]. Như vậy tỷ lệ allen đột biến ($-\alpha^{\text{HbQs}}$) đều thấp ở các quần thể khác nhau.

4.1.3.5. Về đột biến điểm hiếm gặp $-\alpha^{\text{c.2delT}}$, $-\alpha^{\text{c.92 G>A}}$, $-\alpha^{\text{c.426 A>T}}$, $-\alpha^{\text{c.81 G>T}}$

- *Đột biến điểm $-\alpha^{\text{c.2delT}}$ (p.Met1Argfs) trên gen $\alpha 2$*

Đột biến ($-\alpha^{\text{c.2delT}}$) là đột biến mất một nucleotid (T) tại codon ATG, là codon đầu tiên ở exon 1 gen $\alpha 2$. Đây là đột biến dịch khung c.2delTpMetfs, làm thay đổi toàn bộ trình tự của chuỗi α globin phía sau đột biến. Trong nghiên cứu, bệnh nhân HbH kiểu gen ($--^{\text{SEA}}/-\alpha^{\text{c.2delT}}$) gặp với tỷ lệ 6,1%. Đột biến này được thế giới ghi nhận chỉ xuất hiện ở quần thể người Việt Nam [13].

Đột biến được y văn mô tả trên 2 ca bệnh [109] [110], là bệnh nhi mắc HbH đều là người gốc Việt. Năm 2010, Cornelis và Higgs công bố ($-\alpha^{\text{c.2delT}}$) hay ($-\alpha^{\text{intA-G}}$) là đột biến α^+ -thalassemia, là 1 trong 6 loại đột biến xảy ra tại codon mở đầu ATG, gặp phổ biến ở quần thể người Việt Nam [13].

Bảng 4.2. Đột biến tại codon mở đầu gen α globin gây bệnh α -thalassemia [13]

Vị trí	Đột biến	HGVS	Phân bố	Kiểu hình
$-\alpha^{3.7}$	Init ATG>GTG	c.1A>G p.Met1Val	Châu Phi	α^0
$-\alpha^{3.7}$	Init (-2bp)	c.-2_-3delAC	Bắc Phi, ĐTH	α^0, α^+
$\alpha 2$	Init ATG>ACG	c.2T>C p.Met1Thr	Địa Trung Hải	α^+
$\alpha 2$	Init ATG>A-G	c.2delT p.Metfs	Việt Nam	α^+
$\alpha 1$	Init ATG>GTG	c.1A>G p.Met1Val	Địa Trung Hải	α^+
$\alpha 2$	Init ATG>-TG	c.1delA p.Met1fs	Đông Nam Á	α^+

• Đột biến điểm ($-\alpha^{c.92 G>A}$) (*p.Arg31Lys*) trên gen $\alpha 2$

Đột biến ($-\alpha^{c.92 G>A}$) là đột biến điểm trên gen $\alpha 2$, làm thay đổi bộ ba mã hoá AGG thành AAG, và làm biến đổi acid amin Arginin thành Lysin. Đột biến này chưa từng được công bố tại Việt Nam trong các nghiên cứu trước đây.

Đột biến ($--^{SEA}/-\alpha^{c.92 G>A}$) được mô tả trên 2 ca bệnh người Trung Quốc [111] [102]. Năm 2001, Yongzong Zao mô tả đột biến [111] trên một bé trai 4 tuổi có thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc, chưa từng phải truyền máu, phát triển thể chất bình thường, có kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{c.92 G>A}$). Nghiên cứu cho rằng đột biến này có thể ảnh hưởng tới sự ghép nối chuỗi mRNA ở vị trí splicing, vì nó nằm liền kề với trình tự bảo tồn GT của intron 1 của gen $\alpha 2$, nhưng không tìm thấy một sản phẩm mRNA bất thường nào bằng phương pháp RT-PCR. Điều này có thể do mức độ ảnh hưởng của đột biến nhỏ, hoặc sản phẩm mRNA splicing bất thường không bền vững [111]. Năm 2014, trong một công bố khác của Jianpei F về kiểu gen của 435 bệnh nhân HbH ở miền Nam Trung Quốc, đã mô tả 2 đột biến điểm hiếm trong đó có đột biến ($-\alpha^{c.92 G>A}/\alpha\alpha$) [102].

• Đột biến điểm ($-\alpha^{c.426 A>T}$) (*p.Term142Tyr*) trên gen $\alpha 2$ tạo Hb Pakse

Đột biến ($-\alpha^{c.426 A>T}$) là đột biến điểm trên gen $\alpha 2$, làm thay đổi bộ ba mã hoá kết thúc TAA>TAT, thay đổi acid amin kết thúc thành Tyrosin. Đột biến này gây nên tình trạng kéo dài một cách bất thường chuỗi α globin, tạo nên Hb Pakse [112]. Ca đầu tiên mô tả về loại Hemoglobin này là tại thành phố

Pakse nằm ở phía nam nước Lào, và tiếp tục được công bố tại khu vực các nước Đông Dương.

Hb Pakse và Hb Constanst Spring (HbCs) là hai loại Hb bất thường đều do đột biến điểm tại codon kết thúc của gen $\alpha 2$ gây nên, lần lượt là TAA>TAT và TAA>CAA, dẫn tới thêm vào trình tự chuỗi α globin bình thường 31 amino acid nữa. Do đó, mRNA của hai gen bị đột biến này trở nên rất không bền vững, và làm giảm khả năng tổng hợp thành chuỗi α globin. Hai phân tử Hb này cũng không bền vững. Nồng độ của chúng trong máu ngoại vi rất nhỏ và khó để có thể phát hiện được nhất là trong trường hợp đột biến dị hợp tử [113]. Người mang đột biến dị hợp tử của cả hai loại đột biến này đều có lâm sàng và chỉ số huyết học bình thường. Thở đồng hợp tử của cả hai loại đột biến này có biểu hiện như những người mang gen α -thalassemia dạng mất đoạn hai gen, tuy nhiên trong trường hợp này là mang hai đột biến mất đoạn một gen trên hai NST khác nhau. Khi 2 đột biến này kết hợp với đột biến α^0 -thalassemia gây bệnh HbH thể ($--/\alpha^T$). Thở HbH này thường có biểu hiện lâm sàng nặng hơn so với thở HbH($--/-\alpha$) [14].

Có một số báo cáo về tỷ lệ xuất hiện của Hb Pakse tại Việt Nam và trong khu vực Đông Nam Á. Theo một báo cáo gần đây từ miền Trung Việt Nam, Nguyen.V.H thấy tỷ lệ gặp Hb Pakse tại khu vực này khoảng 0,34% [107]. Theo một báo cáo khác từ Thái Lan [114], tỷ lệ Hb Pakse gặp tại khu vực này là khoảng 0,51%. Dựa trên một công bố gần đây của Wiwanikit. V [115] về sự di cư của nhóm bệnh lý Hemoglobin ở khu vực Đông Nam Á, mô hình phân bố về địa lý của Hb Pakse ở Trung Quốc có thể một là do xu hướng dịch chuyển từ phía Tây (Thái Lan), sang phía Đông (Việt Nam), hoặc hai là điểm tập trung ở Nam Lào và di chuyển sang bên trái (Việt Nam), và bên phải (Thái Lan). Trong đó khả năng thứ hai được xem là hợp lý hơn do đã từng có rất nhiều sự di cư của người Lào từ Nam Lào sang các tỉnh của Thái Lan ở gần đó (trong khu vực Đông Bắc). Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có báo

cáo chính thức về sự phổ biến của Hb Pakse ở Nam Lào. Vấn đề về Hb Pakse ở khu vực Đông Dương vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu [115].

Tỷ lệ phát hiện Hb Pakse có thể thấp hơn thực tế, do Hb Pakse có thể bị nhận định nhầm với HbCs, do hai loại Hemoglobin bất thường này cùng di chuyển đến cùng một vị trí khi điện di Hemoglobin. Do đó, kỹ thuật sinh học phân tử ARMS-PCR đa môi cho phép chẩn đoán xác định không những hai loại Hb này. Trong một nghiên cứu trên 144 mẫu máu ở miền Bắc Thái Lan, các mẫu này đã được xác định có HbCs bằng phương pháp điện di mao quản (CE), hoặc sắc ký lỏng cao áp (HPLC), phát hiện 5/144 mẫu (4,4%) có Hb Pakse với các kiểu gen khác nhau, bao gồm Hb Pakse, Hb Pakse/HbCs, HbH-HbPakse, HbH-Hb Pakse-HbE. Những kết quả này cho thấy, Hb Pakse và những thể kết hợp có thể bị nhầm với HbCs. Mặc dù triệu chứng lâm sàng của Hb Pakse và HbCs khá tương đồng nhau, nên phân tích DNA của tất cả các trường hợp có phát hiện thấy đỉnh của HbCs hoặc Hb Pakse trên điện di mao quản hoặc HPLC [116]. Theo một nghiên cứu khác cũng tại Thái Lan trên 30 bệnh nhân đã được chẩn đoán có HbCs trước đó, được phân tích gen α globin bằng kỹ thuật giải trình tự gen, và so sánh với kỹ thuật PCR cắt enzyme giới hạn (PCR-RFLP). Kết quả cho thấy có 5/30 bệnh nhân là HbH-Pakse và các bệnh nhân còn lại là HbH-CS [117]. Khi thực hiện kỹ thuật phân tích DNA, bộ ARMS-PCR của chúng tôi không phát hiện thấy bệnh nhân có HbCs hay HbQs, do đó bệnh nhân đã được giải trình tự toàn bộ gen α globin, phát hiện ra đột biến gây Hb Pakse. Đây là bệnh nhân HbH-Pakse đầu tiên được công bố trong nghiên cứu này.

- Đột biến điểm ($-\alpha^{c.81 G>T}$) (*p.Glu27Asp*) trên gen $\alpha 1$ tạo Hb Hekinan

Đột biến ($-\alpha^{c.81 G>T}$) là đột biến điểm trên gen $\alpha 1$, làm thay đổi bộ ba mã hoá GAG>GAT, và làm biến đổi acid amin Glutamic thành Aspartic, tạo nên Hb Hekinan. Đột biến này cũng có thể xảy ra tại vị trí tương tự trên gen $\alpha 2$ cũng tại codon 27 GAG>GAC. Đây là một loại biến thể hiếm của gen α globin.

Hb Hekinan được phát hiện lần đầu tiên năm 1988 bằng phương pháp điện di huyết sắc tố trên một bệnh nhân nam 46 tuổi tại Nhật [118]. Năm 1989, Hb Hekinan do đột biến trên gen $\alpha 2$ được mô tả trên một người phụ nữ da đen gốc Trung Quốc ở Guyana [119]. Năm 1990, Hb Hekinan do đột biến trên gen $\alpha 1$ được mô tả trên 3 bệnh nhân người Trung Quốc ở Macao, chiếm 13-14% thành phần Hb (trung bình 13,3%) [120]. Năm 2003, Fucharoen mô tả một bệnh nữ 25 tuổi người Thái Lan có thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc, Hb 8,2g/dL, MCV 68,6fL, MCH 21,6pg, MCHC 31,5%. Điện di Hemoglobin chỉ phát hiện có HbE và HbA, không thấy có băng bất thường nào khác. Phân tích DNA phát hiện có sự kết hợp giữa HbE ($\beta 26$ Glu-Lys) với Hb Hekinan ($\alpha 27$ Glu-Asp) do đột biến trên gen $\alpha 2$ với đột biến α^0 -thalassemia dạng $--^{SEA}$ [121]. Gần đây nhất vào năm 2007, Hb Hekinan được mô tả trên 2 bệnh nhân Đài Loan với đột biến ($\alpha 27$ Glu-Asp) trên gen $\alpha 1$, không có Hb Hekinan do đột biến trên gen $\alpha 2$. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng Hb Hekinan chỉ có thể được phát hiện bằng điện di Hb bằng kỹ thuật HPLC, không phát hiện được bằng phương pháp điện di trên giấy Cellulose [122]. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi phát hiện một bệnh nhân HbH có kiểu gen $--^{SEA}/-\alpha^{c.81 G>T}$ trên gen $\alpha 1$, tạo Hb Hekinan.

Bảng 4.3. So sánh tỷ lệ kiểu gen của bệnh nhân HbH [102],[105],[95]

Tác giả	Ngoc ND	Jianpei F	Suthat F	Chui DH
Năm xuất bản	2016	2014	2009	2005
Nước	V. Nam	T. Quốc	Thái Lan	California
Tạp chí		<i>Hemoglobin</i>	<i>Hematology</i>	<i>Blood</i>
Bệnh nhân HbH (%)	97	435	355	319
Thể mất đoạn ($--/-\alpha$)	31,9	75,6	40	83
$--^{SEA}/-\alpha^{3,7}$	21,0	54,0	43,6	55
$--^{SEA}/-\alpha^{4,2}$	9,2	21,6	1,42	12
$--^{SEA}/-\alpha 1$	1,0	-	-	-
Thể không mất đoạn ($--/\alpha^T$)	68,1	24,4	60	17
$--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$	54,6	17,9	51	10
$--^{SEA}/-\alpha^{HbQs}$	4,1	6,2	0,56	2
$--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT}$	6,1	-	0,28	0,31

4.1.4. Ý nghĩa phát hiện đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia bằng kỹ thuật PCR, MLPA, giải trình tự gen

Trong nghiên cứu này, bước đầu tiên chúng tôi sàng lọc các đột biến thường gặp nhất bằng kỹ thuật PCR. Đây là kỹ thuật đơn giản, được thực hiện nhanh chóng, an toàn do không phải sử dụng chất phóng xạ, cho phép nhận định kết quả một cách rõ ràng và chính xác, với chi phí hợp lý. Ngoài ra, việc các đột biến được tối ưu trong cùng một phản ứng PCR đa mồi, giúp tiết kiệm thao tác, chi phí và thời gian xét nghiệm hơn nữa. Bên cạnh việc sử dụng các mẫu chứng nội kiểm tại mỗi lần thực hiện, các đột biến tìm thấy còn được đối chiếu bằng một kỹ thuật khác. Điều này đã khẳng định được độ nhạy, độ đặc hiệu và thành công của phương pháp PCR đa mồi trong việc phân tích các đột biến thường gặp trên gen α globin gây bệnh HbH. Tuy nhiên, phạm vi phát hiện của kỹ thuật PCR này chỉ khu trú trong 7 đột biến thường gặp. Nếu bệnh nhân mang đột biến nằm ngoài nhóm này, thì tùy theo bản chất của đột biến còn lại có thể là đột biến α^0 hay α^+ -thalassemia, mà chúng tôi sẽ tiếp tục lựa chọn các kỹ thuật tiếp theo là MLPA hoặc giải trình tự gen để phân tích, cho phép kiểm chứng các đột biến đã biết và phát hiện các đột biến chưa biết. Chúng tôi đã phát hiện một số đột biến hiếm gặp được phát hiện bằng hai kỹ thuật này.

Nhờ việc áp dụng thành công các kỹ thuật nói trên, các bệnh nhân HbH đã được chẩn đoán xác định bệnh và thể bệnh là HbH mất đoạn hay không mất đoạn. Bệnh nhân được chẩn đoán sớm, đóng vai trò quan trọng trong công tác điều trị, tiên lượng, tư vấn và quản lý bệnh. Ngoài ra, việc phát hiện các đột biến thường gặp, nghiên cứu còn công bố những đột biến hiếm gặp, làm phong phú hơn những hiểu biết về các đột biến gây bệnh trên bệnh nhân α -thalassemia Việt Nam.

4.2. Về mối quan hệ kiểu gen, đặc điểm lâm sàng và huyết học của bệnh HbH

4.2.1. Đặc điểm chung của bệnh HbH

4.2.1.1. Đặc điểm về tuổi vào viện

Tuổi nhập viện trung bình của 97 bệnh nhân HbH là $7,6 \pm 8,84$. Tuổi nhập viện nhỏ nhất là 0,3 tuổi và lớn nhất là 53 tuổi. Bệnh nhân HbH trong nghiên cứu bao gồm bệnh nhân trẻ em (< 18 tuổi) chiếm 88.6%, và bệnh nhân là người trưởng thành (≥ 18 tuổi) chiếm 11.3%. Sự phân bố về độ tuổi vào viện của bệnh HbH rất thay đổi, do các dấu hiệu lâm sàng của bệnh rất khác nhau tùy vào từng thể bệnh, dẫn đến có những bệnh nhân phải nhập viện từ rất sớm, và ngược lại. Đặc điểm này cũng tương tự với các nghiên cứu khác, như của Chen với 114 bệnh nhân HbH phân bố từ sơ sinh đến 80 tuổi [51], của Au .W. trên 90 bệnh nhân HbH phân bố từ 4 đến 83 tuổi, với hơn 50% số bệnh nhân >20 tuổi [123], của Kanavakis trên 75 bệnh nhân HbH trong đó 70 bệnh nhân <18 tuổi và 5 bệnh nhân >18 tuổi [98]. Theo nghiên cứu của DB Trục về đặc điểm lâm sàng của 46 trẻ mắc HbH Việt Nam năm 1996, tuổi nhập viện chủ yếu từ 4-6 tuổi chiếm 34,2%, từ 1-3 tuổi chiếm 23,4%, ngoài ra cũng có trẻ nhập viện sau 10 tuổi [8]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, đối tượng bệnh nhân có độ tuổi rộng hơn, không chỉ là trẻ em mắc HbH đến khám và điều trị tại Bệnh Viện, mà còn có cả những người trưởng thành đến thực hiện các xét nghiệm chẩn đoán, tuy nhiên nhóm >19 tuổi này chỉ chiếm 11,3% tổng số bệnh nhân. Khi so sánh tuổi nhập viện của bệnh nhi mắc HbH nói chung với bệnh nhi mắc β thalassemia, bệnh nhi mắc HbH có độ tuổi nhập viện muộn hơn. Theo N.C. Khanh, có 73,7% số bệnh nhi mắc β thalassemia nhập viện trong năm tuổi đầu tiên [124], trong khi chỉ có 6,3% bệnh nhi mắc HbH nhập viện ở lứa tuổi này [8]. Trong nghiên cứu này, chỉ có 2,06% bệnh nhi mắc HbH nhập viện ở lứa tuổi <1 tuổi.

David. J. W cũng đưa ra nhận định, tại thời điểm sinh, những trẻ sẽ phát triển thành bệnh HbH thường có các chỉ số huyết học tương đối bình thường, không có các dấu hiệu bất thường khác. Chẩn đoán chỉ có thể dựa trên điện di

huyết sắc tố và phân tích DNA. Các dấu hiệu lâm sàng thường phát triển sau năm đầu tiên, và có thể ở những năm tiếp theo rất khác nhau tùy theo từng thể bệnh và từng cá thể. Hầu hết các bệnh nhân đến khám vì phát hiện tình trạng thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc khi được xét nghiệm công thức máu vì một lý do bệnh lý nào đó khác, hoặc bởi vì bắt đầu xuất hiện những dấu hiệu của tình trạng thiếu máu cấp hay mạn tính. Ở trẻ nhỏ thì dấu hiệu thiếu máu cấp tình thường phổ biến hơn [14].

Khi so sánh tuổi nhập viện trung bình của 2 nhóm bệnh ($--/\alpha$) và ($--/\alpha^T$), chúng tôi thấy có sự khác biệt, lần lượt là $10,58 \pm 12,3$ và $6,1 \pm 5,8$, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p=0,063 > 0,05$). Trong nhóm bệnh nhân trẻ em, tất cả các bệnh nhân < 1 tuổi đều thuộc nhóm ($--/\alpha^T$). Trong nhóm từ $1 - < 18$ tuổi, bệnh nhân thuộc nhóm ($--/\alpha^T$) luôn cao hơn nhóm ($--/\alpha$). Trong nhóm bệnh nhân trưởng thành ≥ 18 tuổi, nhóm ($--/\alpha$) có 7 bệnh nhân, nhóm ($--/\alpha^T$) có 4 bệnh nhân. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p=0,351 > 0,05$).

4.2.1.2. Đặc điểm về giới

Bệnh α -thalassemia là bệnh di truyền lặn trên NST thường. Trong số 97 bệnh nhân HbH có 50 bệnh nhân nam chiếm 51,5% và 47 bệnh nhân nữ chiếm 48,5%. Tỷ lệ nam nữ trong nghiên cứu: Nam/Nữ = 1,06 lần. Trong nghiên cứu của D.B.Trực, tỷ lệ Nam/Nữ = 0,91 [8]. Khi xem xét tỷ lệ giới nam và nữ ở từng nhóm bệnh, nhóm ($--/\alpha$), tỷ lệ nam cao hơn nữ. Ngược lại ở nhóm ($--/\alpha^T$), tỷ lệ nam thấp hơn nữ. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,239 > 0,05$).

4.2.1.3. Đặc điểm về dịch tễ

Trong nghiên cứu, địa phương có tỷ lệ bệnh nhân mắc HbH cao nhất là Hà Nội (25,8%), tiếp theo là Bắc Giang (9,3%). Nghiên cứu của D.B. Trực, Hà Nội cũng là địa phương có tỷ lệ bệnh nhân mắc bệnh cao nhất (43,4%).

Trong nghiên cứu, tỷ lệ bệnh nhân người Kinh chiếm cao nhất là 74,2%, ở người dân tộc ít người là 25,8%, trong đó người dân tộc Tày là 13,4%, tiếp theo là người dân tộc Thái là 5,2%. Tỷ lệ này trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của DB Trục, tỷ lệ người kinh là 84,7%, tỷ lệ bệnh nhân ở nhóm dân tộc ít người là 15,3%, trong đó người Tày chiếm tỷ lệ cao nhất 7,2% [8].

4.2.2. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân HbH

4.2.2.1. Đặc điểm về truyền máu

Đặc điểm truyền máu của bệnh nhân mắc HbH trong nghiên cứu rất thay đổi. Số lần truyền máu trung bình trong một năm của một bệnh nhân HbH cũng có thể rất khác nhau ở ngay trong cùng một thể bệnh. Vì vậy, để có thể so sánh về đặc điểm truyền máu này, chúng tôi đã quy ước số lần truyền máu trung bình trong một năm của bệnh nhân bằng tổng số lần truyền máu của bệnh nhân tính đến thời điểm nghiên cứu, chia cho số tuổi của bệnh nhân đó tính theo đơn vị năm.

Trong 97 bệnh nhân HbH, có 31 bệnh nhân chưa từng phải truyền máu (số lần truyền máu = 0) chiếm 31,9%. Có 66 (68%) bệnh nhân phải truyền máu ít nhất 1 lần (số lần truyền máu > 0). Các bệnh nhân này phân bố ở cả 2 nhóm bệnh HbH. Số bệnh nhân chưa từng phải truyền máu ở hai nhóm bệnh là tương đương nhau, 16 bệnh nhân ở nhóm (--/- α) và 15 bệnh nhân ở nhóm (--/- α^T). Số bệnh nhân phải truyền máu ở nhóm (--/- α^T) cao gấp 3,4 lần so với nhóm (--/- α).

Số lần truyền máu trung bình của bệnh nhân nghiên cứu là $2,3 \pm 3,59$ lần/năm. Khi xem xét chỉ số này ở từng nhóm bệnh, nhóm (--/- α^T) có số lần truyền máu trung bình là $2,88 \pm 3,7$, cao hơn nhóm (--/- α) là $1,09 \pm 3,0$. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p=0,014 < 0,05$).

Theo một nghiên cứu năm 2011 về sự đa dạng biểu hiện của bệnh HbH ở trẻ em, có khoảng 3% bệnh nhân mắc HbH thể (--/- α) đều phải truyền máu ít nhất 1 lần từ khi sinh cho đến năm 20 tuổi, trong khi 80% số bệnh nhân HbH thể (--/- α^T) cần phải truyền máu trong giai đoạn này [106]. Cụ thể theo nghiên

cứ trên 125 bệnh nhân HbH thể ($--/\alpha$) và 145 bệnh nhân HbH thể ($--/\alpha^T$), có 29% số bệnh nhân ($--/\alpha$) và 50% số bệnh nhân ($--/\alpha^T$) đã từng phải truyền máu [105]. Một nghiên cứu về bệnh HbH trên 37 bệnh nhân với tuổi trung bình là 40 tuổi, thấy có 10 bệnh nhân đã từng phải truyền máu nhưng đã dừng truyền máu tại thời điểm nghiên cứu. Có 4 bệnh nhân thuộc nhóm ($--/\alpha$) cần phải truyền máu ngắn hạn trong thời kỳ mang thai. Có 2 bệnh nhân phụ thuộc truyền máu thuộc nhóm ($--/\alpha^T$). Tuy nhiên, nghiên cứu này kết luận không tìm thấy mối tương quan giữa phụ thuộc truyền máu và kiểu gen ($p=0,665$) [125].

4.2.2.2. Mức độ thiếu máu

Phân loại mức độ thiếu máu được đánh giá bằng nồng độ Hb máu (Hb): Thiếu máu rất nặng $<30\text{g/dL}$, thiếu máu nặng: từ $30\text{-}59\text{g/dL}$, thiếu máu trung bình: từ $60\text{-}89\text{g/lit}$, thiếu máu nhẹ/không thiếu máu: $\geq 90\text{g/dL}$ [126].

Có 23,7% bệnh nhân chỉ có biểu hiện thiếu máu nhẹ, hoặc không có thiếu máu trên lâm sàng, tập trung ở nhóm bệnh nhân tình cờ phát hiện thông qua các xét nghiệm máu cơ bản, những bệnh nhân này thường không có tiền sử truyền máu. Có 68% bệnh nhân nghiên cứu có biểu hiện thiếu máu ở mức độ trung bình, nằm trong nhóm bệnh nhân trẻ em. Con số này trên nghiên cứu của D.B.Trực là 63% [8]. Có 8,2% bệnh nhân có biểu hiện thiếu máu nặng hoặc rất nặng, phụ thuộc truyền máu hàng tháng. Do tính chất thiếu máu kéo dài, từ từ, nên có những bệnh nhân có triệu chứng từ ngay năm đầu tiên, nhưng cho đến thời điểm vào viện thông thường trong khoảng từ 3 đến 5 tuổi vẫn không phải truyền máu.

Khi so sánh với 2 thể bệnh β thalassemia và HbE/ β thalassemia, những bệnh nhân HbH có mức độ thiếu máu ít hơn. Có 68% bệnh nhân HbH có mức độ thiếu máu trung bình, 8,2% thiếu máu nặng, trong khi ở bệnh nhân β thalassemia thì có tới 71,1% ở mức thiếu máu nặng, và 28,9% thiếu máu vừa. Cũng như vậy đối với bệnh nhân HbE/ β thalassemia, số bệnh nhân thiếu máu nặng chiếm 68,3%, thiếu máu vừa chiếm 30,6%. Cả 2 nhóm β thalassemia và HbE/ β thalassemia không có bệnh nhân ở mức độ thiếu máu

nhẹ hoặc không có thiếu máu [8, 124]. Ở một số trường hợp thiếu máu nặng của bệnh HbH với Hb trong khoảng từ 30-59g/L, có thể giải thích là do diễn biến của quá trình tan máu xảy ra từ từ, thiếu máu không xảy ra nhanh hay đột ngột nên bệnh nhân thường thích nghi được với tình trạng thiếu máu, và chỉ đến viện khi nồng độ hemoglobin xuống quá thấp.

Khi xem xét tình trạng thiếu máu theo nhóm bệnh, chúng tôi nhận thấy ở ngưỡng Hb = 90 g/L, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ thiếu máu giữa 2 nhóm bệnh, với $p=0,004<0,05$. Ở cả 2 nhóm bệnh, số bệnh nhân có Hb<90g/L đều cao hơn so với nhóm bệnh nhân có Hb >90g/L, đặc biệt ở nhóm ($--/\alpha^T$), bệnh nhân có Hb<90g/L cao hơn so gấp 5,6 lần với nhóm Hb>90g/L.

4.2.2.3. Gan to

57,8% bệnh nhân HbH có gan to sờ thấy được trên lâm sàng. Trong đó, số bệnh nhân có gan to ở mức 1-2cm dưới bờ sườn ở cả 2 nhóm bệnh gặp phổ biến hơn, chiếm 34% trên tổng số. Khi xem xét ở từng nhóm bệnh, số bệnh nhân có gan to sờ thấy được trên lâm sàng gặp ở nhóm ($--/\alpha^T$) cao hơn ở nhóm ($--/\alpha$), lần lượt là 71,1% và 28,9%. Ngoài ra, sự khác biệt về các mức độ gan to ở nhóm ($--/\alpha$) có sự chênh lệch rõ rệt hơn, trong khi ở nhóm ($--/\alpha^T$) các mức độ gan to không có sự chênh lệch đáng kể. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,001$.

4.2.2.4. Lách to

Nhiều tác giả đã nhận xét rằng lách có vai trò to lớn trong quá trình tan máu của bệnh thalassemia và các bệnh hemoglobin bất thường khác. Trong những trường hợp này, lách là cơ quan giữ lại và phân huỷ các hồng cầu bất thường như: màng hồng cầu mất tính đàn hồi, có hạt bám ở màng và nguyên sinh chất, biến dạng nặng. Mặt khác, khi có biểu hiện tan máu, hệ thống nội mô đại thực bào ở lách tăng cường hoạt động làm cho lách to thêm. Do đó, các trường hợp có tan máu ô ạt hoặc tan máu mạn tính đều có lách to [74]. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 52,5% bệnh nhân HbH có lách to sờ thấy trên lâm sàng. Các bệnh nhân HbH có lách to ở mức độ 1-2cm (27,8%) gặp nhiều hơn ở

mức độ $>3\text{cm}$ (24,7%) dưới bờ sườn. Khi xem xét ở từng nhóm bệnh, số bệnh nhân có lách to tập trung chủ yếu ở nhóm ($--/-\alpha^T$), chiếm 68,1%, còn ở nhóm ($--/-\alpha$) là 19,3%. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê $p<0,001$. Kết luận này cũng phù hợp với các nghiên cứu khác; lách to gặp phổ biến ở nhóm ($--/-\alpha^T$) của bệnh HbH và liên quan đến mức độ nặng của bệnh [36, 78, 106].

Bảng 4.4. So sánh mức độ gan lách to trên bệnh nhân HbH

	N.D.Ngoc		Vichai [36]		D.B.T [8]
	($--/-\alpha$)	($--/-\alpha^T$)	($--/-\alpha$)	($--/-\alpha^T$)	HbH
N	31	66	83	64	46
Gan to					
1 - 2 cm DBS	7 (22,5%)	26 (39,3%)	19 (22,9%)	30 (46,9%)	16 (34,8%)
≥ 3 cm DBS	2 (6,4%)	21 (31,8%)	2 (2,4%)	30 (46,9%)	16 (34,8%)
Tổng số	56 (57,7%)		81 (55,1%)		32 (69,6)
Lách to					
1 - 2 cm DBS	4 (12,9%)	23 (34,8%)	12 (14,5%)	30 (46,9%)	12 (26,0%)
≥ 3 cm DBS	2 (6,4%)	22 (33,3%)	2 (2,4%)	28 (43,8%)	29 (63%)
Tổng số	51 (52,5%)		72 (48,9%)		41 (89,1%)

Trong nghiên cứu của D.B.Trực, số bệnh nhân có gan to và lách to đều cao hơn trong nghiên cứu của chúng tôi, lần lượt 69,6% và 89,1% so với 57,7% và 52,5%. Có thể do nghiên cứu của D.B.Trực tập trung chủ yếu là các bệnh nhi với biểu hiện lâm sàng rõ rệt phải đến khám và điều trị tại Bệnh Viện, trong khi đối tượng nghiên cứu của chúng tôi bao gồm cả người lớn, là những đối tượng tình cờ phát hiện qua xét nghiệm máu, không có hoặc chỉ có thiếu máu rất nhẹ trên lâm sàng. Khi so sánh với một nghiên cứu khác tương tự của Vichai [36], có sự phân nhóm bệnh HbH, số bệnh nhân có gan to (55,1%) và lách to (48,9%), tương tự với tỷ lệ trong nghiên cứu của chúng tôi. Cũng như sự phân bố về mức độ gan lách to trong từng nhóm bệnh cũng phù

hợp với kết luận chung, biểu hiện gan lách to gặp phổ biến ở nhóm ($--/\alpha^T$) của bệnh HbH và liên quan đến mức độ nặng của bệnh.

4.2.2.5. *Biến dạng xương*

“Bộ mặt Thalassemia” là một trong những biểu hiện biến dạng xương điển hình nhất của bệnh thalassemia, với các biểu hiện như sống mũi tẹt, trán dô, hàm vẩu. Các biểu hiện này có thể xuất hiện đơn độc hoặc kết hợp tùy theo mức độ nặng nhẹ của bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ xem xét việc có hay không có biểu hiện “bộ mặt thalassemia”. Có 42,2% bệnh nhân trong nghiên cứu có bộ mặt thalassmeia, 60,6% số bệnh nhân này tập trung chủ yếu ở nhóm ($--/\alpha^T$), 6,4% số bệnh nhân này tập trung ở nhóm ($--/\alpha$). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Tỷ lệ này trong nghiên cứu của D.B. Trục là 60,8% và không phân nhóm bệnh [8]. Trong nghiên cứu phân nhóm bệnh của Vichai, tỷ lệ chung của biểu hiện này là 27,2%, trong đó tập trung chủ yếu ở nhóm ($--/\alpha^T$) là 60,9% và ở nhóm ($--/\alpha$) là 1,2% [36].

4.2.3. *Về một số đặc điểm huyết học của bệnh nhân HbH*

4.2.3.1. *Phân bố Hb (g/dL)*

Hemoglobin (Hb) trung bình của bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi trong nghiên cứu đều thấp hơn so với giá trị Hb trung bình của người bình thường ở các độ tuổi tương ứng. Hb trung bình chung của nghiên cứu là $80,56 \pm 17,81$ g/dL, trong khoảng từ 45-136 g/dL. Giá trị này trong nghiên cứu của D.B. Trục là $62,1 \pm 17,8$ g/dL, trong khoảng từ 25 - 87 g/dL [8].

Có sự khác biệt có ý nghĩa về nồng độ Hb máu giữa nhóm ($--/\alpha$) và nhóm ($--/\alpha^T$). Hb trung bình của nhóm ($--/\alpha$) là $86,46 \pm 14,93$ g/dL, cao hơn của nhóm ($--/\alpha^T$) là $74,92 \pm 12,75$ g/dL. Nhìn chung Hb ở nhóm ($--/\alpha$) luôn cao hơn so với nhóm ($--/\alpha^T$) ở mọi lứa tuổi. Trong nhóm ($--/\alpha$), nồng độ Hb trung bình tăng dần rõ rệt khi tuổi tăng. Tuy nhiên, ở nhóm ($--/\alpha^T$), chỉ số này không thay đổi đáng kể giữa các lứa tuổi. Theo trình tự, sự khác biệt về

nồng độ Hb trung bình giữa 2 nhóm cũng tăng lên theo độ tuổi, và có ý nghĩa thống kê ($p=0,004<0,05$). Kết quả này cũng tương tự với các công bố khác khi so sánh hai thể bệnh của bệnh HbH [51, 106, 127].

4.2.3.2. Phân bố Hematocrit HCT (%)

63,7% bệnh nhân có HCT nằm trong khoảng $<40\%$, trong đó có 8 (8,1%) bệnh nhân có HCT dưới 20%, phù hợp với mức độ thiếu máu nặng. Mức độ giảm của HCT đều tương đương với độ giảm của Hb trong máu. Vì vậy, trong bệnh HbH, ngoài dựa vào lượng HGB để đánh giá mức độ thiếu máu còn có thể dựa vào giá trị của HCT để đánh giá mức độ thiếu máu, chính xác hơn là dựa vào số lượng hồng cầu. Trong nghiên cứu của D.B. Trục, tất cả các giá trị HCT đều $<36\%$ trong đó có 9 bệnh nhân có HCT $<20\%$ [8].

HCT trung bình của 97 bệnh nhân HbH là $28,45\pm 5,58\%$ (14,6-59,4%). Giá trị này trong nghiên cứu của D.B. Trục là $23\pm 0,07\%$ (0,8-38%). Khi xem xét nồng độ HCT trung bình theo nhóm tuổi, nhìn chung HCT ở nhóm ($--/\alpha$) luôn cao hơn so với nhóm ($--/\alpha^T$) ở mọi lứa tuổi. Trong một nghiên cứu khác trên bệnh nhân HbH của Thái Lan, chỉ số này ở từng nhóm bệnh lần lượt là $30,2\pm 3,7$ và $29,5\pm 3,4$ [36]. Trong nhóm ($--/\alpha$), HCT trung bình tăng dần rõ rệt khi tuổi tăng. Ở nhóm ($--/\alpha^T$), chỉ số này thay đổi ít hơn giữa các lứa tuổi. Trung bình HCT giữa các nhóm tuổi và nhóm bệnh có sự khác biệt, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê ($p=0,13 > 0,05$). Nhìn chung, HCT là một chỉ số ít được đề cập đến trong các nghiên cứu về bệnh HbH, do giá trị của chỉ số này được sử dụng để đánh giá mức độ thiếu máu, được sử dụng để hỗ trợ cùng với các chỉ số khác để đánh giá tình trạng thiếu máu.

4.2.3.3. Phân bố về số lượng hồng cầu (RBC) $\times 10^{12}/lit$

56,7% số bệnh nhân có số lượng hồng cầu nằm trong khoảng từ $3-4,9 \times 10^{12}/lit$, tập trung ở nhóm bệnh nhân có biểu hiện thiếu máu trung bình, phù hợp với các chỉ số HGB và HCT. Có 6,2% bệnh nhân có số lượng hồng

cầu dưới $3 \times 10^{12}/\text{lit}$, phù hợp với nhóm bệnh nhân có biểu hiện thiếu máu nặng và rất nặng. Có 37% số bệnh nhân có số lượng hồng cầu $\geq 5 \times 10^{12}/\text{lit}$, tập trung ở nhóm bệnh nhân có biểu hiện thiếu máu nhẹ hoặc không thiếu máu.

RBC trung bình của các bệnh nhân trong nghiên cứu là $4,47 \pm 0,99$. RBC trung bình của nhóm ($--/\alpha$) là $5,3 \pm 0,55$, cao hơn của ($--/\alpha^T$) là $4,08 \pm 0,91$. Trong một nghiên cứu khác trên bệnh nhân HbH của Thái Lan, chỉ số này lần lượt là $5,41 \pm 0,58$ và $4,2 \pm 0,7$ [36]. Khi xem xét RBC trong các nhóm tuổi, trung bình RBC tăng dần khi tuổi tăng. Số lượng hồng cầu RBC là một chỉ số ít được đề cập tới trong các nghiên cứu về bệnh HbH. Chỉ số này góp phần vào việc đánh giá thêm về tình trạng thiếu máu trên lâm sàng. Một chỉ số liên quan khác về hồng cầu, như đếm hồng cầu lưới, thay đổi hình dáng hồng cầu, đo sức bền thẩm thấu của hồng cầu là những chỉ số có giá trị trong chẩn đoán bệnh hoặc để đánh giá tình trạng thiếu máu. Trong bệnh HbH có kèm theo những sự thay đổi của hồng cầu, như hồng cầu nhược sắc, kích thước không đều, có hồng cầu hình bia, tuy nhiên không được đề cập trong khuôn khổ của nghiên cứu này [128].

4.2.3.4. Phân bố về thể tích trung bình hồng cầu (MCV) fL

MCV là một trong những chỉ số hiệu quả nhất để phân loại thiếu máu dựa trên hình thái tế bào hồng cầu [129]. Thiếu máu hồng cầu nhỏ khi hồng cầu có kích thước $< 80 \text{ fL}$. Hồng cầu có kích thước bình thường khi MCV đạt $80-95 \text{ fL}$ [126]. Trong nghiên cứu này, 97,9% các bệnh nhân đều có thiếu máu hồng cầu nhỏ $\text{MCV} < 80 \text{ fL}$. Trong số này, có 40,2% số bệnh nhân có chỉ số MCV nằm trong khoảng từ $65-77 \text{ fL}$ và có 26,8% số bệnh nhân có MCV nằm trong khoảng từ $55-64 \text{ fL}$. MCV trung bình của 97 bệnh nhân nghiên cứu là $64,5 \pm 11,27 \text{ fL}$ ($34-100 \text{ fL}$), nhỏ hơn hẳn so với người bình thường ($70-100 \text{ fL}$), thay đổi tùy lứa tuổi. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của D.B.Trực trên trẻ mắc HbH tại Việt Nam, có MCV trung bình là $73,6 \pm 7,8 \text{ fL}$. Hoặc trên các bệnh nhân HbH của Thái Lan, MCV trung bình $71-72 \text{ fL}$ [78].

MCV trung bình, giới hạn MCV của bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi đều nằm dưới khoảng giá trị bình thường của người bình thường ở cùng độ tuổi

tương ứng. Khi xem xét MCV trong các nhóm tuổi, ta thấy trung bình MCV tăng dần khi tuổi tăng. Trung bình MCV giữa các nhóm có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,008 < 0,05$). Khi phân tích theo nhóm bệnh, ngược lại với một số chỉ số huyết học khác, MCV trung bình của nhóm ($--/\alpha$) thấp hơn so với nhóm ($--/\alpha^T$), lần lượt là $58,06 \pm 9,19$ và $67,53 \pm 10,93$ fL. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Tình trạng này được ghi nhận ở nhiều nghiên cứu khác, lần lượt là 54,0 fL; (46,0-76,0) và 65,2; (48,7-80,7) như trong nghiên cứu của Vichinsky năm 2014 [127]. Hoặc lần lượt là $63,6 \pm 5,6$ và $73,8 \pm 6,7$ ($p < 0,001$) như trong nghiên cứu của Chen năm 2000 [51], và một số nghiên cứu tương tự [36, 52, 106]. Điều này cũng được Chen giải thích trong công bố của mình rằng do nhóm bệnh ($--/\alpha^T$) có biểu hiện tan máu nặng hơn nhóm ($--/\alpha$). Khi phân tích về mối tương quan giữa nhóm bệnh và nhóm MCV, chúng tôi thấy ở ngưỡng $MCV=70$ fL, có sự khác biệt giữa 2 nhóm bệnh. Số bệnh nhân có $MCV \leq 70$ nhiều hơn số bệnh nhân có $MCV > 70$, lần lượt là 57,7% và 42,3%. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

4.2.3.5. Phân bố về huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) pg

Chỉ số MCH nói lên lượng Hemoglobin chứa trung bình trong mỗi hồng cầu ở máu ngoại vi. Chỉ số này phụ thuộc vào thể tích trung bình hồng cầu và nồng độ hemoglobin trung bình hồng cầu. Ở người bình thường chỉ số này nằm trong khoảng từ 27-30pg. Đây là một trong các chỉ số quan trọng cùng với chỉ số MCV đánh giá tình trạng thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc của bệnh nhân. Các bệnh nhân trong nghiên cứu đều có biểu hiện hồng cầu nhược sắc nặng. Có 99% các bệnh nhân trong nghiên cứu có chỉ số MCH thấp < 27 pg. Trong đó có 57,7% bệnh nhân có MCH rất thấp trong khoảng từ 15-19,9pg. Tiếp theo có 32% bệnh nhân có MCH nằm trong khoảng từ 20-26,9%. Chỉ có 1% có MCH đạt mức bình thường từ 27 - ≥ 29 pg. Không có bệnh nhân nào có MCH đạt giá trị > 30 pg. MCH trung bình của 97 bệnh nhân nghiên cứu là $18,61 \pm 3,44$ pg, dao động trong khoảng từ 13,90 - 34,00 pg, thấp

hơn hẳn so với người bình thường. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của D.B. Trục trên trẻ em mắc HbH là $21,75 \pm 3,82$ pg, và ở trẻ bình thường là từ 28-36pg. MCH trung bình, giới hạn MCH của bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi đều nằm dưới khoảng giá trị bình thường của người bình thường ở cùng độ tuổi tương ứng. Trung bình MCH giữa các nhóm có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,024 < 0,05$).

Khi phân tích theo nhóm bệnh, MCH trung bình của nhóm ($--/-\alpha^T$) cao hơn của nhóm ($--/-\alpha$), lần lượt là $19,23 \pm 3,51$ pg và $17,28 \pm 2,93$ pg ($p < 0,009$). Tình trạng này cũng được ghi nhận tương tự ở nhiều các nghiên cứu khác, lần lượt là $20,2 \pm 1,8$ pg và $18,7 \pm 1,7$ pg ($p < 0,001$) như trong nghiên cứu của Chen [51], hoặc 18,6pg (14,8-24,8) và 16,6pg (14,3-24,7) trong nghiên cứu của Vinchinsky [127]. Khi phân tích về mối tương quan giữa nhóm bệnh và nhóm MCH, chúng tôi thấy, ở ngưỡng $MCH=19$ có sự khác biệt giữa 2 nhóm bệnh. Số bệnh nhân có $MCH \leq 19$ nhiều hơn số có $MCH > 19$, lần lượt là 62,9% và 37,1%. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4.2.3.6. Phân bố về nồng độ hemoglobin trung bình hồng cầu (MCHC) %

Chỉ số MCHC hay còn gọi là độ bão hoà hemoglobin trung bình hồng cầu, cho biết mức độ bão hoà Hb của mỗi hồng cầu trưởng thành. Tối đa mỗi hồng cầu có thể chứa được một lượng Hb bằng 36% trọng lượng của hồng cầu. Chỉ số này được sử dụng để đánh giá mức độ nhược sắc hay bình sắc của hồng cầu. Thiếu máu nhược sắc khi $MCHC < 30\%$. Có 62,9% các bệnh nhân trong nghiên cứu có chỉ số MCHC thấp $< 30\%$. Trong đó có 60,8% bệnh nhân có MCH trong khoảng từ 20-29,9%. Có 2 bệnh nhân có MCHC thấp dưới 20%. Có 37,1% bệnh nhân có MCHC đạt mức bình thường $> 30\%$, trong đó chủ yếu nằm trong khoảng từ 30-32% chiếm 30,9%. Trong nghiên cứu của D.B.Trục, không có bệnh nhi nào có MCHC đạt giá trị trên 30%, có thể do trong nghiên cứu này, tất cả các bệnh nhân đều là trẻ em. Những bệnh nhân này khi đến khám hầu hết đều vì các triệu chứng thiếu máu, do đó các chỉ số

liên quan đến tình trạng thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc thường rất rõ ràng. Còn trong nghiên cứu của chúng tôi, có 11,3% bệnh nhân >19 tuổi. Trong đó có những bệnh nhân chỉ tình cờ phát hiện tình trạng bệnh qua xét nghiệm, tình trạng thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc không điển hình.

MCHC trung bình chung của 97 bệnh nhân trong nghiên cứu là $28,89 \pm 2,63\%$, dao động trong khoảng từ 18,9-35,2%, thấp hơn so với người bình thường. MCHC trung bình của nhóm bệnh nhi trong nghiên cứu của D.B. Trục là $25,8 \pm 4,1\%$, ở trẻ bình thường là từ 30-37%. MCHC trung bình chung, giới hạn MCHC của bệnh nhân HbH ở tất cả các độ tuổi đều nằm dưới khoảng giá trị bình thường của người bình thường ở cùng độ tuổi tương ứng. Khi xem xét MCHC trong các nhóm tuổi, ta thấy trung bình MCHC giữa các nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,664 > 0,05$). Khi phân tích MCHC trung bình theo nhóm bệnh, MCHC trung bình của nhóm ($--/\alpha$) cao hơn của nhóm ($--/\alpha^T$), lần lượt là $29,66 \pm 2,93\%$ và $28,51 \pm 2,42$ ($p < 0,05$). Kết quả này cũng tương ứng với các nghiên cứu nghiên cứu trên bệnh nhân HbH ở Thái Lan $30,1 \pm 1,3$ ở nhóm ($--/\alpha$) và $29,5 \pm 3,4$ ở nhóm ($--/\alpha^T$) như trong ($p < 0,001$) [36], tương tự trong nghiên cứu trên bệnh nhân HbH ở Trung Quốc lần lượt là $29,3 \pm 1,7$ và $27,3 \pm 6,7$ ($p < 0,001$) [51]. Khi phân tích về mối tương quan giữa nhóm bệnh và nhóm MCHC, chúng tôi thấy ở ngưỡng MCHC=30, có sự khác biệt giữa 2 nhóm bệnh. Số bệnh nhân có MCHC<30 lớn hơn số có MCHC \geq 30, lần lượt là 61,9% và 38,1%. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4.2.3.7. Phân bố về thành phần Hemoglobin (%)

HbA2 trung bình trong nghiên cứu là $1,86 \pm 1,27\%$. Nhìn chung, hầu hết các bệnh nhân HbH đều có HbA2 giảm nhẹ so với bình thường ($2,1 \pm 0,5\%$). Có 44,3% bệnh nhân HbH có HbA2 nằm trong khoảng từ 1-1,9%, 10,3% trong khoảng dưới 1%. Số bệnh nhân có HbA2 nằm trong khoảng bình

thường từ 2-3% chiếm 32%. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của các nghiên cứu khác (Bảng 4.5).

Bảng 4.5. So sánh thành phần hemoglobin trên bệnh nhân HbH

Thành phần Hb	Mean \pm SD			
	<i>N.D. Ngọc</i>	<i>D.B. Trức [130]</i>	<i>Vichai L.[36]</i>	<i>Chen [51]</i>
HbA1	88,44 \pm 6,29	85,1 \pm 6,4	87,3 \pm 9,4	-
HbA2	1,86 \pm 1,27	1,4 \pm 0,7	1,45 \pm 0,6	1,05 \pm 0,35
HbH	8,29 \pm 5,65	11,6 \pm 5,7	11,49 \pm 5,81	11,6 \pm 5,8
Hb Bart's	0,23 \pm 1,32	0 - 11,6	5,71 \pm 2,27	1,69 \pm 1,7
Hb F	0,97 \pm 2,92	-	1,12 \pm 0,95	1,8 \pm 1,7

Đặc biệt có 5,1% số bệnh nhân có HbA2 $>$ 3,5%. HbA2 thông thường tăng lên trong bệnh β thalassemia. Vì vậy ở những trường hợp điện di hemoglobin thấy có xuất hiện HbH, kèm theo có tăng HbA2 $>$ 3,5%, cần xem xét khả năng kết hợp với tình trạng mang gen hoặc mắc bệnh β thalassemia. Trong trường hợp này, bệnh nhân cần được làm xét nghiệm di truyền để khẳng định tình trạng trên.

Thành phần HbH là một thành phần hemoglobin quan trọng hiện diện ở hầu hết bệnh nhân mắc HbH và là một trong các tiêu chuẩn để chẩn đoán xác định bệnh. Năm 1992, Fucharoen và cộng sự công bố độ nhạy của xét nghiệm thể HbH ở người α^0 -thalassemia ($--/\alpha$) là khoảng 90% [7]. Hiện nay, việc phân tích gen α globin ngày càng phổ biến, chi phí ngày càng giảm, thì xét nghiệm này đang được sử dụng rộng rãi để tầm soát trực tiếp cho tất cả các trường hợp có MCV và MCH thấp chưa rõ nguyên nhân [43]. HbH được cấu tạo bởi 4 chuỗi β globin trong thành phần globin do sự suy giảm tổng hợp chuỗi α globin. HbH có tỷ lệ thay đổi trong khoảng rộng, từ 1,2% đến khoảng $<$ 40%, thông thường nằm trong khoảng từ 7 - 15%. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 81/97 bệnh nhân phát hiện thấy có HbH, chiếm 83,5%. Kết quả này chỉ ra rằng có 16,49% bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc bệnh HbH bằng di truyền phân tử, nhưng không thấy có HbH trên thành phần điện di huyết sắc tố.

Điều này có thể do HbH là loại hemoglobin không bền vững. Phần chuỗi globin β_4 dễ bị tủa khi bị oxy hoá, do đó HbH dễ bị phá huỷ nên không phát hiện được khi điện di hemoglobin. Để khắc phục nhược điểm này, điện di hemoglobin nên được điện di trực tiếp ngay sau khi hồng cầu được phá vỡ và cần được theo dõi ngay từ quá trình điện di do HbH tách ra khỏi HbA1 và chạy về phía trước rất sớm. Như vậy, HbH trung bình của 81 bệnh nhân có HbH>0 là $9,94 \pm 4,68$, của tổng số 97 bệnh nhân nghiên cứu là $8,3 \pm 5,65$ (4 - 26,9%). Kết quả này phù hợp với kết quả của các nghiên cứu tương tự [36].

Trong số 97 bệnh nhân HbH trong nghiên cứu, có 3 bệnh nhân (3,09%) bệnh nhân ngoài thành phần HbH còn có thành phần Hb Bart's, dao động trong khoảng từ 6,9 đến 8,3%, với giá trị trung bình tính trên 3 bệnh nhân này là $7,6 \pm 0,7$, còn tính trên tổng số 97 bệnh nhân nghiên cứu là $0,23 \pm 1,32\%$. Các nghiên cứu tương tự đều phát hiện thấy có Hb Bart's trên bệnh nhân HbH ở các mức độ khác nhau. Điều này cũng phụ thuộc vào độ tuổi của bệnh nhân khi làm xét nghiệm. Do lượng Hb Bart's nhỏ này được tạo thành do còn tồn tại chuỗi γ từ thời kỳ bào thai. Sự tồn tại của Hb Bart's cùng với HbH đã giúp cho các nhà nghiên cứu từ thời điểm ban đầu tìm được mối liên hệ giữa bệnh HbH và bệnh α -thalassemia. Cũng cần lưu ý rằng Hb Bart's có phần Globin cấu tạo từ 4 chuỗi γ (γ_4) và có vị trí điện di ngay sát sau vạch HbH, dễ bị mất đi trong quá trình xử lý hồng cầu trước điện di. Do đó cũng như đối với HbH, Hb Bart's cũng dễ bị bỏ qua hoặc bị mất đi trong xét nghiệm dẫn đến sự thay đổi về kết quả thành phần điện di huyết sắc tố.

Ngoài ra chúng tôi còn quan sát thấy trên bệnh nhân HbH còn xuất hiện hemoglobin F (HbF). Phần globin của HbF được cấu tạo từ 2 chuỗi α và 2 chuỗi γ ($\alpha_2\gamma_2$), là loại Hb chủ yếu trong thời kỳ thai. Người bình thường HbF dao động <1,5%, thường tăng trong những trường hợp bệnh lý như β thalassemia hoặc bệnh tồn dư HbF. Có 33/97 bệnh nhân có HbF trong thành phần điện di hemoglobin, chiếm 34%. HbF trung bình của 33 bệnh nhân có

HbF>0 là $2,87 \pm 4,29\%$ (0,3% - 21,8%). Nếu tính trên 97 bệnh nhân thì HbF trung bình là $0,97 \pm 2,92\%$. HbF cũng xuất hiện trong các công bố tương tự.

Khi xem xét các thành phần hemoglobin ở từng nhóm bệnh, chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt. Nhóm ($--/\alpha^T$) có tỷ lệ HbH cao hơn, HbA1 và HbA2 thấp hơn so với nhóm ($--/\alpha$), phù hợp với nghiên cứu tương tự [106], [100, 125].

Bảng 4.6. Thành phần hemoglobin ở từng nhóm của bệnh HbH

Hb (%)	Mean \pm SD					
	<i>N,D,Ngọc</i>		<i>Vichai L [36]</i>		<i>Chen [51]</i>	
	($--/\alpha$)	($--/\alpha^T$)	($--/\alpha$)	($--/\alpha^T$)	($--/\alpha$)	($--/\alpha^T$)
N	31	66	83	64	87	27
HbA1	$90,6 \pm 6,71$	$87,42 \pm 5,87$	$90 \pm 4,1$	$84,6 \pm 10,6$	-	-
HbA2	$1,87 \pm 1,4$	$1,85 \pm 1,22$	$1,56 \pm 0,31$	$1,35 \pm 0,96$	$1,2 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,6$
HbH	$6,4 \pm 6,53$	$9,19 \pm 5,0$	$6,98 \pm 3,85$	$16 \pm 7,77$	$7,3 \pm 3,6$	$15,9 \pm 8,0$

4.2.4. Mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh HbH

4.2.4.1. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và hai nhóm bệnh HbH

Khi so sánh các đặc điểm lâm sàng và huyết học của hai nhóm bệnh ($--/\alpha^T$) và ($--/\alpha$) ở bảng 3.33, chúng tôi nhận thấy, bệnh nhân HbH thuộc nhóm không mất đoạn có biểu hiện lâm sàng nặng hơn so với nhóm bệnh nhân mất đoạn ($--/\alpha^T$) > ($--/\alpha$) như sau:

Số lần truyền máu trung bình nhiều hơn ($3,2$ lần/năm > $0,27$ lần/năm), tuổi vào viện sớm hơn ($6,1$ tuổi > $10,58$ tuổi), có biểu hiện thiếu máu với HGB < 90g/dL nhiều hơn ($75,5\%$ > $24,3\%$), tỷ lệ bệnh nhân có gan to ở cả 2 mức độ 2 và 3cm dưới bờ sườn cao hơn ($71,1\%$ > $28,9\%$), tỷ lệ bệnh nhân có lách to ở cả 2 mức độ 2 và 3 cm dưới bờ sườn cao hơn ($68,1\%$ > $19,3\%$), tỷ lệ có bệnh nhân có bộ mặt thalassemia cao hơn ($60,6\%$ > $6,4\%$).

Những bệnh nhân thuộc nhóm ($--/\alpha^T$) có biểu hiện thiếu máu nặng hơn, cụ thể có Hb máu thấp hơn ($74,92$ g/dL < $86,4$ g/dL), HCT thấp hơn ($27,87\%$ < $29,71\%$), tình trạng thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc và tan máu nặng hơn, thể hiện trên chỉ số MCV cao hơn ($67,53$ fL > $58,06$ fL), MCH cao

hơn ($19,13\text{pg} > 17,28\text{pg}$), MCHC thấp hơn ($28,51\% < 29,66\%$). Điện di hemoglobin có tỷ lệ HbH cao hơn ($9,19\% > 6,4\%$) và xuất hiện có Hb Bart's. Những sự khác biệt kể trên đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Kết luận này của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với kết luận của các nghiên cứu khác về vấn đề này [36], [51], [106].

4.2.4.2. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và từng kiểu gen của bệnh HbH

Đã có nhiều nghiên cứu so sánh mối liên quan giữa kiểu gen và đặc điểm lâm sàng của nhóm bệnh HbH dạng mất đoạn và HbH dạng không mất đoạn, nhưng chưa có khảo sát về sự khác biệt về đặc điểm lâm sàng của từng kiểu gen khác nhau trong cùng một nhóm bệnh. Từ đó, chúng tôi tiến hành phân nhóm bệnh nhân theo kiểu đột biến tìm thấy trong nghiên cứu. Bảng 3.34 mô tả một số đặc điểm lâm sàng và huyết học của 5 nhóm kiểu đột biến, trong đó mỗi kiểu đột biến có nhiều hơn một bệnh nhân. Số bệnh nhân ở mỗi nhóm kiểu đột biến khác nhau tùy vào mức độ phổ biến của loại đột biến.

- *Nhóm HbH ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$)*

Có 53 bệnh nhân mang kiểu gen này, có biểu hiện lâm sàng nặng hơn so với các đột biến còn lại. Tuổi vào viện trung bình sớm thứ hai, $5,8 \pm 5,85$ tuổi, chỉ sau nhóm $--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT}$, tuy nhiên, có 3 bệnh nhân mang kiểu gen này được phát hiện ở tuổi trưởng thành, lần lượt là 22, 23 và 31 tuổi. Là nhóm kiểu gen có số lần truyền máu trung bình cao nhất là $3,32 \pm 3,77$ lần/năm. Có số bệnh nhân phụ thuộc truyền máu cao nhất 10/53 (18,9%), có số bệnh nhân phải truyền máu rải rác cao nhất 40/53 (75,6%), có số bệnh nhân không phải truyền máu thấp nhất trong nhóm các bệnh nhân HbH 3/53 (5,6%). Số bệnh nhân có thiếu máu nhiều nhất với $\text{Hb} < 90\text{g/L}$ là 68%, các chỉ số Hb, RBC, HCT, MCHC thấp nhất so với các nhóm còn lại. Hồng cầu nhỏ nhược sắc và tan máu nhiều nhất với MCV là $77,75 \pm 16,77\text{fL}$, MCH là $25,6 \pm 6,72\%$. Điện di Hb có HbH cao nhất là $10,7 \pm 4,22\%$. Biểu hiện lâm sàng này phù hợp với cơ chế bệnh sinh của đột biến. Do đột biến xảy ra tại codon kết thúc của gen $\alpha 2$, TAA > CAA, dẫn đến kéo dài 31 acid amin trên chuỗi globin, mRNA của gen

bị đột biến không bền vững, giảm khả năng tổng hợp chuỗi α globin, tạo Hb bất thường là HbCs.

• *Nhóm HbH* ($--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT}$)

Có 6 bệnh nhân có kiểu gen này, trong đó có 2 bệnh nhân là 2 chị em ruột, có biểu hiện lâm sàng đứng thứ hai sau nhóm ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$), và rất thay đổi ở mỗi bệnh nhân: 4/6 bệnh nhân có tuổi vào viện sớm <5 tuổi, có 1 bệnh nhân vào viện năm 12 tuổi. Tuổi vào viện trung bình sớm nhất là $5,57 \pm 4,49$ tuổi. Số lần truyền máu trung bình là $3,0 \pm 5,13$ lần/năm. Có 1/6 (16,6%) bệnh nhân phụ thuộc truyền máu mỗi tháng một lần, là kiểu gen thứ hai sau nhóm $--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$ có bệnh nhân phụ thuộc truyền máu. Có 3/6 (50%) bệnh nhân chưa từng phải truyền máu, trong đó 2 bệnh nhân là chị em ruột đều nằm trong nhóm này. Có 2/6 (33,3%) bệnh nhân phải truyền máu rải rác ít nhất. Có 4/6 bệnh nhân có Hb <9g/dL, có 2/6 bệnh nhân có HGB >9g/dl. HGB trung bình $84 \pm 18,25$ g/dL. Tất cả các bệnh nhân đều có hồng cầu nhỏ MCV thấp (55,2-61,3fL), nhược sắc MCH thấp (15,9-17pg), HbH từ 5,9-13,5%. Có 2 bệnh nhân có Hb Bart's, 4 bệnh nhân có HbF. Trên y văn, chúng tôi tìm thấy 2 trường hợp HbH có kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT}$) được công bố, đều là bệnh nhân gốc Việt tại Canada và Mỹ. Cả hai bệnh nhân này đều có thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc, và không phải truyền máu. Một bé gái 9 tuổi, với Hb: 9g/dL, MCV: 62,0fL, HbH: 13,6% [109], và một bé trai 9 tháng tuổi với Hb 9,1g/dL, MCV: 53,3fL, MCH: 28pg, HbH: 12,6% [110]. Đây là đột biến mất một nucleotid (T) tại codon đầu tiên ATG exon 1 gen $\alpha 2$, là đột biến dịch khung, làm thay đổi toàn bộ trình tự chuỗi α globin phía sau đột biến, ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp chuỗi α globin (Phụ lục 3).

• *Nhóm HbH* ($--^{SEA}/-\alpha^{HbQs}$)

Có 4 bệnh nhân mang kiểu gen này: 1 bệnh nhân 20 tuổi, 1 bệnh nhân 4 tuổi, 2 bệnh nhân dưới 2 tuổi. Tuổi vào viện trung bình là $6,42 \pm 8,93$ tuổi. Số lần truyền máu trung bình/năm là $1,38 \pm 1,38$ lần. Không có bệnh nhân phụ thuộc truyền máu. Có 3/4 bệnh nhân truyền máu rải rác (75%), và 1 bệnh

nhân không phải truyền máu (25%). 50% số bệnh nhân thiếu máu với $Hb < 90 \text{g/dL}$. Các bệnh nhân đều có thiếu máu hồng nhỏ nhược sắc, trung bình $MCV: 59,94 \pm 10,17 \text{fL}$, $MCH: 17,79 \pm 3,32 \text{pg}$, $HbH: 8,5 \pm 2,65\%$. Đây là một loại Hb phổ biến ở Trung Quốc, nhưng hiếm gặp ở các quần thể khác [131]. Đột biến làm thay đổi bộ ba CTG>CCG tại codon 125 trên gen $\alpha 2$, tạo một loại hemoglobin rất không bền vững là HbQs, gây tổn thương màng và suy giảm chức năng của màng hồng cầu [52]. Một nghiên cứu đã mô tả các dạng lâm sàng của bệnh HbH ($--^{SEA}/-\alpha^{HbQs}$), bao gồm từ nặng nhất là thể phù thai HbH, thể phụ thuộc truyền máu, thể trung gian phải truyền máu rải rác, và thể nhẹ không phải truyền máu [132]. Căn nguyên của vấn đề này vẫn chưa được giải thích. Nhưng với những phát hiện này có thể cho thấy các đột biến trên gen α globin không phải là yếu tố duy nhất quyết định biểu hiện lâm sàng của bệnh HbH, hoặc yếu tố liên quan đến những gen không phải gen globin, hoặc yếu tố bên ngoài có thể tác động làm thay đổi kiểu hình khi sự sản xuất chuỗi globin bị giảm thấp [132].

a. Nhóm HbH ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) và ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$)

Có 9 bệnh nhân có kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) và 21 bệnh nhân có kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$), thuộc về nhóm HbH mất đoạn gen, có biểu hiện lâm sàng gần tương tự nhau, và nhẹ hơn so với các nhóm đột biến của nhóm HbH không mất đoạn kể trên. Trong cả hai trường hợp này, sự sao chép của một gen α globin có thể xảy ra bình thường mà không có sự tương tác cản trở của gen còn lại. Trong đó, nhóm ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$) có biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn so với nhóm ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$).

Nhóm ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$) có tuổi vào viện muộn nhất trong tất cả các kiểu gen của bệnh, $11,24 \pm 13,65$ tuổi. Số lần truyền máu trung bình/năm thấp nhất là $0,24 \pm 0,39$ lần, trong đó 80% số bệnh nhân không cần phải truyền máu, không có bệnh nhân phụ thuộc truyền máu, và chỉ có 4 trường hợp phải truyền máu rải rác. Số bệnh nhân thiếu máu với $Hb < 90 \text{g/dL}$ thấp nhất là 11,0%. Các chỉ số khác như RBC, HCT, MCHC cao nhất. MCV, MCH chỉ thấp sau nhóm $--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$, có HbH thấp nhất $8,15 \pm 5,13\%$.

Nhóm ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$), có tuổi vào viện sớm hơn ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$), $9,2 \pm 9,48$ tuổi. Số lần truyền máu/năm là $1,49 \pm 3,16$ lần. Không có bệnh nhân phụ thuộc truyền máu. Có 7/9 (77,7%) bệnh nhân không cần phải truyền máu. Có 2/9 (22,2%) có truyền máu rải rác. Số bệnh nhân thiếu máu với $Hb < 90g/dL$ là 13,9%. Các chỉ số RBC, HCT, MCHC, MCV, MCH đều thấp hơn nhóm ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$), trừ HbH là $10,27 \pm 6,95\%$.

Như vậy, khi so sánh các biểu hiện lâm sàng và chỉ số huyết học trong phạm vi của nghiên cứu này, các bệnh nhân HbH với các kiểu gen khác nhau có sự khác biệt, có thể được xếp theo mức độ từ nặng đến nhẹ như sau: ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$) > ($--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT}$) > ($--^{SEA}/-\alpha^{HbQs}$) > ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) > ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- *Các đột biến hiếm gặp khác*

Ngoài ra, nghiên cứu còn phát hiện 4 bệnh nhân HbH có kiểu gen hiếm gặp, trong đó có 3 bệnh nhân thuộc nhóm ($--/\alpha^T$) là ($--^{SEA}/-\alpha^{c.426 A>T}$), ($--^{SEA}/-\alpha^{c.92 G>A}$), ($--\alpha^{SEA}/-\alpha^{c.81G>T}$), 1 bệnh nhân thuộc nhóm ($--/-\alpha$) là ($--^{SEA}/-\alpha 1$). Kiểu hình của các kiểu gen này được mô tả trong phần phụ lục 4. Vì mỗi kiểu gen chỉ có một bệnh nhân nên chúng tôi không đưa vào bảng 3.34 để so sánh các giá trị trung bình, mà chỉ mô tả dưới dạng các báo cáo ca bệnh như sau:

Kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{c.426 A>T}$) có biểu hiện lâm sàng nặng nhất, do cơ chế bệnh sinh của đột biến này tương tự với ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$), đều do đột biến điểm tại codon kết thúc của gen $\alpha 2$ gây nên, lần lượt là TAA>TAT và TAA>CAA, dẫn tới thêm vào trình tự chuỗi α globin bình thường 31 amino acid nữa. Do đó, mRNA của hai gen bị đột biến này trở nên rất không bền vững, và làm giảm khả năng tổng hợp thành chuỗi α globin. Bệnh nhân HbH mang kiểu gen được phát hiện bệnh tại thời điểm nghiên cứu khi bé được 1 tuổi, phụ thuộc truyền máu, với số lần truyền máu trung bình là 6,6 lần/năm. Hb: 7,3g/dL, MCV: 76,6fl, MCH: 66,5pg, HbH: 12,9%.

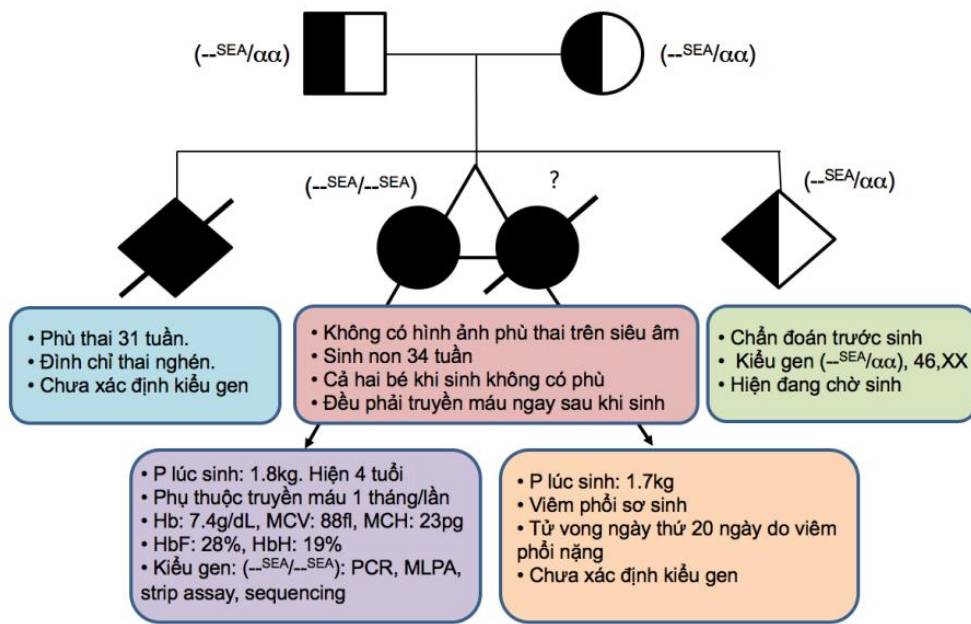
Kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{c.92 G>A}$) gặp ở một bệnh nhân 3 tuổi, truyền máu rải rác, số lần truyền máu trung bình/năm là 0,3 lần. Hb: 8g/dL, MCV: 60,0fL, MCH: 17pg, HbH; 5,7%. Đột biến được cho rằng có thể ảnh hưởng tới sự ghép nối chuỗi mRNA ở vị trí splicing, vì nằm liền kề với trình tự bảo tồn GT của intron 1 của gen $\alpha 2$, nhưng không tìm thấy một sản phẩm mRNA bất thường nào bằng phương pháp RT-PCR. Có thể do mức độ ảnh hưởng của đột biến nhỏ, hoặc sản phẩm mRNA splicing bất thường không bền vững [111].

Kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha 1$) gặp ở một bệnh nhân 5 tuổi, truyền máu rải rác, với số lần truyền máu trung bình là 0,4 lần/năm. HGB là 8,3g/dL, MCV là 66,7fL, MCH là 19,7pg, HbH là 4,5%. Đột biến gây mất toàn bộ gen $\alpha 1$, nhưng không ảnh hưởng tới sự hoạt động của gen $\alpha 2$, mà gen $\alpha 2$ có vai trò gấp đôi so với $\alpha 1$ trong tổng hợp chuỗi α globin, nên biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân mang kiểu gen này không nặng nề như với kiểu gen của thể mất đoạn.

Kiểu gen ($--\alpha^{SEA}/-\alpha^{c.81G>T}$) gặp ở bệnh nhân 4 tuổi, chưa phải truyền máu, Hb: 10g/dL, MCV: 59,7fL, MCH: 18,1%, HbH: 37,2%. Đây là đột biến tạo Hb Hekinan, một biến thể Hb rất hiếm gặp. Đột biến xảy ra trên gen $\alpha 1$, do đó mức độ ảnh hưởng của nó đến quá trình tổng hợp chuỗi α globin cũng không đáng kể, có thể do vậy, bệnh nhân có kiểu hình nhẹ hơn các kiểu gen khác.

4.2.5. Mối liên quan giữa biểu hiện lâm sàng và kiểu gen của bệnh nhân mắc Hb Bart's còn sống sau sinh

Bệnh Hb Bart's là thể nặng nhất của bệnh α -thalassemia, hầu hết tất cả thai mắc Hb Bart's đều tiên triển thành phù thai do thiếu oxy tổ chức. Nếu thai không được điều trị truyền máu từ trong tử cung, thì hầu hết thai sẽ chết lưu vào 3 tháng cuối của thai kỳ hoặc tử vong sớm trong vài giờ đầu sau khi sinh. Do đột biến mất toàn bộ gen α globin dẫn đến sự suy giảm tổng hợp hemoglobin [15, 35, 37].



Hình 4.1. Phả hệ của gia đình có con mắc Hb Bart's còn sống sau sinh

Bảng 4.7. Các dạng hemoglobin qua các giai đoạn phát triển [133]

Giai đoạn phát triển	Người bình thường	Bệnh nhân Hb Bart's
Phôi	Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$)	Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$)
	Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$)	Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$)
	Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$)	
Thai	HbF ($\alpha_2\gamma_2$)	Hb Bart's (γ_4)
		Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$)
Sau sinh/trưởng thành	HbA ($\alpha_2\beta_2$)	HbH (β_4)
	HbA ₂ ($\alpha_2\delta_2$)	Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$)

Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện một bé gái 4 tuổi, là một trong hai bé gái sinh đôi một bánh rau, một buồng ối, được chẩn đoán xác định mắc Hb Bart's bằng kỹ thuật GAP-PCR, MLPA, kiểu gen ($--^{SEA}/--^{SEA}$). PCR sequencing không khuếch đại được gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$. Bố mẹ của bệnh nhân là người mang gen bệnh α -thalassemia, kiểu gen ($--^{SEA}/\alpha\alpha$). Tiền sử, đặc điểm các lần mang thai, kiểu gen của gia đình được mô tả ở hình 4.1.

Trên bệnh nhân này, phân tích thành phần huyết sắc tố có HbH 19,0%, điều này phù hợp với giải thích trên và phù hợp với mô tả của bảng 4.7. Ngoài

ra, còn có HbF 28,1%. Chúng tôi giả thiết loại hemoglobin bào thai này có bản chất là Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$), tuy nhiên ở mức độ điện di huyết sắc tố không thể phân biệt được bản chất của 2 loại này, và chúng tôi chưa có phương tiện để khẳng định giả thiết bằng sinh học phân tử. Vì chuỗi ζ globin hình thành nên Hb Portland II là một trong những chuỗi có bản chất giống chuỗi α globin, chỉ hoạt động ở 3 tháng đầu của thai kỳ. Tuy nhiên, trong một vài trường hợp, các gen globin bào thai trong đó có gen ζ hoặc gen γ vẫn tiếp tục được biểu hiện trong tế bào hồng cầu trưởng thành, gây hội chứng tồn dư huyết sắc tố bào thai có tính chất di truyền, tạo HbF hoặc Hb Portland II ở trẻ sau sinh và người trưởng thành (HPFH) [12, 134].

Nghiên cứu của Chui năm 1998 chỉ ra rằng, ở một số thai mắc Hb Bart's, nếu còn tồn tại ít nhất một bản sao của gen ζ globin (HbZ), có thể sản xuất ra 1 lượng nhỏ huyết sắc tố bào thai có chức năng là Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), mới có thể cho phép thai sống được đến 3 tháng cuối của thai kỳ [37]. Chúng tôi giả thiết sự tồn dư lâu dài của gen ζ globin này đến giai đoạn sau sinh, đã tổng hợp nên Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$), bù trừ một phần sự thiếu hụt tổng hợp chuỗi α globin, dẫn đến làm giảm nhẹ tình trạng thiếu máu của thai, khiến cho thai mắc Hb Bart's có thể sống được đến khi sinh, và sau khi sinh ra, chỉ cần phải phụ thuộc truyền máu để duy trì sự sống. Giả thuyết này của chúng tôi phù hợp với công bố của tác giả Duantida năm 2017 trên các bệnh nhân Hb Bart's còn sống sau sinh, đã được chúng tôi mô tả ở phần 4.1.4 [133]. Nghiên cứu của Duantida còn theo dõi sự phát triển của các bệnh nhân mắc Hb Bart's sau sinh ở cả nhóm đã được truyền máu trong tử cung và truyền máu sau khi sinh. Đến nay, có 39 bệnh nhân đã sống qua 5 tuổi, trong đó có 18 bệnh nhân đã hơn 10 tuổi. Trong số các bệnh nhân này, có khoảng 40% bệnh nhân có chậm phát triển về trọng lượng và 50% có chậm phát triển về chiều cao. Chậm phát triển về tinh thần xuất hiện ở 20% bệnh nhân. Hầu hết tất cả các bệnh nhân đều phải phụ thuộc truyền máu, và thường có kèm theo các dị tật bẩm sinh hoặc bệnh lý khác kèm theo. Tuy

nhiên, đây là một trường hợp đặc biệt hiếm gặp, hiện nay chúng tôi chỉ ghi nhận và mô tả và đưa ra giả thiết để giải thích, và chưa có phương tiện để khẳng định giả thiết này. Bệnh nhân cần được kiểm tra lại điện di hemoglobin bằng các kỹ thuật khác nhau để xác định sự có mặt của các huyết sắc tố bất thường nếu có. Bệnh nhân cần được khẳng định sự có mặt hoặc loại trừ sự hoạt động của gen ζ globin (HbZ), hoặc một loại Hb hiếm gặp nào khác, đã bù trừ cho sự vắng mặt hoạt động của gen α globin, là cơ sở của việc duy trì sự thích nghi với cuộc sống như hiện tại của bệnh nhân. Chúng tôi sẽ kết hợp với các trung tâm khác để khẳng định giả thiết này trong thời gian tới.

4.3. Về chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

4.3.1. Quy trình sàng lọc người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

Mục tiêu của chẩn đoán trước sinh là nhằm đạt được kết quả chính xác và nhanh nhất cho sản phụ mang thai ở tuần thai sớm nhất có thể. Các điều kiện cần bao gồm: a) Xác định kịp thời các cặp vợ chồng có nguy cơ sinh con mắc bệnh, b) xác định đột biến gây bệnh của các cặp vợ chồng này, c) Lấy được các chất liệu chẩn đoán từ thai nhi một cách an toàn và nhanh nhất, d) Xác định kiểu gen của thai bằng phân tích DNA thai dựa trên kiểu đột biến của bố và mẹ [87].

Dựa trên các nghiên cứu xây dựng chương trình sàng lọc và chẩn đoán trước sinh bệnh Thalassemia ở các quốc gia có tỷ lệ mắc cao như Trung Quốc [2], Thái Lan [26], Đài Loan [135], Malaysia [136] chúng tôi sử dụng chỉ số MCV, MCH và điện di hemoglobin bằng kỹ thuật HPLC theo quy trình của Joutovsky và cộng sự mô tả [137] để sàng lọc tình trạng người mang gen thalassemia cho các cặp vợ chồng có thai bị phù, hoặc có tiền sử sinh con mắc bệnh HbH. Nếu cặp vợ chồng cùng có MCV<80fL, MCH<27pg, HbA₂>3,5%, thì cặp vợ chồng được coi là có nguy cơ mang gen bệnh với bệnh β thalassemia, hoặc α -thalassemia kết hợp β thalassemia. Nếu MCV<80fL, MCH<27pg, HbA₂<3,5%, thì cặp vợ chồng được coi là có nguy cơ mang gen bệnh α thalassemia. Tại Việt Nam, nghiên cứu về tầm soát và chẩn đoán trước sinh bệnh α và β thalassemia của N.K.H.Hoan

đã kết luận, khi phối hợp cả 2 chỉ số $MCV < 80\text{fL}$ và $MCH < 27\text{pg}$, tỷ lệ phát hiện đột biến chung cho bệnh thalassemia là 88,1%, trong đó HbH là 87,5%, α -thalassemia 2 là 48%, α -thalassemia 2/HbE là 14,3% và làm giảm tỷ lệ dương tính giả từ 65% xuống còn 30,8% [81].

Trong nghiên cứu này, khi phối hợp cả 2 chỉ số $MCV < 80\text{fL}$ và $MCH < 27\text{pg}$, phát hiện 275/341 cặp vợ chồng có thai bị phù dương tính với cả 2 chỉ số này, chiếm 80,6%. Khi đối chiếu và chẩn đoán xác định bằng phân tích gen α globin, phát hiện 292/341 (85,6%) cặp vợ chồng có thai bị phù có đột biến gen α globin. Như vậy, sàng lọc người mang gen bệnh bằng cả hai chỉ số MCV và MCH cho phép phát hiện 275/292 (94,1%) người mang gen bệnh α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có thai bị phù. 17 cặp vợ chồng còn lại hoặc có $MCV > 80\text{fL}$ hoặc $MCH > 27\text{pg}$ nhưng vẫn mang đột biến gen α globin. Do vậy, với các trường hợp có MCV hoặc MCH không nằm trong giới hạn sàng lọc, nếu có thêm các yếu tố nguy cơ khác nghi ngờ liên quan đến bệnh thalassemia, cần phân tích gen α globin để tránh trường hợp bỏ sót.

Khi chúng tôi kết hợp điện di huyết sắc tố khi sàng lọc cùng với 2 chỉ số MCV và MCH, giúp loại trừ khả năng bỏ sót HbH và HbE. Chúng tôi sẽ bàn luận trong phần 4.3.2.2.

4.3.2. Ý nghĩa việc xác định người mang gen bệnh trên các cặp vợ chồng có thai bị phù

4.3.2.1. Kiểu gen của các cặp vợ chồng có có thai bị phù

292/341 (85,6%) cặp vợ chồng có thai bị phù trong nghiên cứu là do bệnh Hb Bart's gây nên. Các cặp vợ chồng này đều dương tính với test sàng lọc bằng công thức máu và điện di Hemoglobin, trong đó có $MCV < 80\text{fL}$, $MCH < 27\text{pg}$, HbA2 bình thường hoặc giảm nhẹ, đều là người dị hợp tử với đột biến ($--^{SEA}$), hay là người mang gen α^0 -thalassemia, có 25% nguy cơ sinh con số con mắc bệnh Hb Bart's ($--/--$), là thể nặng nhất của bệnh α -thalassemia, có phù thai, thai lưu hoặc tử vong ngay sau khi sinh. Đây là loại đột biến phổ biến nhất trong khu vực Đông Nam Á. Việt Nam nằm trong

khu vực mà tỷ lệ lưu hành loại đột biến này cao nhất thế giới. Tỷ lệ người mang gen bệnh ($--^{SEA}$) trong quần thể ở Hồng Kông chiếm khoảng 4,5%, ở Thái Lan chiếm khoảng 14%, ở Singapore là 27% [138], ở Quảng Đông Trung Quốc là 7,84% [2]. Ở các nước này, bệnh phù thai do Hb Bart's đã được đưa vào chương trình sàng lọc và tầm soát ở quy mô quốc gia và đã đạt được hiệu quả sau nhiều năm triển khai. Quảng Đông Trung Quốc trong vòng 6 năm, đã có 17,555 sản phụ được sàng lọc bệnh thalassemia thể nặng nói chung và bệnh phù thai do Hb Bart's nói riêng, đã phát hiện 1425 sản phụ và chồng (8,1%) là người mang gen bệnh ($--^{SEA}$) được đưa vào đối tượng chẩn đoán trước sinh cho bệnh Hb Bart's [2]. Ở Đông Nam Á, bệnh Hb Bart's là nguyên nhân chính gây phù thai ở 3 tháng cuối của thai kỳ, chiếm 60-90%, do đồng hợp tử đột biến mất đoạn 2 gen ($--^{SEA}$) có chiều dài 20,5 kb, mất đoạn cả gen $\alpha 1$ và gen $\alpha 2$ globin. Nghiên cứu của chúng tôi không phát hiện thấy loại đột biến mất đoạn 2 gen trên cùng 1 NST nào khác, ngay cả với những loại đột biến phổ biến như $--^{THAi}$, $--^{FIL}$, $--^{20.5k}$. Hiện nay, phù thai do Hb Bart's đang trở thành một vấn đề toàn cầu với ít nhất khoảng 26,000 sản phụ có nguy cơ sinh con mắc bệnh và khoảng 6000 thai mắc bệnh ở khu vực này mỗi năm. Sàng lọc và chẩn đoán trước sinh bệnh Hb Bart's ở những khu vực có tỷ lệ người mang gen cao, là chiến lược bảo vệ quan trọng với sức khỏe cộng đồng [2, 139].

4.3.2.2. Đặc điểm chung, đặc điểm sản khoa, và huyết học của cặp vợ chồng mang gen α^0 -thalassemia

- Đặc điểm dịch tễ

Xem xét theo từng địa phương thì Hà Nội là nơi có tỷ lệ người mang gen bệnh α^0 -thalassemia cao nhất, chiếm 18,8%. Tiếp theo là Thanh Hoá chiếm 7,9%, Bắc Giang là 7,2%, Hoà Bình 5,8%, còn lại rải rác ở các tỉnh thành khác. Khi xem xét theo vùng địa lý thì thấy trên tổng số, vùng trung du miền núi phía bắc có tỷ lệ người mang gen bệnh α -thalassemia cao nhất, chiếm 50,5%. Tiếp theo là vùng đồng bằng sông Hồng, chiếm 39%. Thấp nhất là

vùng Bắc Trung Bộ 10,4%. Đa số người mang gen α^0 thalassemia là người dân tộc Kinh, chiếm 68%. Điều này cũng phù hợp với phân bố địa lý ở trên. Tiếp theo là dân tộc Mường chiếm 10,6%, và dân tộc Tày chiếm 8,6%, dân tộc Thái chiếm 5,8%.

• *Đặc điểm về tuổi bố, mẹ và tuổi thai tại thời điểm sàng lọc*

Trong số 292 cặp vợ chồng là người mang gen α^0 thalassemia, tuổi mẹ trung bình là $28,17 \pm 5,33$, trong khoảng 17 đến 43 tuổi. Sàng lọc thalassemia trên 17,555 sản phụ ở Trung Quốc, phát hiện 1425 (8,1%) sản phụ cùng với chồng là người mang gen α^0 -thalassemia, với tuổi trung bình của người mẹ mang thai là $28,3 \pm 2,5$, trong khoảng 19 đến 40 tuổi.

Bảng 4.8. So sánh tuổi thai mắc Hb Bart's tại thời điểm chẩn đoán

Tuần thai	N.D.Ngọc		Can Liao [140]	
	Số người	Tỷ lệ (%)	Số người	Tỷ lệ
10 - < 15	2	0,8	189	32,9
15 - < 20	34	13,9	124	21,6
20 - < 25	86	35,2	96	16,7
25 - < 30	103	42,2	90	15,7
30 - < 35	18	7,4	74	12,9
> 35	1	0,4	0	0
Tổng số	244	100	573	100

Trên các thai nhi mắc Hb Bart's, thiếu máu xảy ra rất sớm, và có thể phát hiện các dấu hiệu ở tim, và rau thai của thai nhi bằng siêu âm từ ba tháng giữa của thai kỳ. Tùy vào kinh nghiệm, việc phát hiện các dấu hiệu này sẽ rất có hiệu quả đối với việc chẩn đoán sớm phù thai do Hb Bart's vào tuần thứ 12-13 của thai kỳ. Tại Quảng Đông, Trung Quốc, từ năm 2011, có 14,2% (203/1425) sản phụ đã lựa chọn được theo dõi liên tục bằng siêu âm hai tuần một lần như một hình thức để chẩn đoán, và càng ngày siêu âm càng trở thành một kỹ thuật có hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh phù thai do Hb Bart's vì giá thành ưu thế

hơn so với các thủ thuật khác, ít tính can thiệp, và cho phép phát hiện ở giai đoạn sớm của thai kỳ [2]. Tuy nhiên, trên thực tế, việc chẩn đoán bằng siêu âm để phát hiện các dấu hiệu của thiếu máu ở thai nhi ở tuần thai sớm dưới 15 tuần chỉ chiếm 0,8%, và thời điểm phát hiện phù thai phổ biến nhất là từ 25-<30 tuần chiếm 42,2%, tiếp theo là từ 20-<24 tuần chiếm 35,2%. Nghiên cứu phòng bệnh Hb Bart's trong 2 năm ở Trung Quốc trên 573 sản phụ nguy cơ cao với bệnh Hb Bart's, tỷ lệ phát hiện phù thai ở thời điểm thai dưới 15 tuần là 32,9%, tiếp theo là từ 15-<20 tuần chiếm 21,6%. Tỷ lệ này giảm dần khi tuần thai tăng dần [140] (Bảng 4.8). Như vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi, tình trạng phù thai được phát hiện khá muộn so với các công bố của các nghiên cứu khác. Có thể vì các sản phụ đến khám muộn, khám ở các cơ sở chưa có kinh nghiệm phát hiện các dấu hiệu thai thiếu máu kín đáo ở các tuần thai nhỏ.

Đặc điểm về tiền sử phù thai được mô tả ở các sản phụ đã từng có tiền sử phù thai ít nhất một lần. Số lần phù thai trung bình ở 133 sản phụ này là $1,47 \pm 0,69$ lần. Trong đó, 61,7% số sản phụ phù thai một lần, 31,6% sản phụ phù thai hai lần, 4,5% sản phụ phù thai 3 lần và 2,3% số sản phụ đã bị phù thai đến lần thứ tư.

• *Đặc điểm về tình trạng có thai và phù thai hiện tại của sản phụ*

Bảng 3.41 dựa trên tình trạng mang thai hiện tại và tiền sử phù thai chia 292 sản phụ thành 6 nhóm. Có 244/292 sản phụ (83,56%) là các sản phụ đang có thai bị phù. Trong nhóm 244 sản phụ này, phân nhóm tiếp theo tiền sử phù thai, nhóm sản phụ chưa từng bị phù thai chiếm tỷ lệ cao hơn là 59,8%, sản phụ đã từng bị phù thai ít nhất một lần chiếm 40,2%. Như vậy, ngay từ lần mang thai đầu tiên, phát hiện thai có dấu hiệu phù, các sản phụ này đã được phát hiện và tư vấn sàng lọc thalassemia.

Có 42/292 sản phụ (14,4%) có thai và chưa phù tại thời điểm nghiên cứu. Trong nhóm này, đa số các sản phụ trong nhóm này đã có tiền sử phù thai ít nhất một lần, chiếm 69,1%. Còn lại 30,9% sản phụ có thai chưa có dấu hiệu phù, cũng chưa từng có tiền sử phù, chỉ tình cờ phát hiện cả hai vợ chồng là

người mang gen α^0 -thalassemia bằng các xét nghiệm sàng lọc trong quá trình mang thai. Các cặp vợ chồng này được tư vấn và chẩn đoán trước sinh kịp thời.

Điều này đã chứng tỏ chương trình tầm soát thalassemia tại tuyến đầu tiếp cận là các Bệnh Viện Phụ Sản, đặc biệt tại khu vực Hà Nội, đang ngày càng trở nên hiệu quả. Các cặp vợ chồng nguy cơ cao sau lần phù thai đầu tiên đã được tư vấn để phòng tránh nguy cơ tiếp tục sinh em bé mắc bệnh. Các cặp vợ chồng chưa từng có tiền sử phù thai, thông qua chương trình sàng lọc Thalassemia trong quá trình ở ba tháng đầu của thai kỳ sẽ được phát hiện kịp thời tình trạng nguy cơ cao sinh con mắc bệnh thể nặng của mình để có các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát kịp thời.

- *Đặc điểm về huyết học*

Xem xét các chỉ số huyết học theo giới, chúng tôi nhận thấy ở người mang gen α^0 -thalassemia, giá trị trung bình của hầu hết các chỉ số đều giảm thấp hơn so với chỉ số của người bình thường ở cùng giới tương ứng, đặc biệt là HGB, HCT, MCV, MCH. Mức giảm thấp này khác nhau tùy từng chỉ số. Một số chỉ số khác giảm nhẹ hoặc vẫn nằm trong giới hạn bình thường như RBC, MCHC, HbA1, HbA2. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ ở hầu hết các biến số. Khi chúng tôi so sánh các chỉ số này với các chỉ số tương tự trong nghiên cứu của N.K.H.Hoan tiến hành trên quần thể các cặp vợ chồng mang thai là người mang gen α^0 -thalassemia ở khu vực Miền Nam, chúng tôi nhận thấy có sự phù hợp tương tự về mức giảm của các chỉ số này (Bảng 4.9).

Mặc dù vậy, ở các chỉ số này, khi xem xét các trường hợp cụ thể, RBC ở cả 2 giới đều có những trường hợp giảm đến $3,38-3,55 \times 10^{12}/L$, hoặc HGB giảm mức thấp nhất trong khoảng từ 6,6-7,4g/dL, hoặc HCT giảm mức thấp nhất trong khoảng từ 13,2-18,1%. Những trường hợp này thường có thể do không chỉ đơn thuần là người mang gen α^0 -thalassemia, mà còn kết hợp thêm các bệnh lý khác làm gia tăng tình trạng thiếu máu. Ngoài ra, các chỉ số ở giới

nữ luôn có xu hướng giảm thấp hơn ở giới nam, do yếu tố mang thai có thể làm gia tăng tình trạng thiếu máu của thai phụ. Kết quả này phù hợp công bố của N.K.H. Hoan năm 2013 [81].

Ngưỡng $MCV < 80\text{fL}$, $MCH < 27\text{pg}$ được hiệp hội thalassemia thế giới khuyến cáo trong sàng lọc người mang gen bệnh thalassemia [1]. Trong nghiên cứu này, người mang gen bệnh α^0 -thalassemia ở cả 2 giới có MCV và MCH đều ở mức thấp dưới ngưỡng sàng lọc, MCV ở nam là $66,59 \pm 5,28\text{fL}$, nữ là $67,85 \pm 4,68\text{fL}$, MCH ở nam là $21,27 \pm 1,6\text{pg}$, ở nữ là $21,22 \pm 1,67\text{pg}$. Kết quả phù hợp công bố của N.K.H. Hoan năm 2013 [81], Can Liao năm 2014 [140], He năm 2014 [2].

MCV từ 65 - 79,9fl là nhóm có tỷ lệ gặp cao nhất, cả giới nam (62,7%) và giới nữ (72,6%). Nhóm $MCV < 65\text{fl}$ là nhóm có tỷ lệ gặp thứ hai, ở nam (35,3%) và nữ (25,7%). Như vậy, người mang gen α^0 -thalassemia hầu hết có chỉ số $MCV < 80\text{fl}$. Trong nghiên cứu, nhóm $MCV > 80\text{fl}$ chỉ gặp 2,1% ở nam, và 1,7% ở nữ mang gen α^0 -thalassemia.

MCH từ 15 - 26,9pg là khoảng có tỷ lệ gặp cao nhất ở người mang gen α^0 -thalassemia, cả giới nam và nữ (98,6%). Nhóm MCH rất thấp $< 15\text{pg}$ ở nam (13,4%) và nữ (17,1%). Như vậy, người mang gen α^0 -thalassemia hầu hết có chỉ số $MCH < 27\text{pg}$. Trong nghiên cứu, nhóm $MCH > 27\text{pg}$ chỉ gặp 1% ở nam và 1% ở nữ mang gen α^0 -thalassemia.

Có 275 cặp vợ chồng có “ $MCV < 80\text{fL}$ và $MCH < 27\text{pg}$ ” trên tổng số 292 cặp vợ chồng có thai bị phù là người mang gen α^0 -thalassemia. Có 17 cặp vợ chồng là người mang gen α^0 -thalassemia, nhưng có vợ hoặc chồng có $MCV > 80\text{fL}$, hoặc có $MCH > 27\text{pg}$. Như vậy, tỷ lệ phát hiện người mang gen α^0 thalassemia của các cặp vợ chồng có thai bị phù qua sàng lọc “ $MCV < 80\text{fL}$ và $MCH < 27\text{pg}$ ” trong nghiên cứu này là 275/292 (94,1%).

Theo nghiên cứu của N.K.H.Hoan, tỷ lệ phát hiện người mang gen α^0 -thalassemia của $MCV < 80\text{fL}$ là 99,4%, của $MCH < 27\text{pg}$ là 80,6%. Tác giả không đề cập tỷ lệ phát hiện đột biến α^0 -thalassemia khi phối hợp cả hai chỉ số này, mà công bố tỷ lệ phát hiện đột biến thalassemia nói chung, với “ $MCV < 80\text{fL}$ hoặc $MCH < 27\text{pg}$ ” là 96,4% nhưng đồng thời làm tăng tỷ lệ dương tính giả, với “ $MCV < 80\text{fL}$ và $MCH < 27\text{pg}$ ” là 88,1% lại làm giảm đáng kể tỷ lệ dương tính giả, nhưng lại bỏ sót HbE và HbH [81].

Nghiên cứu của chúng tôi kết hợp sàng lọc bằng chỉ số MCV, MCH và phân tích thành phần hemoglobin, phát hiện 95,2% người có HbA2 giảm hoặc bình thường, 2,9 % là người có HbH, 3,7% người có α^0/β^E , 4,8% người có α^0/β , với HbA1 trung bình là $96,66 \pm 4,27\%$, HbA2 trung bình là $2,13 \pm 0,89\%$, dao động trong khoảng 0%-6,3%. Nhìn chung, người mang gen α^0 -thalassemia không làm thay đổi tỷ lệ các loại Hb bình thường. Theo Galanello, HbA2 trung bình của α^0 -thalassemia 2,3-2,5% [141]. Như vậy, không thể dựa vào tỉ lệ HbA1, HbA2 để sàng lọc người mang gen α -thalassemia.

Ở nhóm có $HbA2 > 0$, người có HbA2 giảm $< 2,1\%$ chiếm 63%, HbA2 bình thường từ 2,2-3,5% chiếm 29,9%, HbA2 tăng $> 3,5\%$ chiếm 4,8%. Như vậy, người mang gen α^0 -thalassemia có HbA2 bình thường hoặc giảm nhẹ, HbA2 chỉ tăng ($> 3,5\%$) khi có kết hợp mang gen β thalassemia (α^0/β). Tỷ lệ kết hợp α/β thalassemia trong nghiên cứu của N.K.H. Hoan là 1,4% [81]. Ngoài kết hợp gen β thalassemia, chúng tôi phát hiện có 22/584 người (3,7%) mang gen α^0 -thalassemia kết hợp HbE α^0/β^E . Những người mang gen kết hợp này ngoài sự thay đổi về thành phần huyết sắc tố, các biểu hiện về các chỉ số huyết học khác tương tự với người mang gen α^0 -thalassemia. Nếu không dựa trên điện di hemoglobin để phát hiện HbE, các trường hợp α^0/β^E này có thể bị bỏ sót.

HbA₂>3,5% hoặc sự xuất hiện của HbE là một chỉ số đặc hiệu gợi ý cho người mang gen β hoặc β^E , nhưng không có chỉ số nào đặc hiệu cho người mang gen α -thalassemia, ngay cả khi có sự kết hợp giữa (α^0/β) hoặc α^0/β^E . Vì thế, α -thalassemia có thể bị bỏ sót trong quá trình sàng lọc và chẩn đoán. Năm 2006, Li kết luận α -thalassemia có thể bị che giấu và bỏ sót khi kết hợp với β thalassemeia [142]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, vì đối tượng nghiên cứu khu trú trên các cặp vợ chồng có thai bị phù, đây là một trong các tiêu chuẩn nghi ngờ mang gen α^0 -thalassemia, nên khi gặp HbA₂>3,5% hoặc HbE, chúng tôi đều có chỉ định phân tích gen α globin để loại trừ sự kết hợp này. Tuy nhiên, trên thực tế khi sàng lọc trên quy mô lớn cho bệnh Thalassemia nói chung, thì việc phân tích gen α globin cho tất cả các trường hợp có HbA₂>3,5 lại là không hợp lý. Hơn nữa, tỷ lệ kết hợp này khá thấp, trong nghiên cứu của chúng tôi là 4,8% với α^0/β , và 3,7% với α^0/β^E . Trong nghiên cứu của N.K.H. Hoan, tỷ lệ kết hợp có đột biến α và β thalassemeia là 11,6%, nghiên cứu cũng khuyến cáo, khi HbE<18,4% thì nghi ngờ có kết hợp mang gen α -thalassemia [81]. Do đó, chỉ nên phân tích gen α khi có nghi ngờ, hoặc cặp vợ chồng có một trong hai người đã là người mang gen α -thalassemia.

Khi cả bố và mẹ đều là người mang gen của cả 2 bệnh α và β thalassemeia hoặc β^E , sẽ có 25% nguy cơ sinh con mắc Hb Bart's, vừa có 25% nguy cơ sinh con mắc β thalassemeia thể nặng, cần được tư vấn làm chẩn đoán trước sinh cho cả 2 bệnh. Trong nghiên cứu này, có 3 cặp vợ chồng cùng mang gen cả 2 bệnh α và β /HbE thalassemeia, trong đó có 1 cặp vợ chồng mang thai được chẩn đoán trước sinh cho cả 2 nguy cơ mắc bệnh Hb Bart's và β /HbE thalassemeia.

Ngoài ra, chúng tôi cũng phát hiện 17/584 (2,9%) người mắc HbH qua điện di hemoglobin. Người HbH khi kết hôn với 1 người mang gen α^0 -thalassemia, có 25% nguy cơ sinh con mắc HbH, vừa có 25% nguy cơ sinh

con mắc Hb Bart's. Do đó, cặp vợ chồng này cần được tư vấn làm chẩn đoán trước sinh cho cả 2 bệnh. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 2 trường hợp có vợ hoặc chồng là người mắc HbH tham gia chẩn đoán trước sinh.

4.3.3. Về xác định người mang gen α -thalassemia trên các cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc bệnh HbH, có thai lần tiếp theo

Các bệnh nhân HbH trong mục tiêu 1 có bố và mẹ là người mang gen bệnh α -thalassemia, trong đó có một người mang gen α^0 -thalassemia và người còn lại mang gen α^+ -thalassemia. Khi có thai lần tiếp theo, các cặp vợ chồng có nguyện vọng chẩn đoán trước sinh, được tư vấn di truyền về các nguy cơ sinh con bệnh và các nguy cơ liên quan đến thủ thuật chẩn đoán, các cặp vợ chồng được tiến hành xét nghiệm công thức máu và điện di huyết sắc tố. Trong số 97 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc HbH, có 56 cặp vợ chồng có thai lần tiếp theo, có nguyện vọng chẩn đoán trước sinh, chiếm 57,7%.

4.3.3.1. Đột biến gen của các cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc HbH

Khác với bệnh phù thai do Hb Bart's chỉ có một loại đột biến duy nhất là loại đột biến α^0 -thalassemia dạng ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), thì kiểu gen của các cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc HbH rất phong phú: đột biến α^0 -thalassemia bao gồm mất đoạn 2 gen trên cùng một NST hoặc trên hai NST, đột biến α^+ -thalassemia bao gồm dạng mất đoạn và không mất đoạn, thường gặp và hiếm gặp.

- ***Đột biến α^0 -thalassemia***

Tất cả các bệnh nhân HbH đều có đột biến α^0 -thalassemia dạng ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), do đó ở bố và mẹ của các bệnh nhân HbH, có một trong hai người mang gen của đột biến này, chiếm tỷ lệ cao nhất là 50%. Đột biến α^0 -thalassemia ngoài dạng mất đoạn hai gen trên cùng một NST, còn có thể có loại mất đoạn hai gen trên hai NST khác nhau. Trong nghiên cứu, chúng tôi gặp duy nhất một trường hợp người bố có kiểu gen ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{HbCs}$). Vì người mẹ có kiểu gen ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), nên cặp vợ chồng này có 25% nguy cơ sinh con mắc HbH thể

($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$) và 25% mắc HbH thể ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). Như vậy, cặp vợ chồng này sẽ có 50% sinh con mắc HbH. Tuy nhiên, nếu người mang gen dạng này kết hôn với người α^+ -thalassemia, thì không có nguy cơ sinh con mắc HbH, do đó không cần thiết làm chẩn đoán trước sinh.

Mặc dù cùng là mất đoạn 2 gen, cùng có một kiểu hình huyết học, nhưng bản chất của đột biến thì khác nhau, dẫn đến các nguy cơ khác nhau về việc sinh con mắc bệnh. Việc xác định được bản chất của đột biến bằng kỹ thuật sinh học phân tử đóng vai trò quan trọng trong tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh.

- *Đột biến α^+ -thalassemia*

Đột biến ($-\alpha^{HbCs}/\alpha\alpha$) gặp tỷ lệ cao nhất 31,2%. Điều này có thể giải thích do kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$) gây ra các biểu hiện lâm sàng nặng hơn, mức độ phải truyền máu cao hơn những kiểu gen khác, do đó bệnh nhân HbH có ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$) thường đến khám và điều trị tại Bệnh Viện với tỷ lệ cao nhất. Vì vậy, trong tổng số 54 gia đình có tiền sử sinh con HbH với kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$), có 35 (64,8%) gia đình có nguyện vọng làm chẩn đoán trước sinh ở các lần sinh tiếp theo. Đột biến là ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), gặp với tỷ lệ 4,5%. Bệnh nhân HbH với kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$) có biểu hiện lâm sàng nhẹ nhất trong các kiểu gen thường gặp, và thường không phải truyền máu. Có 5/21 (23,8%) gia đình có con HbH ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$) có nguyện vọng làm chẩn đoán trước sinh. Đột biến ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) gặp với tỷ lệ 4,5%. Có 5/9 (55,5%) cặp vợ chồng có tiền sử sinh con HbH ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) có nguyện vọng làm chẩn đoán trước sinh, cao hơn so với kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). Đột biến ($-\alpha^{c.2delT}/\alpha\alpha$) gặp với tỷ lệ 4,5%. Tất cả cặp vợ chồng (5/5) có tiền sử sinh con HbH có đột biến này đều làm chẩn đoán trước sinh. Đột biến ($-\alpha^{HbQs}/\alpha\alpha$), gặp với tỷ lệ 2,67%. Trong nghiên cứu có 4 trường hợp HbH có đột biến này, có 3/4 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con HbH có đột biến này làm chẩn đoán trước sinh, chiếm 75%. Còn lại 2 loại đột biến hiếm gặp, ($-\alpha1/\alpha\alpha$) và ($-\alpha^{c.92 G>A}/\alpha\alpha$). Mỗi đột biến chỉ gặp ở một trường hợp trong

ngiên cứu. Các cặp vợ chồng có tiền sử sinh con HbH mang đột biến này đều làm chẩn đoán trước sinh ở các lần sinh sau.

4.3.4. Về chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

123 thai có nguy cơ mắc bệnh phù thai do Hb Bart's được chẩn đoán trước sinh, phát hiện 47/123 (38,2%) thai bình thường ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), 32/123 (26,0%) thai dị hợp tử ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), và 44/123 (35,7%) thai mắc bệnh Hb Bart's ($--^{SEA}/--^{SEA}$). 56 thai có nguy cơ mắc bệnh HbH được chẩn đoán trước sinh, phát hiện 11/56 (19,6%) thai bình thường, 36/56 (64,2%) thai dị hợp tử, 9/56 (23,2%) thai mắc bệnh.

Tính tổng số trên 179 thai được chẩn đoán trước sinh trong 4 năm trong nghiên cứu của chúng tôi, 58/179 (32,4%) số thai bình thường, 68/179 (38%) thai dị hợp tử, 53/179 (29,6%) thai mắc bệnh là. Kết quả này tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Đài Loan thống kê trong 6 năm trên 102 thai được chẩn đoán trước sinh bệnh α thalassemia, phát hiện 29,5% thai bình thường, 47,05% thai dị hợp tử và 23,5% thai mắc bệnh [135]. Tỷ lệ này trong nghiên cứu ở Miền Bắc Thái Lan thống kê trong vòng 16 năm chẩn đoán trước sinh cho 846 thai có nguy cơ mắc Thalassemia thể nặng, trong đó thai có nguy cơ với bệnh Hb Bart's là 341/646 (40,3%). Kết quả phát hiện có 27% thai bình thường, 47,5% thai dị hợp tử, 25,5% thai mắc Hb Bart's. Nghiên cứu không công bố về chẩn đoán trước sinh thai có nguy cơ mắc HbH [26].

Sau khi có kết quả chẩn đoán trước sinh, đối với các thai được chẩn đoán mắc bệnh Hb Bart's, gia đình được tư vấn về diễn biến của bệnh đối với thai và nguy cơ có thể xảy ra các biến chứng về sản khoa đối với người mẹ. Theo các nghiên cứu quốc tế, hầu hết các trường hợp thai được chẩn đoán xác định mắc Hb Bart's đều có chỉ định đình chỉ thai nghén nếu gia đình có nguyện vọng. Chỉ có một số rất ít trường hợp khi thai được truyền máu từ trong tử cung ở giai đoạn rất sớm ngay sau khi được chẩn đoán mắc Hb Bart's đồng hợp tử α^0 , thì có cơ hội được sinh mà không bị phù thai. Tuy nhiên sau khi sinh, các trẻ này tuy

không có biểu hiện bất thường về thần kinh hay dị tật bẩm sinh, nhưng hầu hết có nguy cơ cao mắc các khiếm khuyết về hệ thống thận sinh dục và dị tật chi [35, 143, 144], và có thể điều trị bằng ghép tế bào gốc tạo máu [145, 146]. Tuy nhiên, các biến chứng về sản khoa cho người mẹ, việc phải phụ thuộc truyền máu lâu dài cho em bé mắc bệnh, và khó khăn trong điều trị ghép tế bào gốc, là những yếu tố cần xem xét trong tư vấn di truyền chẩn đoán trước sinh cho các cặp vợ chồng có nguy cơ sinh con mắc bệnh Hb Bart's [27, 35, 147].

Đối với bệnh HbH, việc tư vấn di truyền sau khi có kết quả chẩn đoán trước sinh cũng cần được cân nhắc, do có sự khác nhau về kiểu hình với các kiểu gen tương ứng. Phát hiện 7/9 thai mắc bệnh HbH với kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$), mỗi kiểu gen ($--^{SEA}/-\alpha^1$) và ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) có 1 thai mắc bệnh.

4.3.5. Đối chiếu kết quả chẩn đoán trước sinh

Đối chiếu kết quả chẩn đoán trước sinh là một bước cần thiết, giúp cho việc theo dõi, đánh giá, và kịp thời đưa ra những biện pháp nâng cao chất lượng, hướng tới việc có thể đưa ra một kết quả chính xác nhất và nhanh chóng nhất. Tuy nhiên, trên thực tế, đây là một bước rất khó để thực hiện một cách toàn diện với mọi đối tượng tham gia chẩn đoán trước sinh, vì nhiều yếu tố khác nhau.

Do đó, cần tư vấn về kết quả chẩn đoán, tạo các điều kiện thuận lợi về thủ tục và kinh phí, để sau khi thai nhi được chẩn đoán là thai mang gen bệnh hoặc bình thường, quay trở lại làm các xét nghiệm đối chiếu sau khi em bé ra đời. Thực tế, đối với bệnh Hb Bart's, chỉ có 6,3% thai bình thường và 21,8% thai dị hợp tử quay lại làm xét nghiệm đối chiếu. Đối với bệnh HbH, con số này lần lượt là 18,1% và 13,8%. Tất cả kết quả chẩn đoán sau sinh có đối chiếu đều phù hợp với kết quả chẩn đoán trước sinh.

Đối với các thai mắc bệnh, việc thực hiện các xét nghiệm đối chiếu khi các gia đình có quyết định đình chỉ thai là một việc còn khó khăn hơn, vì cần phải thu thập máu cuống rốn của thai trong quá trình đình chỉ thai. Quá trình

này cần có sự hỗ trợ và đồng thuận của gia đình bệnh nhân, nhân viên y tế tại các cơ sở sản khoa, đặc biệt ở các bệnh viện tuyến dưới trong việc giải thích mục đích của việc lấy máu cuống rốn và vận chuyển mẫu bệnh phẩm sau khi thu thập được đến Bệnh Viện Nhi TƯ. Chúng tôi chỉ thu thập được 3 mẫu máu cuống rốn của thai trong quá trình đình chỉ thai trên 44 thai mắc Hb Bart's. Các mẫu máu này đã được chúng tôi tiến hành làm các xét nghiệm đối chiếu như công thức máu, điện di huyết sắc tố, phát hiện 100% thành phần hemoglobin là Hb Bart's, và khẳng định lại bằng xét nghiệm di truyền, phát hiện đột biến đồng hợp ($--^{SEA}/--^{SEA}$). Cả 3 mẫu máu cuống rốn này đều có kết quả phù hợp với kết quả chẩn đoán trước sinh.

KẾT LUẬN

Căn cứ trên 3 mục tiêu của nghiên cứu, bằng việc áp dụng kỹ thuật PCR, MLPA và giải trình tự gen Sanger để phát hiện đột biến gen α globin, phân tích đặc điểm lâm sàng, huyết học và kiểu gen của bệnh nhân HbH, sàng lọc, chẩn đoán xác định người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh α thalassemia, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Phát hiện đột biến gen α globin của người mắc α -thalassemia

Trong số 299 bệnh nhân nghi ngờ mắc thalassemia trên lâm sàng, tỷ lệ phát hiện có đột biến gen α globin là 61,5%. Tỷ lệ phát hiện bệnh HbH dựa vào phân tích gen α globin là 97/299 (32,4%). Tỷ lệ phát hiện người mang gen bệnh α -thalassemia là 87/299 (29,1%), trong đó 91% là người mang gen loại mất đoạn 2 gen --^{SEA}, 9,1% là người mang gen loại mất đoạn 1 gen - α ^{3.7}.

Đã phát hiện 5 loại đột biến thường gặp, trong đó có 3 loại đột biến mất đoạn bao gồm: --^{SEA} (50%), - α ^{3.7} (10,8%), - α ^{4.2} (4,6%), và có 2 loại đột biến điểm bao gồm - α ^{HbCs} (27,8%), - α ^{HbQs} (2,1%).

Phát hiện 5 loại đột biến hiếm gặp trên bệnh nhân HbH của Việt Nam: - α 1 (0,5%), - α ^{c.2delT} (3,1%), - α ^{c.92 G>A} (0,5%), - α ^{c.426 A>T} (0,5%) tạo Hb Pakse, - α ^{c.81G>T} (0,5%) tạo Hb Hekinan.

Xác định 8 kiểu gen của bệnh HbH: --^{SEA}/ α ^{HbCs} (54,6%); --^{SEA}/ α ^{3.7} (21,6%); --^{SEA}/ α ^{4.2} (9,2%); --^{SEA}/ α ^{c.2delT} (6,1%); --^{SEA}/ α ^{HbQs} (4,1%); --^{SEA}/ α 1 (1%); --^{SEA}/ α ^{c.92 G>A} (1%); --^{SEA}/ α ^{c.426 A>T} (1%), --^{SEA}/ α ^{c.81G>T} α (1%).

Lần đầu tiên phát hiện một trường hợp bệnh nhân mắc bệnh Hb Bart's kiểu gen (--^{SEA}/ α ^{SEA}), hiện 4 tuổi, phụ thuộc truyền máu.

2. Mối liên hệ giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh HbH

Bệnh HbH có mối liên quan chặt chẽ giữa kiểu gen và kiểu hình. Dựa trên kiểu gen, 97 bệnh HbH được chia thành 2 thể: 31,9% là thể mất đoạn gen ($--/-\alpha$), 68,1% là thể không mất đoạn gen ($--/-\alpha^T$).

HbH thể không mất đoạn gen có biểu hiện lâm sàng nặng hơn thể mất đoạn gen ($--/-\alpha^T$) > ($--/-\alpha$) ($p < 0,05$).

Mức độ biểu hiện lâm sàng của các kiểu gen theo thứ tự giảm dần với ($p < 0,05$): ($--\alpha^{SEA}/-\alpha^{HbCs}$) > ($--\alpha^{SEA}/-\alpha^{c.2delT}$) > ($--\alpha^{SEA}/-\alpha^{HbQs}$) > ($--\alpha^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) > ($--\alpha^{SEA}/-\alpha^{3.7}$).

3. Chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia

Sàng lọc người mang gen α -thalassemia cho 341 cặp vợ chồng có thai bị phù bằng $MCV < 80fL$ và $MCH < 27pg$: phát hiện 275/341 (80,6%) cặp vợ chồng dương tính với xét nghiệm sàng lọc.

Phân tích gen α globin cho 341 cặp vợ chồng có thai bị phù: phát hiện 292/341 (85,6%) cặp vợ chồng cùng là người mang gen α^0 thalassemia dạng ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), có nguy cơ cao sinh con mắc Hb Bart's.

Chẩn đoán xác định người mang gen bệnh α -thalassemia cho 56 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc HbH, với các kiểu gen: $--^{SEA}/\alpha\alpha$ (50%), $-\alpha^{HbCs}/\alpha\alpha$ (31,2%); $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (4,5%); $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ (4,5%); $-\alpha^{c.2delT}/\alpha\alpha$ (4,5%); $-\alpha^{HbQs}/\alpha\alpha$ (2,67%); $-\alpha^{c.92G>A}/\alpha\alpha$ (1,7%), $-\alpha1/\alpha\alpha$ (1,7%).

Có 179 sản phụ đã được chẩn đoán trước sinh, trong đó có 123 sản phụ nguy cơ cao với bệnh Hb Bart's và 56 sản phụ nguy cơ cao với bệnh HbH. Kết quả chẩn đoán trước sinh phát hiện 58 (32,4%) thai bình thường, 68 (38%) thai dị hợp tử và 53 (29,6%) thai mắc bệnh. Trong 53 thai mắc bệnh, phát hiện 44 thai mắc bệnh Hb Bart's và 9 thai mắc bệnh HbH.

Các trường hợp có đối chiếu kết quả giữa chẩn đoán trước sinh với chẩn đoán sau sinh, hoặc với thai có chỉ định đình chỉ bằng máu cuống rốn, đều cho kết quả phù hợp.

KIẾN NGHỊ

1. Cần phân tích gen α globin bằng kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán xác định bệnh HbH và Hb Bart's, xác định thể bệnh HbH thể mất đoạn hoặc thể không mất đoạn và các dạng người mang gen bệnh α^0 hoặc α^+ -thalassemia.
2. Cần có những nghiên cứu tiếp theo để theo dõi và đánh giá về mối tương quan giữa kiểu hình và các kiểu gen của bệnh HbH với cỡ mẫu lớn hơn, trong thời gian dài hơn, để đưa ra tiên lượng dựa trên thể bệnh, theo dõi điều trị bệnh, và là cơ sở tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh.
3. Cần được chẩn đoán xác định người mang gen bằng phân tích gen α globin, tiến đến tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh, đặc biệt cho những trường hợp có nguy cơ sinh con mắc α -thalassemia thể nặng.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Diem Ngoc Ngo, Thi Thanh Ha Ly, Thi Tuyet Nhung Ngo, Thi Phuong Mai Nguyen, Thi Hong Ha Tran, Ba Truc Duong, Danh Cuong Tran, Thi Thanh Thuy Le, Thanh Hai Le, Thi Thanh Huong Tran (2015). Carrier screening and prenatal diagnosis for α - and β -thalassemia in pregnancies at risk in National Hospital of Pediatrics, Vietnam, *Ann Transl Med* 2015; 3(S2):AB123.
2. Ngô Diễm Ngọc, Lý Thị Thanh Hà, Ngô Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Thị Phương Mai, Dương Bá Trực, Trần Hồng Hà, An Thuỳ Lan, Trần Danh Cường, Lê Thị Thanh Thuý, Trần Thị Thanh Hương, Lê Thanh Hải (2015). Sàng lọc và chẩn đoán trước sinh bệnh Alpha và Beta Thalassemia trên các thai phụ nguy cơ cao tại Bệnh viện Nhi Trung Ương, *Tạp chí Y học Việt Nam*, tháng 9 tập 434 số đặc biệt (2015) 83-92.
3. Ngô Diễm Ngọc, Lý Thị Thanh Hà, Ngô Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Thị Phương Mai, Dương Bá Trực, Trần Hồng Hà, An Thuỳ Lan, Trần Danh Cường, Lê Thị Thanh Thuý, Trần Thị Thanh Hương, Lê Thanh Hải (2015). Chẩn đoán trước sinh bệnh HbH và phù thai do Hb Bart' s tại Bệnh viện Nhi Trung Ương. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tháng 9 tập 434 số đặc biệt (2015) 115-120.
4. Ngô Diễm Ngọc, Lý Thị Thanh Hà, Ngô Thị Tuyết Nhung, Trần Danh Cường, Trần Thị Thanh Hương (2014). Chẩn đoán trước sinh bệnh α Thalassemia. *Tạp Chí Nghiên Cứu Y Học*, 89 (4), 8-14.
5. Ngô Diễm Ngọc, Lý Thị Thanh Hà, Dương Bá Trực, Bùi Văn Viên, Trần Thị Thanh Hương (2013). Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong phát hiện đột biến gen α globin của bệnh α thalassemia. *Tạp Chí Nghiên Cứu Y Học*, 81 (1), 14-18.

6. Ngô Diễm Ngọc, Lý Thị Thanh Hà, Ngô Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Thị Phương Mai, Trần Danh Cường, Nguyễn Thị Tân Sinh, Trần Hồng Hà, Dương Bá Trực, Trần Thị Thanh Hương, Nguyễn Thanh Liêm (2013). Phòng bệnh phù thai do Hemoglobin Bart's: Sàng lọc người mẹ mang thai, phát hiện người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh. *Tạp Chí Phụ Sản*, 11(02), 23-26.
7. Ngô Diễm Ngọc, Lý Thị Thanh Hà, Ngô Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Thị Phương Mai, Trần Danh Cường, Nguyễn Thị Tân Sinh, Trần Hồng Hà, Dương Bá Trực, Trần Thị Thanh Hương, Nguyễn Thanh Liêm (2012). Hội chứng phù thai do Hemoglobin Bart's: Sàng lọc người mang gen và chẩn đoán trước sinh. *Tạp Chí Y Học Việt Nam*, 397(9), 159-165.
8. Dương Bá Trực, Ngô Diễm Ngọc, Trần Thị Hồng Hà (2012). Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh HbH do đột biến --^{SEA}/- α ^{HbCs} trên gen α globin. *Tạp Chí Y Học Việt Nam*, 397(9), 159-165.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. John O., Joanne T.S., Renzo G., et al. (2013). Prevention of Thalassemia and other Hemoglobin Disorders. *Thalassemia international federation publications*
2. He S., Zhang Q., Li D., et al. (2014). Prevention and control of Hb Bart's disease in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 178(7)-138-41
3. Chan V., Chan T.K., Tang M., et al. (1995). Prenatal diagnosis and screening of common genetic diseases in Hong Kong. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 26(1)-1-2
4. Boonsa S., Sanchaisuriya K., Fucharoen G., et al. (2004). The diverse molecular basis and hematological features of Hb H and AEBart's diseases in Northeast Thailand. *Acta Haematol*, 111(3)-149-54
5. Fucharoen S. and Winichagoon P. (2011). Haemoglobinopathies in southeast Asia. *Indian J Med Res*, 134(6)-498-506
6. Trí Nguyễn Anh (2012). Viet Nam - Current Situation in Control Strategies and Health Systems in Asia. *Health and Medicine*,
7. Fucharoen S. and Winichagoon P. (1992). Thalassemia in SouthEast Asia: problems and strategy for prevention and control. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 23(4)-647-55
8. Trục Dương Bá (1996). Đặc điểm lâm sàng và huyết học bệnh HbH ở trẻ em Việt Nam. Bước đầu tìm hiểu tần suất bệnh alpha thalassemi ở Hà Nội. *Luận án phó tiến sĩ khoa học Y Dược*,
9. Hoan Nguyễn Khắc Hân (2008). Chẩn đoán di truyền phân tử bệnh beta thalassemi tại bệnh viện Từ Dũ. *Tạp chí Y Học TP Hồ Chí Minh.*, 12(1)-5-10
10. Ngô Diễm Ngọc, Lý Thị Thanh Hà, Dương Bá Trục, et al. (2013). Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong phát hiện đột biến gen alpha globin của bệnh alpha thalassemi. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 34(14-18

11. Schechter A.N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112(10)-3927-38
12. Edsall J.T. (1986). Understanding blood and hemoglobin: an example of international relations in science. *Perspect Biol Med*, 29(3)-107-23
13. Cornelis L.H. and Douglas R.H. (2010). Alpha Thalassemia. *Orphanet journal of rare diseases*, 1(4)-5-13
14. David J.W. (2010). Haemoglobin and the Inherited Disorders of Globin Synthesis. *Postgraduate Haematology, Sixth edition*, 6(85-102
15. Higgs D.R., Vickers M.A., Wilkie A.O., et al. (2010). A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood*, 73(5)-1081-1104
16. Ahmad R., Saleem M., Aloysious N. S., et al. (2013). Distribution of alpha thalassaemia gene variants in diverse ethnic populations in malaysia: data from the institute for medical research. *Int J Mol Sci*, 14(9)-18599-614
17. Vichinsky E.P. (2005). Changing patterns of thalassemia worldwide. *Ann N Y Acad Sci*, 1054(1)-18-24
18. Shaw J.P., Marks J., Mohandas T., et al. (1987). The adult alpha globin gene loci from monkeys to man: the theta globin subfamily and the alpha globin duplication units in Old World monkeys. *Prog Clin Biol Res*, 251(2)-65-79
19. Higgs D.R. and Wood W.G. (2008). Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, 15(3)-176-83
20. Higgs D.R. (2013). The molecular basis of alpha-thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(1)-a011718
21. Hoan Nguyễn Khắc Hân (2005). Thalassaemia and a model of prevention in Vietnam. A thesis of master of medicine. *The University of Sydney. Sydney*,, 45-47
22. George P., Patrinos H. and Stylianos E.A. (2010). Human Hemoglobin *Vogel and Motulsky's Human genetics*, 365-401

23. Weatherall D.J. (1964). Relationship of hemoglobin Bart's and H to alpha thalassemia *Ann N Y Acad Sci*, 119(1)-463-73
24. Kutlar F., Reese A.L., Hsia Y.E., et al. (1989). The types of hemoglobins and globin chains in hydrops fetalis. *Hemoglobin*, 13(1)-671-683
25. Lie-Injo L.E., Solai A., Herrera A.R., et al. (1982). Hb Bart's level in cord blood and deletions of alpha-globin genes. *Blood*, 59(2)-370-6
26. Yamsri S., Sanchaisuriya K., Fucharoen G., et al. (2010). Prevention of severe thalassemia in northeast Thailand: 16 years of experience at a single university center. *Prenat Diagn*, 30(6)-540-6
27. Higgs D.R. (1993). alpha-Thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol*, 6(1)-117-50
28. Antonarakis S. E., Kazazian H. H.Jr and Orkin S. H. (1985). DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet*, 69(1)-1-14
29. Higgs D.R., Pressley L., Aldridge B., et al. (1981). Genetic and molecular diversity in nondeletion Hb H disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(9)-5833-7
30. Orkin S.H., Goff S.C. and Hechtman R.L. (1981). Mutation in an intervening sequence splice junction in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(8)-5041-5
31. Morle F., Starck J. and Godet J. (1986). Alpha-thalassemia due to the deletion of nucleotides -2 and -3 preceding the AUG initiation codon affects translation efficiency both in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*, 14(8)-3279-92
32. Steinberg M.H. and Embury S.H. (1986). Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood*, 68(5)-985-90
33. Milner P.F., Clegg J.B. and Weatherall D.J. (1971). Haemoglobin-H disease due to a unique haemoglobin variant with an elongated alpha-chain. *Lancet*, 1(7702)-729-32

34. Hunt D.M., Higgs D.R., Winichagoon P., et al. (1982). Haemoglobin Constant Spring has an unstable alpha chain messenger RNA. *Br J Haematol*, 51(3)-405-13
35. Weatherall D.G. and Clegg J.B. (2001). The Thalassaemia Syndromes, Fourth Edition. *4th edn. Oxford: Blackwell Science*,
36. Laosombat V., Viprakasit V., Chotsampancharoen T., et al. (2009). Clinical features and molecular analysis in Thai patients with HbH disease. *Ann Hematol*, 88(12)-1185-92
37. Chui D.H. and Waye J.S. (1998). Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia: an emerging health care problem. *Blood*, 91(7)-2213-22
38. Lorey F., Charoenkwan P., Witkowska H.E., et al. (2001). Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. *Br J Haematol*, 115(1)-72-8
39. Hoppe C.C. (2009). Newborn screening for non-sickling hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 19-25
40. Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson C.H., et al. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(16)-6230-4
41. Tyen P.C., Ta C.L., Chao S.C., et al. (2002). PCR-Based Analysis of α -Thalassemia in Southern Taiwan. *International Journal of Hematology*, 4(2)-75-227
42. Chan A.Y., So C.C., Ma E.S., et al. (2007). A laboratory strategy for genotyping haemoglobin H disease in the Chinese. *J Clin Pathol*, 60(8)-931-4
43. Chong S.S., Boehm C.D., Higgs D.R., et al. (2000). Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood*, 95(1)-360-2
44. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, 24(1)-104-8

45. Helene P., Hossein N., Hai Y.L., et al. (2007). Validation of a reverse-hybridization StripAssay for the simultaneous analysis of common α -thalassaemia point mutations and deletions. *Clin Chem Lab Med* 45(5)-605-610
46. Ingram V.M. and Stretton A.O. (1959). Genetic basis of the thalassaemia diseases. *Nature*, 184(2)-1903-9
47. Na-Nakorn S., Wasi P., Pornpatkul M., et al. (1969). Further evidence for a genetic basis of haemoglobin H disease from newborn offspring of patients. *Nature*, 223(5201)-59-60
48. Ottolenghi S., Lanyon W.G., Paul J., et al. (1974). The severe form of α thalassaemia is caused by a haemoglobin gene deletion. *Nature*, 251(5474)-389-92
49. Orkin S.H. (1978). The duplicated human α globin genes lie close together in cellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(12)-5950-4
50. Higgs D.R., Pressley L., Old J.M., et al. (1979). Negro α -thalassaemia is caused by deletion of a single α -globin gene. *Lancet*, 2(8137)-272-6
51. Chen F.E., Ooi C., Ha S.Y., et al. (2000). Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients. *N Engl J Med*, 343(8)-544-50
52. Chui D.H., Fucharoen S. and Chan V. (2003). Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood*, 101(3)-791-800
53. Liebhaber S.A. and Kan Y.W. (1983). α -Thalassaemia caused by an unstable α -globin mutant. *J Clin Invest*, 71(3)-461-6
54. Ganczakowski M., Bowden D.K., Maitland K., et al. (1995). Thalassaemia in Vanuatu, south-west Pacific: frequency and haematological phenotypes of young children. *Br J Haematol* 89(3)-485-495
55. Slomp J., Bosschaart A., Dousma M., et al. (2006). Acute anaemia in a Vietnamese patient with α -thalassaemia and a parvovirusinfection. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 150(2)-1577-1582

56. Cohen A.R., Galanello R., Pennell D.J., et al. (2004). Thalassemia. *HematologyAmSocHematolEducProgram*, 1(1)-14-34
57. Schrier S.L., Bunyaratvej A., Khuhapinant A., et al. (1997). The unusual pathobiology of hemoglobin constant spring red blood cells. *Blood*, 89(1)-1762-1769
58. Cao A. (2002). Carrier screening and genetic counselling in beta-thalassemia. *Int J Hematol*, 76 Suppl 2(105-13
59. Liao C., Mo Q.H., Li J., et al. (2005). Carrier screening for alpha- and beta-thalassemia in pregnancy: the results of an 11-year prospective program in Guangzhou Maternal and Neonatal hospital. *Prenat Diagn*, 25(2)-163-71
60. Leung K.Y., Lee C.P., Tang M.H., et al. (2004). Cost-effectiveness of prenatal screening for thalassaemia in Hong Kong. *Prenat Diagn*, 24(11)-899-907
61. Glanello R., Eleftheriou A., Traeger S.J., et al. (2003). Prevention of thalassaemia and other haemoglobin disorders. *Thalassemia international Federation Publications*,
62. Fucharoen G., Sanchaisuriya K., Saechan V., et al. (2004). "A simplified screening strategy for thalassaemia and haemoglobin E in rural communities in South-East Asia". *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5)-364-372
63. Tongsong T., Wanapirak C., Sirivatanapa P., et al. (1998). Amniocentesis-related fetal loss: a cohort study. *Obstet Gynecol*, 92(1)-64-7
64. Tabor A., Philip J., Madsen M., et al. (1986). Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet*, 1(8493)-1287-93
65. Schutz M., Bredow V., Grabow D., et al. (1985). [Methods of chorion sampling for prenatal diagnosis in the 1st trimester of pregnancy. Report of experiences]. *Zentralbl Gynakol*, 107(18)-1114-7
66. Rhoads G.G., Jackson L.G., Schlesselman S.E., et al. (1989). The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities. *N Engl J Med*, 320(10)-609-17

67. Jauniaux E., Pahal G.S. and Rodeck C.H. (2000). What invasive procedure to use in early pregnancy? *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 14(4)-651-62
68. Leung K.Y., Liao C., Li Q.M., et al. (2006). A new strategy for prenatal diagnosis of homozygous alpha(0)-thalassemia. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 28(2)-173-7
69. Koide K., Sekizawa A., Iwasaki M., et al. (2005). Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women. *Prenat Diagn*, 25(7)-604-7
70. Sekizawa A., Purwosunu Y., Matsuoka R., et al. (2007). Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *J Obstet Gynaecol Res*, 33(6)-747-64
71. Chan V., Ng E.H., Yam I., et al. (2006). Experience in preimplantation genetic diagnosis for exclusion of homozygous alpha degrees thalassemia. *Prenat Diagn*, 26(11)-1029-36
72. Xu Y.W, Zeng Y.H, Deng J., et al. (2009). Preimplantation genetic diagnosis for alpha-thalassaemia in China. *J Assist Reprod Genet*, 26(7)-399-403
73. Minnich V., Na-Nakorn S., Chong-Chareonsuk S., et al. (1954). Mediterranean anemia; a study of thirty-two cases in Thailand. *Blood*, 9(1)-1-23
74. Rigarass D.A. and Koler R.D. (1961). Decreased erythrocytes survival in Hemoglobin H disease as a result of the abnormal properties of HbH - the benefit of splenectomy. *Blood* 18(1)-341-5
75. Gouttas A. (1966). [Hemoglobin H]. *Nouv Rev Fr Hematol*, 6(2)-177-82
76. Ramot B., Sheba C., Fisher S., et al. (1959). Haemoglobin H disease with persistent haemoglobin "Bart's" in an Oriental Jewess and her daughter: a dual alpha-chain deficiency of human haemoglobin. *Br Med J*, 2(5161)-1228-30
77. Dance N., Huehns E.R. and Beaven G.H. (1963). The abnormal haemoglobins in haemoglobin-H disease. *Biochem J*, 87(4)-240-8

78. Wasi P., Na-Nakorn S. and Suingdumrong A. (1964). Haemoglobin H disease in Thailand: a genetical study. *Nature*, 204(2)-907-8
79. Nguyễn Công Khanh and Dương Bá Trục (1984). Tình hình bệnh huyết sắc tố ở người dân tộc miền Bắc. *Huyết Học và Truyền Máu*, 2(1)-34-38
80. Trần Thùy Ngân and Dunstan S. (2005). Xác định kiểu di truyền của các đột biến alpha thalassemia trong vùng dịch tễ sốt rét của tỉnh Bình Phước bằng kỹ thuật PCR. *Luận văn tốt nghiệp Cử nhân khoa học. Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM*, 31-33
81. Hoan Nguyễn Khắc Hân (2013). Nghiên cứu tầm soát và chẩn đoán trước sinh bệnh alpha và beta Thalassemia. *Luận văn tiến sỹ*,
82. Lý Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Phương Mai, Ngô Diễm Ngọc, et al. (2010). Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán trước và sau sinh bệnh Alpha Thalassemia tại Bệnh Viện Nhi TƯ. *Tạp chí Nhi Khoa*, 3(4)-337-342
83. Ngô Diễm Ngọc, Lý Thị Thanh Hà, Ngô Thị Tuyết Nhung, et al. (2014). Chẩn đoán trước sinh bệnh alpha thalassemia. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 89(4)-8-14
84. Winichagoon P., Higgs D.R., Goodbourn S.E., et al. (1984). The molecular basis of alpha-thalassaemia in Thailand. *EMBO J*, 3(8)-1813-8
85. Zhang Q., Fan X., Xu M., et al. (2017). Hb H Disease Caused by Multiple Mutations in the Polyadenylation Signal Site and -SEA/ $\alpha\alpha$. *Hemoglobin*, 41(3)-189-192
86. Old J.M. (2003). Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev*, 17(2)-43-53
87. Harteveld C.L., Kleanthous M. and Traeger S.J. (2009). Prenatal diagnosis of hemoglobin disorders: present and future strategies. *Clin Biochem*, 42(18)-1767-79
88. White S.J., Vink G.R., Kriek M., et al. (2004). Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat*, 24(4)-86-92

89. Harteveld C.L., Voskamp A., Phylipsen M., et al. (2005). Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet*, 42(12)-922-31
90. Suemasu C.N, Kimura E.M, Oliveira D.M, et al. (2011). Characterization of alpha thalassaemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*, 44(1)-16-22
91. Splitt A., Mokras U., Windyga J., et al. (2010). Application of mPCR and MLPA in diagnostics of alpha-thalassaemia. *Przegl Lek.*, 67(7)-460-464
92. Liu J.Z., Han H., Schouten J.P., et al. (2008). Detection of alpha-thalassaemia in China by using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Hemoglobin*, 32(6)-561-571
93. Alessia C. , Valentina G., Valentina G., et al. (2011). Application of MLPA assay to characterize unsolved α -globin gene rearrangements. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46(2)-139-144
94. Little S. (2001). Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 9(Unit 9 8
95. Chui D.H. (2005). Alpha-thalassaemia: Hb H disease and Hb Barts hydrops fetalis. *Ann N Y Acad Sci*, 1054(5)-25-32
96. Charoenkwan P., Taweephon R., Sae-Tung R., et al. (2005). Molecular and clinical features of Hb H disease in northern Thailand. *Hemoglobin*, 29(2)-133-140
97. Origa R., Sollaino M.C., Giagu N., et al. (2007). Clinical and molecular analysis of haemoglobin H disease in Sardinia: haematological, obstetric and cardiac aspects in patients with different genotypes. *Br J Haematol*, 136(2)-326-32
98. Kanavakis E., Papassotiriou I., Karagiorga M., et al. (2000). Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. *Br J Haematol*, 111(3)-915-23

99. Lorey F., Cunningham G., Vichinsky E.P., et al. (2001). Universal newborn screening for Hb H disease in California. *Genet Test*, 5(2)-93-100
100. He S., Zhang Q., Chen B.Y., et al. (2015). Genotypes and clinical features of 595 children with HbH disease in Guangxi, China. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 17(9)-908-911
101. Baysal E., Kleanthous M., Bozkurt G., et al. (1995). alpha-Thalassaemia in the population of Cyprus. *Br J Haematol*, 89(3)-496-9
102. Jianpei F., Luming C., Ruiping Z., et al. (2014). The Hb H Disease Genotypes in Southern China. *Hemoglobin*, 13(2)-76-78
103. Vicky Chan Pui Wah (2003). Molecular Genetics of HbH disease in Hong Kong Chinese. *Thesis of Master Medical Sciences University of Hong Kong*,
104. Souza A.E., Cardoso G.L., Takanashi S.Y., et al. (2009). Alpha-thalassaemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarem, Para State. *Genet Mol Res*, 8(2)-477-81
105. Fucharoen S. and Viprakasit V. (2009). Hb H disease: clinical course and disease modifiers. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 26-34
106. Lal A., Goldrich M.L., Haines D.A., et al. (2011). Heterogeneity of hemoglobin H disease in childhood. *N Engl J Med*, 364(8)-710-8
107. Nguyen V.H., Sanchaisuriya K., Wongprachum K., et al. (2014). Hemoglobin Constant Spring is markedly high in women of an ethnic minority group in Vietnam: a community-based survey and hematologic features. *Blood Cells*, 52(4)-161-5
108. Laig M., Pape M., Hundrieser J., et al. (1990). The distribution of the Hb constant spring gene in Southeast Asian populations. *Hum Genet*, 84(2)-188-190
109. Wayne J.S., Eng B., Patterson M., et al. (1997). Novel mutation of the alpha 2-globin gene initiation codon (ATG-->A-G) in a Vietnamese girl with Hb H disease. *Hemoglobin*, 21(5)-469-72

110. Kutlar F., Adamkiewicz T.V., Markowitz R.B., et al. (1998). An alpha-2 globin gene initiation codon mutation in a Vietnamese patient with Hb H disease. *Ann N Y Acad Sci*, 850(1)-398-400
111. Yongzong Z. (2001). Alpha 2CD31AGG--AAG Arg--Lys causing non-deletional. *Hematologica*, 86(3)-541-542
112. Wiwanitkit V. (2006). Tertiary structural analysis of the elongated part of an abnormal hemoglobin, hemoglobin Pakse. *Int J Nanomedicine*, 1(1)-105-107
113. Singsanan S., Fucharoen G., Savongsy O., et al. (2007). Molecular characterization and origins of Hb Constant Spring and Hb Pakse in Southeast Asian populations. *Ann Hematol*, 86(9)-665-9
114. Pichanun D., Munkongdee T., Klamchuen S., et al. (2010). Molecular screening of the Hbs Constant Spring (codon 142, TAA>CAA, $\alpha 2$) and Paksé (codon 142, TAA>TAT, $\alpha 2$) mutations in Thailand. *Hemoglobin*, 34(6)-582-586
115. Somsri W. and Viroj W. (2014). Hemoglobin Pakse: prevalence and geographical distribution. *Asian Pac J Trop Dis*, 4(5)-401-3
116. Pornprasert S., Panyasai S. and Treesuwan K. (2012). Unmasking Hb Paksé (codon 142, TAA>TAT, $\alpha 2$) and its combinations in patients also carrying Hb Constant Spring (codon 142, TAA>CAA, $\alpha 2$) in northern Thailand. *Hemoglobin*, 36(5)-491-496
117. Viprakasit V., Tanphaichitr V.S., Pung-Amritt P., et al. (2002). Clinical phenotypes and molecular characterization of Hb H-Paksé disease. *hematologica*, 87(2)-117-125
118. Harano T., Harano K., Imai N., et al. (1998). An electrophoretically silent hemoglobin variant, Hb Hekinan [α 27(B8)Glu----Asp] found in a Japanese. *Hemoglobin*, 12(1)-61-65
119. Merault G., Keclard L., Desfontaines L., et al. (1989). Hemoglobin Hekinan [α (2)27(B8)Glu----Asp β 2] detected in Guyana. *Hemoglobin* 13(4)-397-402

120. Zhao W., Wilson J.B., Webber B.B., et al. (1990). Hb Hekinan observed in three Chinese from Macau; identification of the GAG----GAT mutation in the alpha 1-globin gene. *Hemoglobin*, 14(6)-627-635
121. Fucharoen S., Changtrakun Y., Ratanasiri T., et al. (2003). Complex interaction of Hb Hekinan [alpha27(B8) Glu-Asp] and Hb E [beta26(B8) Glu-Lys] with a deletional alpha-thalassemia 1 in a Thai family. *Eur J Haematol*, 70(5)-304-309
122. Shih H.C., Shih M.C., Chang Y.C., et al. (2007). Hb Hekinan in a Taiwanese subject: a G-->T substitution at codon 27 of the alpha1-globin gene abolishes an HaeIII site. *Hemoglobin*, 31(4)-495-498
123. Au W.Y., Cheung W.C., Hu W. H., et al. (2005). Hyperbilirubinemia and cholelithiasis in Chinese patients with hemoglobin H disease. *Ann Hematol*, 84(10)-671-4
124. Nguyễn Công Khanh and Dương Bá Trực (1984). Bệnh Beta Thalassemia và HbE tại Viện Bảo Vệ Sức Khỏe trẻ em 1981-1993. *Y Học Việt Nam*, 4(1)-26-31
125. Ltd John Wiley & Sons (2014). Complications of HbH disease in adulthood. *British Journal of Haematology*, 127(2)-127-146
126. Khanh Nguyễn Công (2008). *Huyết học lâm sàng Nhi Khoa*,
127. Vichinsky E.P. (2013). Clinical manifestations of alpha-thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(5)-a011742
128. Chan V., Ghosh A., Chan T.K., et al. (1984). Prenatal diagnosis of homozygous alpha thalassaemia by direct DNA analysis of uncultured amniotic fluid cells. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 288(6427)-1327-9
129. DH Ryan (2010). Examination of Blood cell. *William Hematology*, 2(
130. Orkin S.H., Goff S.C. (1981). Mutation in an intervening sequence splice junction in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(8)-5041-5
131. Yang Y., Lou J.W., Liu Y.H., et al. (2014). Screening and diagnosis of Hb Quong Sze [HBA2: c.377T > C (or HBA1)] in a prenatal control program for thalassemia. *Hemoglobin*, 38(3)-158-160

132. Liao C., Li J., Xie X.M., et al. (2009). Diversity in clinical presentation of hemoglobin H disease induced by the SEA deletion and the hemoglobin Quong Sze. *Ann Hematol*, 88(11)-1145-7
133. Duantida S., Christian B. and Douglas R.H. (2017). An International registry of survivors with Hb Bart's Hydrops fetalis syndrome. *Blood*, 129(10)-1251-1259
134. Chung S.W., Wong S.C., Clarke B.J., et al. (1984). Human embryonic zeta-globin chains in adult patients with alpha-thalassemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(19)-6188-91
135. Cheng P.J., Chu D.C., Lee C.H., et al. (2003). Prenatal diagnosis of alpha-thalassemia of Southeast Asian deletion with non-radioactive southern hybridization. *Chang Gung Med J*, 26(1)-20-5
136. George E., Mokhtar A.B., Azman Z.A., et al. (1996). Prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis in West Malaysia: the identification of the alpha thal 1 defect by PCR based strategies. *Singapore Med J*, 37(5)-501-4
137. Alla J., Joan H. and Michael A.N. (2004). HPLC Retention Time as a Diagnostic Tool for Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies: A Study of 60000 Samples in a Clinical Diagnostic Laboratory. *Clinical Chemistry*, 50(5)-1736-47
138. Ho S.S., Chong S.S., Koay E.S., et al. (2007). Microsatellite markers within --SEA breakpoints for prenatal diagnosis of HbBarts hydrops fetalis. *Clin Chem*, 53(2)-173-9
139. Tongsong T., Charoenkwan P., Sirivatanapa P., et al. (2013). Effectiveness of the model for prenatal control of severe thalassemia. *Prenat Diagn*, 33(5)-477-83
140. Can Liao, Min Pan, Jin Han, et al. (2014). Prenatal control of Hb Bart's hydrops fetalis: a two-year experience at a mainland Chinese hospital. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*,
141. Galanello R., Sollaino C., Paglietti E., et al. (1998). Alpha thalassemia carrier identification by DNA analysis in the screening for thalassemia. *American Journal of Hematology*, 59(4)-273-278

142. Li D., Liao C., Li J., et al. (2006). Detection of alpha- thalassaemia in beta-thalassaemia carriers and prevention of Hb Bart's hydrops fetalis through prenatal screening. *Haematologica*, 91(5)-649-651
143. Dame C., Albers N., Hasan C., et al. (1999). Homozygous alpha-thalassaemia and hypospadias-- common aetiology or incidental association? Long-term survival of Hb Bart's hydrops syndrome leads to new aspects for counselling of alpha- thalassaemic traits. *Eur J Pediatr* 158(1)-217-220
144. Singer S.T., Styles L., Bojanowski J., et al. (2000). Changing outcome of homozygous alpha-thalassaemia: cautious optimism. *JPediatr Hematol Oncol*, 22(2)-539-542
145. Yi J.S., Moertel C.L. and Baker K.S. (2009). Homozygous alpha-thalassaemia treated with intrauterine transfusions and unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *J Pediatr* 154(3)-766-768
146. Zhou X., Ha S.Y., Chan G.C, et al. (2001). Successful mismatched sibling cord blood transplant in Hb Bart's disease. *Bone Marrow Transplant*, 28(1)-105-107
147. Lee S.Y., Li C.K., Ling S.C., et al. (2009). Survival of homozygous alpha- thalassaemia with aplasia/hypoplasia of phalanges and jejunal atresia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2(1)-1-3

PHỤ LỤC 1
BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

1. THÔNG TIN HÀNH CHÍNH

Họ và tên bệnh nhân:	
Tuổi:	Giới:
Mã số bệnh viện:	Mã số Lab:
Tên bố/mẹ:	Điện thoại:
Địa chỉ:	Dân tộc:

2. PHẢ HỆ VÀ TIỀN SỬ GIA ĐÌNH

Bố mẹ có quan hệ huyết thống không? Có Không

Gia đình có mấy con?

Bệnh nhân là con thứ mấy?

Số con mắc bệnh trong gia đình?

3. TIỀN SỬ VÀ ĐẶC ĐIỂM TRUYỀN MÁU

Có tiền sử truyền máu không? Có Không

Phụ thuộc truyền máu? Có Không Số lần/tháng/năm:

Truyền máu rải rác? Có Không Số lần/tháng/năm:

Tuổi bắt đầu truyền máu?

4. TRIỆU CHỨNG LÂM SÀNG

Cân nặng (kg):

Chiều cao (cm):

Da xanh, niêm mạc nhợt: Có Không

Bộ mặt Thalassemia: Có Không

Gan to: Có Không Số cm DBS:

Lách to: Có Không Số cm DBS:

Triệu chứng khác kèm theo:

5. KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM CẬN LÂM SÀNG VÀ PHÂN TÍCH GEN

5.1. Đặc điểm huyết học (trước truyền máu)

RBCx10¹²/L:

HGB (g/L):

HCT (%):

MCV (fL):

MCH (pg):

MCHC (%):

5.2. Điện di huyết sắc tố

HbA1 (%):

HbA2 (%):

HbH (%):

Hb Bart's (%):

HbF (%):

Hb Khác (%):

5.3. Phân tích đột biến gen α globin

	Allen đột biến 1	Allen đột biến 2	Khác
Bệnh nhân			
Bố			
Mẹ			
Anh/chị em ruột			

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH

BỆNH α THALASSEMIA

1. THÔNG TIN HÀNH CHÍNH

Họ và tên vợ:	Tuổi:	Dân tộc:
Họ và tên chồng:	Tuổi:	Dân tộc:
Mã số Lab:	Điện thoại:	
Địa chỉ:		

2. PHẢ HỆ VÀ TIỀN SỬ GIA ĐÌNH

Bố mẹ có quan hệ huyết thống không? Có Không

Có tiền sử sinh con mắc bệnh α thalassemia? Có Không Không biết

Thể bệnh α -thalassemia được chẩn đoán? HbH Hb Bart's Không biết

Gia đình có mấy con?

Số con mắc bệnh trong gia đình?

Phả hệ:

3. TIỀN SỬ THAI SẢN VÀ QUÁ TRÌNH MANG THAI

3.1. Tiền sử thai sản

Có tiền sử phù thai không? Có Không

Số lần phù thai

Phát hiện ở tuần thai:

Tiền sử thai sản khác:

3.2. Quá trình mang thai hiện tại

Thai lần thứ mấy?

Tuổi thai hiện tại (theo siêu âm hoặc kỳ kinh cuối):

Tình trạng thai hiện tại (theo siêu âm):

4. KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM CẬN LÂM SÀNG VÀ PHÂN TÍCH GEN

	Người vợ	Người chồng
Xét nghiệm công thức máu:		
RBCx10 ¹² /L		
HGB (g/dL)		
HCT (%)		
MCV (fL)		
MCH (pg)		
MCHC (%)		
Điện di huyết sắc tố:		
HbA1 (%)		
HbA2 (%)		
HbH (%)		
HbF (%)		
HbE (%)		
Phân tích gen α globin:		
Kiểu gen		
Kết luận:		

5. KẾT QUẢ CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH

	Allen đột biến 1	Allen đột biến 2	Khác
Bố			
Mẹ			
Thai			

6. KẾT QUẢ ĐỐI CHIẾU

Kiểu gen	Kết quả trước sinh	Kết quả đối chiếu	
		Đình chỉ	Sau sinh
Bố			
Mẹ			
Thai			

PHỤ LỤC 2

1. Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số từ máu ngoại vi và từ dịch ối

- Cho 20 μ l Protease QIAGEN vào mỗi ống ly tâm 1.5ml, sau đó cho tiếp 200 μ l mẫu máu vào trong ống. Thêm 200 μ l dung dịch đệm AL rồi trộn đều hỗn hợp trên bằng máy lắc trong 15''. Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ 56°Cx10'.

- Thêm 200 μ l Ethanol (96-100%). Chuyển hỗn hợp trên vào cột lọc QIAamp.

- Ly tâm cột lọc 8000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch nổi và chuyển cột lọc sang ống 2ml sạch.

- Rửa 2 lần, mỗi lần thêm 500 μ l dung dịch đệm AW, ly tâm ống 8000 vòng/ phút trong 1 phút. Sau đó bỏ dịch nổi, chuyển cột lọc sang ống 2ml sạch khác.

- Thêm 200 μ l dung dịch AE vào cột lọc, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút, sau đó ly tâm 8000 vòng/ phút trong 1 phút thu DNA tổng số.

- DNAs sau khi tách chiết được đo nồng độ và độ tinh sạch bằng máy Nano drop (Thermo). Nồng độ DNAs >30ng. Độ tinh sạch 260/280 = 1.7-1.9

2. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất nghiên cứu

2.1. Dụng cụ

- Máy ly tâm cho ống ly tâm 1.5 mL, 15ml, 50ml (Eppendorf).

- Máy PCR Eppendorf Master Cycler Pro S (Eppendorf).

- Hệ thống điện di nằm ngang (Science Plas).

- Hệ thống giải trình tự gen 3130 Genetics Analyser (ABI).

- Hệ thống soi gel GelDoc (Biorad).

- Tủ nuôi cấy tế bào CO₂ (Thermo).

2.2. Hóa chất

- Hóa chất tách DNA tổng số: QiaAmp DNA blood mini kit (Qiagen).

- Hóa chất chạy PCR:

- 2X PCR Master mix green/colorless (Promega).

- Môi (5'-3'): Pha môi lưu trữ nồng độ 100uM và môi sử dụng nồng độ 10uM dùng trong các phản ứng (Invitrogen).
- Nước không chứa Nuclease (DNAase/RNAase free water) (Qiagen).
- Hóa chất điện di sản phẩm PCR:
 - Agarose (Bioneer).
 - 10X Blue juiceTM (Loading dye) (Invitrogen).
 - Dung dịch đệm Ultra pureTM 10X TBE buffer (Invitrogen).
 - Ethidium Bromide (Invitrogen).
 - 100bp DNA Ladder (1.0UG/UL) (Invitrogen).
- Hóa chất giải trình tự gen:
 - Ethanol 70% (Merk).
 - Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen).
 - Big dye v3.1 Terminator cycle sequencing ready reaction (ABI).
 - Big dye X-Terminator Purification Kit (ABI).
- Hóa chất chạy MLPA: Probe MLPA SALSA P140B (MCR - Holland).
- Hóa chất nuôi cấy tế bào ối:
 - Môi trường nuôi cấy tế bào AmnioMAX complete (Gibco).
 - Huyết thanh phôi bò (FBS) (PAA).
 - Trysin EDTA 1X (Gibco).

PHỤ LỤC 3

Đặc điểm huyết học và đột biến gen của 5 gia đình sinh con mắc HbH có đột biến ($--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT}\alpha$)

Ca	Tuổi	TM năm (lần)	Hb (g/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	HbA1 (%)	HbA2 (%)	HbH (%)	HbF (%)	Hb Bart's (%)	Kiểu gen	
1	Bố	35	-	13.2	75.6	22.4	96.8	2.6	0	0.6	0	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Mẹ	30	-	11.1	76.7	24.4	96.5	3.2	0	0.3	0	$(-\alpha^{c.2delT}/\alpha\alpha)$
	Con	5	0	9.1	61.3	17.0	87.5	1.6	10	0.9	0	$(--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT})$
	Con	1	0	7.9	55.4	16.5	79.6	0	13.5	0	6.9	$(--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT})$
2	Bố	33	-	13.7	63.5	19.9	98.0	2.0	0	0	0	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Mẹ	33	-	13.0	85.4	27.2	97.9	2.1	0	0	0	$(-\alpha^{c.2delT}/\alpha\alpha)$
	Con	4	1	8	59.6	15.9	90.1	1.6	8.0	0.3	0	$(--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT})$
3	Bố	28	-	13.6	75.1	23.4	97.8	2.2	0	0	0	$(-\alpha^{c.2delT}/\alpha\alpha)$
	Mẹ	27	-	11.4	68.4	22.1	98.2	1.8	0	0	0	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Con	2	4	7.3	57.5	17.0	84.1	0.7	5.9	1.7	7.6	$(--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT})$
4	Bố	35	-	15.6	74.8	25.4	98.1	1.9	0	0	0	$(-\alpha^{c.2delT}/\alpha\alpha)$
	Mẹ	32	-	11.9	63.9	20.0	98.0	2.0	0	0	0	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Con	12	0	10.8	55.2	16.6	90.0	2.0	8	0	0	$(--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT})$
5	Bố	32	-	12.2	74.7	24.9	97.1	2.3	0	0.6	0	$(-\alpha^{c.2delT}/\alpha\alpha)$
	Mẹ	29	-	11.0	65.0	21.2	97.9	2.1	0	0	0	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Con	2	12	7.3	59.5	17.0	84.6	1.4	12.0	2	0	$(--^{SEA}/-\alpha^{c.2delT})$

PHỤ LỤC 4

Đặc điểm huyết học và đột biến gen của 4 gia đình sinh con mắc HbH có đột biến hiếm gặp

Số	Gia đình	Tuổi	TM năm (lần)	Hb (g/dl)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA1 (%)	HbA2 (%)	HbH (%)	Kiểu gen
1	Bố	-	-	-	-	-	-	-	-	$(--\alpha^{c.426 A>T}/\alpha\alpha)$
	Mẹ	-	-	-	-	-	-	-	-	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Con	1	6.6	7.3	76.6	21.9	66.5	0.9	12.9	$(--^{SEA}/-\alpha^{c.426 A>T})$
2	Bố	29	-	11.5	79.1	25.1	98.0	2.0	0	$(-\alpha^{c.92 G>A}/\alpha\alpha)$
	Mẹ	23	-	10.7	71.3	21.1	98.2	1.8	0	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Con	3	0.3	8	60.0	17.0	92.3	2.0	5.7	$(--^{SEA}/-\alpha^{c.92 G>A})$
3	Bố	33	-	14.6	80.7	26.3	97.7	2.3	0	$(\alpha\alpha/-\alpha1)$
	Mẹ	28	-	10.2	64.1	20.6	98.0	2.0	0	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Con	5	0.4	8.3	66.7	19.7	86.1	1.0	4.5	$(--^{SEA}/-\alpha1)$
4	Bố	35	-	13.3	68.0	20.7	95.3	4.7	-	$(-\alpha^{c.81G>T}/\alpha\alpha)$
	Mẹ	28	-	11.4	68.8	21.0	98.0	2.0	-	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$
	Con	4	0	10.0	59.7	18.1	61.5	1.3	37.2	$(--\alpha^{SEA}/-\alpha^{c.81G>T})$

PHỤ LỤC 5

Đặc điểm huyết học và đột biến gen của gia đình sinh con mắc Hb Bart's còn sống sau sinh

Lâm sàng và huyết học	Bố	Mẹ	Con mắc Hb Bart's còn sống sau sinh	
			Sau truyền máu	Trước truyền máu
Tuổi (năm)			4	
Tuổi bắt đầu truyền máu (năm)	-	-	Ngay sau đẻ	
Tần số truyền máu (lần)	-	-	1 tháng/lần	
Gan lách to	-	-	3cm dưới bờ sườn	
Bộ mặt Thalassemia	-	-	Rõ	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.11	5.07	4.28	3.22
HGB (g/dL)	14.8	10.7	10.8	7.4
HCT (%)	48.6	34.7	40.5	28.5
MCV (fL)	67.4	68.4	94.6	88.5
MCH (pg)	20.8	21.1	25.2	23.0
MCHC (g/dL)	30.5	30.8	26.7	26.0
RDW-SD (fL)	-	-	59.8	-
RDW-CV (%)	18.5	15.1	18.5	22.3
HbA1 (%)	97.7	97.8	67.2	51.5
HbA2 (%)	2.3	2.2	1.8	1.4
HbF (%)	-	-	-	28.1
HbH (%)	-	-	31.0	19.0
Kiểu gen	(-- ^{SEA} /αα)	(-- ^{SEA} /αα)	(-- ^{SEA} /-- ^{SEA})	(-- ^{SEA} /-- ^{SEA})