

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh thalassemia thuộc nhóm bệnh rối loạn tổng hợp huyết sắc tố, là bệnh di truyền phổ biến nhất trên thế giới với ước tính khoảng 7% dân số mang gen bệnh. Nguyên nhân gây bệnh là do đột biến gen quy định tổng hợp chuỗi globin dẫn đến mất cân bằng các loại chuỗi globin, tạo nên bất thường về huyết sắc tố, làm giảm chất lượng hồng cầu, gây ra tình trạng thiếu máu ở bệnh nhân. Vì thiếu máu, cơ thể tăng hấp thu sắt và tăng tích lũy tại tổ chức trong cơ thể do phải truyền máu, từ đó gây ra rất nhiều biến chứng tại gan, tim, tuyến nội tiết làm giảm chất lượng cuộc sống và tuổi thọ của người bệnh.

Thalassemia là bệnh phòng được và chữa được. Phòng bệnh thalassemia là phòng không ra những trẻ bị bệnh. Để phòng bệnh, nhất thiết phải biết chính xác đột biến và đặc điểm lâm sàng của đột biến gây bệnh thalassemia. Những người bệnh thalassemia hoàn toàn có thể có được cuộc sống gần như bình thường nếu được truyền máu và không bị quá tải sắt tại các tổ chức.

Ở Việt Nam, mặc dù chưa có chương trình phòng bệnh thalassemia quốc gia. Năm 2016, bộ Y tế đã ban hành văn bản hướng dẫn chẩn đoán điều trị bệnh thalassemia, trong đó đã quy định việc chẩn đoán xác định, theo dõi điều trị quá tải sắt ở bệnh nhân thalassemia và thực hiện phòng bệnh thalassemia.

2. Mục tiêu của đề tài

1. Nghiên cứu đặc điểm đột biến gen globin bằng kỹ thuật Strip Assay tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương giai đoạn 2013 - 2016;

2. Đánh giá sự thay đổi một số chỉ số quá tải sắt bằng MRI ở bệnh nhân thalassemia được điều trị thải sắt.

3. Ý nghĩa thực tiễn và đóng góp mới của đề tài

Đóng góp mới về khoa học:

- Triển khai, ứng dụng thành công kỹ thuật Globin Strip Assay trong chẩn đoán đột biến gen globin cho các đối tượng có mang gen bệnh thalassemia;

- Ứng dụng thành công MRI để chẩn đoán chính xác tình trạng quá tải sắt (QTS) tại gan, tim để từ đó tiên lượng biến chứng tại các tổ chức gan, tim và nội tiết ở BN thalassemia.

Giá trị thực tiễn của đề tài:

- Việc xác định được đột biến gen globin và đặc điểm lâm sàng của các đột biến rất có ý nghĩa trong chẩn đoán và đặc biệt là phòng bệnh thalassemia;

- Chẩn đoán mức độ quá tải sắt tại gan, tim ở BN thalassemia từ đó đưa ra phác đồ điều trị phù hợp và tư vấn cho BN kịp thời để ngăn chặn biến chứng nặng nề, góp phần nâng cao chất lượng cuộc sống cho người bệnh.

4. Cấu trúc luận án

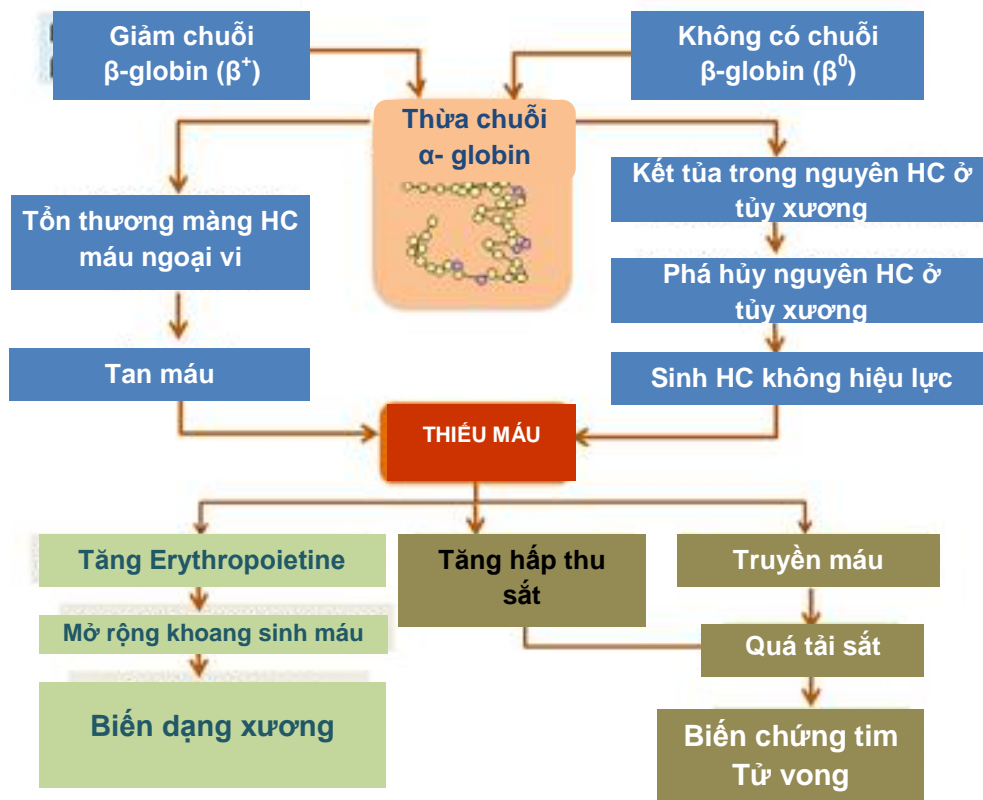
Luận án được trình bày trong 145 trang, bao gồm: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (34 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (25 trang), kết quả nghiên cứu (33 trang), bàn luận (48 trang), kết luận (2 trang), kiến nghị (1 trang).

Luận án gồm 47 bảng, 13 biểu đồ, 1 sơ đồ, 10 hình. Trong 154 tài liệu tham khảo có 128 tài liệu tiếng Anh, 28 tài liệu tiếng Việt, hầu hết trong 10 năm trở lại đây. Phụ lục gồm các tài liệu, hình ảnh kết quả xét nghiệm đột biến gen globin, kết quả chụp MRI gan, tim, danh sách các bệnh nhân, mẫu bệnh án nghiên cứu.

Chương I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Bệnh thalassemia

Cơ chế bệnh sinh của bệnh thalassemia bắt nguồn từ sự mất cân bằng chuỗi α -globin và chuỗi không α -globin.

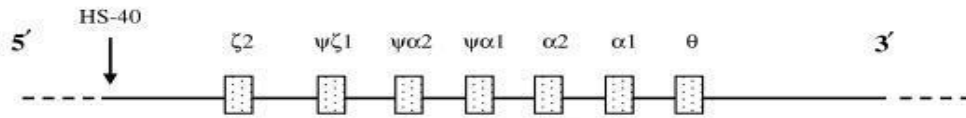


Hình 1.1. Cơ chế bệnh sinh của β -thalassemia

1.2. Đột biến gen globin và các phương pháp phát hiện

Gen globin có kích thước nhỏ, gồm có 3 exon và 2 intron. Sự biểu hiện gen globin được kiểm soát thông qua hoạt động của các vùng khởi động, tăng cường và bất hoạt trên mỗi gen globin và ở các vùng trình tự điều khiển cụm gen. Trật tự các nucleotit là yếu tố quyết định loại Hb, bất kỳ sự thay đổi nào như mất, thêm, thay đổi nucleotit trên gen globin đều tạo ra bất thường mRNA từ đó gây nên các thể bệnh của thalassemia ở mức độ sinh học phân tử.

1.2.1. Gen α -globin và đột biến gen α -globin

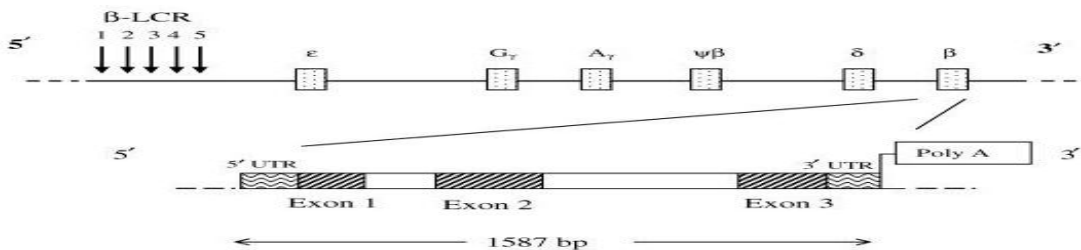


Hình 1.2. Cấu trúc gen α -globin

Họ gen α -globin nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể 16 (16p13.3) gồm 3 gen chức năng là ζ , $\alpha 1$, $\alpha 2$ và 4 gen giả là $\Psi\zeta 1$, $\Psi\alpha 1$, $\Psi\alpha 2$, θ (hình 1.3). Gen $\alpha 1$ có chiều dài 840 bp và gen $\alpha 2$ có chiều dài 830 bp.

Đột biến gây bệnh α -thalassemia bao gồm đột biến mất đoạn và đột biến điểm. Đột biến mất đoạn có 2 dạng là đột biến đoạn lớn làm mất cả 2 gen α (kiểu gen: --) gây α^0 -thalassemia. Đột biến mất đoạn nhỏ làm mất 1 gen α (kiểu gen: $-\alpha$) gây α^+ -thalassemia. Hiện nay đã phát hiện được trên 300 đột biến, trong đó đột biến mất đoạn chiếm khoảng 90%. Đột biến không mất đoạn là các đột biến tại 1 hoặc vài nucleotit làm tổng hợp ra các biến thể chuỗi α -globin (kiểu gen: $\alpha^T\alpha$ hoặc $\alpha\alpha^T$). Các đột biến điểm chủ yếu ở trong vùng HS-40 và trong gen $\alpha 1$, $\alpha 2$. Hiện nay người ta đã xác định được 69 đột biến điểm liên quan đến biểu hiện của gen α .

1.2.2. Gen β -globin và đột biến gen β -globin



Hình 1.3. Cấu trúc gen β -globin

Họ gen β -globin nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể 11 (11p15.5) có độ dài 60 kilobases (kb) gồm có 5 gen chức năng, sắp xếp theo trật tự từ trái sang phải là ϵ / γG / γA / δ / β (hình 1.2). Gen β -globin có 626 base pair (bp) tham gia mã hóa nằm trên 3 exon là exon 1 (142 bp), exon 2 (223 bp) và exon 3 (261 bp). Độ dài intron 1 là 130 bp và intron 2 là 850 bp. Gen β -globin có cơ chế điều hòa rất phức tạp, hoạt động ở mức độ đơn gen cũng như toàn bộ cụm gen.

Đột biến gen β -globin bao gồm: β^0 -thalassemia là các đột biến làm mất chức năng gen β -globin nên không tổng hợp được chuỗi β -globin; β^+ -thalassemia là các đột biến làm giảm tổng hợp chuỗi β -globin ở nhiều mức độ khác nhau; Các biến thể Hb là đột biến điểm làm thay đổi một acid amin, dẫn đến tổng hợp nên các biến thể chuỗi β globin khác tạo Hb bất thường như HbE, HbD... Hiện nay đã phát hiện trên 200 đột biến gen β -globin, chủ yếu là đột biến không mất đoạn. Đột biến tại gen β -globin chiếm trên 75% các đột biến trong cụm gen không α -globin.

Các đột biến gen globin mang tính đặc trưng và phân bố khác nhau ở các vùng miền, dân tộc.

1.2.3. Các phương pháp xác định đột biến gen globin

- Phương pháp PCR cách đoạn (Gap-PCR);
- Kỹ thuật khuếch đại nhiều đoạn đầu dò phụ thuộc kết nối (Multiplex ligation dependent probe amplification – MLPA);
- Kỹ thuật dùng enzyme cắt giới hạn (Restriction endonuclease -RE);
- Kỹ thuật khuếch đại alen đặc hiệu ARMS-PCR;
- Phương pháp lai ngược (Reverse Dot Blot);
- Kỹ thuật lai phân tử (Reversehybridization - kit Strip Assay);
- Kỹ thuật phân tích giải trình tự gen.

1.3. Quá tải sắt ở bệnh nhân thalassemia và phương pháp đánh giá

1.3.1. Quá tải sắt ở bệnh nhân thalassemia

Tình trạng thừa sắt ở bệnh nhân thalassemia là hậu quả của việc truyền máu nhiều lần và tăng hấp thu sắt từ đường tiêu hóa. Ở bệnh nhân thalassemia do tình trạng thiếu oxy tổ chức kéo dài và hiện tượng tăng sinh hồng cầu ở tủy xương đã ức chế gan tổng hợp hepcidin. Hepcidin giảm làm tăng hấp thu sắt từ đường tiêu hóa. Ở bệnh nhân thuộc truyền máu, do phải truyền máu thường xuyên (2- 5 tuần/lần) từ khi còn rất nhỏ tuổi, do đó sau khi nhận 10 – 20 đơn vị máu, bệnh nhân sẽ bị quá tải sắt. Vì thế ở bệnh nhân phụ thuộc truyền máu, bên cạnh nguyên nhân tăng hấp thu sắt, nguyên nhân chính gây quá tải sắt là do truyền máu, bệnh nhân sẽ bị quá tải sắt rất sớm và nặng nếu không được điều trị thải sắt tốt. Bệnh nhân không phụ thuộc truyền máu, nguyên nhân bị quá tải sắt chủ yếu là do tăng hấp thu sắt từ đường tiêu hóa. Quá trình tích lũy sắt diễn ra từ từ, hàng ngày. Sau 15 năm, nếu bệnh nhân không được điều trị thải sắt thì lượng sắt tích lũy có thể gây tổn thương các cơ quan.

Khi sắt huyết thanh tăng lên 10 lần, các vị trí gắn sắt của transferrin đã bão hòa, sắt không gắn được với transferrin sẽ gắn không đặc hiệu với các chất khác như albumin, citrate, aminoacid và đường. Những tế bào ngoài hồng cầu, đặc biệt là gan, tuyến nội tiết và cơ tim thường có ưu thế nhận sắt từ con đường không phụ thuộc transferrin. Do vậy, những tổ chức này nhanh chóng tiếp nhận sắt khi cơ thể có dấu hiệu thừa sắt. Đầu tiên sắt được tích lũy vào tế bào Kupffer trong gan và đại thực bào trong lách, rồi đến tế bào nhu mô gan, tuyến nội tiết, tế bào cơ tim. Những ion sắt gắn không đặc hiệu này dễ dàng bị thay đổi trạng thái từ Fe^{3+} thành Fe^{2+} sinh ra các gốc tự do. Những gốc tự do này sinh ra các chủng oxy hoạt tính (reactive oxygen species - ROS). ROS peroxid hóa lớp màng lipid tế bào, màng lysosom, gây tổn thương ADN, thay đổi cơ chế điều hòa tế bào, làm tế bào tự thoái hóa, làm tăng nguy cơ sinh tế bào non, tăng sinh xơ. Đồng thời góp phần làm tăng hoạt động của vi sinh vật, do đó làm tăng nguy cơ nhiễm trùng và ung thư. Theo nhiều tác giả đã nghiên cứu, nếu không được điều trị thải sắt thì quá tải sắt chiếm đến trên 70% các nguyên nhân gây tử vong cho bệnh nhân thalassemia.

1.3.2. Các phương pháp đánh giá quá tải sắt

- Định lượng ferritin huyết thanh;
- Xác định nồng độ sắt trong gan bằng sinh thiết gan;
- Chụp cộng hưởng từ gan đánh giá nồng độ sắt tại gan: kỹ thuật so sánh mức độ giảm tín hiệu trên cộng hưởng từ ở gan với cơ và kỹ thuật sử dụng chuỗi xung MGRE T2*;
- Chụp cộng hưởng từ tim đánh giá sắt nồng độ tại tim.

Chương II: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu:

Bệnh nhân (BN), người đến tư vấn tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương (Viện HH-TM TW) từ tháng 8/2013 đến tháng 12/2016, bao gồm:

Nhóm 1: 266 người có khả năng mang gen bệnh thalassemia gồm 146 thai phụ mang gen bệnh thalassemia (chẩn đoán trước sinh), 50 bệnh nhân và 70 người nghi ngờ mang gen bệnh thalassemia được làm xét nghiệm xác định đột biến gen globin bằng kit Strip Assay.

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân:

- Sản phụ có thai một ở tuần 16 đến 20, cả sản phụ và người chồng đã được chẩn đoán xác định có mang đột biến gen bệnh thalassemia;

- Bệnh nhân tại Viện HH-TM TW được chẩn đoán bị bệnh thalassemia dựa vào lâm sàng có hội chứng thiếu máu (mạn tính), hội chứng tan máu; xét nghiệm có thiếu máu nhược sắc hồng cầu nhỏ; thành phần huyết sắc tố có HbH trong α -thalassemia, HbF tăng (> 4%) và hoặc HbA2 tăng (> 3,5%) trong β -thalassemia;

- Người nghi ngờ mang gen bệnh thalassemia là những người không có biểu hiện lâm sàng, được làm xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi có chỉ số hồng cầu nhỏ (MCV < 85, MCH < 28); thành phần huyết sắc tố có HbF tăng (> 4%) và hoặc HbA2 tăng (> 3,5%) được nghi mang gen bệnh β -thalassemia, HbA2 giảm nhẹ hoặc bình thường được nghi mang α -thalassemia;

- Các đối tượng tự nguyện tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Người nghi ngờ mang gen bệnh thalassemia có thiếu sắt hoặc đang bị các bệnh nhiễm trùng hoặc bệnh ác tính kèm theo;

- Sản phụ có chồng chỉ định chọc hút dịch ối (theo ý kiến của chuyên khoa sản) như: không đồng ý chọc ối, thai phụ đang mắc các bệnh lý sản khoa khác, có nguy cơ sảy thai...

Nhóm 2: 434 BN thalassemia được làm xét nghiệm MRI chẩn đoán tình trạng quá tải sắt tại gan, tim. Theo dõi dọc 54 BN được điều trị thải sắt thường xuyên và 131 BN không được điều trị thải sắt thường xuyên, đánh giá tình trạng quá tải sắt và các biến chứng trước và sau 1 năm.

Tiêu chuẩn lựa chọn

- BN được chẩn đoán xác định bị bệnh thalassemia;
- BN có khả năng phối hợp làm theo chỉ dẫn của cán bộ y tế khi chụp MRI;
- Bệnh nhân hoặc người bảo trợ đồng ý tham gia làm xét nghiệm.

Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân đang có tình trạng nhiễm trùng cấp hoặc mạn tính;
- Bệnh nhân đang có thai;
- Bệnh nhân bị bệnh tim bẩm sinh;
- Bệnh nhân bị viêm gan cấp;
- Bệnh nhân có dị vật kim loại trong cơ thể (như đinh vít, nẹp vít...).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả cắt ngang, tiền cứu.
- Theo dõi dọc những bệnh nhân về mức độ quá tải sắt và các biến chứng.

2.2.2. Phương pháp chọn mẫu

Sử dụng phương pháp chọn mẫu thuận tiện, có chủ đích.

2.2.3. Các thông số cần thu thập trong nghiên cứu

- *Thông tin chung, cân nặng, các triệu chứng lâm sàng;*
- *Các chỉ số xét nghiệm:* Tổng phân tích tế bào máu ngoại vi (Hb, MCV, MCH, số lượng tiểu cầu); Thành phần huyết sắc tố; Đột biến gen globin; Sắt, ferritin, men gan; FT4, TSH, LH, FSH, testosterone, PTH, HbA1C; prothrombin; nhịp tim, phân suất tổng máu
- *Các chỉ số điều trị:* liều lượng thuốc thải sắt, thể tích khối hồng cầu.

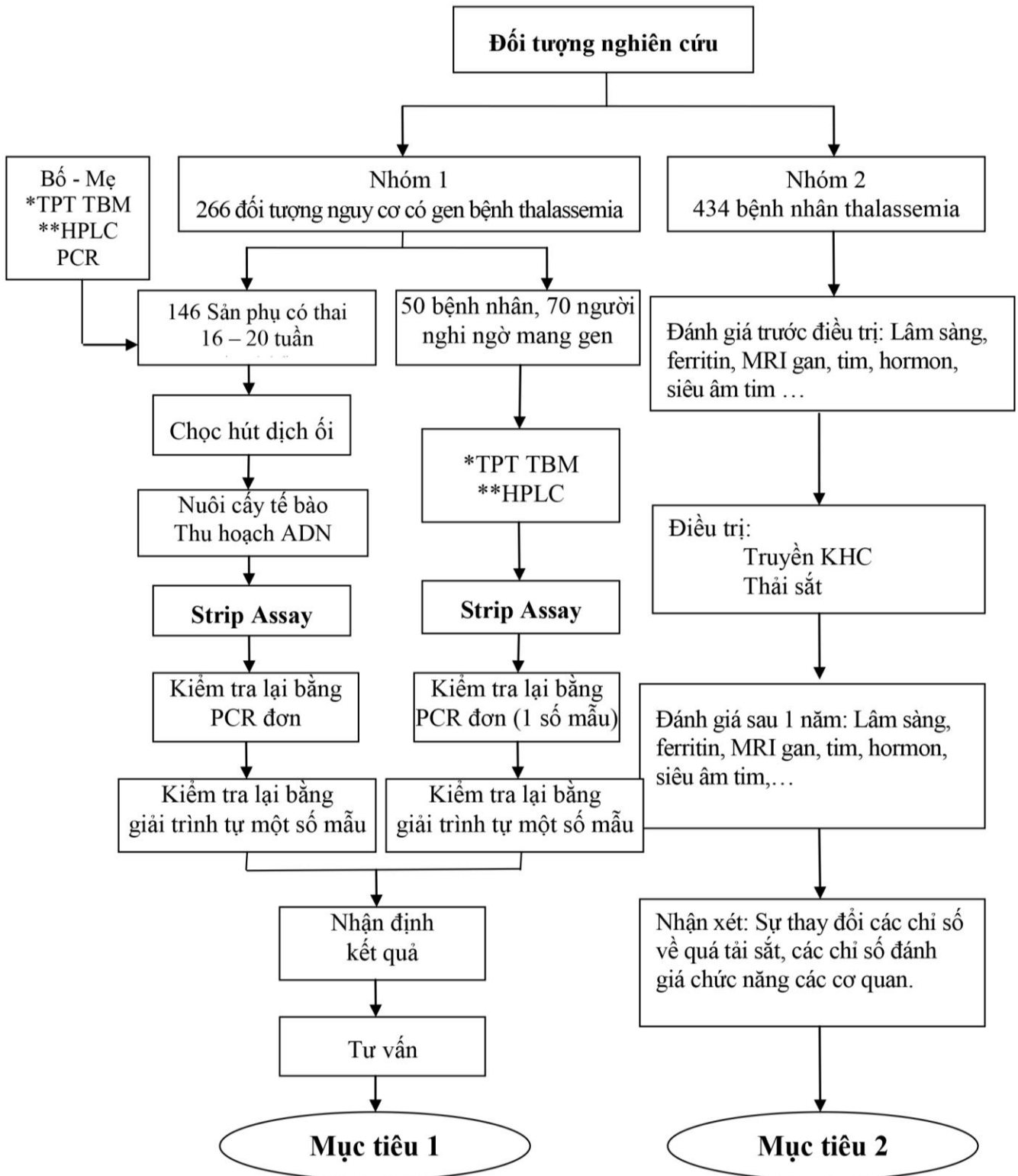
2.2.4. Các nội dung nghiên cứu

- Xác định đột biến gen α -globin, gen β -globin; Tìm hiểu đặc điểm huyết học theo các kiểu đột biến gen globin;
- Đánh giá mức độ quá tải sắt tại gan, tim. Tìm hiểu mối tương quan các mức độ quá tải với nhau, ở các thể bệnh khác nhau. Tìm hiểu mối tương quan giữa mức độ quá tải sắt với biến chứng gan, tim, tuyến nội tiết. Đánh giá sự thay đổi của tình trạng quá tải sắt sau 1 năm theo dõi.

2.2.5. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu số liệu

Quản lý và xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0, excel.

2.2.6. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

Chú thích: *TPT TBM: Tổng phân tích tế bào máu ngoại vi

**HPLC: Xác định thành phần Hb bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp

Chương III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xét nghiệm phát hiện đột biến gen globin bằng Globin Strip Assay

3.1.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu nhóm 1

Bảng 3.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu	α -globin Strip Assay	β -globin Strip Assay	Tổng cộng
Thai phụ chẩn đoán trước sinh	46	100	146
Bệnh nhân thalassemia	16	34	50
Người nghi ngờ mang gen bệnh	41	29	70
Tổng cộng	103	163	266

Nhận xét: 266 đối tượng có khả năng mang gen bệnh thalassemia gồm 146 thai phụ mang gen (có chồng cùng mang gen bệnh), 50 bệnh nhân thalassemia và 70 người khỏe mạnh nghi ngờ mang gen bệnh thalassemia.

3.1.2. Đặc điểm đột biến gen globin được phát hiện

Bảng 3.2. Các đột biến α -globin được phát hiện trên các đối tượng nghiên cứu

TT	Thai phụ chẩn đoán trước sinh		Bệnh nhân		Người nghi ngờ mang gen bệnh		Tổng số alen đột biến	
	Kiểu gen	n (%)	Kiểu gen	n (%)	Kiểu gen	n (%)	Alen	n (%)
1	-- ^{SEA} / -- ^{SEA}	8(17,4%)	-- ^{SEA} / $\alpha^{CS}\alpha$	9(56,3%)	-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$	29 (70,7%)	-- ^{SEA}	90(70,9%)
2	-- ^{SEA} / $\alpha^{CS}\alpha$	2 (4,3%)	-- ^{SEA} / $\alpha^{PS}\alpha$	2(12,5%)	$\alpha^{CS}\alpha$ / $\alpha\alpha$	4(9,8%)	HbCs	19 (15%)
3	-- ^{SEA} / $\alpha^{3.7}\alpha$	5(10,9%)	-- ^{SEA} / $\alpha^{3.7}\alpha$	4(25%)	$\alpha^{3.7}\alpha$ / $\alpha\alpha$	3(7,3%)	3.7	13(10,2%)
4	-- ^{SEA} / $\alpha^{4.2}\alpha$	1 (2,2%)	-- ^{SEA} / $\alpha^{4.2}\alpha$	1 (6,3%)	$\alpha^{4.2}\alpha$ / $\alpha\alpha$	1(2,4%)	4.2	3 (2,4%)
5	$\alpha^{CS}\alpha$ / $\alpha^{CS}\alpha$	1 (2,2%)			$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	4(9,8%)	HbPs	2 (1,6%)
6	$\alpha^{CS}\alpha$ / $\alpha^{3.7}\alpha$	1 (2,2%)						
7	-- ^{SEA} / α^{C2} delT α^*	1 (2,2%)						
8	-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$	20(43,5%)						
9	$\alpha^{CS}\alpha$ / $\alpha\alpha$	1 (2,2%)						
10	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	6(13,0%)						
		46 (100%)		16 (100%)		41 (100%)		127 (100%)

(*) Đột biến C2 delT đã được phát hiện bằng kỹ thuật PCR đơn.

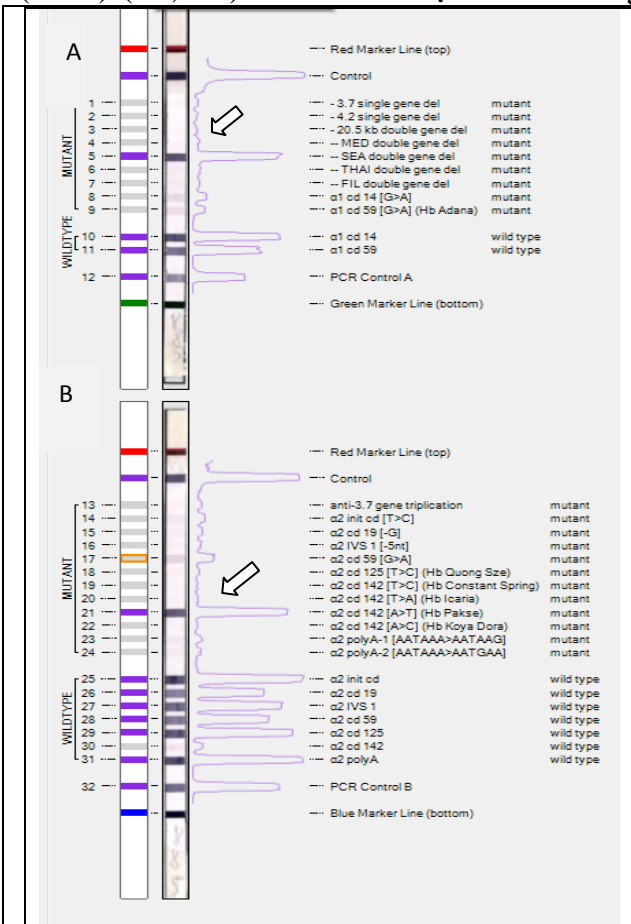
Nhận xét: Trong 46 thai nhi được chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia, có 6 trường hợp (13%) không có đột biến, 21 trường hợp có 1 đột biến (45,7%), 19

trường hợp có 2 đột biến (41,3%). 8 trường hợp Hb Bart's do đột biến SEA đồng hợp tử ($--^{SEA} / --^{SEA}$). 16 bệnh nhân α -thalassemia đều được phát hiện có 2 đột biến. Trong 41 người nghi ngờ mang gen α -thalassemia, 37 người được phát hiện có 1 đột biến, 4 người chưa xác định được đột biến. Trong 103 đối tượng nghiên cứu, phát hiện được 127 alen đột biến với 5 loại đột biến trong đó đột biến SEA chiếm tỷ lệ cao nhất (70,9%). Có 2 alen đột biến hiếm gặp là HbPs.

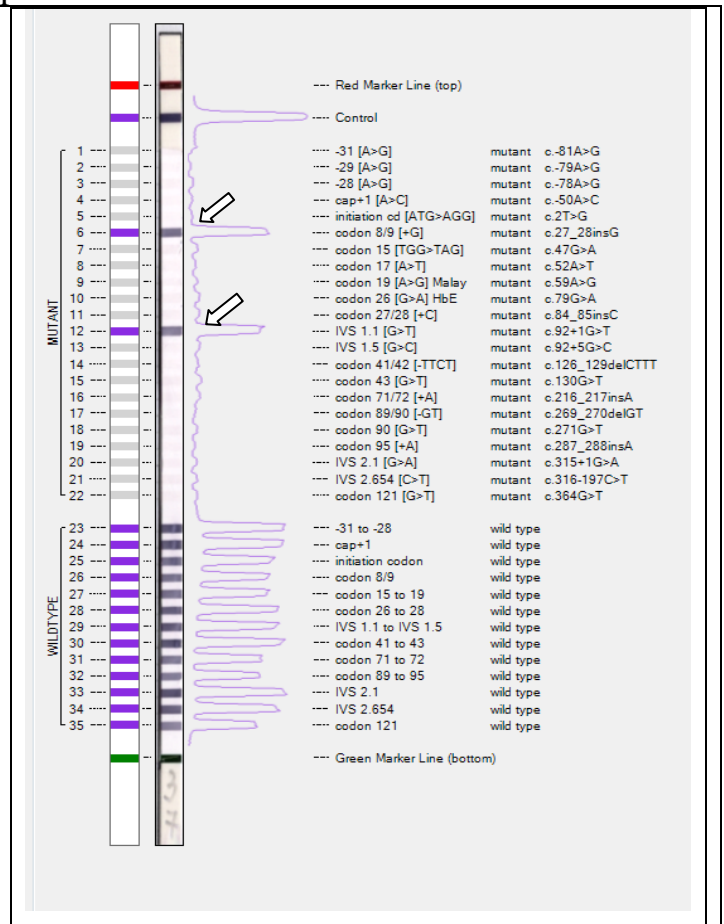
Bảng 3.3. Các đột biến gen β -globin được phát hiện trên các đối tượng nghiên cứu

TT	Thai phụ chẩn đoán trước sinh		Bệnh nhân		Người nghi ngờ mang gen bệnh		Tổng số alen đột biến	
	Kiểu đột biến	n (%)	Kiểu đột biến	n (%)	Kiểu đột biến	n (%)	Alen	n (%)
1	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd26}$	10 (10%)	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd26}$	6(17,6%)	$\beta^{Cd41/42}/\beta$	10(34,5%)	Cd17	60 (30,6%)
2	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd41/42}$	7 (7%)	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd41/42}$	2(5,9%)	β^{Cd17}/β	9 (31%)	Cd41/42	54 (27,6%)
3	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{Cd41/42}$	5 (5%)	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{Cd26}$	3(8,8%)	β^{Cd26}/β	3(10,3%)	Cd26	48 (24,5%)
4	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{Cd26}$	4 (4%)	$\beta^{Cd71/72}/\beta^{Cd26}$	2(6,9%)	β^{IVS1-1}/β	2(6,9%)	IVS1-1	10 (5,1%)
5	β^{Cd17}/β^{-28}	2 (2%)	$\beta^{IVS1-1}/\beta^{Cd26}$	3(8,8%)	$\beta^{IVS2-654}/\beta$	2(6,9%)	-28	9 (4,6%)
6	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd17}$	1 (1%)	$\beta^{IVS2-654}/\beta^{Cd26}$	3(8,8%)	β/β	3(10,3%)	IVS2-654	7 (3,6%)
7	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd71/72}$	1 (1%)	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{Cd41/42}$	1(2,9%)			Cd71/72	6 (3,1%)
8	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{IVS2-654}$	1 (1%)	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd95}$	1(2,9%)			Cd95	1 (0,5%)
9	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{IVS1-1}$	1 (1%)	β^{Cd17}/β^{-28}	1(2,9%)			Cd8/9	1 (0,5%)
10	β^{Cd17}/β	18 (18%)	$\beta^{Cd17}/\beta^{IVS1-1}$	1(2,9%)				
11	β^{Cd26}/β	10 (10%)	$\beta^{IVS1-1}/\beta^{IVS1-1}$	1(2,9%)				
12	$\beta^{Cd41/42}/\beta$	11 (11%)	$\beta^{Cd71/72}/\beta^{IVS2-654}$	1(2,9%)				
13	β^{-28}/β	2 (2%)	$\beta^{Cd8/9}/\beta^{IVS1-1}$	1(2,9%)				
14	$\beta^{Cd71/72}/\beta$	2 (2%)	β^{-28}/β^{Cd26}	1(2,9%)				
15	β/β	25 (25%)	β^{-28}/β^{-28}	1(2,9%)				
16			$\beta^{Cd26}/\beta^{Cd26}$	1(2,9%)				
17			β^{-28}/β	1(2,9%)				
18			β^{Cd26}/β	1(2,9%)				
19			$\beta^{Cd41/42}/\beta$	3(8,8%)				
	Tổng cộng	100 (100%)		34 (100%)		29 (100%)		196 (100%)

Nhận xét: Trong 100 thai nhi được chẩn đoán trước sinh bệnh, có 25 trường hợp không có đột biến (25%), 43 trường hợp có 1 đột biến (43%), 32 trường hợp có 2 đột biến (32%). Trong 34 bệnh nhân, 29 người có 2 đột biến với 16 kiểu gen, có 5 bệnh nhân chỉ phát hiện được 1 đột biến. Trong tổng số 163 đối tượng nghiên cứu, đã phát hiện được 196 alen đột biến với 9 loại đột biến, hay gặp nhất là Cd17 (30,6%), Cd41/41 (27,6%) và Cd26 (HbE) (24,5%). Có 1 alen đột biến hiếm gặp là Cd8/9.



Kết quả xét nghiệm ADN của bệnh nhân Nguyễn Hà V, mã 14015271
Hình 3.1. Hình ảnh đột biến --^{SEA}/α^{Pakse}α trên thanh test α-Globin Strip Assay



Kết quả xét nghiệm ADN của bệnh nhân Trần Đức Q, mã 16010465
Hình 3.2. Hình ảnh đột biến β^{Cd8/9}/β^{IVS 1-1} trên thanh test β-Globin Strip Assay

Bảng 3.4. Nồng độ Hb trung bình theo các kiểu đột biến ở BN thalassemia

	Số bệnh nhân	Hb trung bình (g/l) (X ± SD)
BN α-thalassemia	16	
-- ^{SEA} /α ^T α	11	82,2 ± 18,6
-- ^{SEA} /-α	5	97,4 ± 14,7
BN β-thalassemia	29	
β ⁰ /β ⁰	08	70,9 ± 17,5
β ⁰ /β ^E	18	75,8 ± 14,6
β ⁰ /β ⁺	02	71 - 74
β ⁺ /β ⁺	02	87
β ⁺ /β ^E	01	89
β ^E /β ^E	01	110

Nhận xét: Trong α -thalassemia, bệnh nhân có kiểu đột biến $--^{SEA} / \alpha^T \alpha$ có Hb trung bình thấp hơn kiểu đột biến $--^{SEA} / -\alpha$. Trong β -thalassemia, bệnh nhân có kiểu đột biến β^0 / β^0 có Hb trung bình thấp nhất (70,9g/l), kiểu đột biến β^E / β^E có Hb trung bình cao nhất (110 g/l).

Bảng 3.5. Kết quả các đột biến gen β -globin được xác định bằng β -globin Strip Assay và giải trình tự gen β -globin

STT	Các đột biến theo phương pháp xét nghiệm	
	β -globin Strip Assay	Giải trình tự gen β -globin
1	$\beta^{Cd41/42} / \beta$	$\beta^{Cd41/42} / \beta^{-88}$
2	β^{-28} / β	$\beta^{-28} / \beta^{-90}$
3	β^{Cd26} / β	$\beta^{Cd26} / \beta^{Cd35}$
4	$\beta^{Cd41/42} / \beta$	$\beta^{Cd41/42} / \beta$
5	$\beta^{Cd41/42} / \beta$	$\beta^{Cd41/42} / \beta$
6	β / β	β^{-88} / β
7	β / β	β^{-88} / β
8	β / β	β / β

Nhận xét: Có 3 bệnh nhân β -thalassemia (số thứ tự 1,2,3) đã được phát hiện có thêm đột biến là -88, -90 và Cd35. Có 2 người nghi ngờ mang gen bệnh β -thalassemia (số thứ tự 6,7) đã xác định được có đột biến là -88 khi làm xét nghiệm bằng giải trình gen β -globin khi làm xét nghiệm bằng giải trình tự gen β -globin.

3.2. Kết quả đánh giá quá tải sắt bằng MRI

3.2.1. Đặc điểm chung đối tượng nghiên cứu nhóm 2

Bảng 3.6. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu (n = 434)

Nhóm bệnh	Thể bệnh			Chung	Tuổi (X \pm SD)	Hb (g/L) (X \pm SD)
	α -thal	β -thal	β -thal /HbE			
Phụ thuộc truyền máu (TDT) (1)	0	53 (63,9%)	30 (36,1%)	83 (19,1%)	13,8 \pm 6,0 (7 - 34)	64,3 \pm 15,8
Không phụ thuộc truyền máu (NTDT) (2)	69 (19,7%)	28 (8,0%)	254 (72,3%)	351 (80,8%)	28,2 \pm 11,7 (6 - 63)	74,5 \pm 13,7
Tổng cộng	69 (15,9%)	81 (18,9%)	284 (65,4%)	434 (100%)	24,4 \pm 12,2	72,5 \pm 14,7
					p(1)(2) < 0,001	p(1)(2) < 0,001

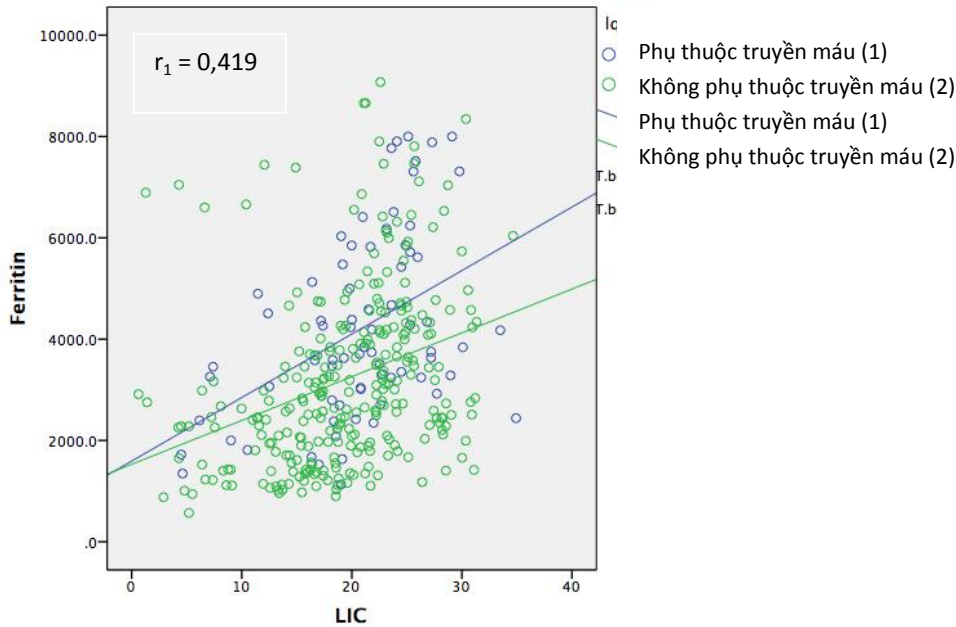
Nhận xét: Có 3 thể bệnh gồm: 69 (15,9%) BN α -thalassemia, 81 (18,9%) BN β -thalassemia và 284 (65,4%) BN β -thalassemia/HbE. Nhóm TDT có 83 BN (19,1%), nhóm NTDT có 351 BN (80,8%). Nhóm TDT có tuổi trung bình là 13,8 tuổi, Hb trung bình là 64,3 g/l thấp hơn so với nhóm NTDT là 28,2 tuổi và Hb là 74,5g/l, sự khác biệt về độ tuổi và Hb trung bình có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

3.2.2. Đặc điểm quá tải sắt

Bảng 3.7. Đặc điểm quá tải sắt (QTS) tại tổ chức ở hai nhóm bệnh nhân phụ thuộc truyền máu và không phụ thuộc truyền máu (TDT và NTDT)

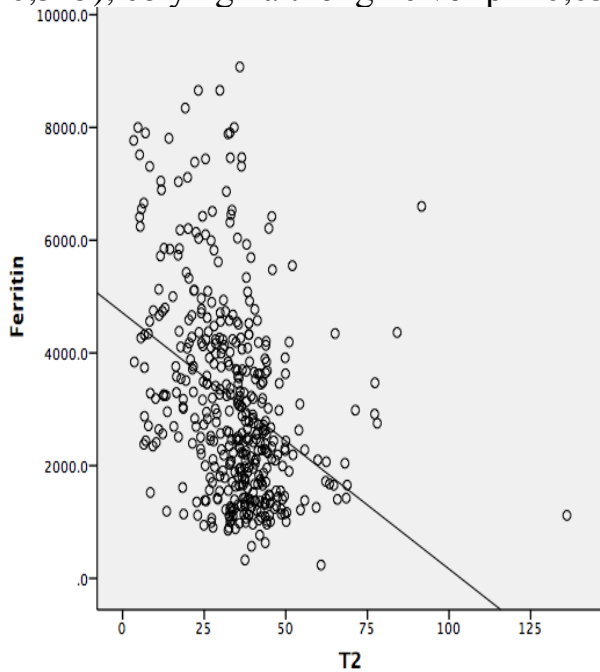
Chỉ số	Thể bệnh	Mức độ quá tải sắt				Tổng	Trung bình	p
		Bình thường	Nhẹ	Trung bình	Nặng			
Ferritin huyết thanh (ng/ml)	TDT (1)	0 (0%)	0 (0%)	15 (18,1%)	68 (81,9%)	83 (100%)	4.229,8 ± 1.839,6	p <0,01
	NTDT (2)	3 (0,9%)	12 (3,4%)	161 (45,9%)	175 (49,9%)	351 (100%)	2.909,9 ± 1.678,7	
	Chung	3 (0,7%)	12 (2,8%)	176 (40,5%)	243 (56%)	434 (100%)	3162,3 ± 1787,6	
LIC (mg/g gan khô)	TDT (1)	0 (0%)	3 (3,6%)	7 (8,4%)	73 (88%)	83 (100%)	21,0 ± 6,0	p <0,01
	NTDT (2)	5 (1,4%)	28 (8%)	73 (20,8%)	245 (69,8%)	351 (100%)	18,0 ± 7,0	
	Chung	5 (1,2%)	31 (7,1%)	80 (18,4%)	318 (73,3%)	434 (100%)	18,6 ± 6,9	
T2* tim (ms)	TDT (1)	48 (57,8%)	10 (12%)	7 (8,4%)	18 (21,7%)	83 (100%)	24,0 ± 14,6	p <0,01
	NTDT (2)	321 (91,5%)	13 (3,7%)	12 (3,4%)	5 (1,4%)	351 (100%)	36,4 ± 13,3	
	Chung	369 (85%)	23 (5,3%)	19 (4,4%)	23 (5,3%)	434 (100%)	34,1 ± 14,4	

Nhận xét: Ferritin huyết thanh trung bình là 3162,3 ng/ml, tỷ lệ BN ở mức độ nặng là 56%, nhóm TDT là 81,6%, nhóm NTDT là 49,9%. LIC trung bình là 18 mg/g gan khô, tỷ lệ BN bị QTS nặng ở gan là 73,3%, nhóm TDT là 88%, nhóm NTDT là 69,8%. Sự khác nhau về tỷ lệ các mức độ QTS giữa hai nhóm bệnh TDT và NTDT có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (test χ^2).



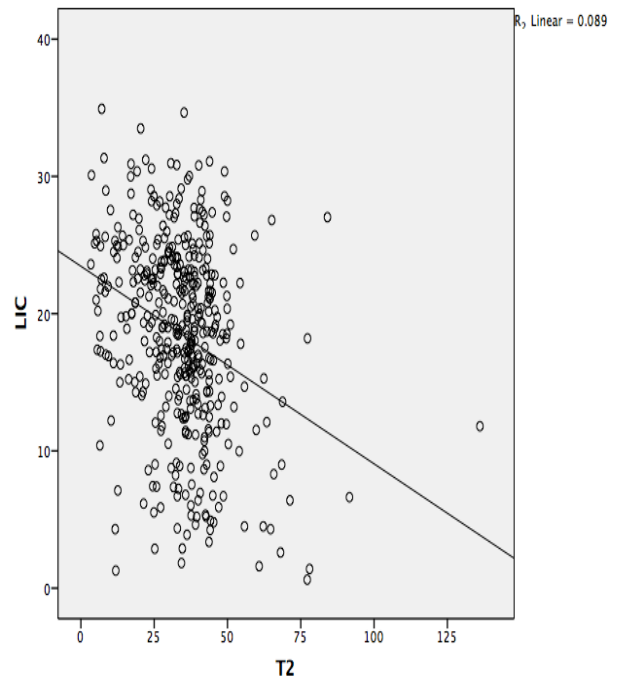
Biểu đồ 3.1. Mối tương quan giữa ferritin và LIC ở nhóm BN TDT và

Nhận xét: Giữa ferritin huyết thanh và nồng độ sắt trong gan (LIC) ở cả hai nhóm TDT và NTDT có mối tương quan thuận mức độ trung bình (r tương ứng là $r_1 = 0,419$, $r_2 = 0,325$), có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.



Biểu đồ 3.2. Mối tương quan giữa ferritin và T2* tim ở BN thalassemia (n = 434)

Nhận xét: Giữa ferritin huyết thanh và T2* tim có mối tương quan nghịch ở mức độ trung bình với $r = -0,360$, có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Giữa LIC và T2* tim có mối tương quan nghịch ở mức độ trung bình với $r = -0,313$, có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.



Biểu đồ 3.3. Mối tương quan giữa LIC và T2* tim ở BN thalassemia (n = 434)

Bảng 3.8. Mối liên quan giữa T2* tim với ferritin ht và LIC ở BN thalassemia (n = 434)

Các chỉ số đánh giá quá tải sắt (QTS)	Quá tải sắt tại tim		
	Không (n, %) (T2* tim > 20 ms)	Có (n, %) (T2* tim ≤ 20 ms)	Tổng cộng (n, %)
Ferritin ≤ 2500	183 (95,8%)	8 (4,2%)	191 (100%)

huyết thanh (ng/ml)	> 2500	186 (76,5%)	57 (23,5%)	243 (100%)
	Tổng	369 (85,0%)	65 (15,0%)	434 (100%)
	p	p < 0,001; OR = 0,143; CI 95% [0,066; 0,307]		
LIC (mg/g gan khô)	≤ 15	110 (94,8%)	6 (5,2%)	116 (100%)
	> 15	259 (81,4%)	59 (18,6%)	318 (100%)
	Tổng	369 (85,0%)	65 (15,0%)	434 (100%)
		p < 0,001; OR = 0,234; CI95% [0,102; 0,578]		

Nhận xét: Với ferritin huyết thanh > 2.500 ng/ml, có 23,5% BN bị QTS tại tim (T2* tim ≤ 20 ms), ferritin ≤ 2.500 ng/ml chỉ có 4,2% bệnh nhân bị QTS tại tim, sự khác biệt về tỷ lệ có ý nghĩa thống kê với p < 0,05. Với LIC > 15 mg/g gan khô có 18,5% BN bị QTS ở tim (T2* tim ≤ 20 ms), LIC ≤ 15 mg/g gan khô chỉ có 5,2% BN bị QTS tại tim, sự khác biệt về tỷ lệ có ý nghĩa thống kê với p < 0,05.

3.2.3. Mối liên quan giữa quá tải sắt và các biến chứng

Bảng 3.9. Mối liên quan giữa LIC và chỉ số xơ gan (APRI*) ở BN thalassemia (n = 181)**

Xếp nhóm xơ gan (theo chỉ số APRI)	n	%	LIC mg/g (X ± SD)
Bình thường (1) APRI ≤ 0,7	118	65,2	15,0 ± 7,4
Xơ hóa (2) APRI: 0,7 – 1,0	34	18,8	16,6 ± 6,2
Xơ gan (3) APRI > 1,0	29	16	18,9 ± 6,2
Tổng cộng	181	100	p(1,2), p(2,3), p(1,3) < 0,05

(*) APRI: Chỉ số đánh giá xơ gan dựa vào men gen GOT và số lượng tiểu cầu (trang 51).

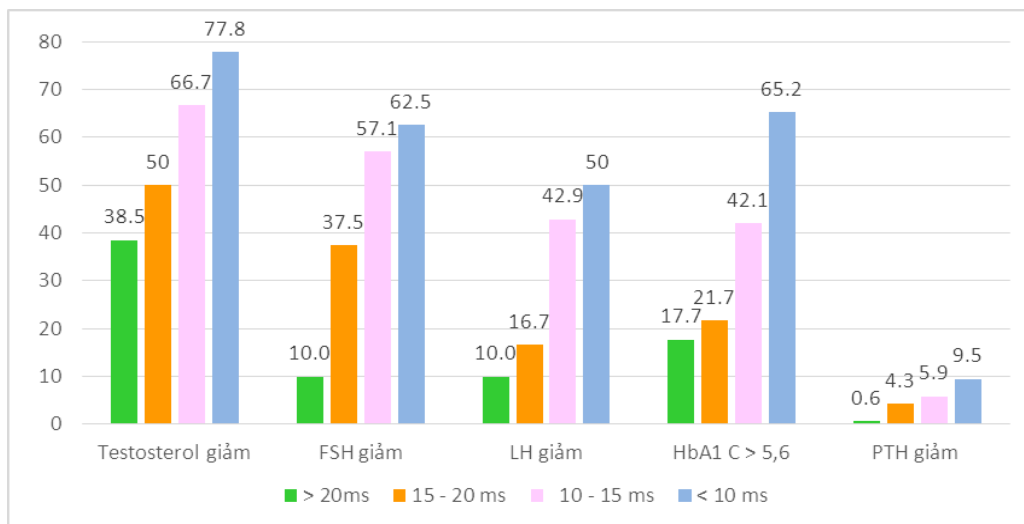
(**) Có 181 bệnh nhân chưa cắt lách được đánh giá tình trạng xơ gan dựa vào chỉ số APRI

Nhận xét: Nồng độ sắt trong gan (LIC) trung bình ở các nhóm BN bị xơ gan, xơ hóa gan và bình thường lần lượt là 18,9; 16,6 và 15,0 mg/g gan khô. Sự khác biệt giữa các nhóm có ý nghĩa thống kê với p < 0,05.

Bảng 3.10. Mối liên quan giữa quá tải sắt tại tim với sức bóp cơ tim ở BN thalassemia (n = 434)

Quá tải sắt tại tim Sức bóp cơ tim	Có (n, %) T2* tim ≤ 20 ms	Không (n, %) T2* tim > 20 ms	Tổng cộng (n, %)
Giảm	8 (12,30%)	12 (3,3%)	20 (4,6%)
Bình thường	57 (87,7%)	357 (96,7%)	414 (95,4%)
Tổng cộng	65 (100%)	369 (100%)	434 (100%)
p < 0,01; OR = 4,174; CI 95% [1,636; 10,660]			

Nhận xét: Có 20 BN (4,6%) bị giảm sức bóp cơ tim, trong đó nhóm có QTS tại tim là 12,3%, nhóm không bị QTS tại tim là 3,3%, sự khác biệt về tỷ lệ giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê với p < 0,01.

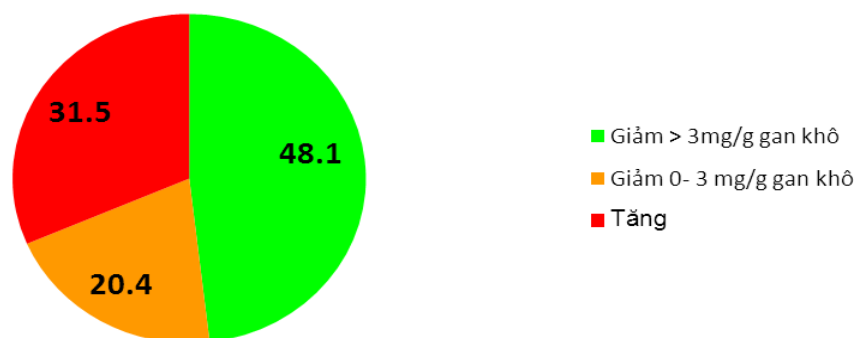


Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ BN bị giảm các loại hormon theo các mức độ quá tải sắt tại tim (T2*tim)

Nhận xét: Mức độ QTS tại tim càng nặng, tỷ lệ BN bị giảm hormon càng cao. Tỷ lệ BN giảm testosterone ở nhóm QTS nặng là 77,8%, nhóm QTS nhẹ là 50%. Tỷ lệ BN có HbA1C > 5,6% ở nhóm QTS nặng là 65,2%, nhóm QTS nhẹ là 17,7%. Sự khác nhau về tỷ lệ BN giảm hormon ở các mức độ QTS ở tim có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

3.2.4. Sự thay đổi tình trạng quá tải sắt sau 1 năm theo dõi

3.2.4.1. Nhóm BN được điều trị thải sắt thường xuyên



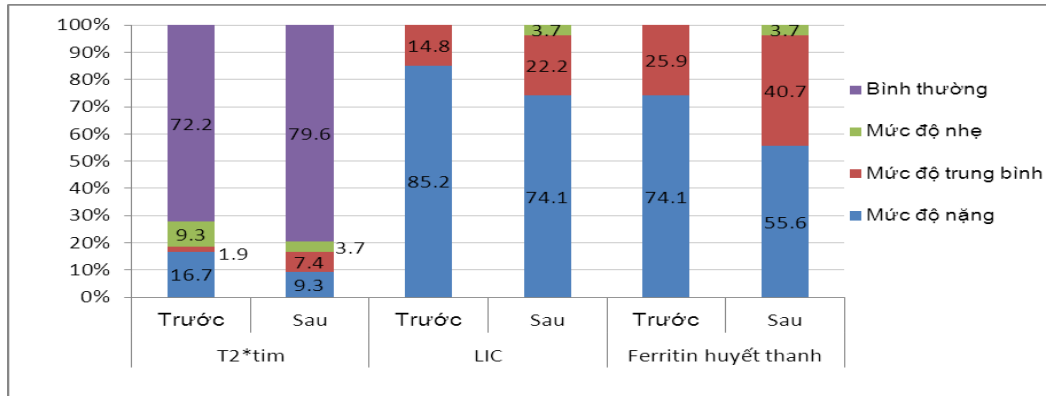
Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ BN thay đổi LIC sau 1 năm điều trị thải sắt thường xuyên (n = 54)

Nhận xét: Sau 1 năm điều trị thải sắt thường xuyên, có 48,1% BN có giảm sắt tại gan tốt.

Bảng 3.11. Giá trị trung bình các chỉ số đánh giá QTS trước và sau điều trị thải sắt 1 năm (n = 54)

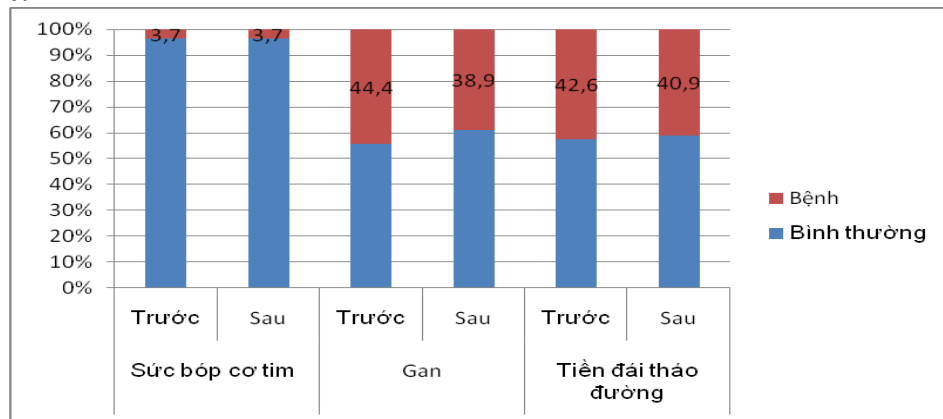
Chỉ số	Trước điều trị (1)	Sau điều trị (2)	Thay đổi	p (1),(2)
LIC (mg/g gan khô)	20,6 ± 5,2	18,2 ± 5,2	2,6 ± 5,2 (-9,2 đến 12,9)	< 0,01
T2*tim (ms)	29,8 ± 13,0	31,5 ± 15,7	-1,7 ± 11 (-41,2 đến 15,7)	< 0,01
Ferritin huyết thanh (ng/ml)	3562,2 ± 1627,6	2936 ± 1600,4	625,5 ± 1121,8 (-1823 đến 4556)	< 0,01

Nhận xét: Sau điều trị 1 năm, nồng độ sắt trong gan giảm trung bình 2,6 mg/g gan khô; ferritin huyết thanh giảm trung bình 625,5 ng/ml; T2* tim tăng trung bình 1,7 ms. Sự thay đổi các chỉ số đánh giá QTS trước và sau điều trị có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.



Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ các mức độ quá tải sắt trước và sau điều trị (n = 54)

Nhận xét: Sau 1 năm điều trị thải sắt thường xuyên, tỷ lệ BN bị quá tải sắt nặng ở tim giảm từ 16,7% xuống 9,3%; quá tải sắt nặng ở gan giảm từ 85,2% xuống 74,1%, ferritin huyết thanh mức độ nặng giảm từ 74,4% xuống 55,6%. Tỷ lệ BN không bị quá tải sắt ở tim tăng từ 72,2% lên 79,6%.



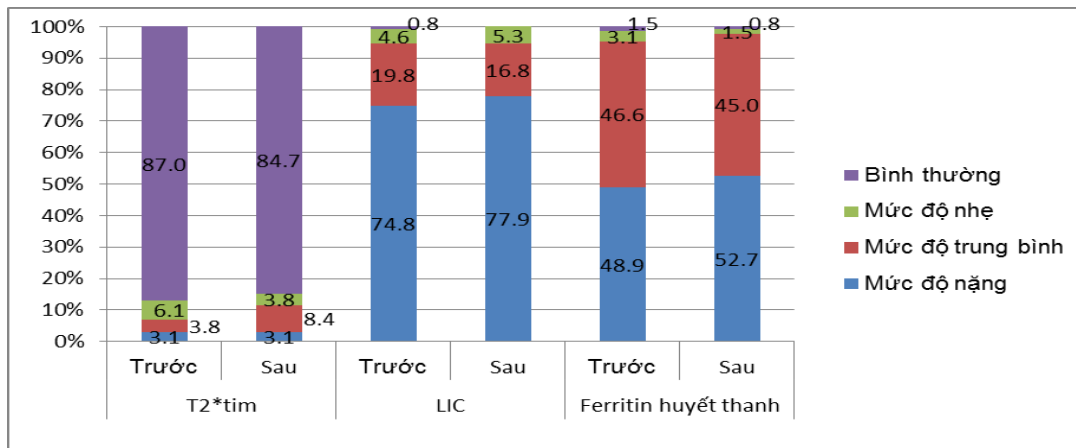
Biểu đồ 3.7. Tỷ lệ bệnh nhân có biến chứng tại các tổ chức trước và sau 1 năm điều trị thải sắt thường xuyên

Nhận xét: Sau điều trị thải sắt 1 năm, tỷ lệ BN bị giảm sức bóp cơ tim không thay đổi (3,7%); tỷ lệ BN bị xơ gan hoặc gan xơ hóa giảm từ 44,4% xuống 38,9%, sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$; tỷ lệ BN bị tiền đái tháo đường (HbA1C > 5,7%) giảm từ 42,6% xuống 40,9%, sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.12. Giá trị trung bình các chỉ số đánh giá QTS sau 1 năm không điều trị thải sắt thường xuyên (n = 131)

Chỉ số	Trước (1)	Sau (2)	p (1),(2)
LIC (mg/g gan khô)	18,6 ± 6,3	19,3 ± 6,3	< 0,001
T2*tim (ms)	34,1 ± 12,0	33,1 ± 13,5	< 0,001
Ferritin huyết thanh (ng/ml)	2929,8 ± 1720,6	3117,8 ± 1819,6	< 0,001

Nhận xét: Sau 1 năm không điều trị thải sắt thường xuyên, trong 131 BN giá trị LIC trung bình tăng từ 18,6 lên 19,3 mg/g gan khô; nồng độ ferritin huyết thanh tăng từ 2929,8 lên 3117,8 ng/ml và giá trị T2* tim giảm từ 34,1 xuống 33,1 ms. Các sự thay đổi này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.



Nhận xét: Sau 1 năm không được điều trị thải sắt thường xuyên, trong 131 bệnh, tỷ lệ bệnh nhân bị quá tải sắt tại tim tăng lên từ 13% lên 15,3%. Tỷ lệ bệnh nhân bị quá tải sắt nặng ở gan tăng từ 74,8% lên 77,9%. Tỷ lệ quá tải sắt nặng ferritin huyết thanh tăng từ 48,9% lên 52,7%.

Chương IV: BÀN LUẬN

4.1. Bàn luận về đặc điểm đột biến gen globin được xác định bằng Strip Assay tại Viện Huyết học Truyền máu Trung ương

4.1.1. Đặc điểm chung

Thalassemia là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường. Người bệnh là người có 2 đột biến trên 1 cặp nhiễm sắc thể. Người mang gen bệnh có 1 đột biến. Nếu cả bố mẹ đều mang gen bệnh thalassemia thì thai nhi có thể bị mắc bệnh thalassemia. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi dùng kit Globin Strip Assay để xác định đột biến gen globin cho 3 nhóm đối tượng có khả năng mang gen bệnh thalassemia gồm bệnh nhân thalassemia, người nghi ngờ mang gen bệnh thalassemia và sản phụ có mang gen bệnh thalassemia (chẩn đoán trước sinh). Cụ thể, có 146 sản phụ trong đó 46 sản phụ và chồng cùng mang gen bệnh α -thalassemia, 100 sản phụ có chồng cùng mang gen bệnh β -thalassemia. 50 bệnh nhân gồm 16 bệnh nhân α -thalassemia và 34 bệnh nhân β -thalassemia. 70 người nghi ngờ mang gen bệnh thalassemia gồm 41 người nghi mang gen α -thalassemia và 29 người nghi mang gen β -thalassemia (bảng 3.1).

4.1.2. Đặc điểm đột biến gen globin đã phát hiện được

4.1.2.1. Đặc điểm đột biến gen α -globin

Kết quả bảng 3.2 cho thấy trên 103 đối tượng ở 3 nhóm đã phát hiện được 123 alen có đột biến gen α -globin với 5 kiểu đột biến là SEA, HbCs, 3.7, 4.2 và đột biến Pakse. Trong đó đột biến SEA chiếm tỷ lệ cao nhất là 70,9%, tiếp đến là HbCs chiếm 15%, 3.7 chiếm 10,2%, có 2 alen đột biến Pakse. Trong 46 trường hợp chẩn đoán trước sinh bệnh α -thalassemia, kết quả 6 trường hợp không phát hiện đột biến (α/α) (13%), 21 trường hợp có 1 đột biến, trong đó 20 trường hợp là $--^{SEA}/\alpha\alpha$; 19 trường hợp có 2 đột biến, trong đó có 8 ca đồng hợp tử đột biến SEA ($--^{SEA}/--^{SEA}$) gây HbBart's, 9 trường hợp HbH (kiểu gen $--^{SEA}/\alpha^{Cs}\alpha$; $--^{SEA}/\alpha^{3.7}\alpha$, $--^{SEA}/\alpha^{4.2}\alpha$, $--^{SEA}/\alpha^{C.2\ delT}\alpha$), 1 trường hợp kiểu gen $\alpha^{Cs}\alpha/\alpha^{Cs}\alpha$ và 1 trường hợp kiểu gen $\alpha^{Cs}\alpha/\alpha^{3.7}$. Tỷ lệ các kiểu gen đột biến trong nghiên cứu này của chúng tôi cũng tương tự như

ngiên cứu của Nguyễn Khắc Hân Hoan và Ngô Diễm Ngọc. Hai trường hợp kiểu gen (α^+/α^+) là $\alpha^{Cs}\alpha/\alpha^{Cs}\alpha$ và $\alpha^{Cs}\alpha/\alpha^{3.7}$ là những đột biến có tỷ lệ thấp nên các trường hợp đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kiểu này rất hiếm gặp (chưa thấy trong báo cáo của tác giả Nguyễn Khắc Hân Hoan và Ngô Diễm Ngọc), biểu hiện lâm sàng của trường hợp này là nhẹ, do vậy mặc dù thai nhi có 2 đột biến nhưng chúng tôi đã tư vấn đề sản phụ giữ thai. Đến nay 2 trẻ đã trên 1 tuổi và không có biểu hiện thiếu máu.

Với 41 người nghi ngờ mang gen bệnh α -thalassemia, không có biểu hiện lâm sàng, được chẩn đoán dựa vào xét nghiệm có chỉ số hồng cầu nhỏ (MCV < 85 fl, MCH < 28 pg), thành phần HbA bình thường và HbA2 bình thường hoặc giảm nhẹ, có 37 trường hợp phát hiện được 1 đột biến, các đột biến đó gồm SEA, HbCs, 3.7 và 4.2. Trên 16 bệnh nhân α -thalassemia (HbH), đã xác định được 32 alen đột biến bao gồm 5 kiểu đột biến là đột biến SEA (50%), đột biến HbCs (28,1%), đột biến 3.7 (12,5%), đột biến Pakse (Ps) (6,3%) và đột biến 4.2 (3,1%). Kiểu gen của 16 bệnh nhân chia 2 nhóm: 11 BN (68,8%) có kiểu gen $--/\alpha^T\alpha$ (gồm $--^{SEA}/\alpha^{Cs}\alpha$ và $--^{SEA}/\alpha^{Ps}\alpha$) và 5 BN (31,2%) có kiểu gen $--/-\alpha$ (gồm $--^{SEA}/\alpha^{3.7}\alpha$ và $--^{SEA}/\alpha^{4.2}\alpha$). Đặc điểm lâm sàng có sự khác biệt rõ rệt giữa hai nhóm kiểu gen, nhóm kiểu gen $--/\alpha^T\alpha$ có Hb trung bình là $82,2 \pm 18,6$ g/l, những bệnh nhân này đôi khi phải truyền máu và nhóm kiểu gen $--/-\alpha$ có Hb trung bình là $97,4 \pm 14,7$ g/l, những bệnh nhân ở nhóm này thường không phải truyền máu (kết quả ở bảng 3.4). Tỷ lệ các kiểu gen của BN trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của tác giả Fucharoen Suthat năm 2009, trong 361 bệnh nhân α -thalassemia, kiểu gen $--^{SEA}/\alpha^{Cs}\alpha$ có tỷ lệ cao nhất chiếm 51%, tiếp đến là kiểu gen $--^{SEA}/\alpha^{3.7}\alpha$ chiếm 38%. Đặc biệt trong nghiên cứu này bằng α -Globin Strip Assay chúng tôi đã xác định được 2 BN có đột biến hiếm gặp là có đột biến là $--^{SEA}/\alpha^{Ps}\alpha$ (hình 3.1). Đột biến Pakse (Ps), là đột biến trên gen $\alpha 2$ tại vị trí kết thúc (TAA>TAT), được mô tả gặp ở người Thái Lan và Lào. HbH-Ps và HbH-Cs có biểu hiện lâm sàng giống nhau và dễ bị chẩn đoán nhầm với nhau nếu chỉ dựa vào tổng phân tích tế bào máu ngoại vi và phân tích thành phần huyết sắc tố.

4.1.2.2. Đặc điểm đột biến gen β -globin

Kết quả ứng dụng β -Globin Strip Assay để phát hiện đột biến gen β -globin trên 163 đối tượng ở bảng 3.3 cho thấy có 196 alen đột biến với 9 kiểu đột biến là Cd17, Cd41/42, Cd26, IVS1-1, -28, IVS2-654, Cd71/72, Cd95 và Cd8/9. Trong đó có 3 đột biến phổ biến nhất là Cd17 (30,6%), Cd41/42 (27,6%), Cd26 (24,5%). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác như: tác giả Trần Tuấn Anh năm 2016 trên 400 người bệnh và mang gen bệnh tại Viện huyết học - Truyền máu TW, tỷ lệ các đột biến hay gặp nhất là Cd17 (31,5%), Cd41/42 (27,2%) và Cd26 (29,9%), nghiên cứu của tác giả Ngô Diễm Ngọc 2015 trên các đối tượng ở Viện Nhi TW với tỷ lệ các đột biến hay gặp nhất theo thứ tự là Cd41/42 (31,2%), Cd17 (28,6%), Cd26 (23,2%), tác giả Nguyễn Khắc Hân Hoan năm 2013 tại BV Từ Dũ thấy tỷ lệ các đột biến hay gặp nhất theo thứ tự là Cd26 (45,4%), Cd17 (15,8%), Cd41/42 (13,6%).

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh β -thalassemia (bảng 3.3), có 32 thai nhi (32%) có 2 đột biến là sự phối hợp của 8 kiểu đột biến với các kiểu gen là: β^0/β^0 (16%), β^0/β^E (14%) và β^0/β^+ (2%). Tỷ lệ các kiểu gen của thai nhi trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh β -thalassemia của tác giả Ngô Diễm Ngọc và tác giả Nguyễn Khắc Hân Hoan. Kiểu gen của 32 thai nhi này đều sẽ gây biểu hiện bệnh mức độ trung bình nặng đến nặng cho trẻ sau khi ra đời nên các gia đình sản phụ đã quyết định đình chỉ thai.

Trong 29 người nghi ngờ mang gen bệnh β -thalassemia, không có biểu hiện lâm sàng, được chẩn đoán dựa vào xét nghiệm có chỉ số hồng cầu nhỏ (MCV < 85 fl, MCH < 28 pg); thành phần huyết sắc tố có HbF tăng (> 4%) và hoặc HbA₂ tăng (> 3,5%). 26 người đã xác định được 1 đột biến gen β -thalassemia, 3 người còn lại được giải trình tự gen β -thalassemia trong đó có 2 trường hợp đã xác định được mang đột biến -88 (bảng 3.5). Trong 34 BN, 29 người đã xác định có 2 đột biến với 6 kiểu gen là β^0/β^{0+} , β^0/β^E , β^0/β^+ , β^+/β^+ , β^+/β^E , β^E/β^E . Bệnh nhân có kiểu đột biến β^0/β^0 có Hb trung bình thấp nhất (70,9 g/l), kiểu đột biến β^E/β^E có Hb trung bình cao nhất (110 g/l). 5 BN chỉ phát hiện được 1 đột biến đã được giải trình tự gen β -thalassemia, trong đó có 3 BN đã xác định có thêm 1 đột biến là -88, -90 và Cd35 (bảng 3.5). Trong nghiên cứu này, bằng bộ kit β -globin Strip Assay, chúng tôi đã chẩn đoán được 1 BN có kiểu gen $\beta^{Cd8/9}/\beta^{IVS 1-1}$ (hình 3.2). Đột biến Cd8/9 (+G) là đột biến làm thay đổi trình tự nucleotide dẫn đến mất khả năng dịch mã (đột biến khung đọc – *Frameshift*) gây ra kiểu gen β^0 . Đột biến Cd8/9 (+G) được mô tả là đột biến gặp ở người Ấn Độ gốc Châu Á và ở người Nhật, hiếm gặp Đông Nam Á, chưa thấy được công bố ở Việt Nam trước đây.

4.2. Bàn luận về kết quả nghiên cứu ứng dụng MRI trong chẩn đoán và đánh giá hiệu quả điều trị quá tải sắt ở bệnh nhân thalassemia

4.2.1. Đặc điểm chung đối tượng nghiên cứu

Bệnh thalassemia có nhiều mức độ biểu hiện nặng nhẹ khác nhau tùy theo kiểu đột biến và sự phối hợp giữa các đột biến của gen tổng hợp chuỗi globin. Từ năm 2013, bên cạnh việc phân loại thalassemia theo cơ chế đột biến là α -thalassemia và β -thalassemia, phân loại theo mức độ nặng, trung bình và nhẹ dựa trên đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm thì Liên đoàn Thalassemia quốc tế còn phân loại thalassemia theo nguyên tắc điều trị truyền máu gồm thalassemia phụ thuộc truyền máu (transfusion dependent thalassemia – TDT) và thalassemia không phụ thuộc truyền máu (nontransfusion dependent thalassemia – NTD). Bảng 3.6 cho thấy 434 BN được nghiên cứu có độ tuổi từ 6-63 tuổi. Số lượng BN ở nhóm β -thalassemia/HbE là nhiều nhất có 284 chiếm 65,4%, nhóm β -thalassemia có 81 BN, chiếm 18,9%; nhóm α -thalassemia có 69 BN chiếm 15,9%, tỷ lệ các nhóm bệnh trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) là số lượng BN β -thalassemia/HbE gặp nhiều ở Đông Nam Á chiếm 66%. Nhóm phụ thuộc truyền máu (TDT) có 83 BN (19,1%), nhóm không phụ thuộc truyền máu (NTDT) gồm 351 BN (80,8%). Độ tuổi trung bình của nhóm TDT là 13,8 và lượng Hb trung bình khi vào viện của nhóm TDT là 64,3 g/l; Các chỉ số này ở nhóm NTDT là 28,2 tuổi và 74,5 g/l, sự khác biệt giữa hai nhóm về tuổi và Hb trung bình có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

4.2.2. Đặc điểm quá tải sắt tại các tổ chức

4.2.2.1. Đặc điểm và mối liên quan giữa các chỉ số đánh giá tình trạng QTS

Quá tải sắt là nguyên nhân chính gây nhiều biến chứng tại các tổ chức trong cơ thể, làm giảm chất lượng cuộc sống cũng như tuổi thọ của BN thalassemia. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng đồng thời cả 2 phương pháp chụp cộng hưởng từ gan và tim để xác định mức độ QTS trong gan và tim, và định lượng nồng độ ferritin huyết thanh.

Bảng 3.7 mô tả các mức độ QTS tại gan, tim và ferritin huyết thanh. Về ferritin huyết thanh, nhóm TDT có 81,9% QTS nặng, 18,1% QTS trung bình; nhóm NTDT có tỷ lệ QTS mức độ nặng là 49,9% và QTS mức độ trung bình là 45,9%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nồng độ ferritin huyết thanh trung bình của nhóm TDT là 4.229,8 ng/ml, nhóm NTDT là 2.909,9 ng/ml, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. Tác giả Taher A (2009) nghiên cứu ở BN β -thalassemia, ferritin huyết thanh là 3.356 ng/ml. Tác giả Nguyễn Thị Hồng Hoa nghiên cứu trên 30 BN TDT ở độ tuổi là 10 tuổi, nồng độ ferritin trung bình là 2.926 ng/ml.

Về nồng độ sắt trong gan (LIC), kết quả ở bảng 3.6 cho thấy có 398 BN bị QTS tại gan, chiếm 91,7%. Tỷ lệ các mức độ QTS nặng, trung bình, nhẹ và bình thường tại gan ở nhóm TDT lần lượt là 88,0%, 8,4%, 3,6% và 0%; các tỷ lệ này ở nhóm NTDT là 69,8%, 20,8%, 7,1% và 2,3%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nồng độ LIC trung bình ở nhóm TDT là 20,97 mg/g gan khô, cao hơn ở nhóm NTDT là 18,0 mg/g gan khô, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. Kết quả trong nghiên cứu này của chúng tôi cũng tương đồng với nghiên cứu của tác giả Taher A (2009) trên 233 BN β -thalassemia với LIC là 18 mg/g gan khô và tác giả Nguyễn Thị Hồng Hoa trên 30 BN TDT có LIC là 21 mg/g gan khô. Tỷ lệ chung BN bị QTS nặng ở gan là 73,3% cao hơn tỷ lệ QTS nặng tính bằng ferritin (56%). Điều này có thể được giải thích là do cơ chế chuyển hóa sắt trong cơ thể, gan là cơ quan dự trữ sắt chính của cơ thể, nên khi cơ thể có tình trạng dư thừa sắt thì lượng sắt này sẽ nhanh chóng được tích lũy tại gan nên gan bị QTS sớm và nặng.

Về tình trạng QTS tại tim, có 65 BN bị QTS tại tim (15%). Tỷ lệ BN bị QTS ở tim với các mức độ nặng, trung bình, nhẹ và bình thường ở nhóm TDT lần lượt 21,7%, 8,4%, 12% và 57,8%; các tỷ lệ này ở nhóm NTDT là 1,4%, 3,4% và 3,7% và 91,5%, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. Chỉ số T2* tim trung bình ở nhóm TDT là 24,0 ms, thấp hơn nhóm NTDT là 36,4 ms, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. Nghiên cứu của tác giả Ali T. Taher (2010) cho thấy chỉ số T2* tim ở nhóm BN TDT là 21,5 ms, ở nhóm BN NTDT là 47,3 ms. Tỷ lệ BN có QTS tại tim nói chung, cũng như tỷ lệ BN bị QTS mức độ nặng ở tim thấp hơn rất nhiều so với tỷ lệ BN có QTS tại gan và ferritin huyết thanh. Điều này được lý giải là: trong tế bào tim không có chức năng dự trữ sắt, còn tế bào gan có chức năng dự trữ sắt dưới dạng ferritin. Sắt chỉ bị tích lũy ở tim khi lượng sắt quá cao, transferrin đã bị bão hòa hết, khi đó ion sắt sẽ gắn không đặc hiệu với các protein khác trong huyết thanh như albumin, để được vận chuyển đến các tế bào tổ chức trong đó có tế bào cơ tim. BN nhóm NTDT có quá trình tích lũy sắt chậm, trong huyết thanh, transferrin vẫn là chất vận chuyển chính để đưa sắt đến tích lũy tại tế bào gan. BN

nhóm TDT có tốc độ tích lũy sắt nhanh, lượng sắt trong cơ thể tăng lên nhanh chóng gây bão hòa transferrin, ion sắt trong huyết thanh sẽ được các protein khác vận chuyển đến các tổ chức như tim, nội tiết.

Biểu đồ 3.1 mô tả mối tương quan giữa chỉ số ferritin huyết thanh và LIC ở hai nhóm BN TDT và NTDT. Ở cả hai nhóm BN, có mối tương quan thuận giữa ferritin huyết thanh và LIC mức độ trung bình ($p < 0,05$), tuy nhiên mức độ tương quan ở nhóm TDT ($r = 0,419$) chặt chẽ hơn so với nhóm NTDT ($r = 0,325$). Kết quả nghiên cứu này tương tự kết quả nghiên cứu của tác giả Taher AT năm 2013 và Pakbaz Z. năm 2007 khi so sánh mối tương quan giữa ferritin huyết thanh và LIC ở 2 nhóm bệnh TDT và NTDT. Biểu đồ 3.2 cho thấy có mối tương quan nghịch giữa ferritin huyết thanh và T2* tim ở mức độ trung bình ($r = - 0,365$, $p < 0,05$). Có mối tương quan nghịch giữa LIC và T2* tim ở mức độ trung bình ($r = - 0,313$, $p < 0,05$). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của tác giả Azarkeivan (2013) trên 156 BN β -thalassemia mức độ nặng, có mối tương quan thuận giữa ferritin huyết thanh và LIC với $r = 0,535$ và có mối tương quan nghịch giữa ferritin huyết thanh và T2* tim với $r = -0,361$, $p < 0,01$. Tác giả Pakbaz Z (2007) đã so sánh và thấy có mối tương quan thuận giữa ferritin huyết thanh và LIC ở nhóm BN TDT ($r = 0,87$) chặt chẽ hơn so với ở nhóm NTDT ($r = 0,32$).

Theo tác giả Tony S (2012) và Pakbaz Z (2007) thì ferritin huyết thanh không phản ánh được chính xác lượng sắt trong cơ thể ở BN thalassemia mức độ trung bình. Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cũng cho thấy, giữa ferritin huyết thanh và LIC và T2* tim có mối tương ở mức độ trung bình và yếu (biểu đồ 3.1, 3.2 và 3.3). Vì vậy, không thể dùng một chỉ số xét nghiệm ferritin huyết thanh để dự đoán chính xác được lượng sắt trong gan, tim ở BN được và ngược lại. Tuy nhiên, theo Liên đoàn thalassemia quốc tế (2008) cảnh báo, 70% BN có ferritin > 2500 ng/ml trong thời gian dài trên một năm sẽ có nguy cơ bị biến chứng tim mạch, trong khi ferritin < 1000 ng/ml sẽ không có nguy cơ này. Kết quả ở bảng 3.8 cho thấy, tỷ lệ BN bị QTS tại tim ở nhóm ferritin huyết thanh > 2500 ng/ml là 23,5%, cao gấp 5,6 lần so với nhóm ferritin huyết thanh ≤ 2500 ng/ml là 4,2%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Tương tự như vậy khi nghiên cứu mối liên quan giữa QTS tại tim với QTS nặng tại gan, tỷ lệ BN bị QTS tại tim ở nhóm BN có LIC > 15 mg/g gan khô là 18,5% cao gấp 3,6 lần so với nhóm có LIC < 15 mg/g gan khô là 5,2%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

4.2.2.1. Đặc điểm và mối liên quan giữa QTS và biến chứng do QTS ở BN thalassemia

Năm 2003, tác giả Wai đã đưa ra một chỉ số APRI (Aspartat Transferase to Platelet Ratio Index) để đánh giá mức độ xơ hóa gan của bệnh nhân viêm gan C, $APRI = [(AST/ULN)/Tiểu cầu \times 100]$. Để tránh bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi số lượng tiểu cầu sau cắt lách và tăng men gan do viêm gan virus, trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ phân tích chỉ số APRI ở những BN chưa cắt lách và có kết quả xét nghiệm HBV, HCV âm tính, có tất cả 181 BN thoả mãn đủ các điều kiện này. Kết quả ở bảng 3.9 thấy, LIC trung bình ở các nhóm BN bị xơ gan, xơ hóa gan và bình thường lần lượt là 18,9, 16,6 và 15,0 mg/g gan khô. Sự khác biệt giữa các nhóm có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Tác giả Olynyk JK, St Pierre TG năm 2005

đã nghiên cứu và so sánh nồng độ sắt trong gan với các độ xơ hóa gan bằng sinh thiết gan, từ kết quả nghiên cứu đó đã kết luận rằng nồng độ sắt cao trong gan có thể gây xơ gan. Tác giả C K Li và cộng sự (2001) nghiên cứu trên 100 BN thalassemia TDT thấy tỷ lệ gan xơ hóa và xơ gan là 44% trong đó xơ gan là 30%.

Giảm sức bóp cơ tim là một yếu tố tiên lượng nặng đối với BN thalassemia. Trong nghiên cứu này, trong 434 BN thalassemia có 20 BN bị giảm sức bóp cơ tim chiếm 4,6%. Tỷ lệ BN bị giảm sức bóp cơ tim trong nhóm 65 BN bị QTS tại tim là 12,3% cao gấp 3,7 lần so với nhóm 369 BN không QTS ở tim là 3,3%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,005$. Tác giả Quatre A (2014) thấy rằng, phân suất tống máu (ejection fraction - EF) trung bình là 57,6% ở nhóm bệnh nhân có T2* tim ≤ 20 ms, là 62,4% ở nhóm bệnh nhân có T2* tim > 20 ms, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Như vậy, từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, chỉ có xét nghiệm cộng hưởng từ tại tim (T2* tim) mới đánh giá được tình trạng QTS ở tim, từ đó mới tiên lượng được nguy cơ giảm sức bóp cơ tim ở BN thalassemia.

Kết quả ở biểu đồ 3.4, cho thấy tỷ lệ BN bị giảm các hormon tăng theo mức độ QTS tại tim. Khi không có QTS tại tim, tỷ lệ BN bị giảm hormon testosterone, FSH, LH, PTH và HbA1 $\geq 5,7\%$ lần lượt là 38,5%, 10,0%, 10,0%, 0,6% và 17,7%. Với mức độ QTS tại tim nặng, các tỷ lệ BN bị giảm các loại hormon testosterone, FSH, LH, PTH và HbA1 $\geq 5,7\%$ lần lượt là 77,8%, 62,5%, 50%, 9,5% và 65,2%. Kết quả nghiên cứu này chứng tỏ rằng, QTS là nguyên nhân quan trọng góp phần làm tăng tỷ lệ BN bị tổn thương các tuyến nội tiết và dựa vào mức độ QTS tại tim có liên quan đến mức độ giảm các hormon tuyến nội tiết.

4.2.3. Sự thay đổi tình trạng QTS sau 1 năm điều trị thải sắt

Việc điều trị thải sắt và theo dõi hiệu quả điều trị cho bệnh nhân là rất cần thiết và quan trọng. LIC là chỉ số được nhiều tác giả nghiên cứu sử dụng trong việc đánh giá hiệu quả điều trị thải sắt. Kết quả ở biểu đồ 3.5 cho thấy, trong 54 BN được điều trị thải sắt thường xuyên, có 48,1% BN có hiệu quả điều trị thải sắt tốt (LIC giảm > 3 mg/gan khô), 20,4% bệnh nhân LIC không thay đổi hoặc giảm nhẹ (LIC giảm < 3 mg/g gan khô), 31,5% BN có LIC tăng thêm sau điều trị 1 năm. Kết quả nghiên cứu của tác giả Ali Taher trên 233 BN β -thalassemia điều trị thải sắt bằng deferasirox trong 1 năm với liều trung bình 23,1 (12–29) mg/kg/ngày, thể tích máu đã truyền là 95 ml/kg/năm, có 57% bệnh nhân có hiệu quả điều trị sắt tốt. Tác giả Cohen (2008) nghiên cứu trên 541 bệnh nhân β -thalassemia mức độ nặng, kết quả cho thấy với liều thuốc deferasirox 20 mg/kg/ngày, lượng KHC đã nhận trung bình 134,4 ml/kg/năm, tỷ lệ đạt hiệu quả giảm nồng độ sắt trong gan là 46%. Kết quả nghiên cứu GPO-L-ONE ở Thái Lan (2013) trên 73 BN TDT được thải sắt bằng deferipron, chỉ có 45,2% bệnh nhân có hiệu quả điều trị thải sắt tốt.

Kết quả ở bảng 3.11 và biểu đồ 3.6 cho thấy, sau 1 năm điều trị, ở 54 BN được điều trị thải sắt thường xuyên, LIC giảm từ 20,6 mg/g gan khô xuống còn 18,2 mg/g gan khô, sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Ferritin huyết thanh giảm từ 3562,2 ng/ml xuống 2936,9 ng/ml, nồng độ ferritin huyết thanh giảm trung bình là 625,5 ng/ml, sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$; Nồng độ sắt trong tim cũng giảm có ý nghĩa, với T2* tim tăng từ 29,8 ms lên 31,5 ms và tỷ lệ BN bị

QTS nặng ở gan giảm từ 85,2% xuống 74,1%, QTS nặng ở tim đã giảm từ 16,7% xuống 9,3%.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích sự thay đổi các chỉ số phản ánh chức năng của các tổ chức bị ảnh hưởng do quá tải sắt trong cơ thể người bệnh. Kết quả ở biểu đồ 3.11 cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân bị giảm sức bóp cơ tim không thay đổi (3,7%). Tỷ lệ BN bị xơ gan/ gan xơ hóa giảm từ 44,4% xuống 38,9%; tỷ lệ BN bị tiền đái tháo đường ($HbA1C \geq 5,7\%$) giảm từ 42,6% xuống 40,9% sau 1 năm điều trị. Nghiên cứu của tác giả Pennell J (2012) trên 71 bệnh nhân thalassemia có quá tải sắt tại tim điều trị bằng deferasirox trong 3 năm, kết quả cho thấy nồng độ sắt trong tim giảm, nhưng phân suất tổng máu không thay đổi trong 18 tháng đầu điều trị. Nghiên cứu của tác giả Wu SF (2006) trên 15 BN thalassemia mức độ nặng, được điều trị bằng deferipron trong thời gian trung bình 3,3 năm, BN được xét nghiệm sinh thiết gan trước và sau thời gian điều trị. Kết quả cho thấy, tất cả BN đã giảm mức độ xơ gan và nồng độ sắt trong gan.

Bên cạnh nhóm BN được điều trị thải sắt thường xuyên, chúng tôi cũng tìm hiểu tình trạng QTS ở 131 BN đã không được điều trị thải sắt thường xuyên (vì hoàn cảnh cá nhân người bệnh không thể đi bệnh viện định kỳ).

Bảng 3.12 và biểu đồ 3.8 cho thấy, LIC tăng từ 18,6 lên 19,3 mg/g gan khô, tỷ lệ QTS nặng ở gan tăng từ 74,8% lên 77,9%, Ferritin huyết thanh tăng từ 2929,8 ng/ml lên 3117,8 ng/ml, tỷ lệ QTS nặng tăng từ 48,9% lên 52,7%. T2* tim giảm từ 34,1 ms xuống 33,1 ms, tỷ lệ QTS ở tim tăng từ 13% lên 15,3%. Như vậy, nếu bệnh nhân thalassemia không được điều trị thải sắt thường xuyên, sau 1 năm, tình trạng quá tải sắt tăng lên ở cả tim, gan và ferritin huyết thanh.

KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu và bàn luận ở trên, chúng tôi xin đưa ra một số kết luận sau:

1. Ứng dụng Strip Assay trong chẩn đoán đột biến gen bệnh thalassemia có nhiều ưu điểm, cụ thể:

- Đã ứng dụng thành công kỹ thuật Globin Strip Assay được trong xác định các đột biến gen bệnh thalassemia ở tế bào dịch ối thai nhi, bệnh nhân và người nghi ngờ mang gen bệnh thalassemia tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương.

- Kỹ thuật α và β -Globin Strip Assay có thể phát hiện được hầu hết các đột biến α hoặc β -globin hay gặp ở Việt Nam trong 1 lần thực hiện xét nghiệm. Tỷ lệ các đột biến phát hiện được ở các đối tượng nghiên cứu tại Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương, trên gen α -globin là SEA (70,9%), HbCs (15,0%), 3.7 (10,2%), (2,4%), Pakse (1,6%); trên gen β -globin là Cd17 (30,6%), Cd41/42 (27,6%), Cd26 (HbE) (24,5%), IVS1-1 (5,1%), -28 (4,6%), IVS2-654 (3,6%), Cd71/72 (3,1%), Cd95 (0,5%), Cd8/9 (0,5%).

- Kỹ thuật Globin Strip Assay đã phát hiện được một số đột biến hiếm và các kiểu đồng hợp tử đột biến hiếm gặp ở Việt Nam mà các xét nghiệm PCR thông thường không phát hiện được như: đột biến Hb Pakse trên gen α -globin, đột biến

Cd8/9 trên gen β -globin, đồng hợp tử HbC_s trên gen α -globin và đồng hợp tử -28 trên gen β -globin.

- Tuy nhiên, bộ kit Strip Assay chưa cho phép phát hiện được một số đột biến rất hiếm gặp ở Việt Nam và Đông Nam Á như: đột biến Cd35, đột biến -88 và -90 trên gen β -globin.

2. Kỹ thuật MRI được sử dụng hiệu quả trong chẩn đoán và theo dõi hiệu quả điều trị quá tải sắt ở bệnh nhân thalassemia, cụ thể:

- Kỹ thuật MRI dùng chỉ số LIC và T2* tim chẩn đoán chính xác mức độ quá tải sắt tại gan, tim và tiên lượng biến chứng tại các tổ chức do quá tải sắt gây ra, cụ thể có 98,8% bệnh nhân bị quá tải sắt tại gan, 15% bệnh nhân bị quá tải sắt tại tim.

- Tỷ lệ bệnh nhân bị quá tải sắt tại các tổ chức, sự tương quan giữa các chỉ số đánh giá quá tải sắt có sự khác nhau giữa các thể bệnh. Cụ thể, tỷ lệ bệnh nhân bị quá tải sắt mức độ nặng ở gan và quá tải sắt ở tim trong nhóm phụ thuộc truyền máu lần lượt là 88% và 44,2%; tỷ lệ này là 69,8% và 8,5% ở nhóm không phụ thuộc truyền máu. LIC và ferritin huyết thanh có mối tương quan thuận mức độ trung bình. LIC và T2* tim có mối tương quan nghịch mức độ yếu. T2* tim và ferritin có mối tương quan nghịch mức độ trung bình.

- Mức độ quá tải sắt có liên quan mật thiết với sự suy giảm chức năng của các cơ quan. Tỷ lệ bệnh nhân bị giảm sức bóp cơ tim là 12,3% ở nhóm có quá tải sắt tại tim, là 3,3% ở nhóm không bị quá tải sắt tại tim. Nồng độ sắt trong gan trung bình ở nhóm bệnh nhân bị xơ gan, gan xơ hóa và gan bình thường lần lượt là 18,9, 16,6 và 15 mg sắt/g gan khô. Tỷ lệ bệnh nhân bị tiền đái tháo đường ở nhóm quá tải sắt nặng tại tim và không quá tải sắt tại tim lần lượt là 65,2% và 17,7%.

- Kỹ thuật MRI dùng chỉ số LIC và T2* tim theo dõi sớm hiệu quả điều trị thải sắt trên bệnh nhân thalassemia. Sau 1 năm điều trị, nồng độ sắt trong gan giảm trung bình 2,6 mg sắt/g gan khô, T2* tim tăng 1,7 ms, ferritin huyết thanh giảm 625 ng/ml. Tương ứng là tỷ lệ bệnh nhân bị gan xơ hóa giảm 5,5% (từ 44,4% xuống 38,9%) và tỷ lệ bệnh nhân tiền đái tháo đường giảm 1,7% (từ 42,6% xuống 41,9%).

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu và phân tích ở trên, chúng tôi xin được đề xuất một số kiến nghị:

1. Nên xây dựng bộ panel với những đột biến phổ biến cho từng khu vực, quốc gia để nâng cao khả năng phát hiện đột biến, giảm chi phí, thời gian.

2. Cần thực hiện chụp cộng hưởng từ gan, tim cho bệnh nhân thalassemia định kỳ 6 - 12 tháng/lần để chẩn đoán sớm, chính xác mức độ quá tải sắt và theo dõi hiệu quả điều trị thải sắt cho từng người bệnh.

3. Nên quan tâm và tạo điều kiện thuận lợi nhiều hơn nữa để tất cả bệnh nhân thalassemia được điều trị thải sắt thường xuyên.

4. Cần tiếp tục nghiên cứu về hiệu quả điều trị quá tải sắt ở bệnh nhân thalassemia trong thời gian dài hơn và trên nhiều nhóm bệnh nhân thalassemia.

INTRODUCTION TO DOCTORAL THESIS

1. Necessity of the thesis

Thalassemia is one of a group of genetic blood disorders referred to as hemoglobinopathies. These disorders are among the most common hereditary diseases worldwide: around 7% of the global population carry an abnormal hemoglobin gene. Patients with severe thalassemia can not make normal red blood cells and do not produce enough hemoglobin. This leads to severe anemia, with increasing iron absorption and accumulate iron in the body, consequences such as retarded growth, bone deformities and reduced levels of energy. In the absence of appropriate medical care, causing various complications in liver, heart and endocrines which affect to living quality and life expectancy, die at a young age.

Thalassemia is preventable and curable. Thalassemia prevention is not giving birth to infants with this disease. In order to prevent from thalassemia, it is necessary to identify correctly mutations and clinical characteristics of mutations causing thalassemia. Appropriate treatment by transfusion and iron chelation will help thalassemia patients having nearly normal life.

In Vietnam, the National Thalassemia prevention programme has not put into practice. However, in 2016, Ministry of Health approved the protocol on thalassemia diagnosis and treatment.

2. Objectives

1. Study on characteristics of the globin gene mutation by Strip Assay technique at National Institute of Hematology and Blood Transfusion period 2013 - 2016;

2. Evaluation of the change in indicators of iron overload by MRI in thalassemia patients receiving iron chelating.

3. Practical signification and new contributions of the thesis

Scientific contributions:

- Successful implement and application of Globin Strip Assay technique in the globin gene mutation diagnosis for people carrying Thalassemia genes;
- Successful application of MRI in diagnosis of the iron overload in liver, heart, which helps predict complications in liver, heart and endocrine in thalassemia patients.

Practical signification of the thesis:

- The identification of the globin gene mutation and clinical characteristics of mutations plays a significant role in thalassemia diagnosis and prevention.
- The diagnosis of the iron overload in liver, heart in thalassemia patients which helps doctor to choose the appropriate therapy as well as timerly consultants in order to prevent from severe complications, contributing to improve the patients' living quality.

4. The structure of the thesis

The thesis consist of 145 pages, including: back ground (2 pages), literature overview (34 pages), study objects and methods (25 pages), findings (33 pages), discussion (48 pages), conclusions (2 pages), recommendations (1 page).

The thesis consits of 47 tables, 13 charts, 1 diagram, 10 picture. Among 154 reference documents, there are 128 English documents, 28 Vietnamese documents, the publication date almost within recent 10 years. Appendix includes documents, pictures of globin gene mutattion tests , picture of liver, heart MRI, list of patients, samples of study records.

Chapter I: LITERATURE OVERVIEW

1.1. Thalassemia disease

The severity of thalassemia is usually related to the degree of imbalance between α - and non- α -globin chain synthesis.

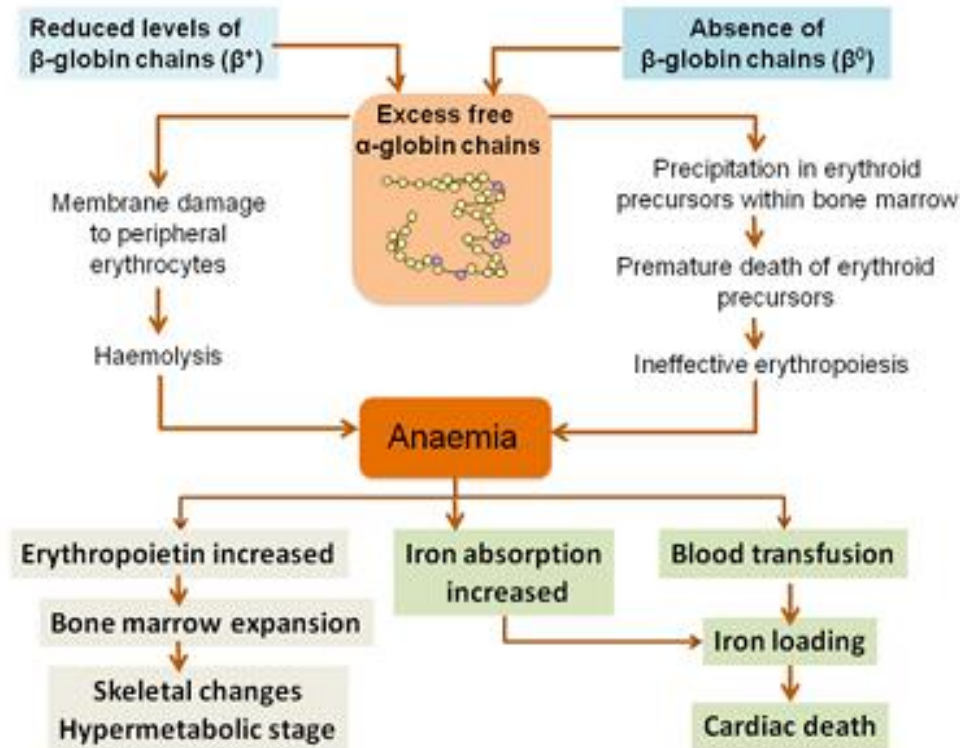


Figure 1.1. The pathophysiology of β -thalassemia

1.2. The globin gene mutation and identifying methods

The globin gene's size is small, includes 3 exons and 2 introns. The performance of globin gene is controlled through activities of promoter, enhancer and silencer region on each globin gene and in sequencing. The order of nucleotide decides Hb type. Any changes in nucleotides such as loss, addition, alternation on the globin gene cause abnormal mRNA, resulting in severities of thalassemia.

1.2.1. α -globin gene and α -globin gene mutation

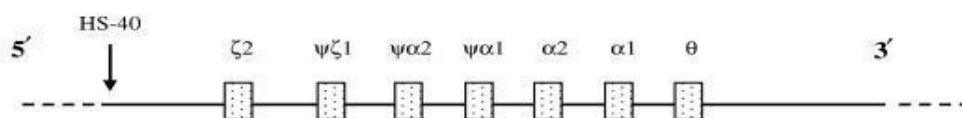


Figure 1.2. The structure of α -globin gene

The α -globin gene cluster locates in the short arm of chromosome 16 (16p13.3), consists of 3 functional genes ζ , $\alpha 1$, $\alpha 2$ and 4 pseudogenes $\Psi\zeta 1$, $\Psi\alpha 1$, $\Psi\alpha 2$, θ (figure 1.2). The length of gene $\alpha 1$ is 840 bp and gene $\alpha 2$ is 830 bp.

α -Thalassaemia is usually caused by α -globin gene mutations that either reduce (α^+) or completely abolish (α^0) the production of α -globin chains by the affected allele. α -

thalassaemia is most frequently caused by deletions that remove part or all of the α -globin gene cluster. Less commonly, the mutations are nucleotide changes within either of the duplicated α -globin genes (the so-called nondeletion determinants. Mutations causing α -thalassaemia include delete and nondelete mutations. 2 types of delete mutation are large deletion ($\alpha 1$ and $\alpha 2$ gen deletion – genotype: --) causing α^0 -thalassaemia and small deletion ($\alpha 1$ or $\alpha 2$ gen deletion – genotype: $-\alpha$) causing α^+ -thalassaemia. At present, more than 300 α -globin gen mutations have been identified, delete mutations contributes about 90%. Nondelete mutations occur at one or some nucleotides which lead to synthesis abnormal α -globin chain (genotype: $\alpha^T\alpha$ or $\alpha\alpha^T$), we currently know of 69 point mutations that alter gene expression, referred to as nondeletional forms of α -thalassaemia (denoted $\alpha^T\alpha$ or $\alpha\alpha^T$ depending on whether the $\alpha 2$ or $\alpha 1$ gene is affected).

1.2.2. β -globin gen and β -globin gen mutations

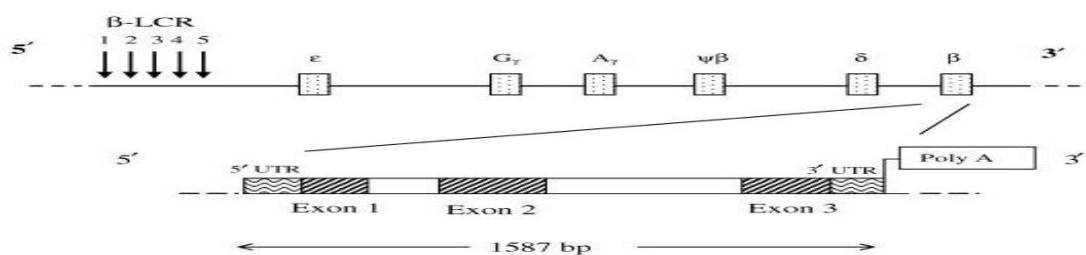


Figure 1.3. The structure of β -globin gene

β -globin gen cluster located in the short arm of chromosome 11 (11p15.5) with the length of 60 kilobases (kb) consists of 5 functional genes $\epsilon / \gamma G / \gamma A / \delta / \beta$ (figure 1.3). β -globin gen consist of 626 base pair (bp) in 3 exons (exon 1 - 142 bp, exon 2 - 223 bp and exon 3 - 261 bp). Between 3 mutations are intron 1 (130 bp) and intron 2 (850 bp).

β -globin mutations that completely inactivate the β gene resulting in no β -globin production cause β^0 -thalassaemia. Other mutations allow the production of some β globin, and depending on the degree of quantitative reduction in the output of the β chains, are classified as β^+ - or β^{++} - (“silent”) thalassaemia; Point mutations in β -globin gen lead to synthesis abnormal β -globin chain cause variant Hb such as HbE, HbD... At present, more than 200 β -globin gen were identified, almost are point mutations. Mutations occur in β -globin gen contribute more than 75% among mutations in non α -globin gen cluster.

Globin gene mutations have unique characteristics and distribute differently in regions and countries.

1.2.3. Methods on identifying the globin gene mutation

- Gap-PCR;
- Multiplex ligation dependent probe amplification assay – MLPA;
- Restriction enzyme -RE;
- Amplification refractory mutation system - ARMS-PCR;
- Reverse Dot Blot;
- Reverse hybridization - kit Strip Assay;
- Sequencing

1.3. The iron overload in thalassaemia patients and evaluation methods

1.3.1. The iron overload in thalassaemia patients

The iron overload in thalassemia patients is the consequence of multi blood transfusions and the increase in iron absorption from gut. The status of chronic hypoxia and hyper erythropoiesis in bone marrow which inhibit the hepcidine synthesis in the liver. The decrease in hepcidin stimulates the iron absorption from gut. In transfusion dependent patients (TDT), because of regular blood transfusions (every 2- 5 weeks) from an early age, the patients suffer the iron overload after receiving 10 – 20 units of red cell. Therefore, the main cause of the iron overload in TDT is blood transfusion, which means that without appropriate iron chelating, the patients will suffer from heavy iron overload from an early age. Regarding transfusion independent patients, the main cause of the iron overload is the increase iron absorption from gut. The procedure of iron accumulation happens slowly daily. After 15 years, if patients do not receive iron chelating therapy, the amount of accumulated iron may do harm to body organs.

When serum iron increases more than 10 times, transferrin become saturated, iron will combine to other protein such as albumin, citrate, amino acid and glucose. The cells as liver, heart, endocrine prefer to receive iron from non transferrin – iron. Excess iron is deposited in parenchymal cells of the liver, heart, pancreas, pituitary gland, and parathyroid gland. When iron overload results from the increased catabolism of erythrocytes (in cases of transfusion iron overload), iron accumulates in reticuloendothelial macrophages first and only later spills over into parenchymal cells. Parenchymal iron loading is particularly dangerous, because it leads to tissue damage and fibrosis. Which increase microorganisms' activities, lead to increase risk of infection and cancer. According to many researches, without the iron chelating treatment, the iron overload accounts for 70% of causes of death in thalassemia patients.

1.3.2. Methods on evaluation of iron overload

- Serum ferritin;
- Liver biopsy;
- MRI in liver by MGRE T2*;
- MRI in heart by MGRE T2*;

Chapter II: STUDY OBJECTS AND METHODS

2.1 Study objects:

Patients, people getting on thalassemia at National Institute of Hematology and Blood transfusion (NIHBT) in period from August 2013 to December 2016, include:

Group 1: 266 people were at risk of having globin gen mutation consist 146 pregnant thalassemia carriers (pre antenatal diagnosis), 50 thalassemia patients and 70 suspect thalassemia carriers had been tested in globin gen by Globin Strip Assay kits.

Selective criteria:

- Pregnant women in Mid-second trimester (16 – 20 weeks), couples were diagnosed having globin gen mutations

- Thalassemia patients at NIHBT were diagnosed by clinical symptoms with chronic anemia, chronic hemolysis; Cell blood count: hypochromic and micro red cells ; Hb typing:

HbH in α -thalassemia, high percentage of HbF (> 4%) and/or HbA2 (> 3,5%) in β -thalassemia;

- Suspect thalassemia carriers are healthy people, Cell blood count: hypochromic and micro red cells (MCV < 85, MCH < 28); Hb typing: high prevalence of HbF (> 4%) and/or HbA2 (> 3,5%) in β -thalassemia, normal range percentage of Hb type or low HbA2 in α -thalassemia;

- Participants were willing to join in study.

Exclusion criteria:

- Suspect thalassemia carriers had co-other conditions such as iron deficiency, infectious or malignance;

- The pregnant women had indication of foetal sampling (according to obstetricians)

Group2: 434 thalassemia patients were implemented MRI test to evaluate iron overload in liver and heart. Follow observation in 1 year of 54 thalassemia patients with regular iron chelating therapy and 131 thalassemia patients without regular iron chelating therapy, assessment of status of iron overload and complication caused by iron overload before and after treatment.

Selection criteria:

- Patients are diagnosed with thalassemia;

- Patients comply with the intructions when implemented MRI;

- Patients or parents of pediatrical patients agreed on carrying out a test.

Exclusion criteria

- Patients were acute or chronic infectious;

- Patients who were pregnant;

- Patients had congenital heart diseases;

- Patients had acute hepatitis;

- Patients had metal equipment in the body.

2.2 Study methods

2.2.1. Study design

- Cross-sectional descriptive, prospective study in combination with clinical trial, following up patients with iron chelating therapy.

2.2.2. Sampling method

Convenience and purposive sampling was used.

2.2.3. Study data

- *General information, weigh, clinical symptoms;*

- *Laboratory criteria:* Blood cell count (Hb, MCV, MCH, platelet); Hb type; Globin gen mutaion;

Plasma iron, ferritin, hepatic enzymes; FT4, TSH, LH, FSH, testosterone, PTH, HbA1C; prothrombin; heart rate, ejection fraction.

- *Treatment criteria*: iron chelator dose, red cell concentration volume.

2.2.4. Study contents

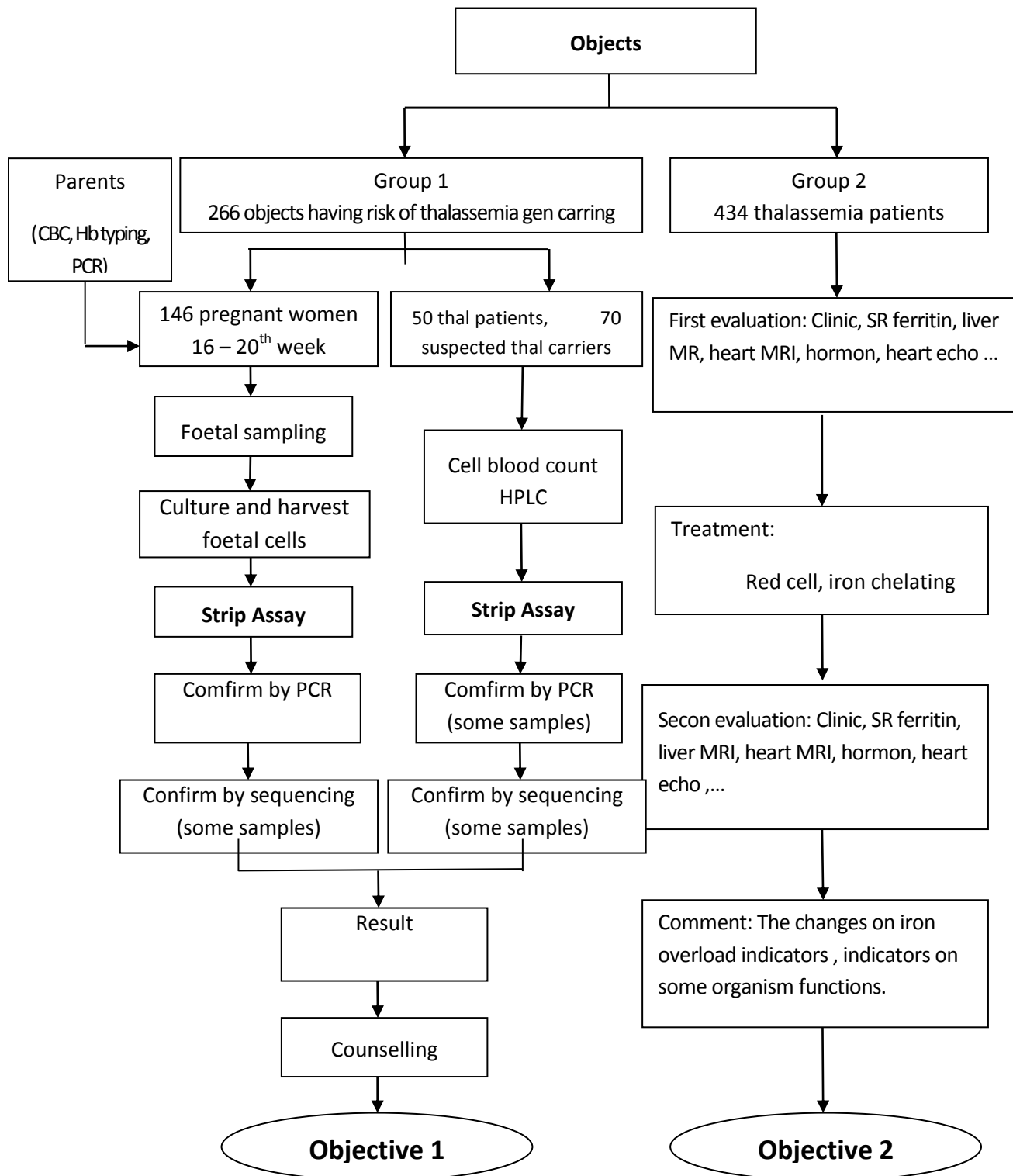
- Identification of α -globin gene, β -globin gene mutations; Hematological characteristics of globin gene mutations;
- Evaluation of the iron overload in liver, heart. Found the relationships of iron overload in different types of thalassemia disease. Found the relationship between severities of iron overload with complications of heart, liver, endocrine glands. Evaluation of the change of iron overload after 1 year under observation.

2.2.5. Data collection and processing method

Data management and processing by SPSS 16.0, excel.

2.2.6. Study diagram

Study diagram



Chapter III: STUDY RESULTS

3.1. Identification of globin gen by Globin Strip Assay kits

3.1.1. Features of objects in group 1

Table 3.1. Characteristics of study objects

Study objects	α -globin Strip Assay	β -globin Strip Assay	Total
Pregnant women (pre antenatal diagnosis)	46	100	146
Thalassemia patients	16	34	50
Suspect thalassemia carriers	41	29	70
Total	103	163	266

266 people were risk of carrying the globin gene mutations included 146 pregnant women (couples were diagnosed to be thalassemia carries), 50 thalassemia patients and 70 normal people who are suspected to carry the thalassemia gene.

3.1.2. Characteristics of the globin gene mutation

Table 3.2. α -globin gen mutations

No	Prenatal diagnosis		Patients		Suspected thalassemia carriers		Sum of mutated alleles	
	Genotype	n (%)	Genotype	n (%)	Genotype	n (%)	Allele	n (%)
1	-- ^{SEA} / -- ^{SEA}	8 (17,4%)	-- ^{SEA} / α^{Cs}	9(56,3%)	-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$	29(70,7%)	-- ^{SEA}	90 (70,9%)
2	-- ^{SEA} / α^{Cs}	2 (4,3%)	-- ^{SEA} / α^{Ps}	2(12,5%)	α^{Cs} / $\alpha\alpha$	4(9,8%)	HbCs	19 (15%)
3	-- ^{SEA} / $\alpha^{3.7}$	5 (10,9%)	-- ^{SEA} / $\alpha^{3.7}$	4(25%)	$\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$	3(7,3%)	3.7	13(10,2%)
4	-- ^{SEA} / $\alpha^{4.2}$	1 (2,2%)	-- ^{SEA} / $\alpha^{4.2}$	1 (6,3%)	$\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$	1(2,4%)	4.2	3 (2,4%)
5	α^{CS} / α^{CS}	1 (2,2%)			$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	4(9,8%)	HbPs	2 (1,6%)
6	α^{CS} / $\alpha^{3.7}$	1 (2,2%)						
7	-- ^{SEA} / α^{C2dT}	1 (2,2%)						
8	-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$	20 (43,5%)						
9	α^{CS} / $\alpha\alpha$	1 (2,2%)						
10	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	6 (13,0%)						
		46 (100%)		16 (100%)		41 (100%)		127 (100%)

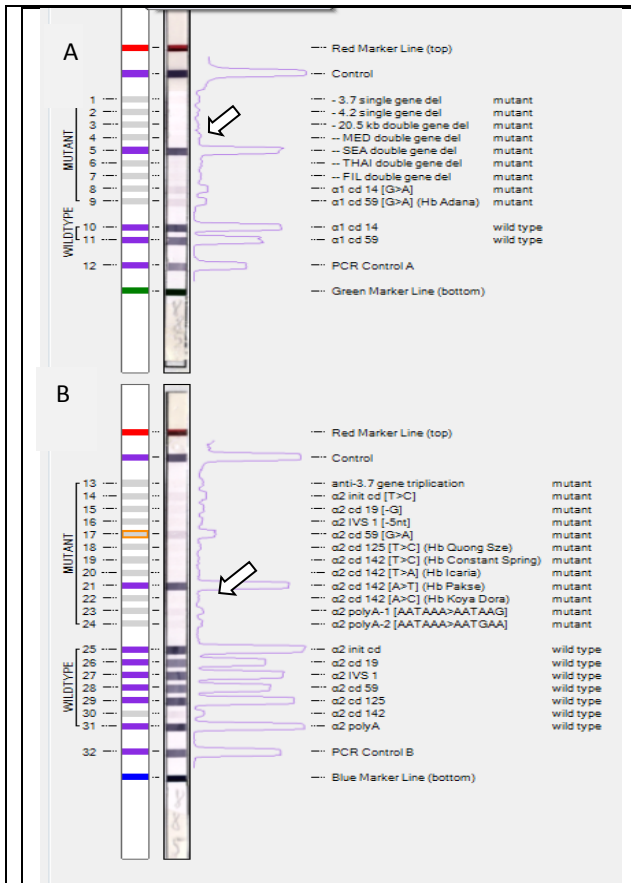
(*)C2 delT was identified by single PCR.

Of the 103 subjects, 127 mutant alleles were detected with 5 mutations in which the SEA mutation was the highest (70.9%). There were two alleles with rare mutation (HbPs). In 46 cases of prenatal, there were 6 cases (13%) without mutation, 21 cases with 1 mutation (45.7%), 19 cases with 2 mutations (41, 3%). 8 cases with Hb Bart's due to homozygous SEA (- SEA / SEA).

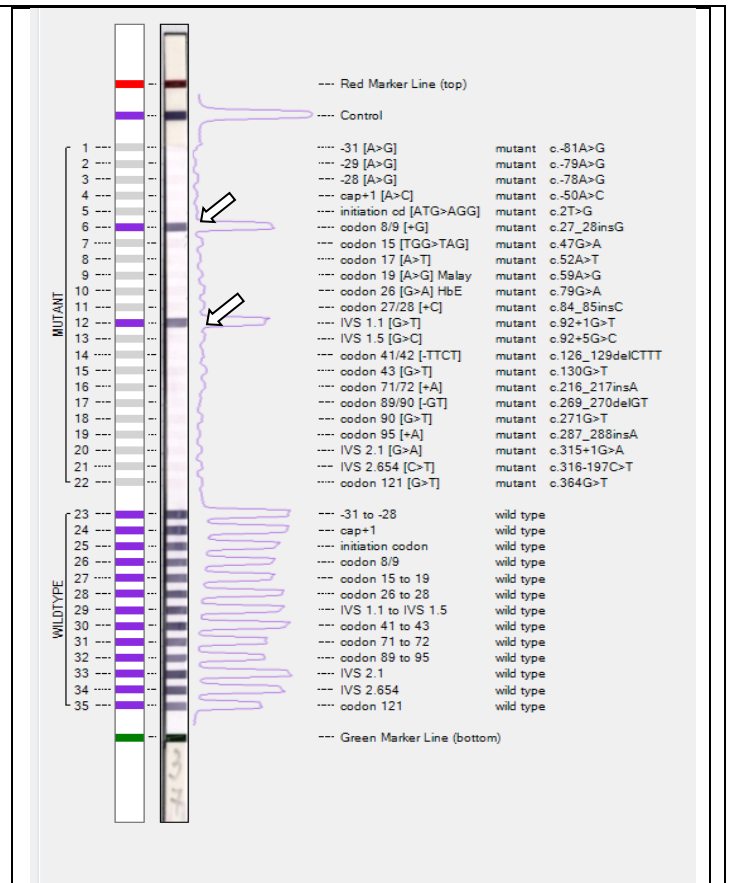
Table 3.3. β -globin gen mutations

No	Prenatal diagnosis		Patients		Suspected thalassemia carriers		Sum of mutated alleles	
	Genotype	n (%)	Genotype	n (%)	Genotype	n (%)	Genotype	n (%)
1	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd26}$	10 (10%)	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd26}$	6 (17,6%)	$\beta^{Cd41/42}/\beta$	10 (34,5%)	Cd17	60 (30,6%)
2	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd41/42}$	7 (7%)	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd41/42}$	2 (5,9%)	β^{Cd17}/β	9 (31%)	Cd41/42	54 (27,6%)
3	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{Cd41/42}$	5 (5%)	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{Cd26}$	3 (8,8%)	β^{Cd26}/β	3 (10,3%)	Cd26	48 (24,5%)
4	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{Cd26}$	4 (4%)	$\beta^{Cd71/72}/\beta^{Cd26}$	2 (6,9%)	β^{IVS1-1}/β	2 (6,9%)	IVS1-1	10 (5,1%)
5	β^{Cd17}/β^{-28}	2 (2%)	$\beta^{IVS1-1}/\beta^{Cd26}$	3 (8,8%)	$\beta^{IVS2-654}/\beta$	2 (6,9%)	-28	9 (4,6%)
6	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd17}$	1 (1%)	$\beta^{IVS2-654}/\beta^{Cd26}$	3 (8,8%)	β/β	3 (10,3%)	IVS2-654	7 (3,6%)
7	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd71/72}$	1 (1%)	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{Cd41/42}$	1 (2,9%)			Cd71/72	6 (3,1%)
8	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{IVS2-654}$	1 (1%)	$\beta^{Cd17}/\beta^{Cd95}$	1 (2,9%)			Cd95	1 (0,5%)
9	$\beta^{Cd41/42}/\beta^{IVS1-1}$	1 (1%)	β^{Cd17}/β^{-28}	1 (2,9%)			Cd8/9	1 (0,5%)
10	β^{Cd17}/β	18 (18%)	$\beta^{Cd17}/\beta^{IVS1-1}$	1 (2,9%)				
11	β^{Cd26}/β	10 (10%)	$\beta^{IVS1-1}/\beta^{IVS1-1}$	1 (2,9%)				
12	$\beta^{Cd41/42}/\beta$	11 (11%)	$\beta^{Cd71/72}/\beta^{IVS2-654}$	1 (2,9%)				
13	β^{-28}/β	2 (2%)	$\beta^{Cd8/9}/\beta^{IVS1-1}$	1 (2,9%)				
14	$\beta^{Cd71/72}/\beta$	2 (2%)	β^{-28}/β^{Cd26}	1 (2,9%)				
15	β/β	25 (25%)	β^{-28}/β^{-28}	1 (2,9%)				
16			$\beta^{Cd26}/\beta^{Cd26}$	1 (2,9%)				
17			β^{-28}/β	1 (2,9%)				
18			β^{Cd26}/β	1 (2,9%)				
19			$\beta^{Cd41/42}/\beta$	3 (8,8%)				
	Sum	100 (100%)		34 (100%)		29 (100%)		196 (100%)

Of the 163 subjects, 196 mutant alleles were detected with 9 mutations in which the Cd17 mutation was the highest (30.6%). There was 1 allele with rare mutation (Cd8/9). In 100 cases of prenatal, there were 25 cases (25%) without mutation, 43 cases with 1 mutation (43%), 32 cases with 2 mutations (32%).



The result of DNA examination of Nguyen Ha V, code 14015271
Image 3.1. Image of $--^{SEA}/\alpha^{Pakse}$ α mutation on α -Globin Strip Assay kit



The result of DNA examination of patient Tran Duc Q, code 16010465
Image 3.2. Image of $\beta^{cd89}/\beta^{IVS1-1}$ mutation on β -Globin Strip Assay kit

Table 3.4. Hb average in different genotype of thalassemia

	Number of patients	Hb (g/l) (X ± SD)
α -thalassemia	16	
$--^{SEA}/\alpha^T\alpha$	11	82.2 ± 18.6
$--^{SEA}/-\alpha$	5	97.4 ± 14.7
β -thalassemia	29	
β^0/β^0	08	70.9 ± 17.5
β^0/β^E	18	75.8 ± 14.6
β^0/β^+	02	71 - 74
β^+/β^+	02	87
β^+/β^E	01	89
β^E/β^E	01	110

Among α -thalassemia, Hb average of patients with genotype of $--^{SEA}/\alpha^T\alpha$ were lower than which of genotype of $--^{SEA}/-\alpha$. Among β -thalassemia, Hb average of patients with genotype of β^0/β^0 was the lowest. The highest Hb was in genotype of β^E/β^E (110 g/l).

Table 3.5. β -globin gene mutations identified by β -globin Strip Assay and sequencing

No	Method	
	β -globin Strip Assay	β -globin gen sequencing
1	$\beta^{\text{Cd41/42}}/\beta$	$\beta^{\text{Cd41/42}}/\beta^{-88}$
2	β^{-28}/β	β^{-28}/β^{-90}
3	$\beta^{\text{Cd26}}/\beta$	$\beta^{\text{Cd26}}/\beta^{\text{Cd35}}$
4	$\beta^{\text{Cd41/42}}/\beta$	$\beta^{\text{Cd41/42}}/\beta$
5	$\beta^{\text{Cd41/42}}/\beta$	$\beta^{\text{Cd41/42}}/\beta$
6	β/β	β^{-88}/β
7	β/β	β^{-88}/β
8	β/β	β/β

3 β -thalassemia patients (numbered 1,2,3) were discovered to have 1 mutation by β -globin Strip Assay and 2 mutations by sequencing. The addition mutations were -88, -90 and Cd35. 2 suspected β -thalassemia carriers (numbered 6,7) were identified to have 1 more mutation by sequencing method, which was -88.

3.2. Evaluation iron overload in thalassemia patients by MRI

3.2.1. Features of objects in group 2

Table 3.6. Characteristics of study objects (n = 434)

Group	Thalassemia			Total	Age (X \pm SD)	Hb (g/L) (X \pm SD)
	α -thal	β -thal	β -thal /HbE			
TDT (1)	0	53 (63.9%)	30 (36.1%)	83 (191%)	13.8 \pm 6.0 (7 - 34)	64.3 \pm 15.8
NTDT (2)	69 (19.7%)	28 (8.0%)	254 (72.3%)	351 (80.8%)	28.2 \pm 11.7 (6 - 63)	74.5 \pm 13.7
Total	69 (15.9%)	81 (18.9%)	284 (65.4%)	434 (100%)	24.4 \pm 12.2	72.5 \pm 14.7
					p(1)(2) < 0.001	p(1)(2) < 0.001

434 thalassemia patients were in 3 groups: 69 (15.9%) α -thalassemia, 81 (18.9%) β -thalassemia and 284 (65.4%) β -thalassemia/HbE. 83 TDT patients (19.1%) had aging average of 13.8 and Hb average of 64.3 g/l. 351 NTDT patients (80.8%) had aging average of 28.2 and Hb average of 74.5g/l, there were significant difference in aging and Hb between TDT and NTDT, p < 0.05.

3.2.2. Features of iron overload indicators

Table 3.7. Iron overload indicators in TDT and NTDT patients

Indicators	Group	Iron overload severity				Total	Average	p
		Non	Mild	Moderate	Severe			
Serum Ferritin	TDT (1)	0 (0%)	0 (0%)	15 (18.1%)	68 (81.9%)	83 (100%)	4229.8 \pm 1839.6	p <0.01

(ng/ml)	NTD T (2)	3 (0.9%)	12 (3.4%)	161 (45.9%)	175 (49.9%)	351 (100%)	2909.9± 1678.7	
	Sum	3 (0.7%)	12 (2.8%)	176 (40.5%)	243 (56%)	434 (100%)	3162.3± 1787.6	
LIC (mg/g dry weight)	TDT (1)	0 (0%)	3 (3.6%)	7 (8.4%)	73 (88%)	83 (100%)	21.0±6.0	p <0.01
	NTD T (2)	5 (14%)	28 (8%)	73 (208%)	245 (69.8%)	351 (100%)	18.0±7.0	
	Sum	5 (1.2%)	31 (7.1%)	80 (18.4%)	318 (73.3%)	434 (100%)	18.6±6.9	
Heart T2* (ms)	TDT (1)	48 (57.8%)	10 (12%)	7 (8.4%)	18 (21.7%)	83 (100%)	24.0 ± 14.6	p <0.01
	NTD T (2)	321 (91.5%)	13 (3.7%)	12 (3.4%)	5 (1.4%)	351 (100%)	36.4 ± 13.3	
	Sum	369 (85%)	23 (5.3%)	19 (4.4%)	23 (5.3%)	434 (100%)	34.1 ± 14.4	

Average serum ferritin was 3162.3 ng/ml, 56% patients had SF over 2500 ng/ml in total, 81.6% in TDT group and 49.9% in NTDT. Average LIC was 18 mg/g, 73.3% patients had iron overload in liver in total, 88% in TDT group and 69.8% in NTDT group. The difference was significant, $p < 0,05$ (test χ^2).

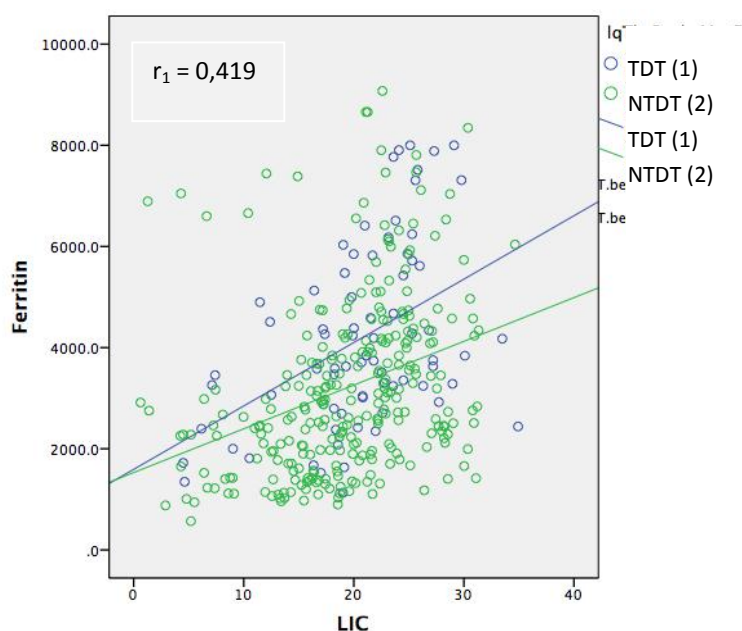


Figure 3.1. The correlation between serum ferritin and LIC in TDT and NTDT ($n =$

Linear regression analysis of serum ferritin (SF) versus liver iron concentration (LIC) in both TDT patients and NTDT patients. There was a moderate positive correlation between serum ferritin and LIC in both TDT and NTDT ($r_1 = 0.419$, $r_2 = 0.325$), $p < 0.05$.

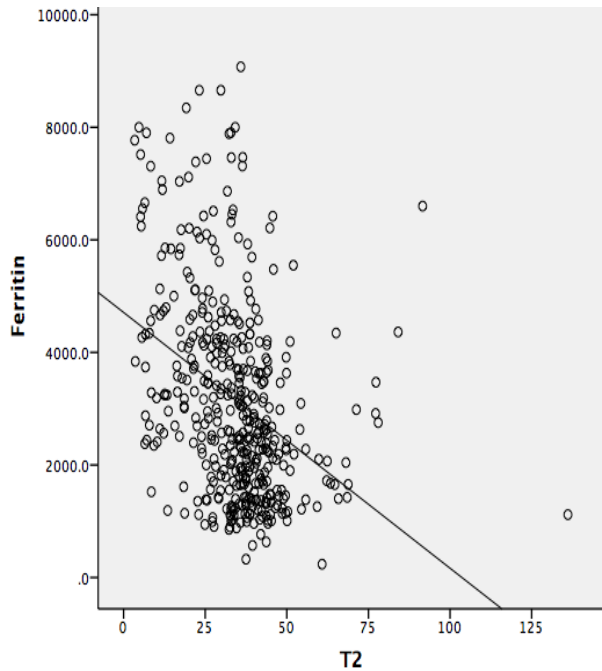


Figure 3.2. The correlation between serum ferritin and heart MRI T2* relaxation time in thalassemia patients (n = 434)

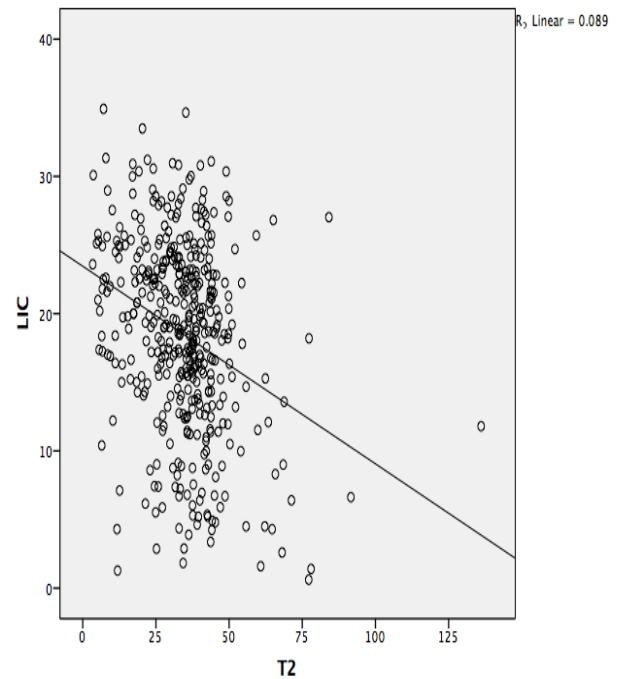


Figure 3.3. The correlation between LIC and heart MRI T2* relaxation time in thalassemia patients (n = 434)

There was a moderate negative correlation between serum ferritin and heart MRI T2* relaxation time in thalassemia patients ($r = -0.360$, $p < 0.05$). There was a moderate negative correlation between LIC and heart MRI T2* relaxation time in thalassemia patients ($r = -0.313$, $p < 0.05$).

Table 3.8. The relation between heart MRI T2* relaxation time with serum ferritin and LIC in thalassemia patients (n = 434)

Indicators of iron overload evaluation		Heart iron overload		Sum (n, %)
		No (n, %) (Heart T2* > 20 ms)	Yes (n, %) (Heart T2* ≤ 20 ms)	
Serum ferritin (ng/ml)	≤ 2500	183 (95.8%)	8 (4.2%)	191 (100%)
	> 2500	186 (76.5%)	57 (23.5%)	243 (100%)
	Sum	369 (85.0%)	65 (15.0%)	434 (100%)
	p	p < 0.001; OR = 0.143; CI 95% [0.066; 0.307]		
LIC (mg/g dry weightt)	≤ 15	110 (94.8%)	6 (5.2%)	116 (100%)
	> 15	259 (81.4%)	59 (18.6%)	318 (100%)
	Sum	369 (85.0%)	65 (15.0%)	434 (100%)
	p	p < 0.001; OR = 0.234; CI95% [0.102; 0.578]		

When serum ferritin > 2.500 ng/ml, 23.5% thalassemia had heart iron overload (heart T2* ≤ 20 ms), serum ferritin ≤ 2.500 ng/ml, 4.2% thalsasemia patients had heart iron overload, the difference was significant ($p < 0.05$). When LIC > 15 mg/g dry weightt),

18.5% thalassemia patients had heart iron overload, amongs LIC ≤ 15 mg/ g dry weightt, 5.2% patients had heart iron overload, the difference was statistically significant ($p < 0.05$).

3.2.3. The relation between iron overload and complications

Table 3.9. The relation between LIC and APRI (*) in thalassemia patients (n = 181**)

Liver (APRI index)	n	%	LIC mg/g (X \pm SD)
Normal (1) (APRI $\leq 0,7$)	118	65.2	15.0 \pm 7.4
Cirrhosis (2) (APRI: 0.7 – 1.0)	34	18.8	16.6 \pm 6.2
Fibrosis (3) (APRI > 1.0)	29	16	18.9 \pm 6.2
<i>Total</i>	<i>181</i>	<i>100</i>	<i>p(1,2), p(2,3), p(1,3) < 0.05</i>

(*) APRI: Aspartate amino transferase to platelet ratio index.

(**) 181 thalassemia patients had been not splenectomized and negative tests of HBV and HCV.

Average of LIC in group of patients had fibrosis liver were 18.9 mg/g dry weight. Average LIC in group of patients had no fibrosis liver were 18.9 mg/g dry weight. The difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Table 3.10. The relation between heart iron overload and heart ejection fraction in thalassemia patients (n = 434)

Heart iron overload Ejection fraction	Yes (n, %) Heart T2* ≤ 20 ms	No (n, %) Heart T2* > 20 ms	Sum (n, %)
Reduced	8 (12.30%)	12 (3.3%)	20 (4.6%)
Normal	57 (87.7%)	357 (96.7%)	414 (95.4%)
Total	65 (100%)	369 (100%)	434 (100%)

$p < 0.01$; OR = 4.174, CI 95% [1.636; 10.660]

There were 20 thalassemia patients with decreased heart ejection fraction (4.6%). The proportions of thalassemia patients who had decreased ejection fraction in group of heart iron overload was 12.3% and in group without heart iron overload was 3.3%, the statistically significant difference between 2 groups ($p < 0.01$).

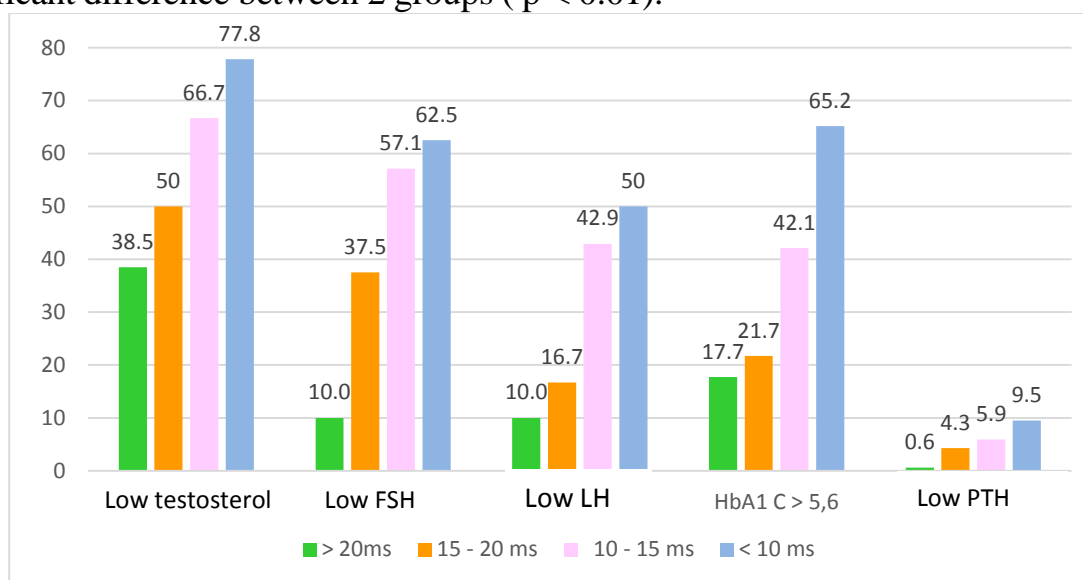


Figure 3.4. The proportion of patients with reduced levels of hormones at levels of iron overload in the heart (heart MRI T2* relaxation time)

The higher the level of iron overload in the heart, the higher the proportion of hypo hormonal. The proportion of patients with low level of testosterone was 77.8% in group of severe iron overload in heart (heart T2* < 10ms) and 38.3% in patients without heart iron overload (heart T2* > 20ms) The difference in the rate of patients with hypo hormonal was statistically significant, $p < 0.05$

3.2.4. Changes in iron overload after one year of follow-up

3.2.4.1. Patients are treated with regular iron chelation

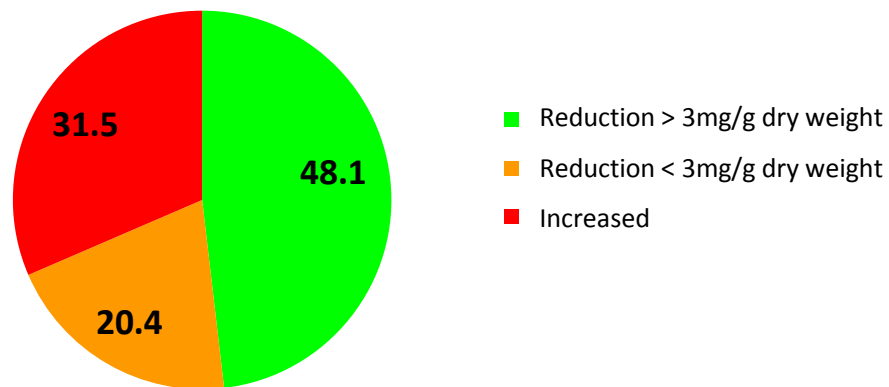


Figure 3.5. The percentage of patients who changed their LIC after one year of regular chelation therapy ($n = 54$)

After 1 year of regular iron chelation, 48.1% of patients had reduction in liver iron concentration (LIC) of more than 3 mg Fe/g dry weight.

Table 3.11. Mean indicators of iron overload evaluation before and after a year of regular chelation therapy ($n = 54$)

Indicator	Before (1)	After (2)	Change	p (1),(2)
LIC (mg/g dry weight)	20.6 ± 5.2	18.2 ± 5.2	2.6 ± 5.2 (-9.2 to 12.9)	< 0.01
Heart T2* relaxation time (ms)	29.8 ± 13.0	31.5 ± 15.7	-1.7 ± 11 (-41.2 to 15.7)	< 0.01
Serum ferritin (ng/ml)	3562.2 ± 1627.6	2936 ± 1600.4	625.5 ± 1121.8 (-1823 to 4556)	< 0.01

After 1 year of regular iron chelation therapy, the mean serum ferritin decreased from 3562.2 ng/ml to 2936 ng/ml, the mean LIC decreased from 20.6 mg/g to 18.2 mg/g dry weight, the heart T2* relaxation time increased from 29.8 ms to 31.5 ms. The changes were statistically significant ($p < 0.01$).

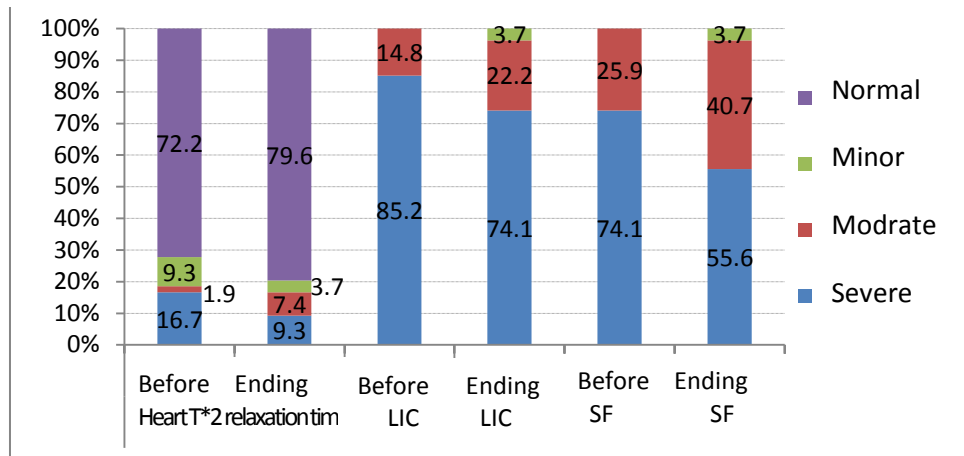


Figure 3.6. Proportion of iron overload levels before and after a year of regular iron chelation therapy (n = 54)

After a year of regular iron chelation therapy, percentage of patients had severe heart iron overload decreased from 16.7% to 9.3%; whose severe iron overload in liver decreased from 85.2% to 74.1%, whose serum feritin over 2500 ng/ml decreased from 74.4% to 55.6%.

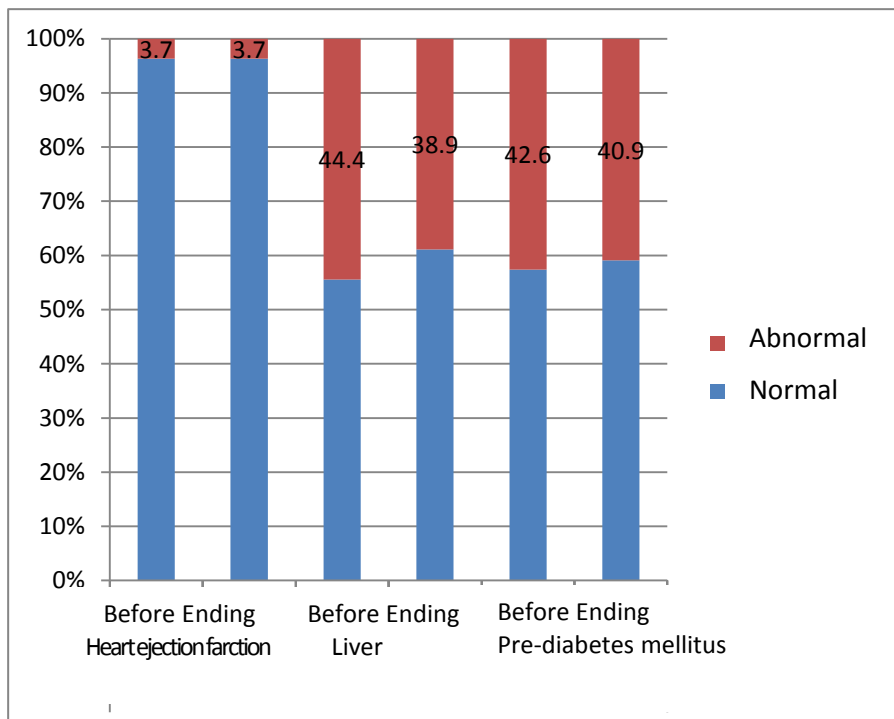


Figure 3.7. Percentage of patients having complications before and ending of one year of regular iron chelation therapy

After a year of regular iron chelation therapy, percentage of patients had reduced heart ejection fraction remained 3.7%; percentage of patients had cirrhosis or fibrosis reduced from 44.4% to 38.9% but the changes was not statistically significant ($p > 0.05$);

percentage of patients had HbA1C over 5.7% decreased from 42.6% to 40.9% but the changes was not statistically significant ($p > 0.05$).

Figure 3.12. The mean indicators of iron overload evaluation before and ending of one year of irregular iron chelation therapy (n = 131)

Indicator	Before (1)	Ending (2)	p (1),(2)
LIC (mg/g dry weight)	18.6 ± 6.3	19.3 ± 6.3	< 0.001
Heart T2* relaxation time	34.1 ± 12.0	33.1 ± 13.5	< 0.001
Serum ferritin (ng/ml)	2929.8 ± 1720.6	3117.8 ± 1819.6	< 0.001

After 1 year of irregular iron chelation therapy, the mean serum ferritin increased from 2929.9 ng/ml to 3117.8 ng/ml, the mean LIC increased from 18.6 mg/g to 19.3 mg/g dry weight, the heart T2* relaxation time decreased from 34.1 ms to 33.1 ms. The changes were statistically significant ($p < 0.01$)

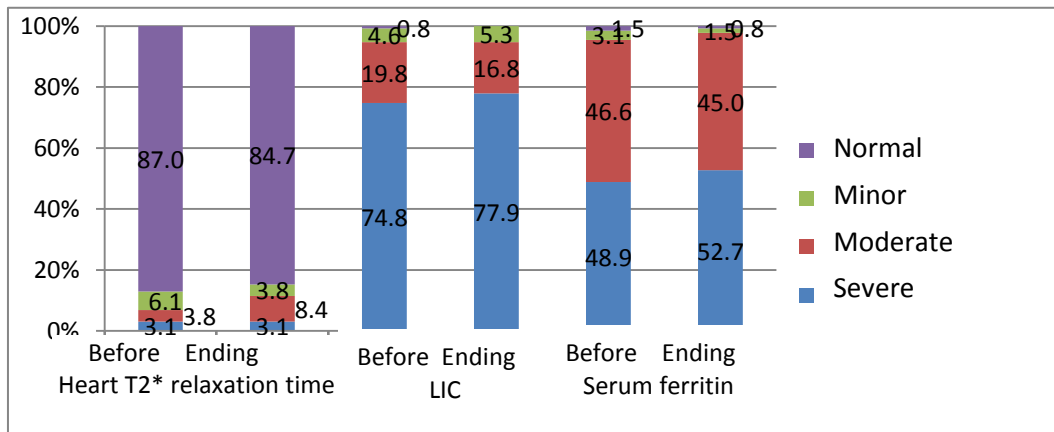


Figure 3.8. Proportion of iron overload levels before and ending a year of irregular iron chelation therapy (n = 131)

After a year of irregular iron chelation therapy, among 131 thalassemia patients, percentage of patients had heart iron overload increased from 12.4% to 15.3%; whose severe iron overload in liver increased from 74.8% to 77.9%, whose serum ferritin over 2500 ng/ml increased from 48.9% to 52.7%.

Chapter IV: DISCUSSION

4.1. Discussion on the characteristics of the globin gene mutations were determined by the Strip Assay at the National Institute of Hematology and Blood Transfusion

4.1.1. Characteristics of objects in group 1

Thalassemia is a hereditary disease on chromosomal abnormalities. The patient has 2 mutations in chromosome pair. The thalassemia carrier has 1 mutation. If both parents carry the thalassemia genes, they could delivery a child with thalassemia.

Therefore, in this study, we used the Globin Strip Assay kit to determine the globin gene mutation for three groups of thalassemia carriers, including thalassemia patients, suspected thalassemia carriers and foetus of couples with thalassemia (via prenatal diagnosis by amniocytic cell). In this study, there are 146 pregnant women in which 46 women and their husbands carry the α -thalassemia gene, and 100 women carry the β -thalassemia gene. 50 thalassemia patients included 16 α -thalassemia and 34 β -thalassemia. 70 subjects suspected of carrying the thalassemia gene, including 41 suspected of carrying α -thalassemia gene and 29 suspected of carrying β -thalassemia gene (table 3.1).

4.1.2. *Characteristics of the globin gene mutation*

4.1.2.1. *Characteristics of the α -globin gen mutations*

Table 3.2 shows that 123 alleles with α -globin mutation in 5 types include of SEA, HbCs, 3.7, 4.2 and Pakse mutation were detected in 103 subjects in three groups. Among them, the SEA mutation was highest percentage at 70.9%, followed by HbCs at 15%, 3.7 at 10.2%, and 2 mutant alleles of Pakse. In 46 cases of prenatal diagnosis of α -thalassemia, the results of six cases with no detectable mutation ($\alpha\alpha / \alpha\alpha$) (13%), 21 cases of 1 mutation, of which 20 cases were $--^{SEA}/\alpha\alpha$; 19 cases included two mutations, including eight HbBart's ($--^{SEA}/--^{SEA}$), nine HbH cases (genotypes: $--^{SEA}/\alpha^{Cs}\alpha$; $--^{SEA}/\alpha^{3.7}\alpha$, $--^{SEA}/\alpha^{4.2}\alpha$, $--^{SEA}/\alpha^{C.2\ delT}\alpha$), one case $\alpha^{Cs}\alpha/\alpha^{Cs}\alpha$ and one case $\alpha^{Cs}\alpha/\alpha^{3.7}$. The rates of mutant genotypes in this study were similar to those of Nguyen Khac Han and Ngo Diem Ngoc. Two cases of genotypes (α^+/α^+) as $\alpha^{Cs}\alpha/\alpha^{Cs}\alpha$ and $\alpha^{Cs}\alpha/\alpha^{3.7}$ were low-rate mutations, which were not reported in researchs of Nguyen Khac Han Hoan and Ngo Diem Ngoc. The clinical presentation of these cases are mild, sothat the fetus were kept for delivery. Up to now, 2 children are over 1 year old and have no anemia.

41 suspected α -thalassemia carriers had healthy appearances, their diagnosis based on tests of peripheral blood cell count (MCV <85 fl, MCH <28 pg), Hb typing (normal range of HbA and HbA2). They were tested DNA by α -Globin Strip Assay kit, 37 of 41 people were detected having 1 mutation, one of 4 common mutations (SEA, HbCs, 3.7 and 4.2 mutation). In 16 α -thalassemia patients (HbH), 32 mutant alleles were identified, including 5 mutations SEA (50%), HbCs (28.1%), 3.7 (12, 5%), Pakse (Ps) mutations (6.3%) and 4.2 (3.1%) mutations.

Genotypes of 16 patients were divided into two groups: 11 patients (68.8%) had genotypes $--/\alpha^T\alpha$ ($--^{SEA}/\alpha^{Cs}\alpha$ and $--^{SEA}/\alpha^{Ps}\alpha$) and 5 patients (31.2%) had the genotype $--/-\alpha$ ($--^{SEA}/\alpha^{3.7}\alpha$ and $--^{SEA}/\alpha^{4.2}\alpha$). Clinical characteristics were markedly different between the two groups, the $--/\alpha^T\alpha$ group with mean Hb was 82.2 ± 18.6 g/l, patients need blood transfusions. And other group of genotype $--/-\alpha$ had an average Hb of 97.4 ± 14.7 g/l; patients in this group did not need blood transfusion (table 3.4).

The proportion of patients with genotypes in our study was similar to the findings of the Fucharoen Suthat 2009, in 361 α -thalassemia patients, genotype $--^{SEA}/\alpha^{Cs}\alpha$ have highest rates accounted for 51%, followed by genotype $--^{SEA}/\alpha^{3.7}\alpha$ accounted for 38%. Especially in this study, by the α -Globin Strip Assay, we identified 2 patients with rare mutations $--^{SEA}/\alpha^{Ps}$ (Figure 3.1). The Pakse (Ps) mutation, which is a mutation in the $\alpha 2$ gene at the terminal site (TAA > TAT), is described in Thai and Lao people. HbH-Ps and HbH-Cs

exhibit the same clinical manifestations, so that they were likely to be misdiagnosed if based on peripheral blood cell count and analysis of hemoglobin.

4.1.2.2. Characteristics of the β -globin gene mutations

The results of the application of the β -Globin Strip Assay kit for the detection of the β -globin gene mutation in 163 subjects in table 3.3. 196 mutant alleles with 9 mutant types Cd17, Cd41/42, Cd26, IVS1-1, 28, IVS2-654, Cd71/72, Cd95 and Cd8/9. Of these, the three most common mutations were Cd17 (30.6%), Cd41/42 (27.6%), Cd26 (24.5%). The results of our study were similar with the results of other authors such as Tran Tuan Anh (2016) on 400 β -thalassemia patients and carriers at the National Institute of Hematology and Blood Transfusion, the percentage of mutations were Cd17 (31.5%), Cd41/42 (27.2%) and Cd26 (29.9%). According to Ngo Diem Ngoc at the Vietnam National Children's hospital, the most common mutations in order were Cd41/42 (31.2%), Cd17 (28.6%), Cd26 (23.2%); Nguyen Khac Han Hoan (2013) at Tu Du hospital, the most common mutations in order were Cd26 (45.4%), Cd17 (15.8%), Cd41/42 (13.6%).

The results of pre-natal diagnosis of β -thalassemia (table 3.3), 32 fetuses (32) with two mutations in 8 types of the mutant combination among 4 genotypes as β^0/β^0 (16%), β^0/β^E (14%) và β^0/β^+ (2%). The prevalence of fetal genotypes in our study were similar to those of Ngo Diem Ngoc and Nguyen Khac Han Hoan. The genotype of 32 fetuses would have severe to moderate clinic manifestations after birth, so that parents had decided to terminate the pregnancy.

29 suspected β -thalassemia carriers had no clinical manifestations, their diagnosis based on tests of peripheral blood cell count (MCV <85 fl, MCH <28 pg), Hb typing (HbF > 4% and/or HbA2 > 3.5%). 26 people had been identified β -thalassemia gene mutation, the three left had been tested by β -thalassemia gene sequencing, two cases had been identified owing -88 mutation (table 3.5).

In 34 patients, 29 were identified having two mutations with 6 types of genotype as β^0/β^{0+} , β^0/β^E , β^0/β^+ , β^+/ β^+ , β^+/ β^E , β^E/β^E . Patients with genotype of β^0/β^0 having the lowest mean Hb (70.9 g/l), genotype of β^E/β^E having the highest mean Hb (110 g/l). Among 5 patients were identified one mutation by β -Globin Strip Assay kit, three patients had been identified having an additional mutation of -88, -90, and Cd35 when using sequencing method (table 3.5).

In this study, we identified one patient with the rare mutation $\beta^{Cd8/9}/\beta^{IVS 1-1}$ (Fig. 3.2). The Cd8/9 (+ G) is a mutation that results in the loss of translation capabilities (frameshift), genotype as the β^0 . The mutation Cd8/9 (+G) was found in Asian Indians and Japanese, rare in Southeast Asia, and not previously reported in Vietnam.

4.2. Discussion on the results of MRI application in diagnosing and evaluating the effect of iron overload therapy in thalassemia patients.

4.2.1. Characteristics of objects in group 1

The various clinical manifestations of thalassemia patients and carriers depend on the type of mutation and the combination of mutations in the globin gene. From 2013, beside classification on severity and mutant gene (α and β thalassemia), the Thalassemia International Federation added one classification which based on

transfusion therapy, there are 2 types as transfusion dependent thalassemia (TDT) and nontransfusion dependent thalassemia (NTDT).

Table 3.6 showed that 434 patients studied aged from 6 to 63. The highest number of patients in the β -thalassemia/HbE group was 284, accounting for 65.4%; number of α -thalassemia patients was 81, accounting for 18.9%; The β -thalassemia group was 69, accounting for 15.9%. The proportion of patients in thalassemia types in our study was similar with the World Health Organization (WHO) report that the number of patients with β -thalassemia/HbE was high in Southeast Asia accounts for 66%. The blood transfusion dependent thalassemia group (TDT) included 83 patients (19.1%), non-dependent (NTDT) 351 patients (80.8%). The mean age and mean Hb were 13.8 and 64.3 g/l in TDT group and were 28.2 years and 74.5 g/l in NTDT group, the differences between the two groups in terms of age and mean Hb were statistically significant $p < 0.05$.

4.2.2. Characteristics of iron overload (IOL) in organs

4.2.2.1. Characteristics of iron overload and relation between iron load indicators

Iron overload is the main cause of many complications in thalassemia patients, which reduce the quality of life and the life expectancy. In this study, we used concomitant magnetic resonance imaging to determine iron overload levels in the liver and heart, and serum ferritin.

Table 3.7 described the levels of IOL in the liver, heart and serum ferritin. Regarding ferritin serum, 81.9% severe IOL, 18.1% medium IOL in TDT group; proportions in NTDTs were 49.9% and 45.9%. The difference was statistically significant at $p < 0.05$. The serum ferritin were 4,229.8 ng/ml and 2,909.9 ng/ml in TDT and NTDT group respectively, the difference was statistically significant at $p < 0.01$. According to Taher A's study (2009) in β -thalassemia patients, serum ferritin was 3,356 ng/ml. Nguyen Thi Hong Hoa studied 30 TDT patients at the average age of 10 years, the mean serum ferritin was 2.926 ng/ml.

Regarding to liver iron concentration (LIC), there were 398 patients with liver IOL, accounting for 91.7% (table 3.6). The percentage of severe, moderate, mild and normal liver IOL were 88.0%, 8.4%, 3.6% and 0% in the TDT group, respectively. The percentage of severe, moderate, mild and normal liver IOL were 69.8%, 20.8%, 7.1% and 2.3% in the NTDT group, respectively. The difference was statistically significant at $p < 0.05$. The mean LIC were 20.97 mg/g dry weight and 18.0 mg/g dry weight in the TDT and NTDT respectively, significant difference was $p < 0.01$. The results of our study were similar with the study by Taher A (2009) in 233 β -thalassemia patients LIC of 18 mg/g dry weight and Nguyen Thi Hong Hoa in 30 TDT thassemia patients, the mean LIC was 21 mg/g dry weight. Comparison of LIC and serum ferritin, the severe IOL in liver and in severe serum ferritin were 73.3% and 56%. This difference could be explained by the mechanism of iron metabolism in the body, the liver is the body's main iron stores, so that when the body has excess iron, the iron will be quickly accumulated in the liver, that is why the liver becomes early and severe IOL.

Regarding to iron overload in heart, 65 patients had heart IOL (15%). The proportion of patients with severe, moderate, mild and normal heart IOL in TDT group were 21.7%, 8.4%, 12% and 57.8 % respectively; These proportion in NTDT group were 1.4%, 3.4%, 3.7% and 91.5%, respectively. The difference was statistically significant at $p < 0.01$. The mean heart MRI T2* relaxation time in the TDT group was 24.0 ms, lower than the NTDT group at 36.4 ms, the difference was statistically significant at $p < 0.01$. Research by Ali T. Taher (2010) showed that the heart MRI T2* relaxation time were 21.5 ms and 47.3 ms in the TDT group and NTDT group respectively. The prevalence of patients had iron overload in the heart was low in the general population, as well as the percentage of patients having severe heart iron overload was lower than in the liver and serum ferritin.

The correlation between serum ferritin and LIC in both TDT and NTDT groups were positive ($p < 0.05$), but the correlation in TDT group ($r = 0.419$) was tighter than that of NTDT group ($r = 0.325$) (figure 3.1). The results of this study were similar to those of Taher AT in 2013 and Pakbaz Z. in 2007 when comparing the correlation between serum ferritin and LIC in both TDT and NTDT. Figure 3.2 showed the negative correlation between serum ferritin and heart T2* relaxation time ($r = -0.365$, $p < 0.05$). There was a negative correlation between LIC and heart T2* relaxation time ($r = -0.313$, $p < 0.05$). The results of our study were similar with those of the Azarkeivan (2013) study of 156 severe thalassemia patients, a positive correlation between serum ferritin and LIC with $r = 0.535$ and a negative correlation between serum ferritin and heart T2* relaxation time $r = -0.336$, $p < 0.01$. Pakbaz Z (2007) compared and found a positive correlation between serum ferritin and LIC in the TDT group ($r = 0.87$) closer than in the NTDT group ($r = 0.32$).

According to Tony S (2012) and Pakbaz Z (2007), serum ferritin did not accurately reflect iron overload in moderate thalassemia patients. The results of our study also showed that the correlation between serum ferritin and LIC, serum ferritin and heart T2* relaxation time, LIC and heart T2* relaxation time were moderate and weak (figures 3.1.3.2 and 3.3). Therefore, a serum ferritin test could not be used to accurately predict liver iron concentration in liver as well as in the heart in the patient. However, according to the International Thalassemia Association (2008), 70% of patients with ferritin > 2500 ng/ml over a period of longer than one year are at risk of cardiovascular complications, while there would be no danger of this if patients' serum ferritin under 1000 ng/ml. As the results in table 3.8, the percentage of heart complication in groups of patients having serum ferritin over 2500 ng/ml was 23.5%, 5.6 times higher than in groups with serum ferritin ≤ 2500 ng/ml with rate of 4.2%, difference was statistically significant at $p < 0.05$. Similarly, when studying the relationship between heart IOL with severe IOL in the liver, the proportion of patients with IOL at the heart in patients with LIC over 15 mg/g dry weight was 18.5%, which was 3.6 times higher than that in the group with LIC under 15mg/g dry weight at rate of 5.2%, difference was statistically significant, $p < 0.05$.

4.2.2.1. Characteristics of complications caused by IOL in thalassemia patients

In 2003, Wai studied status of liver fibrosis and cirrhosis in patients with hepatitis C based on aspartate transferase and platelet, he used index APRI (Aspartate Transferase to Platelet Ratio Index). $APRI = [(AST / ULN) / Platelet \times 100]$ evaluating the level of liver fibrosis. In order to avoid being affected by number of platelet in case of splenectomy and elevated liver enzymes due to HCV or HBV, in this study, we only analyzed APRI scores in non-splenectomy patients and negative test of HBV or HCV. So that, there were 181

patients were eligible for studying. The results in Table 3.9 show that the average LIC in patients with cirrhosis, liver fibrosis and normal was 18.9, 16.6 and 15.0 mg/g dry weight, respectively. The difference between groups was statistically significant at $p < 0.05$. Olynyk JK, St Pierre TG (2005) studied and compared liver iron concentrations with liver biopsy, which concluded that elevated iron levels in the liver may cause cirrhosis. C K Li et al. (2001) studied in 100 TDT patients, percentage of patients with liver fibrosis and cirrhosis of 44% and 30%, respectively.

Decreased myocardial ejection fraction is a bad predictor of thalassemia patients. In this study, in 434 thalassemia patients, 20 patients (4.6%) had a reduced myocardial ejection fraction. The proportion of patients with reduced myocardial ejection fraction in 65 patients with heart iron overload was 12.3%, 3.7 times higher than those in the 369 patients with noncardiac dysfunction at 3.3%, the difference was statistically significant, $p < 0.005$. Quatre A (2014) found that mean ejection fraction (EF) was 57.6% in patients with heart T2* relaxation time < 20 ms, 62.4% in patients with heart T2* relaxation time > 20 ms, the difference was significant. Thus, the results from this study showed that only cardiac MRI (heart T2* relaxation time) tests could assess the status of the heart IOL, so that could predict the risk of myocardial ejection infarction in thalassemia patients.

Figure 3.4 showed that the rate of patients with hypo-hormon increased increased in high level of heart iron overload in heart. In the cases of absence of heart iron overload, the percentage of patients with decreased testosterone, FSH, LH, PTH and increased HbA1 by 5.7% to 38.5%, 10.0%, 10.0%, 0.6% and 17.7%, respectively. In the cases of severe iron overload in the heart, the rate of patients with decreased testosterone, FSH, LH, PTH and increased HbA1 were 5.7%, 77.8%, 62.5%, 50%, 9.5% and 65.2%, respectively. The results of this study demonstrated that iron overload in the heart was an important contributor to the increased incidence of endocrine injuries.

4.2.3. Changing of iron overload in thalassemia after 1 year of chelation therapy

The iron chelation therapy and monitoring of effect of iron chelation therapy in thalassemia patients are very necessary and important. LIC was an index used by many authors in evaluating the effect of chelation therapy. Figure 3.5 showed that amongs 54 thalassemia patients who had regularly iron chelation therapy, 48.1% patients had good effect of iron chelation (LIC reduction > 3 mg / dry weight), the LIC did not change or decreased slightly (LIC reduction < 3 mg/g dry weight) in 20.4% patients, 31.5% of patients had increased LIC after one year of treatment. The study by Ali Taher in 233 thalassemia patients treated with deferasirox for 1 year at an average dose of 23.1 (12-29) mg/kg/day, blood transfusion of 95 ml/kg/year, 57% patients had good result. Cohen (2008) studied in 541 major β -thalassemia patients, the results showed that with doses of deferasirox 20 mg / kg / day, average of red cell volume received of 134.4 ml / kg / year, 46% patients had good result. The results of GPO-L-ONE study in Thailand (2013) in 73 TDT patients chelated with deferiprone, only 45.2% Good iron chelation.

As the results showed in table 3.11 and figure 3.6, after 1 year of treatment, in 54 patients who received regular iron chelation therapy, LIC decreased from 20.6 mg/g dry liver to 18.2 mg/g dried weight, the change was statistically significant with $p < 0.001$. Serum ferritin decreased from 3562.2 ng/ml to 2936.9 ng/ml; mean serum ferritin decreased by 625.5 ng/ml, statistically significant change with $p < 0.05$; Concentration of iron in the heart also decreased significantly, with heart T2* relaxation time increased from 29.8 ms to 31.5 ms. And the proportion of patients with severe hepatic QTS decreased from 85.2% to 74.1%, and heart disease was reduced from 16.7% to 9.3%.

In this study, we analyzed changes in some indexes which reflecting the function of organisms in the patient, affected by iron overload. The figure 3.11 showed that the incidence of myocardial ejection fraction (EF) was unchanged (3.7%), the percentage of patients with cirrhosis or liver fibrosis decreased from 44.4% to 38.9%; The prevalence of pre-diabetes (HbA1C > 5.7%) decreased from 42.6% to 40.9% after one year of treatment. The study by Pennell J (2012) in 71 thalassemia patients with cardiac iron overload treated with deferasirox for 3 years resulted in reduced serum iron concentrations, but the ejection fraction remained unchanged for 18 first month of treatment. Wu SF (2006) studied in 15 severe thalassemia patients, treated with deferiprone for an average of 3.3 years, liver biopsy were done before and after treatment, the result showed that all patients had reduced levels of cirrhosis and iron levels in the liver.

In addition to the patients who were treated with regular iron chelation, we also examined IOL status in 131 patients who did not receive regular iron chelation therapy (because of personal circumstances the patient could not be hospitalized periodically). Table 3.12 and figure 3.8 showed that LIC increased from 18.6 to 19.3 mg g dry weight, the incidence of severe hepatic IOL increased from 74.8% to 77.9%, serum ferritin increased from 2929.8 ng / ml to 3117.8 ng/ml, the rate of severe IOL increased from 48.9% to 52.7%. The heart T2* relaxation time decreased from 34.1 ms to 33.1 ms, percentage of patients having heart IOL increased from 13% to 15.3%. Thus, if thalassemia patients do not receive regular iron chelation therapy, after one year, iron overload increased in the heart, liver and serum ferritin.

CONCLUSION

Through the above-mentioned study and discussion, we would give conclusions as follow:

1. The application of Strip Assay in the diagnosis of mutations of the Thalassemia gene proves positive effects, specified:

- Successfully applied the Globin Strip Assay technique on identifying mutations of the Thalassemia gene in pre-natal diagnosis, patients and suspected thalssemia carriers at National Institute of Hematology and Blood Transfusion.

- α and β -Globin Strip Assay techniques can detect almost α or β -globin mutations which are popular in Vietnam in one test. Percentages of mutation on the α -globin gene in objects at National Institute of Hematology and Blood Transfusion, were SEA (70,9%), HbCs (15,0%), 3.7 (10,2%), (2,4%), Pakse (1,6%); mutation on β -globin gen were Cd17 (30,6%), Cd41/42 (27,6%), Cd26 (HbE) (24,5%), IVS1-1 (5,1%), -28 (4,6%), IVS2-654 (3,6%), Cd71/72 (3,1%), Cd95 (0,5%), Cd8/9 (0,5%).

- Globin Strip Assay technique had detected several rare mutations and some rare types of homozygous in Vietnam such as: the Hb Pakse mutation on the α -globin gene, the Cd8/9 mutation on the β -globin gene, homozygous of HbC_S on the α -globin gene and homozygous of -28 on the β -globin gene.

- However, Globin Strip Assay was unable to detect very rare mutations in Vietnam and South East Asia such as the Cd35 mutation, the -88 and -90 mutations on the β -globin gene.

2. MRI technique had been effectively applied on the diagnosis of iron overload in thalassemia patients, specified:

- MRI techniques used liver T2* relaxation time (LIC) and heart T2* relaxation time to accurately diagnose iron overload in the liver, heart and make prognosis of complications caused by iron overload. Specifically, in this study, there were 98.8% of patients having iron overloaded in the liver, 15% of patients having iron overloaded at the heart.

- The proportion of patients having iron overload in organizations, the correlation between the iron overload indicators (LIC, heart T2* relaxation time and serum ferritin) were different between the types of thalassemia (TDT, NTDT). Specifically, the percentage of TDT patients with severe hepatic iron overload and iron overload in heart were 88% and 44.2%, respectively. These percentages in NTDT groups were 69.8% and 8.5%. There were moderate positive correlation between LIC and serum ferritin, weak negative correlation between LIC and heart T2* relaxation time, moderate negative correlation between the heart T2* relaxation time and serum ferritin.

- The level of iron overload was closely related to the decline in function of organs. The proportion of patients with decreased myocardial ejection fraction (EF) were 12.3% in the group with cardiac iron overload, 3.3% in the group without cardiac iron overload. Mean liver iron concentrations in patients with hepatic cirrhosis, liver fibrosis and normal liver were 18.9, 16.6 and 15 mg iron/g dry liver respectively. The proportion of patients with pre-diabetes mellitus in the severe heart iron overload group and no heart iron overload were 65.2% and 17.7%, respectively.

- MRI techniques used liver T2* relaxation time (LIC) and heart T2* relaxation time to early prognose the effect of iron chelation therapy in thalassemia patients. After 1 year of treatment, iron storage in the liver decreased average of 2.6 mg iron/g dry weight, heart T2* relaxation time increased 1.7 ms, serum ferritin decreased 625 ng/ml. Correspondingly, the incidence of fibrosis patients decreased by 5.5% (from 44.4% to 38.9%) and the pre-diabetes mellitus percentage decreased by 1.7% (from 42.6% to 41.9%).

RECOMMENDATION

According to the above-mentioned and analysis, we would propose several recommendations as follow:

1. To build the panel of popular mutations in each region and country in order to improve the ability to recognize mutations as well as minimize costs and time.
2. Implement MRI liver, heart for thalassemia patients every 6 - 12 month periodically in order to have the early and accurate diagnosis of the iron overload and have effective observations on the iron chelation therapy for each patient.
3. To pay attention to and create more opportunities for all thalassemia patients to receive the regular iron chelation therapy.
4. To continue researching on the effects of the iron chelation therapy in thalassemia patients through longer time phrase and in more various groups of thalassemia patients.