

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Hội chứng thận hư tiên phát là bệnh thận mạn tính thường gặp ở trẻ em với sự thay đổi đáng kể cả về tỷ lệ mắc cũng như đáp ứng với thuốc steroid theo các chủng tộc khác nhau. Tỷ lệ mắc hội chứng thận hư tiên phát (HCTHTP) ở trẻ em trên thế giới trung bình từ 2 đến 16,9/100.000 trẻ em. 50% bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid sẽ tiến triển thành bệnh thận mạn giai đoạn cuối sau 10 năm. Khi trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid phải điều trị thêm bằng các thuốc ức chế miễn dịch khác, nhưng kết quả vẫn còn hạn chế, tỷ lệ suy thận mạn giai đoạn cuối cao, gây ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe và cuộc sống của trẻ cũng như gia đình trẻ. Gần đây, các nghiên cứu về sinh học phân tử đã phát hiện thấy đa hình di truyền đơn nucleotit (Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs) trong đó có các đột biến trên gen *NPHS2* có ảnh hưởng lớn đến tiến triển cũng như đáp ứng điều trị của trẻ mắc HCTHTP kháng steroid. Tại Việt Nam hiện chưa có nghiên cứu nào phát hiện đột biến trên gen *NPHS2* để đánh giá những ảnh hưởng của gen này đến đáp ứng điều trị cũng như tiến triển ở bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid được thực hiện. Xuất phát từ những lý do trên đây chúng tôi thực hiện nghiên cứu: “Nghiên cứu mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen *NPHS2* ở trẻ mắc hội chứng thận hư tiên phát kháng thuốc steroid”.

2. Mục tiêu của đề tài nghiên cứu:

1. *Mô tả các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân mắc hội chứng thận hư tiên phát kháng thuốc steroid.*
2. *Phát hiện các đột biến trên gen *NPHS2* ở trẻ mắc hội chứng thận hư tiên phát kháng thuốc steroid.*
3. *Đánh giá mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến trên gen *NPHS2* ở trẻ mắc hội chứng thận hư tiên phát kháng thuốc steroid.*

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

Thông qua nghiên cứu mô tả có theo dõi dọc sẽ có thông tin một cách đầy đủ các biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng của trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid. Đồng thời thông qua phát hiện các đột biến gen *NPHS2* để đánh giá vai trò của khía cạnh di truyền trên trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid. Đây là một đóng góp mới trong lĩnh vực bệnh lý thận di truyền ở nước ta, đồng thời nghiên cứu vừa có tính khoa học và vừa có tính nhân văn. Phát hiện các đột biến gen nhằm tư vấn sớm cho bệnh nhân tiến triển cũng như đáp ứng điều trị cho bệnh nhân. Luận

án đầu tiên nghiên cứu về phát hiện các đột biến gen NPHS2 trên trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid. Những phát hiện và đóng góp mới của luận án không chỉ có giá trị về mặt thực tiễn khi phát hiện các đột biến trên trẻ em mắc HCTHTP tại Việt Nam mà còn đóng góp thêm các dữ liệu thông tin di truyền cho ngân hàng gen. Kết quả của nghiên cứu đã phát hiện thấy 52 đột biến trên 51 trẻ em (44 bệnh nhân kháng thuốc, 7 bệnh nhân nhạy cảm steroid) gồm 46 đột biến đồng nghĩa, 6 đột biến sai nghĩa tại 4 exon từ exon 1 đến exon 4 của gen NPHS2. 71,2% đột biến xuất hiện trên exon 2 với kiểu đột biến đồng nghĩa 288C>T (p.S96S) chỉ có ở nhóm kháng thuốc steroid. Tỷ lệ kiểu đột biến này trên trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid tại Việt Nam có tỷ lệ phát hiện khá cao.

4. Cấu trúc của luận án Luận

Luận án bao gồm 128 trang, bao gồm 4 chương: Chương 1: Tổng quan vấn đề nghiên cứu 43 trang; Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 15 trang; Chương 3: Kết quả nghiên cứu 32 trang; Chương 4: Bàn luận 33 trang. Kết luận: 2 trang; Kiến nghị: 1 trang. Luận án có: 47 bảng, 5 biểu đồ, 16 hình ảnh; 2 sơ đồ; 110 tài liệu tham khảo (7 tiếng Việt, 103 tiếng Anh).

Chương 1 TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan hội chứng thận hư kháng thuốc steroid

1.1.1 Định nghĩa: Hội chứng thận hư tiên phát thường gặp nhất trong các bệnh của cầu thận, nguyên nhân của bệnh đến nay vẫn chưa được sáng tỏ. Chẩn đoán xác định gồm 3 triệu chứng bắt buộc là: protein niệu $\geq 50\text{mg/kg/24h}$, hoặc protein niệu/creatin niệu $> 200\text{ mg/mmol}$; albumin máu $\leq 25\text{ g/l}$; protein máu $\leq 56\text{ g/l}$, ngoài ra có thể kèm theo phù, tăng lipid và cholesterol máu.

1.1.2. Đặc điểm hội chứng thận hư kháng thuốc steroid

Cơ chế và nguyên nhân của bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid vẫn chưa được rõ ràng. Một số định nghĩa về HCTHTP kháng thuốc steroid được đưa ra trong những năm 70. Đầu tiên ISKDC (International Study of Kidney Disease in Children) thông báo tỷ lệ kháng thuốc steroid ở bệnh nhân mắc hội chứng thận hư (HCTH) là khoảng 10%-20%. Theo phác đồ điều trị steroid của ISKDC đưa ra ban đầu với liều 2mg/kg/ngày (không quá 80mg/ngày) trong 4 tuần, sau đó 4 tuần tiếp theo liều $1,5\text{mg/kg}$ (không quá 60mg/ngày) uống 3 ngày trong 4 tuần tiếp theo. Một số nhà lâm sàng thận nhi ở châu Âu khuyến nghị phác đồ điều trị để chẩn đoán kháng thuốc steroid là sau 6 tuần điều trị prednisone liều 2mg/kg/ngày và tiêu chuẩn này được sử dụng rộng rãi ở châu Âu. tại Pháp

CONCLUSION

A descriptive analysis was conducted and a 6-exon (exon 1 to exon 6) PCR-sequencing technique was used in the NPHS2 gene on 94 children with steroid-resistance nephrotic syndrome and 46 steroid-sensitivity nephrotic syndrome children, we have found some conclusions:

1. Clinical, subclinical characteristics in children with steroid-resistant nephrotic syndrome

Patients with steroid-resistant nephrotic syndrome have a higher level of clinical manifestation, prolonged hospitalization days, and recurrent so many times during the year.

Renal biopsy results in 34 patients with steroid-resistant nephrotic syndrome showed a higher incidence of partial and focal glomerular sclerosis than previously reported. The incidence of end-stage renal failure and mortality in pediatric STDs in this study was also high.

2. Detection of mutations in 6 exons (from exon 1 to exon 6) of the NPHS2 gene

71.2% of the synonymous mutation occurred on exon 2 with genotype 288C> T (p.S96S) and only in the steroid resistant group. This type of mutation in children with steroid resistant nephrotic syndrome in Vietnam has a high rate of detection.

Other mutations occurring in exon 1, exon 3 and exon 4 have low frequency, with no difference in the steroid-resistance group and steroid-sensitivity group.

3. Clinical Characteristics and NPHS2 Gene Mutation

Patients with advanced disease if carrying the mutation NPHS2 gene will increase the risk of steroid-resistance 4.903 times. NPHS2 gene mutation increases the risk of death in patients with steroid-resistance nephrotic syndrome by 16.37 times, an increase in the risk of end-stage renal disease by 5.85 times. Children with steroid-resistance nephrotic syndrome if the 288C> T mutation has a higher incidence of edema and infection than those with no mutation. On the other hand, the change of 288C> T will increase the risk of progression to chronic renal failure to 7.26 times, increasing the risk of death to 28.14 times.

thì áp dụng phác đồ điều trị hết 4 tuần tấn công bằng prednisone với liều 60mg/m²/24 giờ (tương đương 2mg/kg/24giờ) và 3 liều Methylprednisolon bolus 1000 mg/1,73m² da cơ thể/48 giờ mà protein niệu của bệnh nhân vẫn \geq 50mg/kg/24 giờ thì chẩn đoán kháng steroid. KDIGO đã khuyến nghị tiêu chuẩn chẩn đoán về HCTHTP kháng steroid ở trẻ em khi điều trị hết 4 tuần tấn công bằng prednisone với liều 60mg/m² /24 giờ (tương đương 2mg/kg/24giờ, không quá 60mg/ngày) và 4 tuần tiếp theo với liều 40mg/m² /48 giờ (tương đương 1,5mg/kg/48giờ) mà protein niệu vẫn \geq 50mg/kg/24 giờ hoặc protein/creatinin niệu > 200mg/mmol. Như vậy theo phác đồ điều trị này thời gian chẩn đoán xác định bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid là 8 tuần. ISKDC nghiên cứu 521 bệnh nhân mắc HCTHTP thấy tỷ lệ bệnh nhân kháng thuốc steroid chiếm khoảng 20%. Nếu bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid 70-80% bệnh nhân có tổn thương xơ cứng cầu thận từng phần và khu trú. Các thống kê cho thấy 20% bệnh nhân mắc HCTHTP sẽ không đáp ứng với điều trị bằng thuốc steroid và các thuốc ức chế miễn dịch khác, khoảng 50% bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid tiến triển đến suy thận mạn hoặc bệnh thận mạn giai đoạn cuối.

1.2. Vị trí, cấu trúc, chức năng gen NPHS2

Gen NPHS2 có tên là nephrosis 2 được cho là có liên quan nhiều đến HCTHTP kháng thuốc steroid (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) No.600995). NPHS2 là một gen mã hóa cho protein có tên là podocin, gen nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể số 1 (1q25-q31), kích thước 25438 bp. Vùng mã hóa của gen NPHS2 gồm 8 exon, có kích thước 1149 bp mã hóa cho protein có tên là podocin liên kết với nhiều protein khác nhau của podocyte. Podocin cấu tạo gồm 383 axit amin và trọng lượng 42kD, là một loại protein bám dính trên khe màng ngăn của podocyte, thuộc họ stomatin. Podocin được xem như là một khung đỡ protein tạo nên mối liên kết giữa tế bào biểu mô và podocyte để hình thành cấu trúc màng đáy cầu thận. Vị trí khe màng ngăn là nơi thực hiện các chức năng lọc chính của hệ thống màng lọc của cầu thận trong đó podocyte đóng vai trò là một hàng rào để ngăn không cho các phân tử hữu hình trong máu đi qua màng lọc này. Thực nghiệm khác cũng đã chứng minh khi gây ra các đột biến gen NPHS2 sẽ làm cho podocin không được nitor hóa dẫn đến khả năng gắn kết với calcineurin bị giảm, do đó mối liên kết với các protein khác trong bào tương của podocyte bị ảnh hưởng. Ngoài ra khi gen NPHS2 bị đột biến nửa đời sinh học của podocin bị giảm nghiêm trọng và làm biến dạng các phân tử podocin.

1.3. Phương pháp phát hiện đột biến gen NPHS2 ứng dụng trong chẩn đoán: Phát hiện đột biến gen NPHS2 theo phương pháp giải trình tự Sanger.

1.4. Tình hình nghiên cứu trong nước về HCTHTP kháng thuốc steroid

Tại Việt Nam, đã có một số nghiên cứu về HCTHTP kháng thuốc steroid ở trẻ em. Đầu tiên, Nguyễn Ngọc Sáng (1999) có nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị bằng Methylprednisolon và những thay đổi miễn dịch trước và sau điều trị hội chứng thận hư tiên phát ở trẻ em kháng thuốc trong Luận án tiến sĩ Y học. Năm 2009, Trần Thanh Thúy, Vũ Huy Trụ có nghiên cứu hồi cứu về các đặc điểm hội chứng thận hư nguyên phát kháng thuốc steroid có sang thương xơ hóa cầu thận từng phần và khu trú ở trẻ em được thực hiện trên 41 trẻ em tại bệnh viện Nhi Đồng I. Dương Thị Thúy Nga (2011) cũng đã có nghiên cứu nhận xét kết quả điều trị hội chứng thận hư tiên phát kháng corticosteroid tại khoa Thận-Tiết niệu bệnh viện Nhi Trung Ương trong Luận văn thạc sĩ Y học. Năm 2014, Trần Hữu Minh Quân, Huỳnh Thoại Loan, Nguyễn Đức Quang và cộng sự có nghiên cứu đặc điểm hội chứng thận hư kháng steroid trên 67 bệnh nhân tại bệnh viện Nhi Đồng I. Như vậy hiện tại, trong nước chưa có nghiên cứu nào về di truyền nói chung, phát hiện đột biến gen NPHS2 nói riêng trên trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid được thực hiện.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng 140 trẻ mắc HCTHTP trong đó 94 trẻ được chẩn đoán mắc HCTHTP kháng thuốc steroid và 46 trẻ mắc HCTHTP nhạy cảm steroid

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Đề tài được tiến hành tại: Đề tài được tiến hành tại khoa Thận-Lọc máu, phòng xét nghiệm sinh hóa, huyết học, vi sinh và khoa Giải phẫu bệnh của Bệnh viện Nhi Trung ương là nơi chẩn đoán, điều trị và quản lý bệnh nhân. Các xét nghiệm sinh học phân tử thực hiện tại khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội. Thời gian 3 năm: từ tháng 11 năm 2014 đến 11 năm 2017.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả hàng loạt ca bệnh có theo dõi dọc.

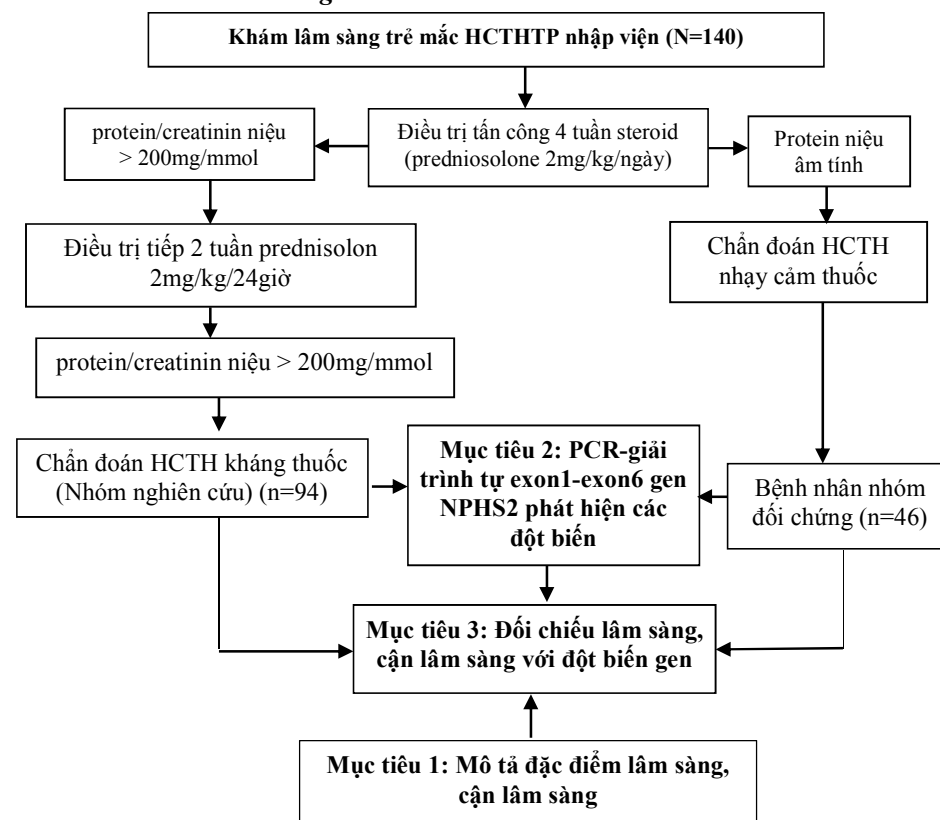
2.3.2. Cơ mẫu: tiện ích; tất cả những bệnh nhân đủ tiêu chuẩn chẩn đoán, nhập viện trong thời gian 12 tháng từ 01 tháng 01 năm 2015 đến 30 tháng 12 năm 2015 và tự nguyện tham gia nghiên cứu

Table 3.11, there is an association between genetic mutation and treatment outcome. Accordingly, the end of the study, in children with idiopathic nephrotic syndrome if children with NPHS2 gene mutations have a higher incidence of end-stage renal disease and mortality than those with no genetic mutation, the difference was statistically significant with $p < 0.05$. The NPHS2 gene mutation increased the risk of end-stage renal disease by 5.85 and increased the risk of death by 16.37. Studies in the journal published one of the largest effects of the NPHS2 gene mutation in patients with idiopathic SRNS have been reported to have a higher incidence of chronic kidney disease or CKD. Studies published worldwide, the rate of detection of 288C>T mutation on idiopathic SRNS is quite low. However, when this study was conducted on children with idiopathic nephrotic syndrome in Vietnam, we found that the 288C>T mutation had a high frequency, which is quite interesting and very clinically significant. This is the basis for a strategy of treatment as well as prognosis for patients carrying the mutation in children with idiopathic SRNS in Vietnam. 288C>T mutation increased the risk of progression to end-stage renal disease 7.26 (95% CI: 2.29-23.04). The related assessment as well as the risk of 288C>T mutation in mortality in idiopathic nephrotic syndrome with 288C>T mutation in Table 3.12. There was a significant difference in the number of children with 288C>T mutations, with 8/37 (21.6%) having a 288C>T mutation that was higher than the non-mutant group 1 patient (1%), the difference was statistically significant at $p < 0.05$. Group 288C>T mutations increased the risk of mortality by 28.14 (95% CI: 2.29-23.04).

The phenotypic and genotype results in children with idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome were shown in Figure 3.1, 3.2,3.3 and 3.4 both 2 patients with a 288C > T (S96S) mutation at exon 2 of NPHS2 showed severe clinical manifestations: antisera, pleural effusion, peritoneal effusion, pericardial effusion, progression to early end-stage renal disease, they were died (one in the first year when the disease was about 10 months old). In Figure 3.5 and Figure 3.6 were the phenotype and genotype of children with idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome atypical (hypertension), the children with 02 mutations was 102G>A (G34G) at exon 1, one case with missense mutation 385G>T (Q128H) at exon 3. In Figure 3.10 and Figure 3.11 is a phenotype of children with idiopathic SSNS of genotype 102G> A (G34G). The patient in Figure 3.5 with missense mutation 385G>T (Q128H) at exon 3 so phenotypic expression was idiopathic SRNS atypical. The results in Table 3.9 regarding the mutation and response to steroids in pediatric idiopathic nephrotic syndrome show that the rates of idiopathic SRNS in the NPHS2 mutation group are higher than in the more steroid-sensitive group ($\chi^2 = 14,1$; $p < 0,0001$). When assessing the risk of NPHS2 mutation and steroid resistance in table 3.2, odds ratio (OR) was 4.9 (95% CI; 1.92-12.069). As such, patients with a genetic mutation had a 4.9-fold increase in risk of resistance compared to patients without the NPHS2 mutation

When comparing the mean biochemical results at the time of hospitalization, Table 3.10 shows that patients with NPHS2 mutation had significantly higher urea and creatinine than patients with idiopathic nephrotic syndrome without NPHS2 mutation. In contrast, protein and albumin in blood were lower, with statistically significant differences at $p < 0.05$. A study by Thomas et al. (2018) in a study of 10 patients with idiopathic SRNS with mutations in the NPHS2 gene in Egypt showed that protein and albumin in blood level in patients with idiopathic SRNS which had mutations is higher than group without the mutation. In the resistant group, the mutant group had higher urea and creatinine levels than the non-mutant group. When comparing the results of treatment in

2.2.3. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu



Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.4. Các chỉ số, biến số nghiên cứu

2.4.1. Mục tiêu 1: Mô tả các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid

Các đặc điểm lâm sàng chung của đối tượng nghiên cứu: Tuổi, giới, lý do vào viện, thời gian phát bệnh, tính chất khởi phát, số lần tái phát, mức độ tái phát, thời gian phát bệnh đến thời điểm nghiên cứu, tiền sử bệnh có liên quan, tiền sử gia đình. Làm các xét nghiệm sinh hóa máu, nước tiểu, xét nghiệm huyết học để đánh sự thay đổi các chỉ số cận lâm sàng, sinh thiết thận để chẩn đoán mô bệnh học. So sánh các chỉ số lâm sàng, cận lâm

sàng ở trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid và nhạy cảm steroid để đánh giá sự khác biệt.

2.4.2. Mục tiêu 2: Phát hiện các đột biến trên gen *NPHS2* ở trẻ mắc hội chứng thận hư tiên phát kháng thuốc steroid

Kết quả giải trình tự được đọc bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9. Các nucleotid trên gen sẽ được biểu hiện bằng các đỉnh (peak) với 4 màu tương đương với 4 loại nucleotid A,T,G,C. Trình tự gen *NPHS2* thu được sau khi giải trình tự cho các bệnh nhân nghiên cứu sẽ được so sánh với trình tự gen *NPHS2* so sánh với dữ liệu từ Human Gene Mutation database (HGMD), tại <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=NPHS2> để phân tích các đột biến gen. Đánh giá tỷ lệ, tần suất xuất hiện các đột biến gen tại 6 exon (từ exon 1 đến exon 6) của gen *NPHS2* trên 96 trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid và 46 trẻ được chẩn đoán mắc HCTHTP nhạy cảm steroid từ đó đánh giá sự khác biệt.

2.4.3. Mục tiêu 3: Đánh giá mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng với đột biến trên gen *NPHS2* ở trẻ mắc hội chứng thận hư tiên phát kháng thuốc steroid

So sánh mức độ thay đổi các chỉ số sinh hóa máu, huyết học, chức năng lọc của cầu thận, so sánh các chỉ số ure, creatinin máu, tiến triển của bệnh, phân giai đoạn suy thận mạn, tỷ lệ tử vong, giữa bệnh nhân có đột biến và không có đột biến, giữa nhóm nhạy cảm steroid và nhóm kháng steroid. Từ đó đánh giá vai trò, tác động của đột biến gen *NPHS2* trên nhóm bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid. Tìm mối tương quan giữa đột biến gen và đáp ứng thuốc steroid thông qua đó đánh giá vai trò ảnh hưởng của các đột biến gen *NPHS2* trên bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid và so sánh với nhóm nhạy cảm steroid. Theo dõi tiến triển của bệnh cũng như đáp ứng với thuốc điều trị để đánh giá những ảnh hưởng của đột biến gen *NPHS2*.

2.3. Công cụ thu thập thông tin và xử lý kết quả

Sử dụng phần mềm SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) để xử lý các kết quả thống kê, giải trình tự gen *NPHS2* được đọc bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9.

2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu được tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học. Đề tài đã được thông qua Hội đồng Đạo đức bệnh viện Nhi Trung ương. Các kết quả phân tích gen đã được Hội đồng nghiên cứu đề tài tại Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua. Bệnh nhân được miễn phí các xét nghiệm phân tích gen. Các thành viên gia đình và người bảo trợ tự

Boute et al in 2000, when they studied 14 patients with idiopathic SRNS in France, 10 patients with *NPHS2* mutation included 3 polymorphic mutations including G at position 104 on exon 1, G loss at 419 on exon 3, loss of A at 855 on exon 7; 6 mutations mean that 59 C> T, 274 G> T at exon 1, 413 G> A exon 3, 479 A> G on exon 4, 583 G> A on exon 5 and 871 C> T at exon 7; 1 Missense mutations 412 C> T at exon 3. Especially all these patients are also resistant to other immunosuppressive drugs. In the study on 430 children with SRNS included congenital nephrotic syndrome from 404 families in several European countries, Hinkes et al found that 18.1% of families had a R138Q mutation in the *NPHS2* gene. Carini et al. (2001) published the results of study in Italy on 44 patients with idiopathic SRNS showed that 9 patients with a mutation which include 7 framing disorders (6 cases of 419delG on exon 3, 1 case 467/8insT on exon 2), 7 mutations wrong meaning R138Q (413G> A), 2 mutations wrong meaning V180M (538G> A), 1 stop codon mutation R138X (412C> T). Yaacov et al (2002) studied on 27 children with SRNS in Israel found that the *NPHS2* gene mutation only occurred in 55% of Israeli-Arabian children, while the Hebrew child did not have this mutation. Studies in Japan and China found that the rate of detection of *NPHS2* mutations in children with idiopathic SRNS was very low. To date, there has been no consistency in the frequency, incidence, and location of mutations in the *NPHS2* gene. Compared with published studies in the world, we found that the results of mutant detection of *NPHS2* gene in general and on exon 2 of *NPHS2* in particular in children with idiopathic SRNS in Vietnam in this study were higher tendency. This may be a different genetic trait in children in Vietnam with idiopathic nephrotic syndrome in general and idiopathic SRNS in particular. This is of great genetic significance for further research in the field of molecular biology in children with idiopathic nephrotic syndrome in Vietnam.

4.3. Correlation between phenotypes and genotypes of patients with idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome

4.1.4. Subclinical characteristics

Comparative results of some biochemical indices of the blood and urine in table 3.4. showed that patients with steroid-resistant group had the level of expression is heavier than steroid-sensitive. In table 3.5 and 3.6., when comparing levels of acute kidney injury with pRIFLE when they hospitalized (time begin study) and stages of renal failure at the end of the study showed that the SRNS group has a higher rate of acute kidney injury and renal failure ($p < 0.05$). All studies in the world have found that children with SRNS which had significantly affect renal function. The results of kidney biopsy showed that 34 patients with idiopathic SRNS. Result of chart 3.1 show that 24/34 patients (70.6%) had focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS), minimal change disease (MCD) was only 9 patients (24.6%), 1 patient (3%) had diffuse fibrosis. Through statistical systematically of the studies, we found that the histopathology results in our study were accordant and quite similar to those in the world.

4.2. Discussion on NPHS2 mutations expression

Of the 51 patients with detectable mutations, the steroid-resistant group had 44 patients (86.3%), the steroid-sensitive group had 7 patients (13.7%). Results of the distribution of the NPHS2 mutations in tables 3.7, and 3.8 showed that the 288C> (p .S96S) mutation on exon 2 was found only in the steroid-resistant group. Exon 4 has 10 mutations with two types of mutations: missense mutation 507C>T (L169F) and synonymous mutation 452G>A (G150G). Missense mutation 507C>T (L169F) only in steroid-resistant group. Seven cases in the steroid-sensitive group had synonymous mutations consisting of 4 cases synonymous mutation 452G>A (G150G) at exon 4, 2 cases 102 G> A (G34G) at exon 1 and one missense mutation 385G>T (Q128H) at exon 3. The frequency, location, and rate of detection of mutations in the NPHS2 gene, as well as the effect of these mutations on the phenotype of the patient, varied depending on the study, size sample and race of patients with idiopathic nephrotic syndrome in general and idiopathic SRNS in particular. The NPHS2 gene mutation was first reported by

nguyên tham gia nghiên cứu, các thông tin của bệnh nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid.

3.1.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

- Tuổi trung bình của bệnh nhân là $5,8 \pm 3,6$ tuổi, nhỏ nhất 4 tháng lớn nhất 16 tuổi. Tuổi mắc (tuổi khởi phát bệnh) là $4,09 \pm 2,87$ (4 tháng-14 tuổi). Tuổi mắc bệnh trung bình mắc giữa của trẻ bị HCTHTP kháng thuốc steroid không có sự khác biệt với trẻ bị HCTHTP nhạy cảm steroid. Thời gian mắc bệnh trung bình là $2,5 \pm 0,2$ năm. Thời gian từ khi khởi phát đến thời điểm nghiên cứu trung bình là $1,5 \pm 0,3$ năm. Thời gian theo dõi trung bình là $1,2 \pm 0,4$ năm. Có 100 trẻ trai chiếm 71,4%, 40 trẻ gái chiếm 28,6%, tỷ lệ trẻ trai/trẻ gái là 2,5.

3.1.2. Đặc điểm lâm sàng

Bảng 3.1: Liên quan mức độ tái phát của đối tượng nghiên cứu

Phân nhóm Mức độ	Nhạy cảm steroid	Kháng steroid	Tổng, p Chi-Square Tests
Tái phát dày	7 (15,2%)	58 (62,4%)	65
Tái phát thưa	39 (84,8%)	35 (37,6%)	74
Tổng	46	93	139 ($\chi^2 = 27,49$; $p=0,0001$)

Trẻ mắc HCTHTP nhóm kháng thuốc steroid có số tái phát dày cao hơn hẳn nhóm nhạy cảm steroid, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $\chi^2 = 27,49$; $p < 0,05$.

Bảng 3.2: So sánh số ngày nằm viện trung bình và số lần nhập của đối tượng nghiên cứu trong thời gian 12 tháng

Phân nhóm	Nhóm nhạy cảm steroid	Nhóm kháng steroid	p T-test
Số ngày/lần			
Số ngày nằm viện (ngày)	$8,8 \pm 4,7$	$24,9 \pm 23,5$	0,0001
Số lần tái phát (lần)	$1,5 \pm 0,7$	$4,2 \pm 1,6$	0,0001

Trẻ mắc HCTHTP kháng steroid có số ngày nằm viện và số lần tái phát cao hơn hẳn nhóm bệnh nhân nhạy cảm steroid, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Có 20 trẻ mắc HCTHTP thể không đơn thuần (20,2%) đều thuộc nhóm kháng steroid, nhóm nhạy cảm steroid không gặp thể không đơn thuần ($< 0,05$).

Bảng 3.3: Liên quan mức độ phù của đối tượng nghiên cứu tại thời điểm nhập viện

Phân nhóm Mức độ phù	Nhạy cảm steroid (n,%)	Kháng steroid (n,%)	Tổng, p Chi-Square Tests
Phù nhẹ	5 (10,9%)	3 (3,2%)	8
Phù vừa	35 (76,1%)	35 (37,3%)	70
Phù nặng	6 (13,0%)	56 (59,6%)	62
Tổng	46 (100%)	94 (100%)	139 ($\chi^2 = 27,61$; $p = 0,0001$)

HCTHTP kháng thuốc steroid có 56 bệnh nhân (chiếm 59,6%) bị phù mức độ nặng cao hơn hẳn nhóm bệnh nhân nhạy cảm steroid chỉ có 6 bệnh nhân (chiếm 13,0%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $\chi^2 = 27,61$; $p < 0,05$.

3.1.3. Đặc điểm cận lâm sàng

Bảng 3.4: So sánh chỉ số sinh hóa máu và nước tiểu trung bình của đối tượng nghiên cứu tại thời điểm nhập viện

Chỉ số Phân nhóm	Nhạy cảm steroid	Kháng steroid	p T-test
Protein máu (g/l)	43,4 ± 5,1	38,8 ± 4,9	0,001
Albumin máu	14,6 ± 2,4	13,3 ± 2,2	0,002
Protein niệu (g/l)	13,1 ± 6,1	18,9 ± 13,9	0,001
Protein/creatinin niệu (mg/mmol)	1.808 ± 866	2.556 ± 1499	0,001
Ure máu (mmol/l)	4,6 ± 2,2	6,6 ± 5,8	0,004
Creatinin máu (mmol/l)	42,5 ± 14,5	68,9 ± 106,8	0,02
Cholesterol máu (mmol/l)	10,7 ± 2,5	11,7 ± 3,9	0,09

hypertension, 22% hematuria, 12.5% renal failure. Alberto et al (2013) studied on 136 children with idiopathic SRNS in Brazil and found 15% hypertension, 18% renal insufficiency and hematuria. Mortazavi et al studied in Iran for 10 years (from 1999 to 2010) on 165 patients with idiopathic nephrotic syndrome which had 41 children (24.8%) with steroid-resistant. Hematuria, hypertension in the steroid-resistant group were 51.2% and 14.6%, it is higher than the steroid-sensitive group (17.3% and 10.5%), 9 patients (5.4%) with steroid-resistant were end-stage renal failure. Previous research in Vietnam of T.H.M. Quan when he retrospective 67 children with idiopathic SRNS at Children's Hospital I showed that without children had renal failure, hypertension was only 6%, without hematuria. The clinical, subclinical of idiopathic nephrotic syndrome atypical in our study when compared with study of T.H.M. Quan at Children's Hospital I, the clinical symptoms of idiopathic nephrotic syndrome atypical encountered with much higher rate, but it was lower than some abroad studies.

The mortality rate in children with steroid-resistant nephrotic syndrome with 288C> T mutation was 21.6%, higher than those without mutation (1%), ($p < 0.05$). The 288C> T mutation increased the risk of death in children with steroid-resistance nephrotic syndrome to 28,14 times.

CHAPTER 4 DISCUSSION

4.1. Discussion on clinical characteristics, subclinical idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome

Comparing to studies in some parts of the world, the average age of children with idiopathic SRNS in our study was higher than some places but it was lower than other places, however all documents were unified that the average age of idiopathic SRNS was predominantly pre-school and school-age children. The results in our study without difference but the smallest age which we encountered was 4 months, the earlier studies have few reports. The sex distribution of children who had idiopathic SRNS was not different from children who had idiopathic SSNS. Comparing with the documents, the results in this study found that the rate of boys with idiopathic SRNS was always higher than that of girls. The results of table 3.1 and 3.2 were show that patients in steroid resistance group had an average number hospitalized days per year was 24 ± 23.5 days and recurrence times was 4.2 ± 1.6 times. These two parameters were significantly higher than those of the steroid-resistant group (average number hospitalized days was 8.8 ± 4.7 days and average recurrence times was 1.5 ± 0.7 times), difference was statistical significance with $p < 0.05$. Thus, if patient has idiopathic SSNS in a year, the average of hospitalized days will be about 4 weeks, it affected to the life, activities and learning of children (school age children). That is also a significant financial burden for their family and society when healthy costs are increased.

Idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome included 19 patients (20.2%) atypical, in while steroid-sensitive group didn't encounter ($p < 0.05$). Roy et al studied on 32 children with SRNS in Bangladesh and found 71.88% idiopathic nephrotic syndrome atypical in which 40.63%

Trẻ bị kháng thuốc steroid có chỉ số protein trung bình và albumin trung bình trong máu thấp hơn, ngược lại protein niệu và chỉ số protein/creatinin niệu cao hơn nhóm nhạy cảm. Chỉ số ure/crea máu nhóm kháng thuốc steroid cũng cao hơn với $p < 0,05$.

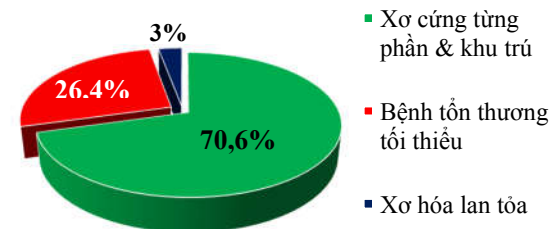
Bảng 3.5: Liên quan mức độ tổn thương thận cấp và kháng thuốc của đối tượng nghiên cứu tại thời điểm nhập viện

Phân nhóm / Phân loại	Nhạy cảm steroid (n,%)	Kháng steroid (n,%)	Tổng, p Fisher's Exact Test
Không có TTTC	40 (87,0%)	69 (74,1%)	108
Nguy cơ	3 (6,5%)	10 (10,8%)	13
Tổn thương	3 (6,5%)	9 (9,7%)	12
Mất bù	0 (0%)	4 (4,3%)	4
Suy thận giai đoạn cuối	0 (0%)	2 (2,2%)	2
Tổng	46 (100%)	94 (100%)	140 (p = 0,03)

MLCT*: Mức lọc cầu thận

87% bệnh nhân nhóm nhạy cảm steroid không bị tổn thương thận cấp, trong khi đó nhóm kháng thuốc chỉ có 74,1%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả sinh thiết được 34 bệnh nhân được thể hiện trong biểu đồ 3.3. dưới đây



Biểu đồ 3.1: Phân bố bệnh nhân theo thể mô bệnh học của nhóm kháng steroid

HCTHTP kháng thuốc steroid thể mô bệnh học chủ yếu là FSGS 70,6%, thể MCD chỉ gặp 26,4%, có 1 (3%) bệnh nhân bị xơ hóa lan tỏa.

Bảng 3.6: Liên quan thay giai đoạn suy thận mạn của đối tượng nghiên cứu tại thời điểm kết thúc nghiên cứu

Phân nhóm	Nhạy cảm steroid	Kháng steroid	Tổng, p Fisher's Exact Test
Giai đoạn STM			
Giai đoạn 1	39 (84,4%)	61 (64,9%)	100
Giai đoạn 2	6 (13,0%)	9 (9,6%)	13
Giai đoạn 3	1 (2,2%)	7 (7,4%)	8
Giai đoạn 4	0	2 (2,1%)	2
Giai đoạn 5	0	15 (16,0%)	15
Tổng	46 (100%)	94 (100%)	140 (p=0,008)

STM: Suy thận mạn

Nhóm nhạy cảm steroid chưa có bệnh nhân tiến triển đến suy thận giai đoạn 4 và 5, trong khi đó nhóm kháng thuốc steroid có 2 bệnh nhân ở giai đoạn 4, 15 bệnh nhân giai đoạn 5, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

3.2. Kết quả giải trình tự 6 exon (ex1-ex6) gen NPHS2

3.2.1. Kết quả giải trình tự tìm đột biến gen NPHS2

Chúng tôi đã giải trình tự 6 exon của gen NPHS2 (từ exon 1 đến exon 6), đã xác định được 5 thể đột biến với tần số 52 lần ở 51 trẻ (1 trường hợp mang 2 đột biến tại exon 4 thuộc nhóm kháng thuốc steroid). 45 trường hợp mang đột biến đồng nghĩa, 6 trường hợp mang đột biến sai nghĩa. Tỷ lệ phát hiện thấy đột biến gen NPHS2 chung là 36,4%, trong đó nhóm kháng thuốc steroid có 44 trẻ (chiếm 31,4%), nhóm nhạy cảm có 7 trẻ (5%). Tỷ lệ đột biến gen NPHS2 ở nhóm kháng thuốc 46,8%, nhóm nhạy cảm là 15,2%, đa số xuất hiện tại exon 2 của gen NPHS2 với 37/52 (chiếm 71,2%), chỉ phát hiện thấy ở nhóm kháng thuốc steroid. Có 51 đột biến dạng dị hợp, 1 đột biến dạng đồng hợp 288C>T (S96S).

Bảng 3.7: Tần số và tỷ lệ các đột biến của 52 đột biến gen NPHS2

Đột biến Exon	Các đột biến gen NPHS2		Tần số	Tỷ lệ %
	c.DNA	protein		
Exon 2	288C>T	p.S96S	37	71,2
Exon 4	507C>T	p.L169F	4	7,7
	425G>A	p.G150G	6	11,5
Exon 1	102G>A	p.G34G	3	5,7
Exon 3	385G>T	p.Q128H	2	3,8
Tổng số			52	100%

Albumin (g/l)	13,1 ± 2,5	14,2 ± 2,1	0,01
Proteinuria (g/l)	20,1 ± 15,1	15,1 ± 9,8	0,04
Protein / Creatininuria (mg/mmol)	2509 ± 1432	1948 ± 991	0,001

Serum urea, creatinine concentration in the group with higher mutation was higher than non-mutant, blood protein and serum albumin levels; Proteinuria and proteinuria /creatinine ratio were significantly higher than non-mutant ($p < 0.05$).

Table 3.11: Treatment outcomes and NPHS2 mutation at the end of the study

Grouping Conclusion	NPHS2 gene mutation		Total, p Fisher's Exact Test
	Yes (n,%)	No (n,%)	
Fully reduced	18 (35,3%)	53(59,6%)	71
Partly reduced	16 (31,4%)	28(31,5%)	44
Not relieved	3(5,9%)	3(3,4%)	6
End-stage renal disease	6(11,8%)	4(4,5%)	10
Dead	8(15,7%)	1(1,1%)	9
Total	51 (100%)	89(100%)	140 (p=0,006)

NPHS2 gene mutations had a higher rate of end-stage renal failure and mortality than those without a mutation ($p < 0.05$).

The NPHS2 gene mutation increased the risk of end-stage renal disease by 5.85 times and increased the risk of death by 16.37. If a child carries a 288C> T mutation, it increases the risk of progressive end-stage renal disease by 7.26.

Table 3.12: Relatedness and risk of death in children with steroid-resistant children with 288C> T mutation at end of study

Grouping Conclusion	Polynomial 288C> T		Total, p, OR (95%CI) Fisher's Exact Test
	Yes (n,%)	No (n,%)	
Dead	8 (21,6%)	1 (1,0%)	9 (6,4%)
Alive	29 (78,4%)	102 (99,0%)	131 (93,6%)
Total	37 (100%)	103 (100%)	140 (p=0,0001); 28,14 (3,38-234,27)

3.3. Relationship between clinical characteristics, subclinical and genetic mutations

3.3.1. Relative clinical characteristics of the subject and NPHS2 gene mutation

There was no gender association between the two mutant groups and no NPHS2 mutation. There was no difference between the mutant and no NPHS2 mutations in clinical presentation. The recurrence rate between the two groups of patients with mutations and no gene mutations was not significantly different ($p > 0.05$).

Table 3.9: Relationship between drug response and NPHS2 gene mutation

Grouping	NPHS2 gene mutation		Total, p Chi-Square Tests
	Yes (n,%)	No (n,%)	
Drug response			
Sensitive	7 (13,7%)	39 (44,9%)	46
Drug resistance	44 (86,3%)	50 (55,1%)	94
Total	51 (100%)	89(100%)	140 ($\chi^2 = 14,1$; $p=0,0001$)

86.3% of patients with NPHS2 mutation in patients with steroid-resistant nephrotic syndrome were significantly higher than the steroid-sensitive group (only 13.7%), the difference was statistically significant with $\chi^2 = 14.1$; $p < 0.05$.

Patients with NPHS2 mutation increased the risk of steroid resistance to 4.903 (95% CI: 1.992-12.069)

3.3.2. Correlation of clinical characteristics and genotype

Table 3.10: Comparison of blood and urine biochemical indexes for hospitalization between mutant and non-mutant NPHS2

Index	NPHS2 gene mutation		p T- test
	Yes (X ± SD)	No (X ± SD)	
Ure (mmol/l)	7,3 ± 6,7	5,2 ± 3,5	0,04
Creatinin (mmol/l)	86,4 ± 14,9	45,3 ± 22,6	0,008
Protein (g/l)	37,5 ± 5,3	42,7 ± 4,8	0,001

Nhận xét: 71,2% các đột biến phát hiện được xuất hiện tại exon 2 của gen NPHS2.

Bảng 3.8: Phân bố tần số và tỷ lệ đột biến của 52 đột biến gen NPHS2 ở hai nhóm nhạy cảm và kháng thuốc steroid

Đột biến	Phân nhóm	Nhạy cảm steroid (n,%)	Kháng steroid (n,%)	Tổng, n (%) (Fisher's Exact Test)
Exon 2: 288C>T (S96S)		0 (0%)	37 (71,2%)	37 (71,2)
Exon 4: 507C>T(L169F)		0 (0%)	4 (7,7%)	4 (7,7)
Exon 4: 452G>A (G150G)		4 (7,7%)	2 (3,8%)	6 (11,5)
Exon 1: 102G>A (G34G)		2 (3,8%)	1 (1,9%)	3 (5,7)
Exon 3: 385G>T (Q128H)		1 (1,9%)	1 (1,9%)	2 (3,8)
Tổng		7	45	52 (100%) 0,0001

Nhận xét: Nhóm nhạy cảm steroid chủ yếu tại exon 4 và 1, nhóm kháng thuốc steroid xác định được đột biến trên cả 4 exon của gen NPHS2.

3.2.2. Minh họa kiểu hình và kiểu gen ở một số bệnh nhân

Kiểu hình

Hoàng Văn T nam
Khởi phát lúc 6 tháng tuổi.

Chẩn đoán:

HCTHTP kháng thuốc sớm, không đơn thuần (suy thận), thời gian bị bệnh 10 tháng.

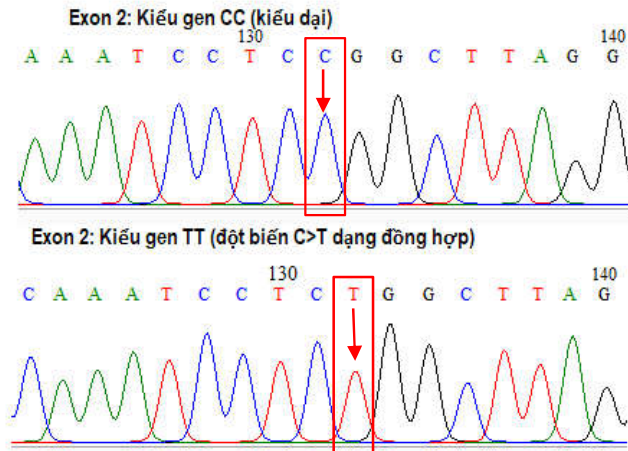
Lâm sàng: Phù to, tràn dịch đa màng. Nhiễm trùng; Suy thận giai đoạn cuối khi 10 tháng và tử vong tại nhà.



Kiểu gen

Exon 2
288C>T
(p.S96S)

Hình 3.1: Kiểu hình bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid



Hình 3.2: Hình ảnh kiểu đại và đột biến 288C>T (S96S) đồng hợp trên đối tượng nghiên cứu

Nhận xét: Đột biến đồng nghĩa 288C>T (S96S) đồng hợp do thay thế nucleotid tại vị trí 16170 C>T làm cho bộ ba thứ 96 từ TCC thành TCT cùng mã hóa Serine.

Kiểu hình

Hoàng Bá T nam
6 tuổi, thời gian bị bệnh 12 tháng
Chẩn đoán:
HCTHTP kháng thuốc sớm
Lâm sàng: Phù to
Tràn dịch da màng
Nhiễm trùng
Suy thận giai đoạn cuối sau 24 tháng. Từ vong do suy thận giai đoạn cuối.



Kiểu gen

Exon 2
288C>T
(p.S96S)

Hình 3.3: Kiểu hình bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid

	Phenotype	Genotype
Vương Ngọc Anh Đ Male 4 years' old Diagnosis: Steroid-sensitivity nephrotic syndrome. Duration of disease: 12 months. Clinical: edema		Exon 1 102 G>A p.Gly34Gly

Figure 3.10: Phenotype of patients with Steroid-sensitivity nephrotic syndrome

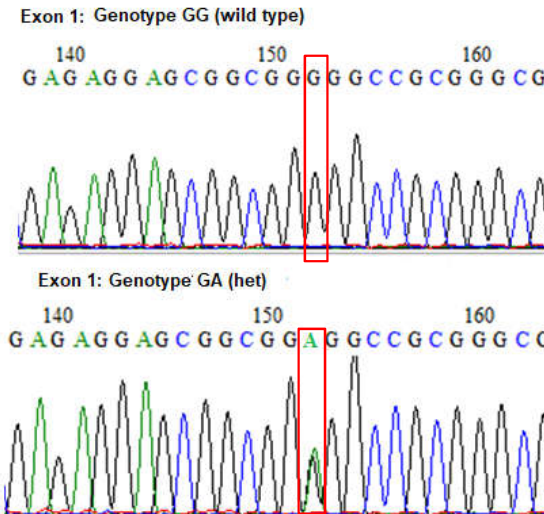


Figure 3.11: Wilde type and Het mutation image of 102 G>A p.G34G

Patient had a synonymous mutation 102 G>A (G34G) at nucleotide number 5250 at exon 1 by replacing G> A as the GGG into GGA with Glycin amino acid coding.

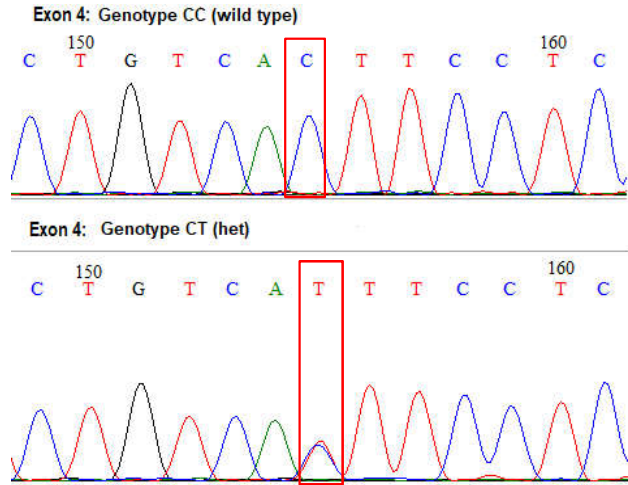
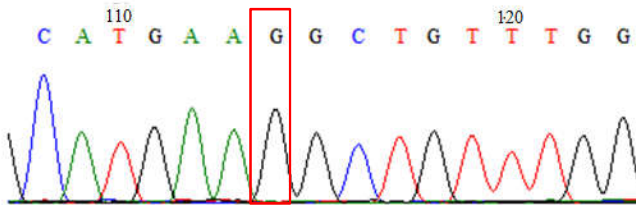


Figure 3.8: Wilde type and Het mutation image of 507 C>T (L169F)

Exon 4: Kiểu gen GG (Kiểu dại)



Exon 4: Kiểu gen GA (dị hợp)

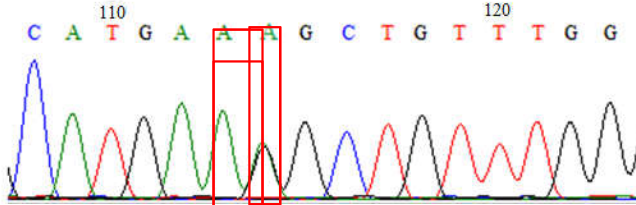
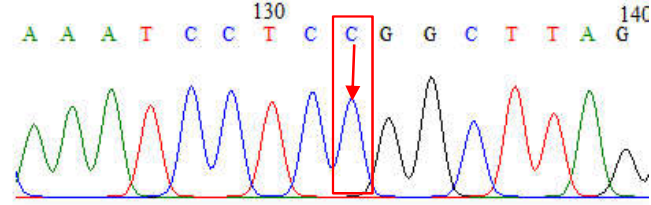


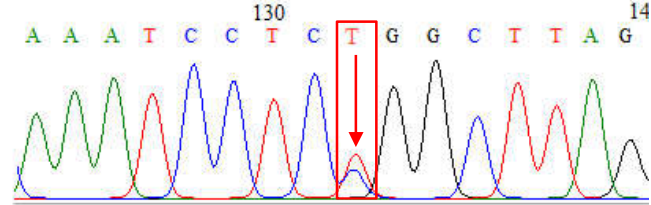
Figure 3.9: Wilde type and Het mutation image of 452G>A (G150G)

Patient with missense mutation 507 C>T change CTT Leucine encoding into TTT Phenylalanine encoding and and synonymous mutation 452G>A (G150G) at exon 4.

Exon 2: Kiểu gen CC (kiểu dại)



Exon 2: Kiểu gen CT (đột biến 288C>T dị hợp)



Hình 3.4: Hình ảnh kiểu dại và dị hợp tử chứa đột biến 288C>T (S96S)

Nhận xét: Đột biến đồng nghĩa 288C>T (S96S) dị hợp do thay thế C>T làm cho bộ ba thứ 96 từ TCC thành TCT cùng mã hóa Serine.

Kiểu hình

Nguyễn Vũ Ngọc K nam; 12 tuổi

Chẩn đoán:

HCTHTP kháng thuốc muện, thể không đơn thuần (tăng huyết áp), thời gian bị bệnh 7 năm.

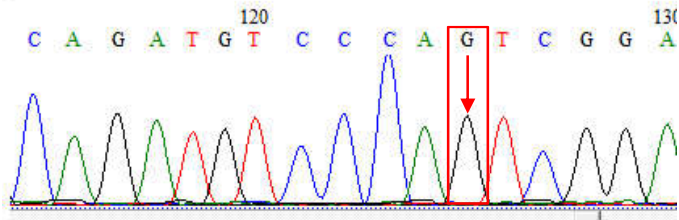
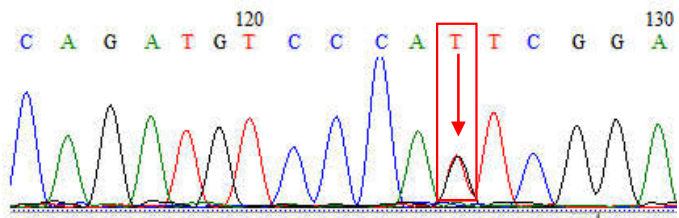
Lâm sàng: Phù vừa; Cushing; mô bệnh học trên sinh thiết thận thể FSGS



Kiểu gen

Exon 3:
385G>T
(Q128H)

Hình 3.5: Kiểu hình bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid

Exon 3: Kiểu gen GG (Kiểu dại)**Exon 3: Kiểu gen GT (Dị hợp)**

Hình 3.6:
Hình ảnh
kiểu dại và dị
hợp tử chứa
đột biến
385G>T
(Q128H)

Nhận xét: Đột biến sai nghĩa 385G>T (Q128H) dị hợp do thay thế nucleotid G>T làm cho bộ ba thứ 128 từ CAG (mã hóa Glutamin) thành CAT (mã hóa Histamin).

Kiểu hình

Kiểu

Patient had missense mutation 385G>T (Q128H) at exon 3 replacing 128 CAG (Glutamine encoding) change CAT (Histamine encoding).


<i>Phenotype</i>		<i>Genotype</i>
<p>Kieu Thi Hai M; 9 years old, female Diagnose: Late-stage steroid-resistance nephrotic syndrome, not only (hematuria) Clinical: severe edema; Histopathology: FSGS type. End stage renal failure, waiting for kidney transplant.</p>		<p>Exon 4: 507 C>T (L169F) and 452C>T (G150G)</p>

Figure 3.7: Type of patients with stable steroid resistant nephrotic syndrome

Phenotype
 Nguyen Vu Ngoc K male;
 12 years' old
 Diagnose:
 Late-stage steroid-resistant
 nephrotic syndrome, not
 only (hypertension),
 duration of disease was 7
 years.

Clinical: Moderate
 edema; Cushing;
 Histopathology: FSGS type.



Genotype

Exon 3:
 385G>T (Q128H)

Figure 3.5: Type of patients with stable steroid resistant nephrotic syndrome,

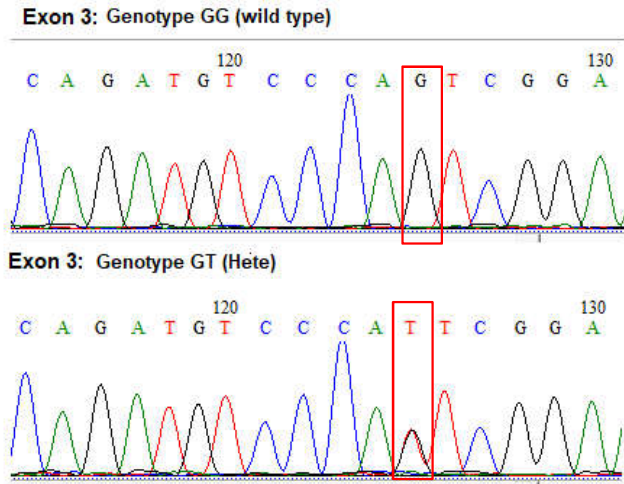


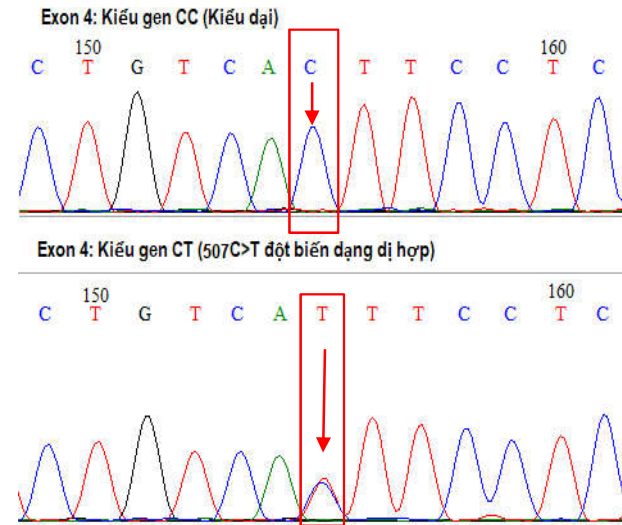
Figure 3.6: Wilde
 type and Het
 mutation image of
 385G>T (Q128H)

Kiều Thị Hải M;
 9 tuổi, nữ
 Chẩn đoán:
 HCTHTP kháng thuốc
 muộn, thời gian mắc 5 năm.
 Thê lâm sàng: không đơn
 thuần (đái máu)
 Lâm sàng: phù nặng; mô
 bệnh học: FSGS. Suy thận
 giai đoạn cuối, chờ ghép
 thận.



gen
 Exon 4:
 CT
 507
 C>T
 (L169F
) và
 452G>
 A
 (G150
 G)

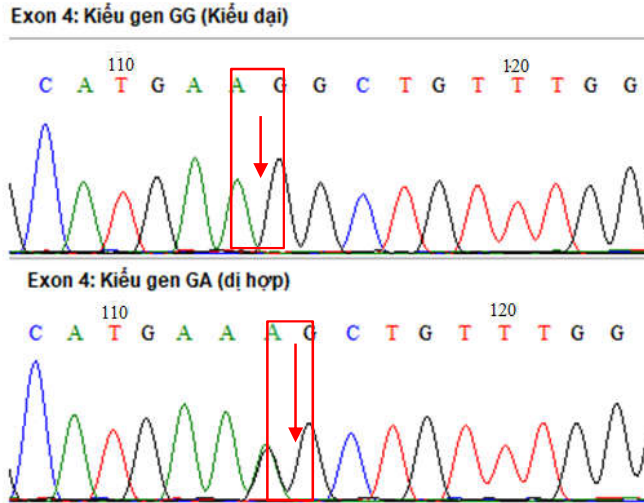
Hình 3.7: Kiểu hình bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid



Hình
 3.8:
 Hình
 ảnh
 kiểu
 gen
 bình
 thường
 và đột
 biến
 507
 C>T(L
 169F)
 dị hợp

Đột biến sai nghĩa 507 C>T (L169F) tại exon 4 làm cho

CTT mã hóa Leucin thành TTT mã hóa Phenylalanin.



Hình 3.9: Hình ảnh kiểu dại và dị hợp đột biến 452G>A trên bệnh nhân mang 2 đột biến tại exon 4.

Nhận xét: Bệnh nhân có kiểu hình là trẻ nữ bị HCTHTP kháng thuốc steroid, mang hai đột biến sai nghĩa là 507C>T (L169F) và đột biến đồng nghĩa 452G>A (G150G).

Kiểu hình

Vương Ngọc Anh Đ
 Nam 4 tuổi
 Chân đoán: HCTHTP
 nhạy cảm steroid
 Thời gian mắc bệnh:
 12 tháng.
 Lâm sàng: Phù to,



Kiểu gen

Exon 1
 102 G>A
 G34G

caused by change location of nucleotide at position 16170 C> T made the 96th TCC become Serine TCT triple.

Phenotype

Hoang Ba T male
 6 years, duration of disease
 was 12 months
 Diagnose:
 Steroid-resistance nephrotic
 syndrome in early age
 Clinical characteristic: severe
 edema; multi-membrane
 effusion. Infection; End-stage
 renal disease after 24 months.
 Death from end-stage renal
 failure.



Genotype

Exon 2
 288C>T
 p.S96S)

Figure 3.3: Type of patients with stable steroid resistance

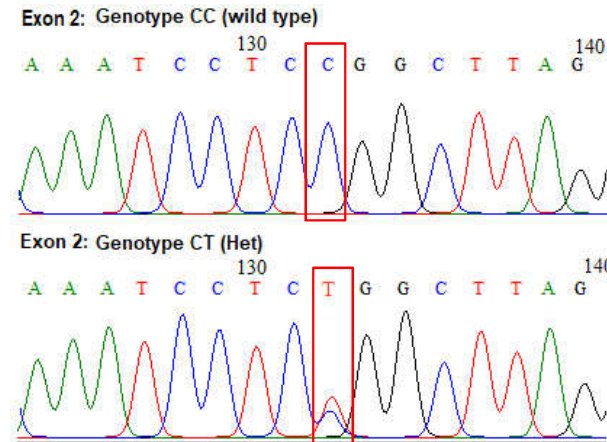


Figure 3.4: Wilde type and Het mutation image of 288C> T (S96S)

Patient who had synonymous mutated heterozygous 288C>T (S96S) caused by change location of nucleotide at position 16170 C> T made the 96th TCC become Serine TCT triple

			0,001
--	--	--	-------

Mutations in the steroid-sensitive group at exon 4 and 1, the drug resistance group found mutations in all 4 exons of the NPHS2 gene.

3.2.2. Phenotypic and genotype implications in some patients

Phenotype
 Hoang Van T male
 Onset at 6 months.
 Diagnose: Steroid-resistance nephrotic syndrome in early age, not just kidney failure, duration of disease was 10 months.
 Clinical characteristics: severe edema; multi-membrane effusion. Infection; End-stage renal disease at 10 months and mortality at home.



Genotype
 Exon 2
 288C>T
 (p.S96S)

Figure 3.1: Type of patients with steroid resistant staphylococcus

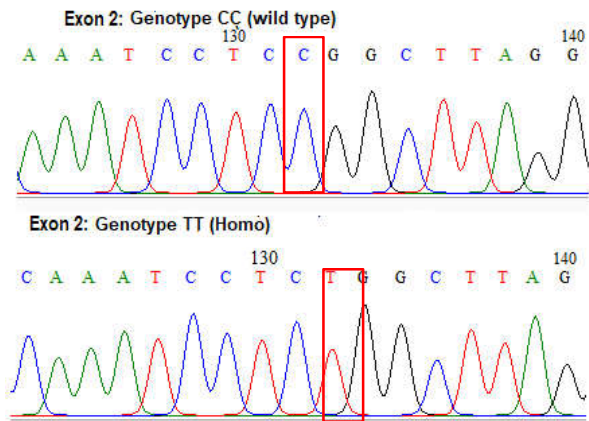
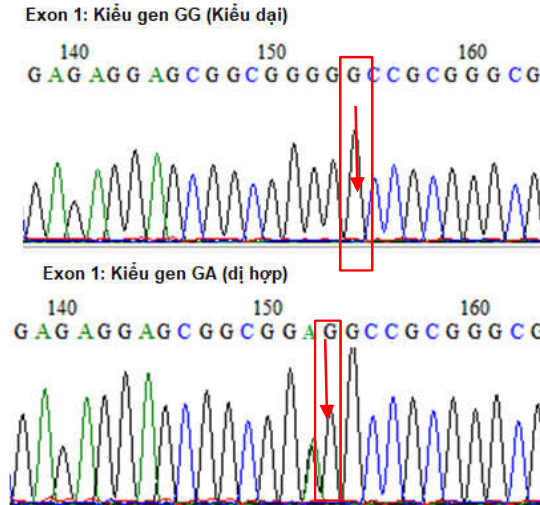


Figure 3.2: Wilde type and homozygous mutation image of 288C>T (S96S)

Patient who had synonymous mutated homozygous 288C>T (S96S)

Hình 3.10: Kiểu hình bệnh nhân mắc HCTHTP nhạy cảm steroid



Hình 3.11: Hình ảnh đột biến 102 G>A (p.G34G)

Nhận xét: Đột biến đồng nghĩa 102G>A tại exon 1 do thay thế G>A làm bộ ba GGG thành GGA cùng mã hóa Glycin ở trẻ bị HCTHTP nhạy cảm steroid.

3.3. Liên quan giữa đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen

3.3.1. Liên quan đặc điểm lâm sàng của đối tượng nghiên cứu và đột biến gen NPHS2

Không có sự liên quan về giới giữa hai nhóm có đột biến và không có đột biến gen NPHS2. Về biểu hiện lâm sàng là phù cũng không có sự khác biệt giữa nhóm có đột biến và không có đột biến gen NPHS2. Mức độ tái phát giữa hai nhóm bệnh nhân có đột biến gen và không có đột biến gen cũng không có sự khác biệt (p>0,05).

Bảng 3.9: Liên quan giữa đáp ứng thuốc và đột biến gen NPHS2

Phân nhóm / Đáp ứng thuốc	Đột biến gen NPHS2		Tổng, p Chi-Square Tests
	Có (n,%)	Không (n,%)	
Nhạy cảm	7 (13,7%)	39 (44,9%)	46
Kháng thuốc	44 (86,3%)	50 (55,1%)	94
Tổng	51 (100%)	89(100%)	140 (χ² = 14,1; p=0,0001)

86,3% bệnh nhân có đột biến gen NPHS2 ở nhóm bệnh nhân mắc

HCTHTP kháng thuốc steroid, cao hơn hẳn nhóm nhạy cảm thuốc steroid (chỉ có 13,7%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $\chi^2 = 14,1$; $p < 0,05$.

Bệnh nhân mắc HCTHTP có đột biến gen *NPHS2* làm tăng nguy cơ kháng thuốc steroid lên 4,903 lần (95%CI: 1,992-12,069)

3.3.2. Tương quan đặc điểm cận lâm sàng và kiểu gen

Bảng 3.10: So sánh một số chỉ số hóa sinh máu và nước tiểu trung bình khi nhập viện giữa nhóm có đột biến và nhóm không có đột biến gen *NPHS2*

Phân nhóm Chỉ số	Đột biến gen <i>NPHS2</i>		p T-test
	Có (X ± SD)	Không (X ± SD)	
Ure (mmol/l)	7,3 ± 6,7	5,2 ± 3,5	0,04
Creatinin (mmol/l)	86,4 ± 14,9	45,3 ± 22,6	0,008
Protein (g/l)	37,5 ± 5,3	42,7 ± 4,8	0,001
Albumin (g/l)	13,1 ± 2,5	14,2 ± 2,1	0,01
Protein niệu (g/l)	20,1 ± 15,1	15,1 ± 9,8	0,04
Protein/creatinin niệu(mg/mmol)	2509 ± 1432	1948 ± 991	0,001

Nồng độ ure, creatinin máu ở nhóm có đột biến cao hơn nhóm trẻ không mang đột biến, protein máu và albumin máu lại thấp hơn; protein niệu và protein/creatinin niệu nhóm có đột biến cao hơn nhóm không đột biến ($p < 0,05$).

Bảng 3.11: Kết quả điều trị và đột biến gen *NPHS2* khi kết thúc nghiên cứu

Phân nhóm Kết quả	Đột biến gen <i>NPHS2</i>		Tổng, p Fisher's Exact Test
	Có (n,%)	Không (n,%)	
Thuyên giảm hoàn toàn	18 (35,3%)	53 (59,6%)	71
Thuyên giảm một phần	16 (31,4%)	28 (31,5%)	44
Không thuyên giảm	3 (5,9%)	3 (3,4%)	6
Suy thận giai đoạn cuối	6 (11,8%)	4 (4,5%)	10
Tử vong	8 (15,7%)	1 (1,1%)	9
Tổng	51 (100%)	89 (100%)	140 (p=0,006)

Đột biến gen *NPHS2* có tỷ lệ suy thận giai đoạn cuối và tử vong cao hơn nhóm không có đột biến gen ($p < 0,05$).

3.2. Results of the 6 exon (ex1-ex6) sequencing of the *NPHS2* gene

3.2.1. Results of *NPHS2* mutation sequencing

The sequencing in 6 exons, there were 51 patients with 52 mutations occurring in 4 exons (ex1, ex2, ex3, ex4), exon 5 and exon 6 with no mutations. Of the 52 mutations detected, 50 patients had one mutation, one with two mutations (the steroid resistant group). The incidence of *NPHS2* mutation was 36.4%, in which 44 patients (31.4%) had steroid resistance, and 7 patients had steroid sensitivity (5%). The percentage of patients carrying the *NPHS2* gene mutation was 46.8%, the sensitive group was 15.2%. One case homozygous mutation and 50 cases in heterozygosity.

Table 3.7: Frequency and mutation rates of 52 *NPHS2* mutations

Mutation Exon	The <i>NPHS2</i> gene mutation		Frequency	Ratio %
	c.DNA	Protein		
Exon 2	288C>T	p.S96S	37	71,2
Exon 4	507C>T	p.L169F	4	7,7
	425G>A	p.G150G	6	11,5
Exon 1	102G>A	p.G34G	3	5,7
Exon 3	385G>T	p.Q128H	2	3,8
Total			52	100%

71.2% of the mutation were detected at exon 2 of the *NPHS2* gene.

Table 3.8: Frequency distribution and mutation incidence of 52 *NPHS2* mutations in two sensitive and steroid resistant groups

Mutation	Grouping	Steroid sensitivity (n,%)	Steroid resistant (n,%)	Total n (%),p
Exon 2: 288C>T (S96S)		0 (0%)	37 (71,2%)	37 (71,2)
Exon 4: 507C>T(L169F)		0 (0%)	4 (7,7%)	4 (7,7)
Exon 4: 452G>A (G150G)		4 (7,7%)	2 (3,8%)	6 (11,5)
Exon 1: 102G>A (G34G)		2 (3,8%)	1 (1,9%)	3 (5,7)
Exon 3: 385G>T (Q128H)		1 (1,9%)	1 (1,9%)	2 (3,8)
Total		7	45	52 (100%),

The steroid-sensitive group did not have patients progressing to CKD stages 4 and 5, whereas the steroid resistance group had 2 patients in stage 4, 15 patients in stage 5, the difference was statistically significant with $p < 0.05$.

Đột biến gen *NPHS2* làm tăng nguy cơ suy thận giai đoạn cuối lên 5,85 lần và làm tăng nguy tử vong lên 16,37 lần. Nếu trẻ mang đột biến 288C>T còn làm tăng nguy cơ tiên triển đến suy thận giai đoạn cuối lên 7,26 lần.

Bảng 3.12: Liên quan và nguy cơ tử vong ở trẻ mắc HCTTH kháng thuốc steroid có đột biến 288C>T khi kết thúc nghiên cứu

Phân nhóm	Đa hình 288C>T		Tổng, p, OR (95%CI) <i>Fisher's Exact Test</i>
	Có (n,%)	Không (n,%)	
Kết quả			
Tử vong	8 (21,6%)	1 (1,0%)	9 (6,4%)
Sống	29 (78,4%)	102 (99,0%)	131 (93,6%)
Tổng	37 (100%)	103 (100%)	140 ($p=0,0001$); 28,14 (3,38-234,27)

Tỷ lệ tử vong ở trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid có đột biến 288C>T là 21,6%, cao hơn nhóm không có đột biến (1%), ($p < 0,05$). Đột biến 288C>T làm tăng nguy cơ tử vong ở trẻ mắc HCTHTP kháng steroid lên 28,14 lần. Khi đánh giá ảnh hưởng của từng vị trí đột biến chúng tôi thấy không có sự khác biệt về lâm sàng và xét nghiệm. Ảnh hưởng của kiểu đột biến lên tiên triển và đáp ứng điều trị chúng tôi thấy đột biến đồng nghĩa 288C>T có tỷ lệ thuyên giảm thấp hơn với $p < 0,05$.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Bàn luận về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng HCTHTP kháng thuốc steroid

So với các nghiên cứu ở một số nơi trên thế giới đã công bố cho thấy tuổi trung bình của trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid có nơi cao hơn cũng có nơi thấp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi, nhưng y văn đều thống nhất tuổi trung bình mắc HCTHTP phần lớn là trẻ trong độ tuổi tiền học đường và học đường. Kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi không có sự khác biệt, tuy nhiên tuổi nhỏ nhất chúng tôi gặp là 4 tháng, các nghiên cứu trước đó ít có báo cáo. Phân bố về giới trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid không có sự khác biệt với trẻ mắc HCTHTP nhạy cảm steroid. Kết quả trong nghiên cứu này so với trong y văn đều nhận thấy tỷ lệ trẻ trai mắc HCTHTP luôn cao hơn trẻ gái. Kết quả trong bảng 3.1., 3.2., cho thấy bệnh nhân nhóm kháng thuốc steroid có số ngày nằm viện trung bình trong 1 năm là $24 \pm 23,5$ ngày và số lần tái phát là $4,2 \pm 1,6$ lần, hai chỉ số này đều cao hơn nhiều nhóm nhạy cảm steroid (số ngày nằm viện trung bình $8,8 \pm 4,7$ ngày và số lần tái phát trung bình là $1,5 \pm 0,7$ lần), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Như vậy khi bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid trong 1 năm bệnh nhân phải nằm

viện trung bình khoảng 4 tuần, gây ảnh hưởng nhiều đến cuộc sống, sinh hoạt và học tập của trẻ (do trẻ trong độ tuổi đi học). Ngoài ra còn là gánh nặng không nhỏ về tài chính của gia đình trẻ và xã hội khi các chi phí y tế tăng lên.

HCTHTP kháng thuốc có 19 bệnh nhân (20,2%) thể không đơn thuần, nhóm nhạy cảm không gặp ($p < 0,05$). Roy và cs nghiên cứu 32 trẻ mắc HCTH kháng steroid tại Bangladesh thấy 71,88% HCTHTP không đơn thuần trong đó 40,63% cao huyết áp, đái máu gặp 22%, suy thận gặp 12,5%. Alberto và cs (2013) nghiên cứu trên 136 trẻ mắc HCTHTP kháng steroid tại Brazil thấy cao huyết áp gặp 15%, suy thận và đái máu gặp 18%. Mortazavi và cs nghiên cứu tại Iran trong 10 năm (từ 1999 đến 2010) trên 165 bệnh nhân mắc HCTHTP có 41 trẻ (24,8%) bị kháng steroid. Đái máu, tăng huyết áp ở nhóm kháng thuốc là 51,2% và 14,6%, cao hơn hẳn nhóm nhạy cảm (17,3% và 10,5%), có 9 bệnh nhân (5,4%) kháng steroid bị suy thận giai đoạn cuối. Nghiên cứu trước đó tại Việt Nam của T.H.M. Quân khi hồi cứu 67 trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid tại bệnh viện Nhi Đồng I cho thấy không có suy thận nào bị suy thận, tăng huyết áp chỉ gặp có 6%, không gặp đái máu. Về các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng của HCTHTP thể không đơn thuần trong nghiên cứu của chúng tôi khi so sánh với nghiên cứu trong nước của T.H.M. Quân tại bệnh viện Nhi Đồng I thì các triệu chứng lâm sàng của HCTHTP không đơn thuần gặp với tỷ lệ cao hơn rất nhiều, nhưng lại thấp hơn một số nghiên cứu ở nước ngoài.

4.1.4. Đặc điểm cận lâm sàng

Kết quả so sánh một số chỉ số sinh hóa máu và nước tiểu trong bảng 3.4. cho thấy bệnh nhân nhóm kháng steroid có mức độ biểu hiện nặng nề nhóm nhạy cảm,

Bảng 3.5., và 3.6., khi so sánh các mức tổn thương thận cấp theo pRIFLE cho thấy khi nhập viện (thời điểm bắt đầu nghiên cứu) và các giai đoạn suy thận tại thời điểm kết thúc nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid có tỷ lệ tổn thương thận cấp và tỷ lệ suy thận mạn giai đoạn cuối cao hơn ($p < 0,05$). Các nghiên cứu trên thế giới đều thấy trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid ảnh hưởng lớn đến chức năng thận. Kết sinh thiết được 34 bệnh nhân bị HCTHTP kháng thuốc steroid, kết quả trong biểu đồ 3.1 cho thấy có 24/34 bệnh nhân (70,6%) biểu hiện thể tổn thương xơ cứng cầu thận từng phần và khu trú (FSGS: Focal and segmental glomerulosclerosis), thể bệnh tổn thương tối thiểu (MCD: minimal change disease) chỉ gặp 9 bệnh nhân (24,6%), 1 bệnh nhân (3%) tổn thương thể xơ hóa lan tỏa. Qua thống kê một số các hệ thống các nghiên cứu trong y văn chúng tôi thấy kết quả mô bệnh học trong nghiên

Serum albumin	14,6 ± 2,4	13,3 ± 2,2	0,002
Proteinuria (g / l)	13,1 ± 6,1	18,9 ± 13,9	0,001
Protein/crea ratio (mg/mmol)	1.808 ± 866	2.556 ± 1499	0,001
Serum urea (mmol / l)	4,6 ± 2,2	6,6 ± 5,8	0,004
Serum creatinine (mmol / l)	42,5 ± 14,5	68,9 ± 106,8	0,02
Serum cholesterol (mmol / l)	10,7 ± 2,5	11,7 ± 3,9	0,09

Steroid-resistant children had lower protein and albumin concentration levels in the serum, whereas proteinuria and proteinuria / creatinine were higher than those in the control group. Urea/creatinine ratio in the steroid-resistance group was also significantly higher with $p < 0,05$.

Table 3.5: Relative levels of acute kidney injury and drug resistance at admission time

	Steroid sensitivity (n,%)	Steroid resistant (n,%)	Total, p (Fisher's Exact Test)
No acute kidney injury	40 (87,0%)	69 (74,1%)	108
Risk	3 (6,5%)	10 (10,8%)	13
Injury	3 (6,5%)	9 (9,7%)	12
Decompensated	0 (0%)	4 (4,3%)	4
End-stage renal disease	0 (0%)	2 (2,2%)	2
Total	46 (100%)	94 (100%)	140 (p = 0,03)

87% of patients in the steroid sensitivity group had no acute renal impairment, whereas the resistance group was only 74.1%; the difference was statistically significant at $p < 0,05$.

Biopsy results of 34 patients are shown, the result show that pathologic in resistant-steroids group are mainly FSGS 70.6%, MCD only 26.4%, and 1 (3%) patients with diffuse fibrosis.

Table 3.6: Changes in the stage of chronic renal failure of study subjects at the end of the study

Grouping	Steroid sensitivity	Steroid resistant	Total, p (Fisher's Exact Test)
Stage of chronic renal failure			
1	39 (84,4%)	61 (64,9%)	100
2	6 (13,0%)	9 (9,6%)	13
3	1 (2,2%)	7 (7,4%)	8
4	0	2 (2,1%)	2
5	0	15 (16,0%)	15
Total	46 (100%)	94 (100%)	140 (p=0,008)

Total	46	93	139 ($\chi^2 = 27,4$; $p=0,001$)
--------------	----	----	--

Pediatric patients with steroid resistance syndrome had a higher recurrence interval rate than the steroid-sensitive group; the difference was statistically significant with $\chi^2 2 = 27.49$; $p < 0.05$.

Table 3.2: Comparison of average number of hospitalization days and number of admission times for 12 months

Grouping	Steroid-sensitive group	Steroid resistance group	P
Days/times			<i>T-test</i>
Number of hospitalization days (days)	8,8 ± 4,7	24,9 ± 23,5	0,0001
Recurrences (times)	1,5 ± 0,7	4,2 ± 1,6	0,0001

Children with steroid-resistant nephrotic syndrome had a higher number of hospitalization days and recurrence rates were significantly higher than those of the steroid-sensitive group, with a statistically significant difference at $p < 0.05$.

There were 20 children with STIs not only (20.2%) were steroid resistance group, steroid sensitivity group was not normal (< 0.05).

Table 3.3: Relation of the degree of edema of the subjects at admission

Grouping	Steroid sensitivity (n,%)	Steroid resistance (n,%)	Total, p
Level of edema			<i>Chi-Square Tests</i>
Slight	5 (10,9%)	3 (3,2%)	8
Mild	35 (76,1%)	35 (37,3%)	70
Severe	6 (13,0%)	56 (59,6%)	62
Total	46 (100%)	94 (100%)	139 ($\chi^2 = 27,61$; $p=0,001$)

Steroid-resistant nephrotic syndrome was 56 patients (59.6%) had a significantly higher level of edema than steroid-sensitive patients in only 6 patients (13.0%), statistically significant difference with $\chi^2 = 27.61$; $p < 0.05$.

3.1.3. Subclinical characteristics

Table 3.4: Comparison of mean of urine and serum biochemical parameters of subjects studied at the time of admission

Grouping	Steroid sensitivity	Steroid resistance	p
Index			<i>T-test</i>
Serum proteins (g / l)	43,4 ± 5,1	38,8 ± 4,9	0,001

cứu của chúng tôi phù hợp và khá tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới.

4.2. Bàn về kết quả phát hiện đột biến gen NPFS2

Trong tổng số 51 trẻ mang đột biến đã xác định được, nhóm kháng thuốc steroid có 44 bệnh nhân (chiếm 86,3%), nhóm nhạy cảm cũng có 7 bệnh nhân (chiếm 13,7%) xuất hiện đột biến. Kết quả phân bố các đột biến gen NPFS2 trong bảng 3.7., và 3.8., chúng tôi thấy đột biến 288C>(p.S96S) trên exon 2 chỉ có ở nhóm kháng thuốc steroid. Exon 4 có 10 đột biến gồm hai kiểu đột biến sai nghĩa 507 C>T (L169F) và đột biến đồng nghĩa 452G>A (G150G). Đột biến sai nghĩa 507C>T (L169F) chỉ có ở bệnh nhân nhóm kháng thuốc steroid. 7 trường hợp nhóm nhạy cảm steroid có đột biến bao gồm 4 kiểu đột biến đồng nghĩa 452G>A (G150G) trên exon 4, 2 kiểu đột biến đồng nghĩa 102G>A (G34G) trên exon 1 và đột biến sai nghĩa 385G>T (Q128H) trên exon 3. Theo kết quả các nghiên cứu xác định đột biến gen NPFS2 trên trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid đã công bố trên thế giới cho thấy tần số, vị trí, tỷ lệ phát hiện thấy các kiểu đột biến của gen NPFS2, cũng như ảnh hưởng của những đột biến này lên kiểu hình của bệnh nhân có sự khác nhau tùy theo từng nghiên cứu, kích thước mẫu, chủng tộc bệnh nhân mắc HCTHTP nói chung và HCTHTP kháng thuốc steroid nói riêng. Đột biến gen NPFS2 được tác giả Boute và cs lần đầu tiên thông báo vào năm 2000 khi nghiên cứu 14 bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid tại Pháp có 10 bệnh nhân mang đột biến gen NPFS2 bao gồm 3 đột biến lệch khung bao gồm thêm G tại vị trí 104 trên exon 1, mất G tại vị trí 419 trên exon 3, mất A tại vị trí 855 trên exon 7; 6 đột biến sai nghĩa là 59 C>T, 274 G>T trên exon 1, 413 G>A exon 3, 479 A>G trên exon 4, 583 G>A trên exon 5 và 871 C>T trên exon 7, 1 đột biến vô nghĩa 412 C>T trên exon 3. Đặc biệt tất cả những bệnh nhân này cũng kháng với thuốc ức chế miễn dịch khác. Trong nghiên cứu trên 430 trẻ mắc HCTH kháng steroid trong đó có cả HCTHBS từ 404 gia đình ở một số nước châu Âu, tác giả Hinkes và cs đã phát hiện thấy 18.1% các gia đình có sự xuất hiện đột biến R138Q của gen NPFS2. Carini và cs (2001) công bố kết quả nghiên cứu ở Italy trên 44 bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid thấy 9 bệnh nhân mang đột biến gồm 7 đột biến lệch khung (6 trường hợp 419delG trên exon 3, 1 trường hợp 467/8insT trên exon 2), 7 đột biến sai nghĩa R138Q (413G>A), 2 đột biến sai nghĩa V180M (538G>A), 1 vô nghĩa R138X (412C>T). Yaacov và cs (2002) nghiên cứu 27 trẻ mắc HCTH kháng steroid ở Israel thấy đột biến gen NPFS2 chỉ xuất hiện trên trẻ em là

người Israel gốc Ả-rập với tỷ lệ 55% trong khi đó trẻ gốc Do Thái không có đột biến gen này. Các nghiên cứu tại Nhật Bản và Trung Quốc thấy tỷ lệ phát hiện thấy các đột biến gen *NPHS2* trên trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc rất thấp. Đến nay, vẫn chưa có sự thống nhất về tần suất, tỷ lệ cũng như vị trí phát hiện các đột biến của gen *NPHS2*. So với các nghiên cứu đã được công bố trên thế giới chúng tôi thấy kết quả xác định đột biến của gen *NPHS2* nói chung và trên exon 2 của gen *NPHS2* nói riêng ở trẻ mắc HCTHTP kháng steroid tại Việt Nam trong nghiên cứu này có xu hướng cao hơn, các thể đột biến R138Q trên exon 3 và R229Q không gặp trẻ em Việt Nam bị HCTHTP kháng thuốc steroid. Đây có thể là một đặc điểm khác biệt về khía cạnh di truyền trên trẻ em tại Việt Nam mắc HCTHTP nói chung và HCTHTP kháng steroid nói riêng. Điều này hết sức có ý nghĩa nhằm thúc đẩy các nghiên cứu về di truyền tiếp theo trong lĩnh vực sinh học phân tử trên trẻ mắc HCTHTP tại Việt Nam nhằm có thông tin đầy đủ hơn.

4.3. Mối tương quan giữa kiểu hình và kiểu gen của bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid

Theo kết quả minh họa giữa kiểu hình và kiểu gen ở trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid trong hình 3.1., 3.2., 3.2. và 3.4. cho thấy trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid khi mang đột biến kiểu 288C>T (p.S96S) tại exon 2 của gen *NPHS2* có biểu hiện lâm sàng rất nặng: phù to, tràn dịch đa màng, tiên triển thành suy thận giai đoạn cuối sớm và đều đã tử vong (có 1 ngay trong năm đầu tiên khi thời gian mắc bệnh khoảng 10 tháng). Trong hình 3.7., 3.8. và 3.9. cho thấy kiểu hình và kiểu gen của trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid thể không đơn thuần (tăng huyết áp) do trẻ mang 02 đột biến đột biến sai nghĩa là 507C>T (L169F) và đột biến đồng nghĩa 452G>A (G150G) tại exon 4. Trong hình 3.10. và hình 3.11. là kiểu hình và kiểu gen của trẻ mắc HCTHTP nhạy cảm steroid với kiểu gen 102G>A (G34G) đây là đột biến đồng nghĩa không thay đổi cấu trúc acid amin nên kiểu hình của trẻ là HCTHTP nhạy cảm steroid. Kết quả ở bảng 3.9. liên quan giữa đột biến và đáp ứng với thuốc steroid ở trẻ mắc HCTHTP cho thấy tỷ lệ trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid trong nhóm có đột biến gen *NPHS2* cao hơn nhiều nhóm bệnh nhân nhạy cảm thuốc steroid ($\chi^2 = 14,1$; $p < 0,0001$). Khi đánh giá của nguy cơ giữa đột biến gen *NPHS2* và kháng thuốc steroid trong bảng 3.2. cho thấy tỷ suất chênh (OR: odds ratio) là 4,9 (95%CI; 1,92-12,069), khi trẻ có đột biến gen nguy cơ kháng thuốc tăng 4,9 lần so với trẻ không có đột biến gen *NPHS2*.

Khi so sánh kết quả các chỉ số sinh hóa máu trung bình tại thời điểm

progression of the disease as well as evaluate the responding to medications that assess the effects of the *NHPS2* gene mutation.

2.3. Data Analyzing

Using SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) to process statistical results, the *NPHS2* gene sequence was read using BioEdit software version 7.1.9.

2.4. Ethical issues in researching

Research topics are strictly adhered to ethics of research in medicine. The subject has been approved by the Ethical Board of the National Hospital of Pediatrics. The results of gene analysis have been thoroughly studied by the Hanoi National University. Patients do not have to pay any fee for genetic analysis tests. Family members and guardians voluntarily participate in the study and patient information will be kept confidential.

Chapter 3 RESEARCHING RESULT

3.1. Clinical, subclinical characteristics of patients with steroid-resistant nephrotic syndrome.

3.1.1. General characteristics of the research object

The mean age of the patients was 5.8 ± 3.6 years old, the smallest was 4 months, the largest was 16 years old. The onset (disease onset) was 4.09 ± 2.87 (4 months-14 years). The middle age of patients with steroid-resistant nephrotic syndrome is not different from that of steroid-sensitive childhood hypertension. The mean incidence was 2.5 ± 0.2 years old. The duration from onset to the mean study time was 1.5 ± 0.3 years. The mean follow-up time was 1.2 ± 0.4 years old. There are 100 boys, 71.4%, 40 girls, 28.6%, 2.5 boys/irls.

3.1.2. Clinical features

Table 3.1: Recurrence interval rate of study subjects

Grouping Level	Steroid sensitivity	Steroid resistance	Total, p Chi-Square Tests
Fast recurrence	7 (15,2%)	58 (62,4%)	65
Low recurrence	39 (84,8%)	35 (37,6%)	74

Researching diagram

2.4. Indicators, research variables

2.4.1. Objective 1: Describe the clinical and subclinical characteristics of patients with steroid-resistant nephrotic syndrome

Overall clinical characteristics of the study subjects: age, sex, reasons for hospitalization, duration of onset, onset, recurrence, recurrence, time to onset, related medical history, family history. Perform blood test chemistry, urine, hematological tests to evaluate the change of clinical index, kidney biopsy to diagnose histopathology. Comparison of clinical and subclinical index in children with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic to assess the differences.

2.4.2. OBJECTIVE 2: Detect mutations in the NPHS2 gene in children with primary steroid-resistant nephrotic syndrome

The sequencing results are read using BioEdit software version 7.1.9. The nucleotides on the gene are expressed by peaks with four colors equivalent to the four nucleotides A, T, G, C. The NPHS2 gene sequences obtained after sequencing for study patients will be compared with NPHS2 gene sequences compared to data from the Human Gene Mutation Database (HGMD). Evaluation of the incidence, frequency of gene mutations at 6 exons (from exon 1 to exon 6) of NPHS2 in 96 children with steroid-resistant nephrotic syndrome and 46 children diagnosed with steroid-sensitive.

2.4.3. Objective 3: To assess the association between clinical and subclinical characteristics with mutations in NPHS2 gene in children with primary nephrotic syndrome

Comparison of changes in blood test chemistry, hematology, glomerular filtration function, comparison of urea, serum creatinine, progression of disease, chronic renal failure, mortality, Patients with mutations and no mutations, between the steroid-sensitive group and the steroid-resistant group. The role and effect of the NPHS2 mutation in the patients with steroid resistance was assessed. The correlation between gene mutation and steroid response was assessed by evaluating the role of NPHS2 mutations in patients with steroid-resistant nephrotic syndrome and compared with steroid-sensitive groups. Follow up the

trẻ nhập viện trong bảng 3.10. cho thấy trẻ có mang đột biến gen *NPHS2* có nồng độ ure, creatinin máu ở bệnh nhân có đột biến gen cao hơn thực sự nhóm trẻ mắc HCTHTP mà không có đột biến gen *NPHS2*. Ngược lại protein máu và albumin máu lại thấp hơn, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nghiên cứu của tác giả Thomas và cs (2018) khi nghiên cứu 10 bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid có đột biến gen *NPHS2* tại Ai Cập cho thấy nồng độ protein và albumin trong máu bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid có mang đột biến gen thấp hơn bệnh nhân không mang đột biến, trong khi đó, ure, creatinin máu nhóm kháng thuốc có đột biến gen cũng cao hơn nhóm không mang đột biến. Khi so sánh kết quả điều trị trong bảng 3.11. cho thấy có sự liên quan giữa đột biến gen và kết quả điều trị, theo đó khi kết thúc nghiên cứu trẻ mắc HCTHTP nếu có đột biến gen *NPHS2* có tỷ lệ suy thận giai đoạn cuối và tử vong cao hơn hẳn bệnh nhân không có đột biến gen, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Đột biến gen *NPHS2* còn làm tăng nguy cơ suy thận giai đoạn cuối lên 5,85 lần và tăng nguy cơ tử vong lên 16,37 lần. Theo các nghiên cứu trong y văn đã công bố một trong những ảnh hưởng lớn nhất của đột biến gen *NPHS2* đến bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid đó là có tỷ lệ tiến triển thành bệnh thận mạn hoặc suy thận giai đoạn cuối cao hơn. Các nghiên cứu đã công bố trên thế giới, tỷ lệ phát hiện đột biến 288C>T trên mắc HCTHTP kháng steroid khá thấp. Tuy nhiên khi thực hiện nghiên cứu này trên trẻ mắc HCTHTP là chủng tộc người Việt Nam chúng tôi đã phát hiện được đột biến 288C>T có tần suất khá cao. Đây là một kiểu đột biến đồng nghĩa nhưng lại chỉ xuất hiện trên nhóm trẻ kháng thuốc steroid, đây là điểm khác biệt khá thú vị và rất có ý nghĩa lâm sàng làm cơ sở để có chiến lược điều trị cũng như tiên lượng cho bệnh nhân có mang đột biến trên quần thể trẻ mắc HCTHTP kháng steroid tại Việt Nam. Đột biến 288C>T làm tăng nguy cơ tiến triển đến suy thận giai đoạn cuối là 7,26 (95%CI: 2,29-23,04). Khi đánh giá liên quan cũng như nguy cơ của đột biến 288C>T lên tử vong ở trẻ mắc HCTHTP có đột biến 288C>T trong bảng 3.12. thấy có liên quan ở trẻ mang đột biến 288C>T với tử vong, theo đó đã có 8/37 (chiếm 21,6%) trẻ mang đột biến 288C>T bị tử vong, cao hơn hẳn nhóm không mang đột biến chỉ có 1 bệnh nhân (1%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nhóm mang đột biến 288C>T làm tăng nguy cơ tử vong lên 28,14 lần (95%CI: 2,29-23,04).

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp nghiên cứu mô tả phân tích hàng loạt ca bệnh và áp dụng kỹ thuật PCR-giải trình tự 6 exon (từ exon 1 đến exon 6) của gen *NPHS2* trên 94 trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid và 46 trẻ nhạy cảm steroid chúng tôi rút ra một số kết luận:

1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở trẻ mắc HCTHTP kháng steroid

Bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid có mức độ biểu hiện lâm sàng nặng nề hơn, thời gian nằm viện kéo dài, tái phát nhiều lần trong năm.

Bệnh nhân kháng thuốc steroid có thể lâm sàng HCTHTP không đơn thuần cao hơn. Kết quả sinh thiết thận ở 34 bệnh nhân mắc HCTHTP kháng steroid cho thấy tỷ lệ tổn thương trên mô bệnh học thể xơ cứng cầu thận từng phần và khu trú cao hơn so với các nghiên cứu đã công bố trước đó. Tỷ lệ suy thận giai đoạn cuối và tử vong ở trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid trong nghiên cứu này cũng khá cao.

2. Phát hiện các đột biến trên 6 exon (từ exon 1 đến exon 6) của gen *NPHS2*

71,2% đột biến xuất hiện trên exon 2 với kiểu đột biến đồng nghĩa 288C>T (p.S96S) và chỉ có ở nhóm kháng thuốc steroid. Kiểu đột biến này trên trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid tại Việt Nam có tỷ lệ phát hiện khá cao.

Các đột biến khác xuất hiện trên exon 1, exon 3 và exon 4 có tần suất thấp, không có sự khác biệt về tỷ lệ giữa bệnh trẻ mắc HCTHTP nhạy cảm và kháng thuốc steroid.

3. Tương quan đặc điểm lâm sàng và đột biến gen *NPHS2*

Bệnh nhân mắc HCTHTP nếu mang đột biến gen *NPHS2* sẽ làm tăng nguy cơ kháng thuốc gấp 4,903 lần. Đột biến gen *NPHS2* làm tăng nguy tử vong ở bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid lên 16,37 lần, tăng nguy cơ suy thận giai đoạn cuối lên 5,85 lần. Trẻ mắc HCTHTP kháng thuốc steroid nếu mang đột biến 288C>T có tỷ lệ phù nặng, và nhiễm trùng cao hơn bệnh nhân không có đột biến. Mặt khác độ biến 288C>T sẽ làm tăng nguy cơ tiến triển thành suy thận mạn giai đoạn cuối lên 7,26 lần, tăng nguy cơ tử vong lên 28,14 lần.

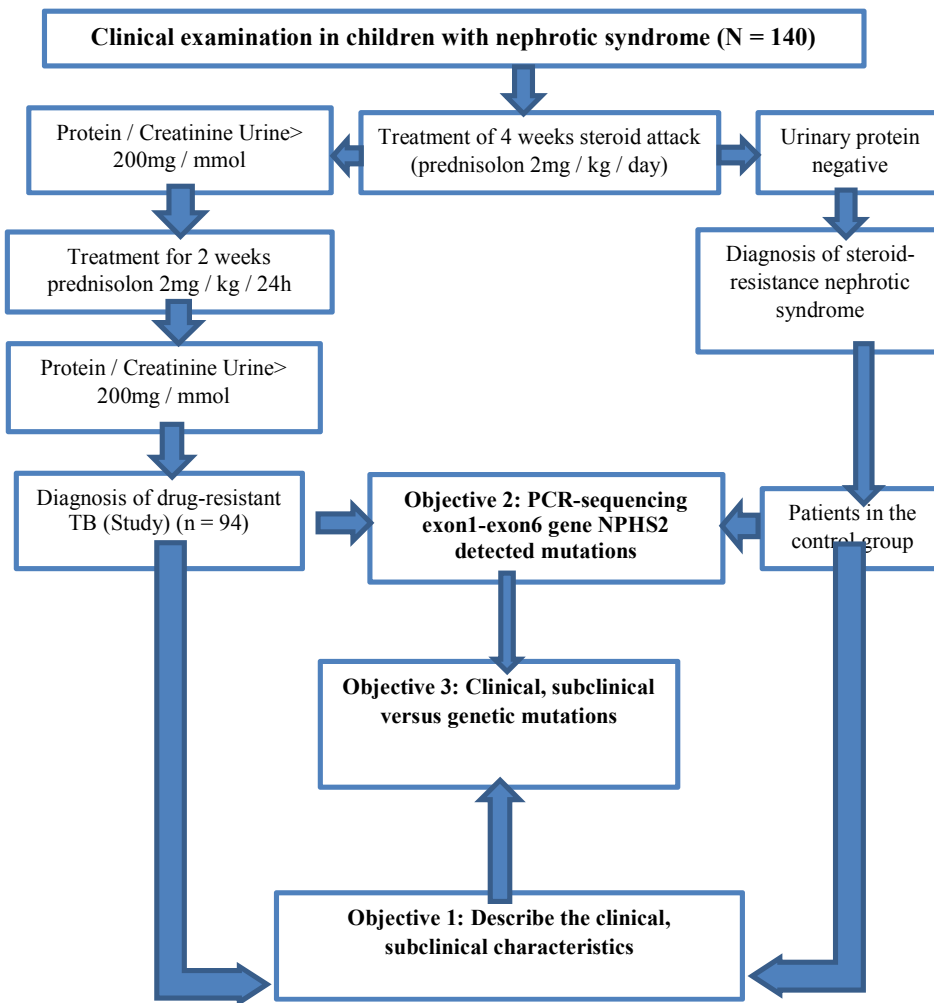
KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Cần có chỉ định sàng lọc các đột biến trên gen *NPHS2* cho bệnh nhân mắc HCTHTP kháng thuốc steroid đặc biệt đột biến 288C>T.

Cần có chiến lược theo dõi lâu dài cho bệnh nhân các mang đột biến của gen *NPHS2*, nhằm đánh giá hết được những ảnh hưởng của những đột biến này đến tiến triển cũng như đáp ứng điều trị của bệnh nhân.

2.3.2. Sample size: utility; All patients who are eligible for diagnosis and hospitalization for 12 months from 1 January 2015 to 30 December 2015 and voluntarily participate in the study.

2.3.3. Researching diagram



the cytosol of the podocyte is affected. enjoy Also, when the NPHS2 gene mutated half-life of the podocin was severely reduced and deformed the podocin molecules.

1.3. Methodology of NPHS2 gene mutation detection in diagnostic applications:

Detection of NPHS2 gene mutation by Sange sequencing.

1.4. The national research on steroid-resistance nephrotic syndrome

In Viet Nam, there have been a number of studies on steroid-resistance pediatric nephrotic syndrome. The first author is Nguyen Ngoc Sang Nguyen Ngoc Sang (1999) had to study the effectiveness of treatment with Methylprednisolone and the changes in immunity before and after treatment of steroid-resistance pediatric nephrotic syndrome in the medical doctoral thesis. In 2009, Tran Thanh Thuy, Vu Huy Tru's retrospective study on the features of primary nephrotic syndrome with Focal Segmental Glomerulosclerosis and pediatric focal abnormalities were performed on 41 children at Children's Hospital I. Duong Thi Thuy Nga (2011) has also studied the results of treatment for secondary corticosteroid resistance nephrotic syndrome in the Department of Kidney-Urology at the National Hospital of Pediatrics in the medical master's thesis. Tran Huu Minh Quan, Huynh Thai Loan, Nguyen Duc Quang et al have studied about features of steroid-resistance nephrotic syndrome in 67 patients at Nhi Dong I hospital. Thus, Vietnam haven't had any genetic research in general, detection of NPHS2 gene mutation in particular in children with steroid -resistance nephrotic syndrome.

Chapter 2: OBJECTIVES AND RESEARCHING METHODS

2.1. Object

140 children were diagnosed with steroid -resistance nephrotic syndrome, 94 children were diagnosed with steroid-resistant nephrotic syndrome and 46 children were diagnosed with steroid-sensitive.

2.2. Location and time

The subject was conducted in the subject of kidney-hemodialysis, biochemical laboratory, hematology, microbiology and surgery of the National Hospital of Pediatrics where is the place of diagnosis, treatment and management of pediatrics patient. patient treatment. Molecular biology tests conducted at the Faculty of Medicine, Vietnam National University, Hanoi. Duration of 3 years: from November 2014 to November 2017.

2.3 Research Methodology

2.3.1. Study design: A descriptive longitudinal study.

INTRODUCTION

Primary nephrotic syndrome is a common chronic kidney disease in children with significant changes in both morbidity and response to steroids in different races. The prevalence of primary nephrotic syndrome in children is on average between 2 and 16.9 per 100,000 children. 50% of patients with steroid-resistant primary nephrotic syndrome will progress to end-stage renal disease after 10 years. When children with steroid-resistant primary nephrotic syndrome disease are treated with other immunosuppressive drugs, the results are still limited, with high rates of chronic renal failure, which greatly affect their health and their family. Recently, research about molecular biology has found that single nucleotide polymorphisms (SNPs), including mutations in the NPHS2 gene, have a large effect on progression and response to treatment. In Vietnam, no study has identified a mutation in the NPHS2 gene to assess the effects of this gene on therapeutic response as well as progression in patients with steroid-resistant primary nephrotic syndrome. Based on the above reasons, we conducted a study "Investigating the relationship between clinical characteristics, subclinical and NPHS2 mutations in steroid-resistant pediatric nephrotic syndrome."

2. Objectives of the study:

- 1. Describe the clinical and subclinical characteristics of patients with primary nephrotic syndrome.*
- 2. Mutations detected on NPHS2 gene in children with primary steroid-resistant nephrotic syndrome.*
- 3. Evaluated of the association between clinical, subclinical characteristics and mutation in the NPHS2 gene in children with primary steroid-resistant nephrotic syndrome.*

3. Practical significance and contribution of the study

Through a descriptive longitudinal study, there will be sufficient information on the clinical and laboratory findings of steroid-resistant pediatric nephrotic syndrome. Simultaneously, the detection of NPHS2 mutations was performed to evaluate the role of genetic aspects in steroid-resistant pediatric nephrotic syndrome. This is a new contribution in the field of kidney disease genetics in our country, at the same time

research is both scientific and humanity. Detection of genetic mutations that provide early counseling for advanced patients such as response to treatment for patients. The first thesis on detection of NPHS2 gene mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. New findings and contributions of the thesis are not only of real value when detecting mutations in infectious children in Vietnam but also contributing additional genetic information to the gene bank. The results of the study revealed 52 mutations in 51 children (44 steroid-resistant patients, 7 steroid-sensitive patients at 4 exons from exon 1 to exon 4 on *NPHS2*, 71% mutations occurred in exon 2 with synonymous mutations type 288C> T (p.S96S) and only in steroid resistance group. This type of mutation in children with steroid-resistant nephrotic syndrome in Vietnam has a high rate of detection.

4. Structure of the thesis

The thesis has 128 pages, consisting of 4 chapters: Chapter 1: Overview 43 pages; Chapter 2: Objectives and Methodology 15 pages; Chapter 3: Results of the research, 32 pages; Chapter 4: Discussion, 33 pages. Conclusion: 2 pages; Recommendation: 1 page. The thesis has: 47 tables, 5 graphs, 16 images; 2 pictures; 110 references (7 in Vietnamese, 103 in English).

Chapter 1: OVERVIEW

1.1. Overview of steroid-resistant nephrotic syndrome

1.1.1 Definition:

Primary nephrotic syndrome is most common in glomerular diseases; the cause of the disease so far has not been elucidated. Definitive diagnosis includes 3 compulsory symptoms: proteinuria $\geq 50\text{mg} / \text{kg} / 24\text{h}$, or proteinuria / creatinine ratio in urine $> 200\text{mg} / \text{mmol}$; serum albumin $\leq 25 \text{ g} / \text{l}$; Serum protein $\leq 56 \text{ g} / \text{l}$, may be accompanied by edema, hyperlipidemia and blood cholesterol. 2044/5000

1.1.2. Characteristics of steroid-resistant nephrotic syndrome

The mechanism and cause of patients with steroid-resistant nephrotic syndrome is unclear. Some definitions of steroid-resistant steroid medications were given in the 1970s. First, the International Kidney Disease Study (ISKDC) reported that steroid resistance rates in patients with nephrotic syndrome were about 10 % -20%. The ISKDC steroid guideline was originally given at 2 mg / kg / day (no more than 80 mg / day) for 4 weeks, followed by 4 weeks followed by a dose of 1.5 mg / kg (not more than 60 mg / day). 3 days in a week for the next 4

weeks. Several European kidney clinicians recommend a treatment regimen to diagnose steroid resistance after 6 weeks of prednisone 2mg / kg / day and is widely used in Europe. In France, a 4-week course of treatment with prednisone was applied at a dose of 60 mg / m² / 24 hours (equivalent to 2 mg / kg / 24 hours) and 3 doses of Methylprednisolone bolus 1000 mg / 1.73 m² body skin area/ 48 hours. The proteinuria of the patient remains $\geq 50 \text{ mg} / \text{kg} / 24 \text{ hours}$, the diagnosis of steroid resistance. KDIGO has recommended a standardized diagnosis of steroid-resistant steroids in pediatric patients for 4 weeks, with a prednisone equivalent of 60 mg/ m²/ 24 hours (equivalent to 2 mg / kg / 24 hours, not more than 60 mg daily). The next 4 weeks at a dose of 40mg/ m² / 48 hours (equivalent to 1.5 mg/ kg / 48h) the proteinuria remains $\geq 50\text{mg} / \text{kg} / 24 \text{ hours}$ or protein/creatinine in urea $> 200\text{mg} / \text{mmol}$. Thus, according to this guideline treatment, the diagnosis time for patients with steroid-resistant nephrotic syndrome was 8 weeks. ISKDC studied 521 patients with diarrhea and found that the proportion of patients with steroid resistance was about 20%. In patients with steroid-resistant nephrotic syndrome, 70-80% of patients have focal segmental glomerulosclerosis. Statistics show that 20% of patients with nephrotic syndrome will not respond to treatment with steroids or other immunosuppressive drugs. Approximately 50% of patients with steroid-resistant nephrotic syndrome progress to chronic renal failure or end-stage renal disease.

1.2. Position, structure, function of NPHS2 gene

The NPHS2 gene, the name is nephritis 2, is thought to be highly related to steroid-resistant nephrotic syndrome (OMIM) No.600995. NPHS2 is a gene coding for a protein called podocin, located on the long branch of chromosome 1 (1q25-q31), measuring 25438 bp. The coding region of the NPHS2 gene consists of eight exons, which are 1149 bp coding for a protein called a podocin linked to several different proteins of the podocyte. The structure is composed of 383 amino acids and weighs 42 kD, which is a sticky substance on the membrane of the podocyte, the stomatal family. Podocin is thought to be a protein carrier that links the epithelial and podocyte to the glomerular basement membrane. The diaphragm site is where the primary filter functions of the glomerular filtration system, in which the podocytes serve as a barrier to prevent visible particles from passing through the membrane. Other experiments have also demonstrated that inducing NPHS2 mutations will result in undocumented podocin leading to reduced binding to calcineurin, so that binding to other proteins in