

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh hemophilia A hay còn gọi là bệnh rối loạn đông máu. Đây là một bệnh di truyền gen lặn liên quan đến nhiễm sắc thể giới tính X, bệnh gây nên do thiếu hụt hay bất thường chức năng của yếu tố VIII. Việt Nam là một nước có tỉ lệ mắc bệnh hemophilia A trong cộng đồng khá cao. Theo nghiên cứu của Đỗ Trung Phần năm 1996 tỷ lệ mắc bệnh khoảng 25 – 60/1.000.000 người. Hiện nay có khoảng 6000 bệnh nhân hemophilia tại Việt Nam trong đó chỉ có 30% được phát hiện và điều trị, trong đó phương pháp điều trị chủ yếu là sử dụng yếu tố VIII trong máu toàn phần (truyền trực tiếp hoặc tách chiết) rất tốn kém và hiệu quả không cao, đặc biệt có nguy cơ cao đối với các bệnh lây truyền qua đường máu. Trên thế giới, các nhà khoa học đã phân tích gen của bệnh nhân hemophilia A và rất nhiều dạng đột biến gen yếu tố VIII (F8) được công bố. Các nghiên cứu khẳng định dạng đột biến khác nhau sẽ gây những kiểu hình đặc trưng khác nhau. Bệnh nhân hemophilia A thể nặng thường gặp dạng đột biến đảo đoạn exon 22 (chiếm 45-50%), trong khi đó đột biến điểm chiếm đa số ở bệnh nhân hemophilia A thể bệnh vừa và nhẹ (chiếm 90-95%). Ở Việt Nam, các công trình nghiên cứu về bệnh hemophilia A chủ yếu là nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, đánh giá tỷ lệ mắc bệnh hay các nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị bệnh bằng các chế phẩm thay thế... Chưa có công trình nào nghiên cứu toàn diện về đột biến gen mã hóa yếu tố VIII ở người Việt Nam, tạo cơ sở dữ liệu để làm tiền đề cho việc xây dựng bản đồ gen ở bệnh nhân hemophilia A Việt Nam. Với sự tiến bộ của kỹ thuật sinh học phân tử, các nhà khoa học có thể phân tích DNA của người bệnh để xác định chính xác các tổn thương gen gây bệnh hemophilia A, cũng như kiểm soát bệnh tốt hơn nhờ phát hiện người phụ nữ mang gen bệnh và tư vấn di truyền trước hôn nhân, tăng hiệu quả trong việc phòng ngừa bệnh tật đồng thời nâng cao chất lượng chăm sóc sức khỏe trong cộng đồng.

2. Mục tiêu của đề tài:

1. Phát hiện đột biến gen F8 của bệnh nhân hemophilia A ở Việt Nam.
2. Bước đầu xây dựng bản đồ đột biến gen F8 đối với bệnh nhân hemophilia A tại Việt Nam.

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

Từ kết quả các vị trí đột biến xác định được, bước đầu đã xây dựng được bản đồ đột biến gen F8 đối với bệnh nhân hemophilia A tại Việt Nam. Xác định vị trí các đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A cung cấp nhiều lợi ích cho khoa học cơ bản và ứng dụng lâm sàng. Đối với những bệnh nhân bị bệnh hemophilia A, xác định được vị trí đột biến là một tiêu chuẩn vàng để khẳng định chính xác chẩn đoán bệnh, ngoài ra nó cũng hỗ trợ trong việc tiên lượng mức độ nghiêm trọng của bệnh và diễn biến lâm sàng, trong dự báo nguy cơ phát triển các kháng thể kháng FVIII để từ đó lựa chọn phương pháp điều trị tối ưu. Hơn nữa, xác định được vị trí đột biến của bệnh nhân là điều kiện tiên quyết cho việc chẩn đoán trước sinh những phụ nữ mang gen bệnh. Thiết lập bản đồ đột biến gen F8 còn là tiền đề hết sức quan trọng cho việc áp dụng liệu pháp điều trị gen trong tương lai để giải quyết triệt để căn bệnh này.

4. Cấu trúc luận án:

Luận án được trình bày trong 108 trang (không kể tài liệu tham khảo và phụ lục); bao gồm: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan tài liệu (33 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (17 trang), kết quả nghiên cứu (25 trang), bản luận (29 trang), kết luận (1 trang), kiến nghị (1 trang).

Luận án gồm 06 bảng, 04 biểu đồ, 01 sơ đồ, 35 hình; 141 tài liệu tham khảo. Phụ lục gồm các hình minh họa và danh sách bệnh nhân.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.2. Đặc điểm của bệnh hemophilia A

1.2.1. Đặc điểm lâm sàng

Triệu chứng chảy máu là đặc trưng của bệnh. Hội chứng chảy máu ít khi xảy ra vào lúc mới đẻ, thường xuất hiện khi trẻ tập đi, lúc đó trẻ xuất hiện các nốt hoặc các điểm tụ máu. Trong các thể xuất huyết nhẹ, xuất huyết xảy ra khi răng sữa rụng hoặc nhổ răng. Bệnh hemophilia A thể nặng đặc trưng bởi bầm tím và chảy máu thường xuyên tái phát vào khớp, đặc biệt là đầu gối, mắt cá chân, hông và khuỷu tay gây giới hạn chuyển động của các khớp. Nếu không điều trị sẽ dẫn đến hỏng khớp.

1.2.2. Xét nghiệm cận lâm sàng

Thời gian đông máu kéo dài có thể hơn 1 giờ; chất lượng cục máu đông kém; thời gian Howel kéo dài. Định lượng yếu tố VIII giảm hoặc không có. Xét nghiệm DNA phát hiện đột biến gen F8.

1.2.3. Chẩn đoán thể bệnh

Bình thường nồng độ FVIII ở người là 200 ng/ml. Trường hợp bị bệnh, hoạt tính yếu tố VIII giảm dưới 30%. Thể nặng: hoạt tính FVIII dưới 1%, thường bị chảy máu vài lần trong tháng. Thể trung bình: hoạt tính FVIII từ 1-5%, chỉ bị chảy máu sau những chấn thương nhẹ. Thể nhẹ: hoạt tính FVIII từ 5-30%, chảy máu sau phẫu thuật hoặc những chấn thương nặng, sau những động tác mạnh khi chơi thể thao.

1.2.4. Bệnh học phân tử bệnh hemophilia A

a/ Bệnh học phân tử của hemophilia A thể nặng

Nhiều mô hình đột biến khác nhau chịu trách nhiệm cho hemophilia A thể nặng, tuy nhiên dạng đột biến thường gặp nhất là đảo đoạn intron 22 và intron 1 của gen F8. **Đảo đoạn trên cùng nhiễm sắc thể (NST):** đảo đoạn intron 22 xảy ra do sự tái tổ hợp giữa bản sao của vùng int22h1 (vùng lặp lại gồm 9,5 kb) thuộc intron 22 với một trong hai bản sao của vùng đồng nhất nằm ở telomere vùng int22h2, int22h3; vị trí 400 kb ở đầu 5' ngoài gen F8. Hiện tượng đảo đoạn dẫn đến đứt gãy gen F8 và hậu quả gây thể bệnh nặng cho bệnh nhân. Đột biến này chiếm 45-50% bệnh nhân hemophilia A thể nặng. Đảo đoạn intron 1 xảy ra tương tự, do sự tái tổ hợp vùng int1h1 thuộc intron 1 (kích thước 900 bp) nằm vị trí 140 kb ở đầu 5' của gen F8 với bản sao int1h2 nằm ngoài gen F8. Đột biến này hiếm gặp hơn so với đảo đoạn intron 22, chiếm khoảng 1,5% bệnh nhân nặng. **Đột biến mất đoạn và chèn đoạn lớn:** đột biến mất đoạn lớn chiếm 2-5% bệnh nhân hemophilia A thể nặng. Có thể mất 1 exon hoặc mất toàn bộ gen. Cơ chế phân tử của dạng đột biến này đã được kết luận là do quá trình tái tổ hợp do hiện tượng lặp lại Alu. Đột biến chèn đoạn lớn và hiện tượng Alu làm đứt gãy gen F8 và gây hemophilia A thể nặng. **Đột biến điểm:** hầu hết bệnh nhân nặng là do đột biến thay thế một nucleotid. Đột biến vô nghĩa (nonsense) tạo mã kết thúc hoặc đột biến mất nucleotid gây lệch khung dịch mã dẫn đến không tổng hợp hoặc tổng hợp protein không có chức năng.

b/ Bệnh học phân tử của hemophilia A thể vừa và nhẹ

Đột biến điểm gây lệch khung dịch mã và đột biến thay thế nucleotid (missense) là cơ chế chính gây bệnh hemophilia A thể vừa và nhẹ, chiếm 90-95% bệnh nhân. Đột biến tại vị trí nối và vùng promoter của gen được phát hiện ở một số bệnh nhân. Hiện tượng lặp đoạn exon 13 cũng được mô tả ở các bệnh nhân hemophilia A thể nhẹ.

1.2.5. Kháng thể kháng FVIII

Cơ chế hình thành kháng thể hiện nay còn nhiều bàn cãi, một số nghiên cứu cho rằng có mối liên quan với kiểu đột biến gen, mức độ nặng của bệnh, tuổi bắt đầu điều trị, loại chế phẩm điều trị, yếu tố di truyền. Trong khi nhiều yếu tố nguy cơ tạo kháng thể kháng FVIII chưa được xác định rõ, vai trò quan trọng của các dạng đột biến F8 làm tăng tỉ lệ nguy cơ đã được công bố. Dạng đột biến ở vị trí nối giữa exon và intron, đột biến sai nghĩa là nhóm có nguy cơ tương đối thấp, trong khi khoảng 21% bệnh nhân đột biến đảo đoạn intron 22 liên quan đến phát triển các kháng thể kháng FVIII. Tỷ lệ chất ức chế cao nhất là nhóm đột biến mất đoạn lớn, mất các exon mã hóa nhiều vùng trong gen F8 chiếm 88%.

1.3. Các phương pháp phát hiện đột biến gen F8

1.3.1. Phương pháp phát hiện đột biến đảo đoạn trên cùng NST

- Phương pháp phát hiện đột biến đảo đoạn intron 22: có 3 phương pháp chính: Southern Blot, Long Distance PCR, Inversion- PCR.

- Phương pháp phát hiện đột biến đảo đoạn intron 1: Multiplex PCR.

1.3.2. Phương pháp phát hiện các dạng đột biến khác

- Phương pháp PCR phát hiện đột biến mất exon.

- Phân tích dị sợi kép (heteroduplex).

Hai kỹ thuật sàng lọc đột biến thường được sử dụng dựa trên phân tích dị sợi kép là phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao biến tính:

DHPLC: Denaturing high pressure liquid chromatography.

CSGE: Conformation Sensitive Gel Electrophoresis.

- Giải trình tự DNA.

- Phương pháp dựa trên RT-PCR.

- Phương pháp MLPA.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- **Nhóm đối chứng:** gồm 20 người (10 nam, 10 nữ) khỏe mạnh, tiền sử gia đình không có người mắc bệnh di truyền.

- **Nhóm nghiên cứu:** 103 bệnh nhân được chẩn đoán xác định hemophilia A tại viện Nhi Trung ương và viện Huyết học - Truyền máu Trung ương.

2.2. Trang thiết bị, dụng cụ nghiên cứu và hóa chất

2.3. Phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu:

- Đối với bệnh nhân thể nặng, xác định hiện tượng đảo đoạn intron 22 bằng phương pháp inversion PCR. Không đột biến đảo đoạn intron 22, xác định đảo đoạn intron 1 bằng phương pháp multiplex PCR. Nếu vẫn không xác định được thì ta khuếch đại toàn bộ 26 exon tìm đột biến mất exon. Nếu không đột biến, phân tích đột biến điểm bằng phương pháp giải trình tự. Vị trí đột biến xác định được sẽ xây dựng bản đồ gen F8.

- Đối với bệnh nhân thể vừa và thể nhẹ sử dụng phương pháp PCR tìm đột biến mất exon, nếu không đột biến thì giải trình tự gen trực tiếp để phát hiện các dạng đột biến điểm.

2.3.1. Quy trình lấy mẫu

Bệnh nhân đã chẩn đoán hemophilia A được lấy 5 mL máu tĩnh mạch, cho vào ống chống đông bằng EDTA với hàm lượng 1,5 mg/mL. Quy trình lấy máu đảm bảo vô trùng tuyệt đối.

2.3.2. Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi

2.3.3. Xác định đột biến gen F8

2.3.3.1. Phát hiện đột biến đảo đoạn intron 22 bằng kỹ thuật Inversion- PCR

Kỹ thuật *Inversion- PCR* (I-PCR) gồm 3 bước: (1) *Cắt DNA bằng enzym BclI*, (2) *Nối bằng T4 ligase*, (3) *Khuếch đại bằng phản ứng Multiplex PCR*. Phương pháp I-PCR có ưu điểm là dễ tiến hành. Enzym *BclI* tác dụng rất đặc hiệu nên sản phẩm cắt enzym có tính đặc hiệu cao. Sản phẩm PCR được khuếch đại dễ dàng trong thời gian khoảng 30 phút do các đoạn DNA có kích thước ngắn (487 và 559 bp). Như vậy xét nghiệm phân tích gen được tiến hành nhanh chóng, kết quả thu được có độ tin cậy cao, dễ thực hiện.

2.3.3.2. Phát hiện đột biến đảo đoạn intron 1 bằng kỹ thuật Multiplex PCR

Kỹ thuật *Multiplex PCR*: thiết kế hai phản ứng *Multiplex PCR* có thể phát hiện được các bệnh nhân bị đột biến. Phản ứng 1 có chứa các cặp mồi đặc hiệu cho int1h1 cộng với một mồi đặc hiệu cho chuỗi int1h2; phản ứng 2 chứa cặp mồi đặc hiệu cho int1h2 cộng với một mồi đặc hiệu cho int1h1. Dựa vào kích thước khác nhau của các đoạn DNA sau khi điện di để phát hiện đột biến. Trường hợp không có đột biến đảo đoạn intron 1, phản ứng 1 chỉ có mồi int1h1 bắt cặp cho kích thước 1908 bp. Ở phản ứng 2 chỉ có mồi đặc hiệu cho int1h2 bắt cặp cho kích thước 1191 bp. Nếu đột biến xảy ra, mồi int1h1 bắt cặp với int1h2 ở cả hai phản ứng sẽ cho các kích thước 1323 bp và 1776 pb tương ứng ở phản ứng 1 và phản ứng 2.

2.3.3.2. Phát hiện đột biến mất exon bằng kỹ thuật PCR

2.3.3.3. Phát hiện các dạng đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự

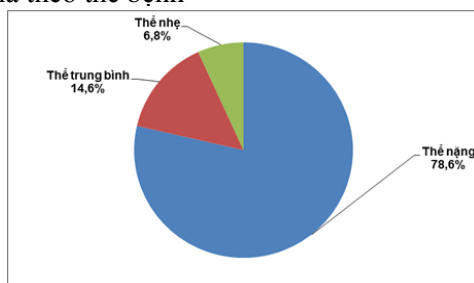
2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Các gia đình bệnh nhân hemophilia A tham gia nhóm đối tượng nghiên cứu trên tinh thần tự nguyện. Các thông tin về bệnh nhân và gia đình bệnh nhân được giữ bí mật.

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung về đối tượng nghiên cứu

Tỉ lệ bệnh nhân chia theo thể bệnh



Nhận xét:

81/103 bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng thể nặng chiếm tỷ lệ 78,6%; 15/103 bệnh nhân thể trung bình chiếm tỷ lệ 14,6%; 7/103 bệnh nhân thể nhẹ chiếm tỷ lệ 6,8%.

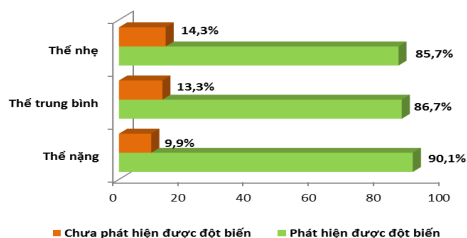
3.2. Kết quả phát hiện đột biến gen F8

3.2.1. Tỷ lệ phát hiện được đột biến

3.2.1.1. Tỷ lệ bệnh nhân theo kết quả phát hiện đột biến

Nghiên cứu phát hiện được 92/103 trường hợp bệnh nhân có đột biến gen F8 gây bệnh hemophilia A, chiếm tỷ lệ 89,3%. Số bệnh nhân chưa phát hiện được 11/103 trường hợp, chiếm tỷ lệ 10,7%.

3.2.1.2. Tỷ lệ đột biến theo thể bệnh ở nhóm phát hiện và không phát hiện được đột biến



Nhận xét:

- 73/81 bệnh nhân thể nặng phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 90,1%; 8/81 bệnh nhân thể nặng không phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 9,9%.

- 13/15 bệnh nhân thể trung bình phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 86,7%; 2/15 bệnh nhân thể trung bình không phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 13,3%.

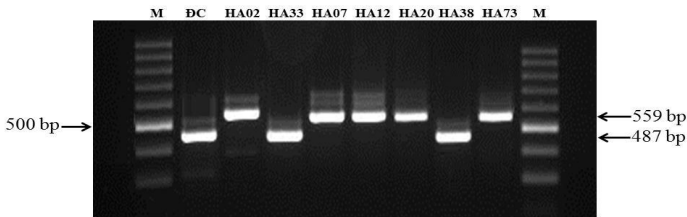
- 6/7 bệnh nhân thể nhẹ phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 85,7 %; 1/7 bệnh nhân thể nhẹ không phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 14,3%.

3.2.2. Kết quả phát hiện các dạng đột biến gen F8

3.2.2.1. Kết quả xác định đột biến đảo đoạn

a/ *Xác định đột biến đảo đoạn intron 22 bằng kỹ thuật Inversion –PCR*

81 bệnh nhân hemophilia A chẩn đoán lâm sàng thể nặng được xét nghiệm đột biến đảo đoạn intron 22 bằng phương pháp Inversion–PCR. Kết quả có 35/81 bệnh nhân có đột biến đảo đoạn chiếm tỉ lệ 43,2% bệnh nhân thể nặng.



M: Marker kích thước 100bp
 ĐC: mẫu đối chứng (người bình thường)
 HA33, HA38: Không có đảo đoạn intron 22
 HA02, HA07, HA12, HA20, HA73 : Đột biến đảo đoạn intron 22

Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 22

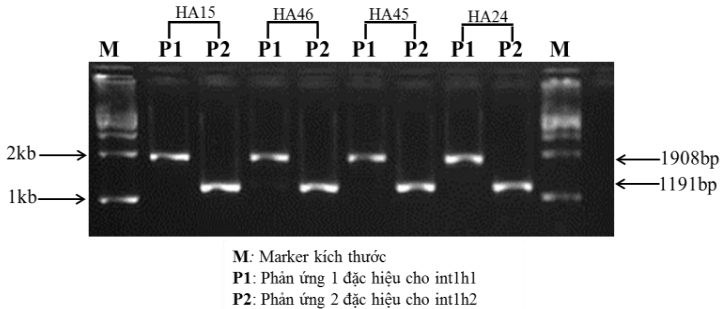
Nhận xét:

DNA người bình thường ở mẫu đối chứng (ĐC) khi được khuếch đại bằng phản ứng Multiplex-PCR có 1 băng kích thước tương ứng 487 bp. Nếu đột biến xảy ra, khi khuếch đại sẽ cho 1 đoạn kích thước 559 bp. Như vậy, ở vị trí các giếng tương ứng với các bệnh nhân mã số HA33, HA38 không có đảo đoạn intron 22 do cùng có vạch DNA kích thước 487 bp. Ở giếng mã số HA02, HA07, HA12, HA20, HA73 là bệnh nhân hemophilia A có đột biến đảo đoạn intron 22 do điện di đều có vạch DNA kích thước 559 bp.

b/ *Xác định đột biến đảo đoạn intron 1 bằng phương pháp Multiplex PCR*

Có 35/81 bệnh nhân hemophilia A thể nặng bị đột biến đảo đoạn intron 22, 46/81 bệnh nhân hemophilia A thể nặng còn lại tiếp tục

được sàng lọc đột biến đảo đoạn intron 1 bằng kỹ thuật *Multiplex PCR*. Kết quả 46 bệnh nhân này không bị đột biến đảo đoạn intron 1.



Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định đảo đoạn intron 1

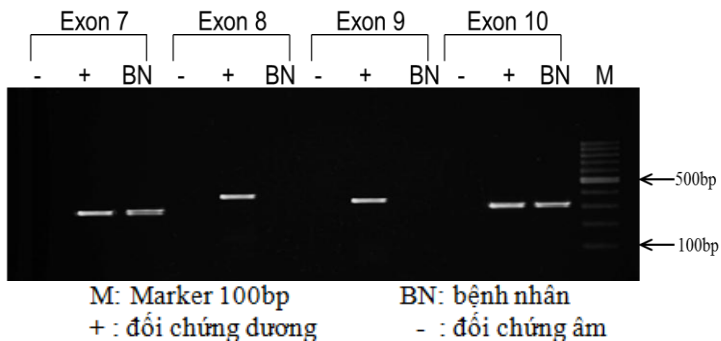
Nhận xét:

Các phản ứng *Multiplex PCR* khuếch đại đoạn int1h1(P1) chỉ cho các đoạn DNA kích thước 1908bp chứng tỏ cặp mồi 9F và 9cR thiết kế cho đoạn int1h1 bắt cặp với nhau. Các phản ứng khuếch đại đoạn int1h2 (P2) đều cho kích thước 1191bp chứng tỏ chỉ có cặp mồi int1h-2R và int1h-2F đặc hiệu cho đoạn int1h2 bắt cặp với nhau. Như vậy, không có đột biến intron 1 ở các bệnh nhân mã số HA15, HA46, HA45 và HA24.

3.2.2.2. Kết quả phát hiện đột biến mất exon bằng phản ứng PCR:

Nghiên cứu này có 4 bệnh nhân đột biến mất exon bao gồm HA38, HA51, HA55, HA64.

- Đột biến mất exon 8 và exon 9 ở bệnh nhân HA64:



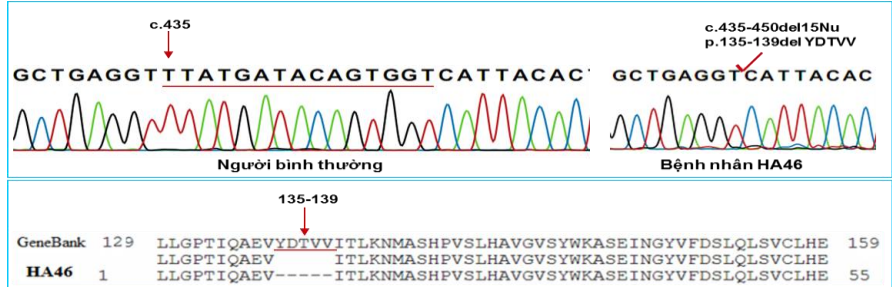
Kết quả PCR xác định đột biến mất exon ở bệnh nhân HA64

Nhận xét:

Bệnh nhân mã số HA64 sau khi được khuếch đại toàn bộ 38 cặp môi cùng với các mẫu đối chứng âm và đối chứng dương phát hiện ở vị trí exon 8, exon 9 của bệnh nhân không có vạch DNA trong khi tất cả các exon còn lại đều lên vạch DNA tương ứng với mẫu đối chứng dương. Điều này chứng tỏ bệnh nhân bị đột biến mất đoạn exon 8 và exon 9.

3.2.2.3. Kết quả phát hiện đột biến bằng phương pháp giải trình tự

a/ Đột biến mất đoạn nucleotid

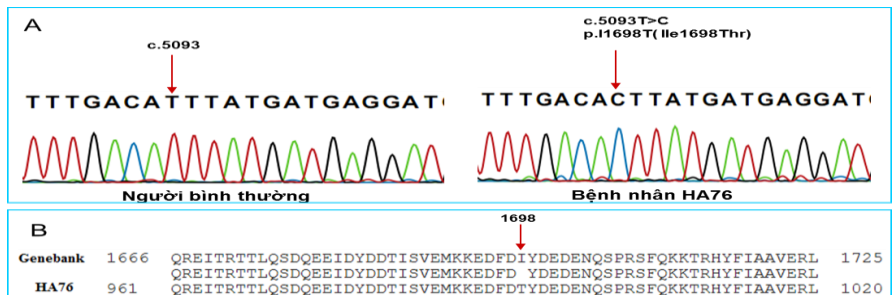


Hình ảnh đột biến mất đoạn 15 nucleotid ở bệnh nhân HA46

Nhận xét

Bệnh nhân mã số HA46 thể nặng, không phát hiện thấy đảo đoạn intron 22, intron 1. Khuếch đại 38 cặp môi đều lên vạch căng, rõ nét. Tinh sạch DNA của các phản ứng khuếch đại này và giải trình tự, sau đó so sánh với trình tự người bình thường. Kết quả tại exon 4 phát hiện thấy đột biến mất 15 nucleotid tại vị trí c.435-450. Khi kiểm tra sự thay đổi acid amin do đột biến gây ra, thấy tại vị trí protein từ 135 đến 139 bị mất 5 acid amin Tyrosin, Asparagin, Threonin, Valin, Valin (p.135-139delTyr-Val).

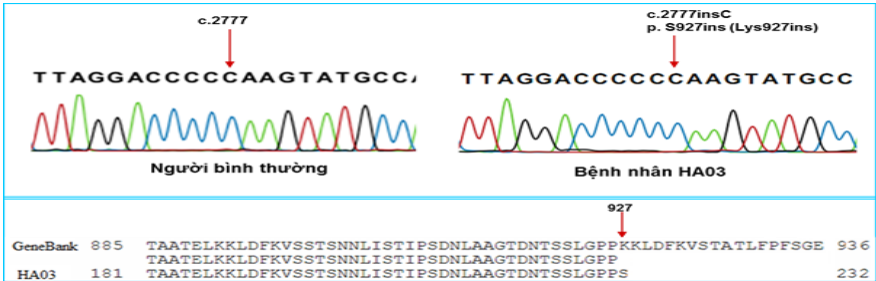
b/ Đột biến sai nghĩa:



Hình ảnh đột biến của bệnh nhân HA76

Nhận xét:

Ở bệnh nhân HA76, tại exon 14 khi kiểm tra có đột biến tại vị trí c.5093 nucleotid T được thay thế bằng nucleotid C gây ra đột biến thay thế acid amin Isoleucin bằng acid amin Threonin. Như vậy bệnh nhân có đột biến exon 14 của gen F8 tại vị trí c. 5093T>C (p.Ile927Thr).

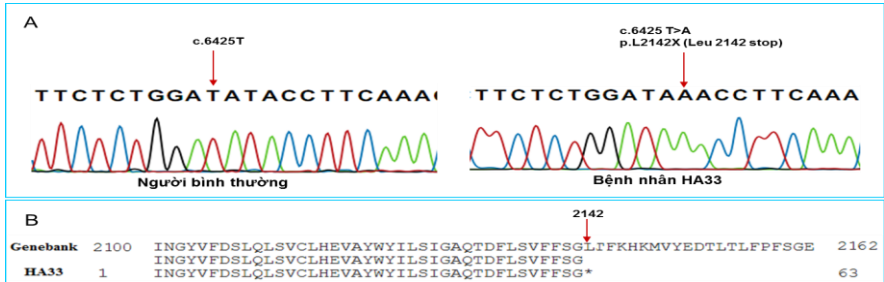
c/ Đột biến thêm một nucleotid**Hình ảnh đột biến thêm nucleotid C của bệnh nhân HA03****Nhận xét:**

Hình ảnh giải trình tự cho thấy bệnh nhân mã số HA03 có đột biến thêm một nucleotid C trên exon 14 của gen F8. Kiểm tra trên trình tự Genebank xác định thay đổi này trên exon 14 là c.2777 insC, đột biến gây lệch khung dịch mã toàn bộ acid amin còn lại từ vị trí p.927(p.Lys927ins).

d/ Đột biến mất 1 nucleotid**Hình 3.13. Hình ảnh đột biến mất nucleotid của bệnh nhân HA39****Nhận xét:**

Ở bệnh nhân HA39, khi giải trình tự toàn bộ 26 exon thấy tại vị trí exon 14 có đột biến mất nucleotid G tại vị trí c.2185. Đột biến mất nucleotid G gây lệch khung dịch mã làm thay đổi toàn bộ các acid amin từ vị trí p.729 (p.Ser729del).

e/ Đột biến vô nghĩa

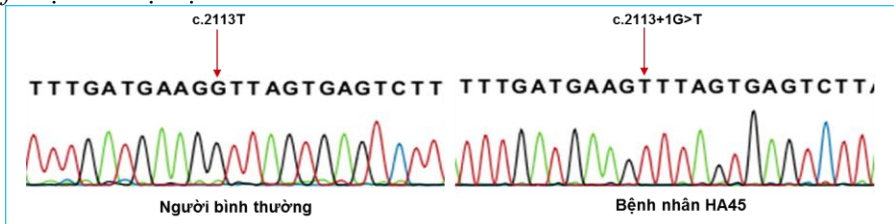


Hình 3.14. Hình ảnh đột biến tạo stop codon của bệnh nhân HA33

Nhận xét:

Bệnh nhân mã số HA33 sau khi được giải trình tự kiểm tra vị trí đột biến cho thấy: đột biến thay thế nucleotid T bằng nucleotid A tại vị trí 6425. So sánh với trình tự Genebank cho thấy: đột biến này làm thay đổi acid amin Leucin tạo thành stop codon gây dừng đột ngột quá trình phiên mã protein (p.Leu2142Stop).

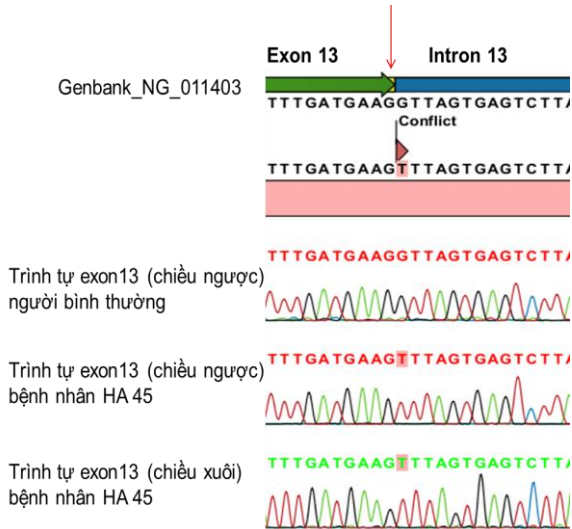
f/ Đột biến tại vị trí nối



Hình ảnh đột biến tại vị trí nối exon/intron của bệnh nhân HA45

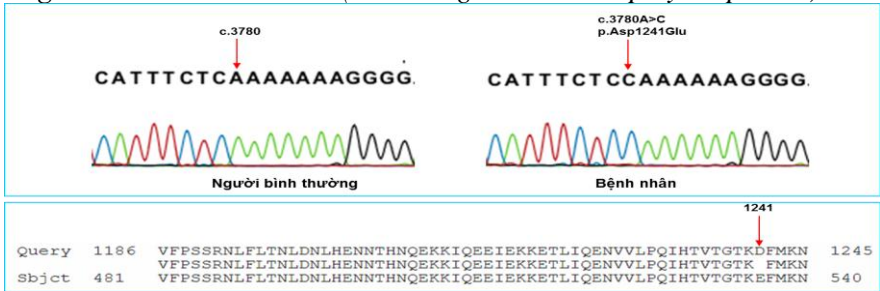
Nhận xét:

Với những thay đổi bất thường ở gần hoặc tại vị trí đầu hoặc cuối exon là vị trí nối giữa exon và intron, chúng tôi sử dụng chương trình dự đoán vị trí nối (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) để dự đoán những thay đổi ở RNA và kiểm tra xem đột biến đó đã được công bố chưa. Do đột biến thay đổi nucleotid ở vị trí cuối exon nên không sử dụng được phần mềm Blast của NCBI kiểm tra thay đổi acid amin trên protein. Khi Blast bằng phần mềm CLC kiểm tra vị trí nối thấy bệnh nhân HA45 thay đổi nucleotid G của GT đầu tiên của intron nên được kí hiệu là c.2113+1.



Hình ảnh Blast bằng phần mềm CLC kiểm tra đột biến ở vị trí nối exon/intron của bệnh nhân HA45

g/ Đa hình nucleotid đơn (SNP -Single nucleotide polymorphisms)

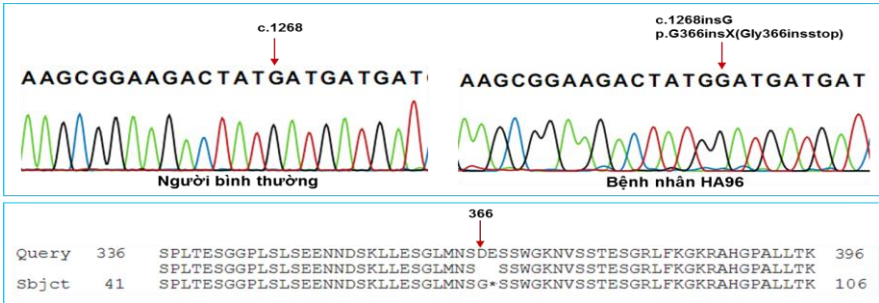


Hình ảnh đột biến thay thế nucleotid tạo SNP của bệnh nhân HA26

Nhận xét:

Trong quá trình giải trình tự exon 14 của bệnh nhân HA 26, HA53 khi so sánh với trình tự Genebank NG_011403 phát hiện đột biến thay thế nucleotid A thành nucleotid C tại vị trí 3780. Đột biến này làm thay đổi acid amin Aspartic thành Glutamic. Tuy nhiên khi kiểm tra trên Hamster và CDC (cơ sở dữ liệu về bệnh hemophilia A của Hoa Kỳ và Anh) phát hiện đây không phải là đột biến gây bệnh mà là một SNP (đã được công bố mã số 1800292).

e/ Đột biến mới chưa được công bố

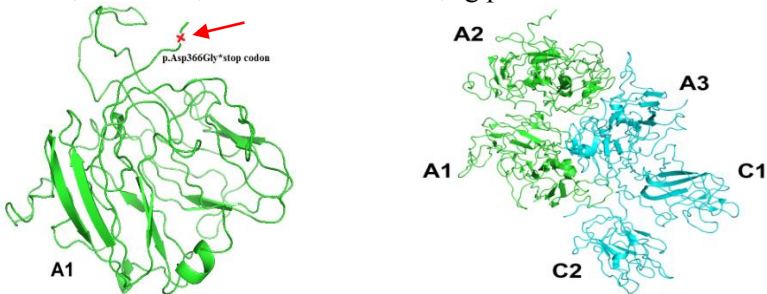


Hình ảnh đột biến mới chưa được công bố của bệnh nhân HA96

Nhận xét:

Bệnh nhân HA96 được kiểm tra vị trí đột biến cho thấy ở exon 8 thêm một nucleotid G tại vị trí c.1268 làm thay đổi acid amin Aspartic thành acid amin Glycin sau đó tạo stop codon ở vị trí acid amin tiếp theo. Khi kiểm tra trên cơ sở dữ liệu Hamster và CDC chưa thấy công bố đột biến này. Sử dụng phần mềm **DNASTAR** (<http://www.dnastar.com/t-products-dnastar-lasergene-structural-biology.aspx>) để kiểm tra hình ảnh cấu trúc 3D dự đoán thay đổi cấu trúc của protein F8.

Hình ảnh đột biến ở bệnh nhân HA96 sử dụng phần mềm **DNASTAR**



Hình ảnh cấu trúc 3D của protein F8 phân tích ở bệnh nhân HA96

(Vị trí đột biến vùng mũi tên đỏ)

Nhận xét:

Cấu trúc đầy đủ của protein F8 theo thứ tự gồm A1-A2-A3-C1-C2 trong đó 3 vùng A có chức năng gắn Ca^{2+} , còn 2 vùng C sẽ liên kết với phospholipid và yếu tố vWF, vùng B không có chức năng sẽ bị phân giải.

Đột biến tạo stop codon tại exon 8 ở vị trí p.Gly366insStop làm dừng đột ngột quá trình phiên mã protein FVIII (vị trí mũi tên đỏ hình 3.20). Protein này chỉ còn phân cấu trúc vùng A1, mất hoàn toàn các vùng A2,

A3, C1, C2 dẫn đến biểu hiện của bệnh hemophilia A trên lâm sàng.

3.2. Lập bản đồ đột biến gen F8 gây bệnh hemophilia A ở Việt Nam

3.2.1. Kết quả vị trí đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A Việt Nam

a/ Đột biến đảo đoạn intron 22

Có 35 bệnh nhân hemophilia A thể nặng đột biến đảo đoạn intron 22.

b/ Vị trí đột biến trên exon và các vị trí nối exon-intron

Kết quả các vị trí đột biến trên gen F8 gây bệnh hemophilia A

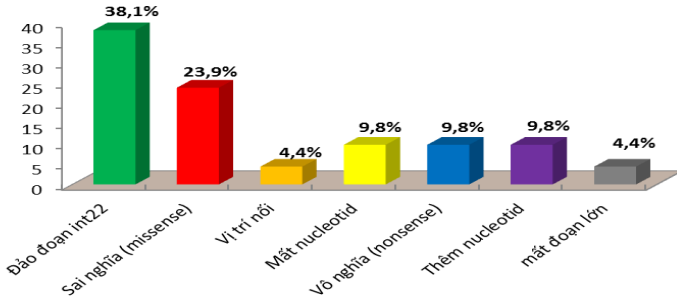
STT	Mã số BN	Thể bệnh	Exon	Domain/ chuỗi	Thay đổi Nucleotid	Thay đổi acid amin	Bài báo công bố
1.	HA16	Nặng	1	A1/ chuỗi nặng	c.65G>T	p.Arg22Ile	HAMSTeR
2.	HA18	Nặng	1	A1/ chuỗi nặng	c.143G>A	p.Arg48Lys	Becker J 1996
3.	HA67	Trung bình	2	A1/ chuỗi nặng	c.223G>T	p.Asp75Tyr	Goodeve AC 2000
4.	HA21	Nặng	3	A1/ chuỗi nặng	c.301G>C	p.Asn101His	Leuer M 2001
5.	HA10	Nhẹ	3	A1/ chuỗi nặng	c.386A>T	p.Glu129Val	Maugard (1998)
6.	HA15	Nặng	4	A1/ chuỗi nặng	c.446C>T	p.Pro149Leu	Margagline (2008)
7.	HA46	Nặng	4	A1/ chuỗi nặng	c.435-50 del 15nucleotid	p.135-139delTyr- Val	Vinciguerra C (2006)
8.	HA61	Trung bình	8	A1/ chuỗi nặng	c.1063G>A	p.Arg336Cys	Arai (1989)
9.	HA96	Nặng	8	A1/ chuỗi nặng	c.1268insG	p.Asp366Gly*Stop	Chưa công bố
10.	HA64	Nặng	8,9	A1,A2	Del exon		HAMSTeR
11.	HA47	Trung bình	12	A2/ chuỗi nặng	c.1801A>C	p.Asn601His	Miller CH (2011)
12.	HA09	Nhẹ	12	A2/ chuỗi nặng	c.1832-34delCT	p.Gln611del	Miller CH (2011)
13.	HA56	Trung bình	13	A2/ chuỗi nặng	c.1963T>C	p.Tyr655His	Ahmed R (2005)
14.	HA45	Nặng	IVS13	A2/ chuỗi nặng	c.2113+1G>T	Splicing	Ravanbod S (2011)
15.	HA51	Nặng	14	chuỗi nặng	Del exon		HAMSTeR
16.	HA39	Trung bình	14	A2/ chuỗi nặng	c.2185delG	p.Ser729del	Hua B (2010)
17.	HA11	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.2777-78insC	p.Lys927ins	HAMSTeR, Margagline (2008)
18.	HA03	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.2777-78insC	p.Lys927ins	HAMSTeR, Margagline (2008)
19.	HA01	Trung bình	14	B/ chuỗi nặng	c.3388delA	p.Arg1130del	Ma GC (2008)
20.	HA57	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.3169G>A	p.Glu1057Lys	Ogata K (2011)
21.	HA54	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.3263C>T	p.Thr1088Ile	Miller CH (2011)
22.	HA24	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.3637insA	p.Asn1213ins	HAMSTeR, Pieneman Wc (1995)
23.	HA31	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.3637insA	p.Asn1213ins	HAMSTeR, Pieneman Wc (1995)
24.	HA100	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.3637insA	p.Asn1213ins	HAMSTeR, Pieneman Wc (1995)

25.	HA92	Trung bình	14	B/ chuỗi nặng	c.3870insA	p.Arg1272ins	Frusconi (2002)
26.	HA65	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.4114A>G	p.Thr1372Ala	Margagline (2008)
27.	HA23	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.4156C>T	p.Gln1386Stop	Margagline (2008)
28.	HA59	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.4232delA	p.Lys1411del	Gouw C (2011)
29.	HA62	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.4288-92del	p.Asp1430del	David D (2006)
30.	HA06	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.4379insA	p.Lys1460ins	Higuch (1991)
31.	HA93	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.4409-18del	p.Glu1470del	HAMSTeR, Hiu M (2005)
32.	HA04	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.4550insA	p.Lys1555ins	Higuchi (1991)
33.	HA76	Nhẹ	14	B/ chuỗi nặng	c.5093 T>C	p.Ile1698Thr	Liu M (1998)
34.	HA91	Nặng	14	B/ chuỗi nặng	c.5144-46delCTC	p.Phe1672del	David D (2006)
35.	HA41	Nặng	14	A3/ chuỗi nhẹ	c.5177 G>A	p.Trp1726Stop	HAMSTeR
36.	HA102	Trung bình	IVS14		c.5220-1G>C	Splicing	Elmadmoudi H (2012)
37.	HA55	Nặng	16	A3/ chuỗi nhẹ	Del exon		HAMSTeR
38.	HA19	Nhẹ	16	A3/ chuỗi nhẹ	c.5543A>T	p.Glu1848Val	Green PM (2008)
39.	HA37	Nặng	17	A3/ chuỗi nhẹ	c.5665C>T	p.Gln1889Stop	Liu ML (2002)
40.	HA95	Nặng	17	A3/ chuỗi nhẹ	c.5691-2insC	p.Leu1898ins	Ravanbod S (2011)
41.	HA29	Nhẹ	17	A3/ chuỗi nhẹ	c.5738A>G	p.Asn1913Ser	HAMSTeR
42.	HA98	Nặng	18	A3/ chuỗi nhẹ	c.5953C>T	p.Arg1985Stop	Tud GD (1991) Dia C (1992)
43.	HA49	Nặng	IVS18		c.5998+1G>A	Splicing	HAMSTeR, Freson K (1998)
44.	HA34	Nặng	19	A3/ chuỗi nhẹ	c.6016G>T	p.Gln2006Stop	Schwaab R (1993)
45.	HA68	Nặng	IVS20		c.6188-1G>T	Splicing	Margagline (2008)
46.	HA36	Nhẹ	22	C1/ chuỗi nhẹ	c.6403C>G	p.Arg2135Gly	Miller CH (2011)
47.	HA53	Nặng	22	C1/ chuỗi nhẹ	c.6374G>C	p.Ser2125Thr	Margagline (2008)
48.	HA33	Nặng	22	C1/ chuỗi nhẹ	c.6425T>A	p.Leu2142Stop	HAMSTeR
49.	HA26	Nặng	23	C1/ chuỗi nhẹ	c.6497C>T	p.Arg2166Leu	David D (2006)
50.	HA38	Nặng	23	C1/ chuỗi nhẹ	Del exon 23		HAMSTeR
51.	HA94	Trung bình	23	C1/ chuỗi nhẹ	c.6537C>G	p.Ser2179Arg	Ahmed R (2005)
52.	HA63	Trung bình	23	C1/ chuỗi nhẹ	c.6544C>T	p.Arg2182Cys	Rainer AP (1992)
53.	HA90	Trung bình	23	C1/ chuỗi nhẹ	c.6545G>A	p.Arg2182His	Tuddenham (1994)
54.	HA30	Nặng	24	C2/ chuỗi nhẹ	c.6666G>A	p.Trp2222Stop	Miller CH (2011)
55.	HA99	Trung bình	24	C2/ chuỗi nhẹ	c.6694C>T	p.Gln2232Stop	Ahmed R (2005)
56.	HA85	Trung bình	25	C2/ chuỗi nhẹ	c.6825delT	p.Tyr2275del	Green PM (2008)
57.	HA28	Nặng	26	C2/ chuỗi nặng	c.7015A>T	p.Arg2339Trp	Green PM (2008)

Nhận xét:

- Các đột biến nằm rải rác trên toàn bộ gen F8.
- Đột biến tập trung nhiều ở exon 14.
- Mỗi bệnh nhân chỉ có một vị trí đột biến gây bệnh.

3.2.2. Tỷ lệ các dạng đột biến khác nhau trên bệnh nhân hemophilia A ở Việt Nam

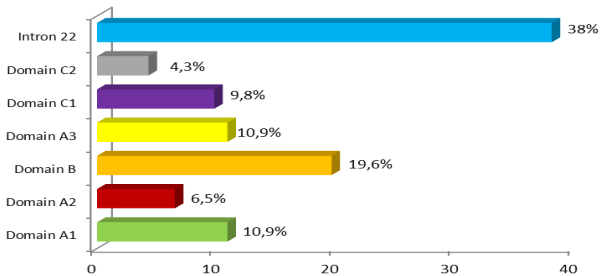


Các dạng đột biến phát hiện được trên bệnh nhân hemophilia A

Nhận xét:

Trong 92 bệnh nhân phát hiện được đột biến có: đột biến đảo đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất 38,1% (35/92 bệnh nhân). Tiếp theo là đột biến sai nghĩa chiếm tỷ lệ 23,9% (22/92 bệnh nhân). Chiếm tỉ lệ cao thứ ba là các dạng đột biến mất nucleotid, đột biến vô nghĩa, đột biến thêm nucleotid với tỉ lệ 9,8% (9/92 bệnh nhân). Tỉ lệ thấp nhất là dạng đột biến ở vị trí nối exon-intron và đột biến mất đoạn lớn chiếm tỷ lệ 4,4% (4/92 bệnh nhân).

3.2.3. Tỷ lệ các dạng đột biến trên các vùng của gen F8

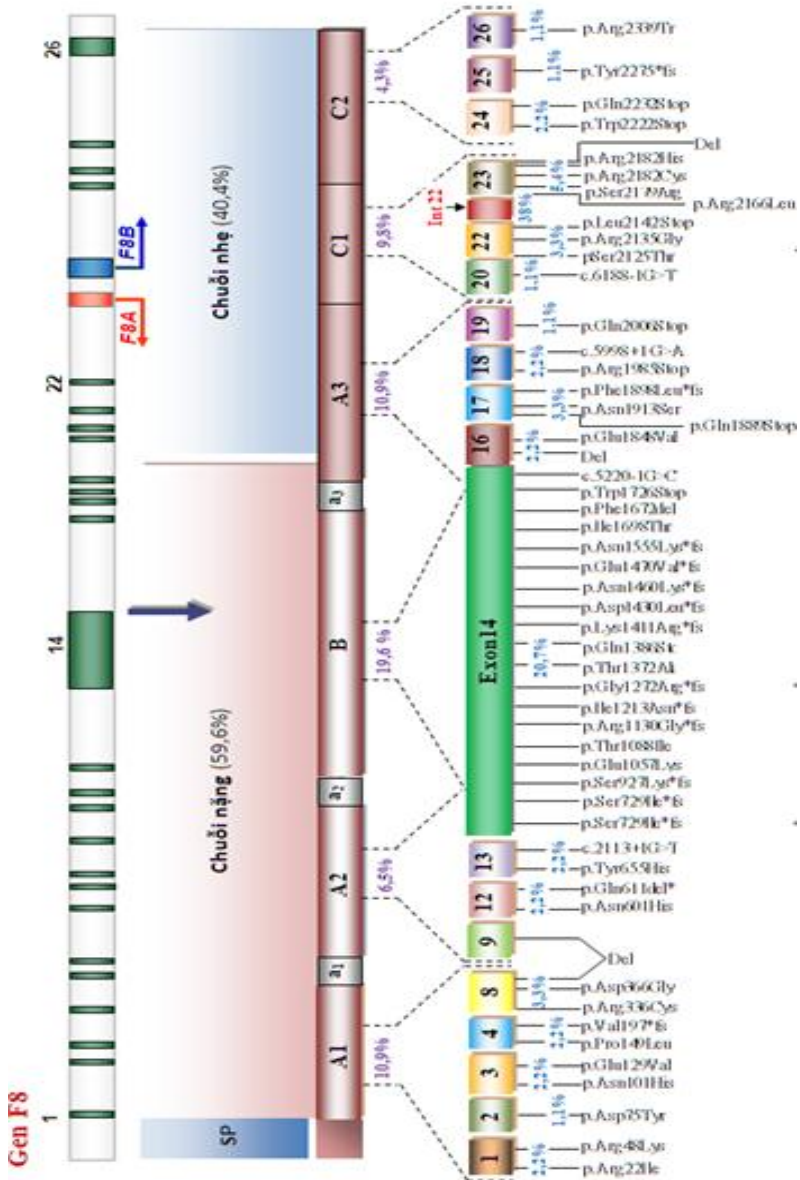


Phân bố tỷ lệ các dạng đột biến trên các vùng của gen F8

Nhận xét:

Trên các vùng gen F8: đột biến đảo đoạn intron 22 chiếm tỷ lệ cao nhất (38%); đột biến vùng B chiếm tỷ lệ 19,6%; đột biến vùng A1 và A3 chiếm tỷ lệ 10,9%; đột biến vùng C1 chiếm tỷ lệ 9,8%; đột biến vùng A2 chiếm tỷ lệ 6,5%; đột biến trên vùng C2 chiếm tỷ lệ thấp nhất (4,3%).

3.2.4. Bản đồ đột biến gen F8 gây bệnh hemophilia A ở Việt Nam



Bản đồ vị trí đột biến gen F8 gây bệnh hemophilia A ở Việt Nam

Chương 4

BÀN LUẬN

Bệnh hemophilia A là một bệnh di truyền do thiếu hụt hoặc bất thường chức năng của yếu tố đông máu huyết tương - yếu tố VIII. Từ năm 1984, nghiên cứu của Gitschier đã cho thấy những hiểu biết đầy đủ về cấu trúc phân tử gen F8 tổng hợp protein yếu tố VIII, mở đường cho các nghiên cứu về cơ chế bệnh học phân tử hemophilia A và các dạng đột biến gen F8 gây bệnh.

4.1. Đặc điểm chung về đối tượng nghiên cứu

4.2. Phát hiện đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A của Việt Nam - Tỷ lệ phát hiện đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A

Trong nghiên cứu này, xác định đột biến trên gen F8 được thực hiện trên 103 bệnh nhân đã được chẩn đoán hemophilia A không có quan hệ huyết thống cho thấy tỷ lệ phát hiện đột biến là 89,3%, có 11 trường hợp không phát hiện được đột biến chiếm tỉ lệ 10,7%. Tỉ lệ không phát hiện được đột biến của chúng tôi cao hơn các tác giả khác công bố là 2-7%. Nguyên nhân có thể do chúng tôi chưa thực hiện được phối hợp nhiều phương pháp khác để chẩn đoán các vị trí đột biến ở trong vùng intron, chưa xác định được các đột biến lặp đoạn DNA bằng phương pháp MLPA...Tuy nhiên, so với các tác giả chỉ sử dụng phương pháp giải trình tự để chẩn đoán thì tỉ lệ phát hiện bệnh của chúng tôi cũng hoàn toàn phù hợp. Số bệnh nhân phát hiện được đột biến trong nghiên cứu này ở từng thể bệnh tương ứng là: thể nặng 90,1%, thể trung bình 86,7% và thể nhẹ là 85,7%. Tỉ lệ xác định được đột biến ở từng thể bệnh được tác giả Santacroce và cộng sự thực hiện trên 1296 bệnh nhân hemophilia A thực hiện ở Italia là 874 (89%), 146 (84%), 133 (94%) tương ứng với bệnh nhân thể nặng, trung bình và thể nhẹ. Theo tác giả Bogdanova cũng chỉ sử dụng phương pháp giải trình tự phát hiện đột

biến cho kết quả xác định được đột biến ở từng thể là 100% thể nặng, 96% thể trung bình và 88% thể nhẹ.

- Các dạng đột biến gây bệnh hemophilia A ở Việt Nam

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện xác định đảo đoạn intron 22 bằng phương pháp Inversion-PCR. Có 35 bệnh nhân hemophilia A thể nặng được chẩn đoán đột biến đảo đoạn intron 22 trong tổng số 81 bệnh nhân hemophilia A thể nặng được sàng lọc chiếm tỉ lệ 43,7%. Tỉ lệ này tương tự với tỉ lệ đột biến đảo đoạn intron 22 được các tác giả công bố là 42-50% ở nhóm bệnh nhân hemophilia A thể nặng, ở Đài Loan tỉ lệ này là 45,1%; 42,5 - 44,25% dân số ở Ấn Độ và 40-50% ở châu Âu.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 46 bệnh nhân hemophilia A không bị đột biến đảo đoạn intron 22 trong tổng số 81 bệnh nhân hemophilia A thể nặng được kiểm tra xác định đột biến đảo đoạn intron 1 bằng phương pháp *Multiplex* PCR cho thấy không có trường hợp nào bị đột biến đảo đoạn intron 1. Chúng tôi cho rằng kết quả âm tính này rất có thể do mẫu nghiên cứu của chúng tôi chưa đủ lớn để phát hiện dạng đột biến này. Trong nghiên cứu của Andrikovics cũng cho thấy sự vắng mặt của đảo đoạn intron 1 khi nghiên cứu 104 trường hợp hemophilia A ở Hungary. Ngoài ra, một nghiên cứu gần đây cho thấy tỷ lệ tổng thể của đảo đoạn intron 1 là thấp hơn 1%. Đặc biệt, tỉ lệ này là khác nhau giữa các chủng tộc. Nghiên cứu trên bệnh nhân hemophilia A của Ấn Độ thấy tỉ lệ đột biến intron 1 là 2,7%, tương tự như của nghiên cứu ở Nam Phi. Các đột biến này chỉ xác định được ở những bệnh nhân da đen mà không tìm thấy đột biến đảo đoạn intron 1 trong số bệnh nhân da trắng. Tuy nhiên, đảo đoạn intron 1 là một đột biến quan trọng cần sàng lọc, mặc dù tỉ lệ xác định trong quần thể người da trắng thấp.

Sau khi thu được DNA có chất lượng tốt, nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật PCR với 38 cặp mồi đặc hiệu cho 26 exon của gen *F8*. Với kích thước lớn của exon 14 cần 9 cặp mồi và exon 26 cần 5 cặp mồi để giải trình tự toàn bộ những exon này. Trong nghiên cứu này, có 4 bệnh nhân

đột biến mất exon đã được phát hiện bằng phương pháp khuếch đại PCR đơn thuần: HA38, HA51, HA55, HA64; trong đó bệnh nhân HA64 đột biến mất 2 exon liên tiếp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện được các đột biến mất từ 1 nucleotid như bệnh nhân HA01, HA39 đến mất 15 nucleotid HA46, đột biến thêm nucleotid A, nucleotid C gặp ở các bệnh nhân HA11, HA24... Đột biến sai nghĩa là đa dạng và hay gặp nhất ở bệnh nhân hemophilia A thể nhẹ và trung bình: HA76, HA90, HA29...

Để xác định đột biến ở vị trí nối giữa intron và exon đòi hỏi phải có trình tự nucleotid tại đầu 3'- 5' vùng exon-intron cũng như trình tự các điểm dễ bị đột biến nằm cách 18-40 bp đầu 3'. Hầu hết các đột biến vị trí nối đều gây bệnh, trong đó 10% đến 15% đột biến gây bệnh là các đột biến điểm ở vị trí nối. Để khẳng định chắc chắn các đột biến ở vị trí ranh giới giữa intron và exon là đột biến vị trí nối cần sử dụng phương pháp RT-PCR giải trình tự trên mRNA. Tuy nhiên trong nghiên cứu này của chúng tôi, 4 đột biến ở vị trí nối trên các bệnh nhân mã số HA45, HA49, HA68, HA102 đều đã được công bố nên có thể hoàn toàn khẳng định chắc chắn mà không cần kiểm tra.

Ở Việt Nam, chưa có công bố nào về các vị trí đột biến trên gen F8 gây bệnh hemophilia A. Trong nghiên cứu này, bệnh nhân HA96 khi xác định được vị trí nghi ngờ đột biến ở vị trí c.1268 làm thay đổi acid amin Aspartic thành acid amin Glycin, khi kiểm tra các đột biến đã được công bố trên thế giới chưa thấy công bố vị trí đột biến này. Sử dụng phần mềm DNASTAR (<http://www.dnastar.com/t-products-dnastar-lasergene-structural-biology.aspx>) để kiểm tra sự thay đổi cấu trúc protein FVIII cho thấy: bình thường FVIII sẽ liên kết với yếu tố vWF, khi hoạt động nó sẽ tách ra khỏi yếu tố vWF và sẽ nhanh chóng bị phân giải trong máu. So với cấu trúc đầy đủ của FVIII thì protein đột biến này chỉ còn vùng A1. Trong khi đó FVIII cấu trúc đầy đủ gồm 3 vùng A, 1 vùng B và 2 vùng C. Do stop codon xuất hiện rất sớm ngay ở exon 8

nên không tạo được 3 vùng A2, C1, C2 để liên kết với yếu tố vWF. Do đó, FVIII của bệnh nhân này sẽ không bền vững và nhanh chóng bị phân hủy cho dù protein này có được tổng hợp. Kết hợp với nồng độ FVIII của bệnh nhân <1% với các biểu hiện lâm sàng của hemophilia A thể nặng thì kết quả dạng đột biến này rất phù hợp.

- Đánh giá nguy cơ hình thành chất ức chế

Một số nghiên cứu cho rằng có mối liên quan với kiểu đột biến gen, mức độ nặng của bệnh, tuổi bắt đầu điều trị, loại chế phẩm điều trị, yếu tố di truyền. Trong khi nhiều yếu tố nguy cơ tạo kháng thể kháng FVIII chưa được xác định rõ, vai trò quan trọng của các dạng đột biến F8 làm tăng tỉ lệ nguy cơ đã được nhiều tác giả công bố. Cần nghi ngờ có chất ức chế trong máu khi lâm sàng không đáp ứng với điều trị thông thường. Xét nghiệm xác định sự có mặt của chất ức chế là mixtest. Đo nồng độ chất ức chế bằng thử nghiệm Bethesda. Nguyên lý của kỹ thuật này: cho FVIII vào huyết tương bệnh nhân, nếu có kháng thể thì FVIII sẽ bị trung hoà và có phản ứng ngưng kết. Nghiên cứu của chúng tôi gặp 1/4 bệnh nhân thể nặng có đột biến mất đoạn lớn, chiếm tỷ lệ 25%. Đây là nhóm nguy cơ cao phát triển chất ức chế trong quá trình điều trị. Đặc biệt với trường hợp bệnh nhân HA64, đột biến mất hai exon 8 và 9 nằm trên hai vùng A1, A2 khác nhau do đó nguy cơ rất cao sẽ phát triển chất ức chế. Do đó, bệnh nhân này cần kiểm tra định kỳ yếu tố đông máu khoảng 6-12 tháng một lần hoặc trước phẫu thuật. Đảo đoạn intron 22 là dạng đột biến có nguy cơ làm xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII với tỷ lệ cao (21%) so với các dạng đột biến khác. Đây là dạng đột biến hay gặp nhất ở các bệnh nhân hemophilia A thể nặng, gen F8 bị cắt thành 2 đoạn (exon 1-22 và exon 23-26) cách nhau 400kb gây bất hoạt hoàn toàn gen mã hóa yếu tố VIII do vậy gây thiếu trầm trọng yếu tố VIII lưu thông trong vòng tuần hoàn. Do vậy tất cả những yếu tố VIII đưa vào trong quá trình điều trị đều là mới đối với cơ thể và do đó nguy cơ kích thích hệ miễn dịch sinh ra kháng thể kháng yếu tố VIII cao hơn so với các đột biến khác. Với 35

bệnh nhân phát hiện đột biến đảo đoạn intron 22 trong nghiên cứu này cũng là những bệnh nhân có cần được theo dõi trong quá trình điều trị để phát hiện sớm tình trạng xuất hiện chất ức chế để có chế độ điều trị phù hợp. Đột biến vị trí nổi là dạng đột biến ít nguy cơ làm xuất hiện chất ức chế (tỷ lệ 3%). Điều này có thể được giải thích là do có một số lượng rất nhỏ các phân tử protein yếu tố VIII đủ để gây ra đáp ứng miễn dịch. Trong nghiên cứu này, những bệnh nhân đột biến sai nghĩa chủ yếu ở thể nhẹ và trung bình, có 4 trường hợp đột biến ở vị trí nổi được phát hiện, những bệnh nhân này có nguy cơ xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII thấp.

4.3. Xây dựng bản đồ đột biến gen F8 đối với bệnh nhân hemophilia A tại Việt Nam

- Vị trí đột biến gây bệnh hemophilia A

Nằm rải rác trên toàn bộ các vùng A1, A2, B, A3, C1, C2.

- Tần suất hay gặp ở một số vị trí đột biến

Hay gặp nhất là đột biến đảo đoạn intron 22: 35/103 bệnh nhân chiếm tỉ lệ 38,1%. Ngoài ra, có hai đột biến xuất hiện nhiều hơn 2 lần ở những bệnh nhân khác nhau: bệnh nhân HA03, HA11 đều cùng phát hiện đột biến ở vị trí p.Lys927ins; đột biến ở vị trí c.3637insA gây đột biến p.Asn1213ins được phát hiện trên 3 bệnh nhân khác nhau (HA24, HA31, HA100). Trong đó, đột biến ở vị trí c.3637insA là đột biến hay gặp đã được công bố bởi rất nhiều báo cáo trước đây trong dữ liệu HAMSTeR với tần suất là 14%-16% ở những bệnh nhân da trắng. Nghiên cứu của chúng tôi, đột biến này gặp ở 3/92 bệnh nhân phát hiện được đột biến nhưng chỉ chiếm 3,2%. Sự khác biệt này có thể được lý giải là do yếu tố chủng tộc.

- Tỷ lệ phát hiện đột biến trên từng exon

Tỉ lệ phát hiện được đột biến ở exon 14 trong nghiên cứu này là cao nhất chiếm tỉ lệ 20,7%. Đột biến ở exon 14 cao hơn các exon còn lại do kích thước lớn hơn nhiều lần, với kích thước khoảng 3,1 Kb (từ 3106 đến 7227pb) bản thân exon 14 chiếm khoảng 43% vùng mã hóa protein FVIII. Tỉ lệ này phù hợp với các báo cáo trong nghiên cứu tại Đài Loan

đột biến ở exon 14 là 21,9%, nghiên cứu của Italia tỉ lệ này là 33%. Điều này còn chứng tỏ đột biến ở vùng B rất quan trọng đến chức năng hoạt động của FVIII mặc dù không tham gia vào cấu trúc protein F8 hoàn thiện. Theo như một số nghiên cứu, với tỉ lệ đột biến cao hay gặp ở exon 14 nên khuyến cáo ngay sau khi xác định không có đột biến đảo đoạn intron 22 và intron 1 thì giải trình tự exon 14 để sàng lọc tìm vị trí có khả năng gây đột biến. Còn theo tác giả David tỉ lệ đột biến ở vị trí c.3637insA nằm trong exon 14 chiếm tỉ lệ cao nên giải trình tự sớm, trước khi đi tìm các vị trí đột biến ở trên exon khác.

Trong nghiên cứu này các exon còn lại đều có tỉ lệ đột biến là tương đương nhau. Chưa phát hiện được đột biến trên các exon 5, 6, 7,10,11,15, 21 có thể do số lượng bệnh nhân còn hạn chế nên chưa tìm thấy các vị trí đột biến trên các exon này.

Nghiên cứu của chúng tôi xác nhận sự tương quan về tỉ lệ các dạng đột biến ở bệnh nhân hemophilia A. Các loại đột biến được tìm thấy tỉ lệ phù hợp với các kết quả báo cáo được công bố bởi các tác giả Repesse (Pháp), Jochen Graw (Đức), Adoracion Vencela (Tây Ban Nha), Rosetti (Argentina).

	Pháp 120 BN	Đức 845 BN	Tây Ban Nha 267 BN	Argentina 260 BN	Nghiên cứu này 103 BN
Inv22	46,0	35,7	43	44	38,1
Missence	15,0	38,2	34	12,2	23,9
Vị trí nối	7,0	2,6	2,6	3,7	4,4
Nonsense	13,0	9,3	3,7	10,2	9,8
Thêm nucleotid	7,0	2,6	2,0	1,9	9,8
Mất nucleotid	10,0	7,5	7,8	15,9	9,8
Xóa đoạn	2,0	3,0	1,0	10,2	4,4

-Về tỉ lệ các dạng đột biến trong từng thể bệnh

Trong nghiên cứu của chúng tôi hay gặp nhất ở bệnh nhân hemophilia A thể nặng là đảo đoạn intron 22 (38,1%). Đột biến missence gặp nhiều ở bệnh nhân hemophilia A thể trung bình 46,7% và thể nhẹ 71,4%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Margaglione, Becker cũng khẳng định tỉ lệ đột biến sai nghĩa hay gặp nhất ở hemophilia A thể trung bình và thể nhẹ .

KẾT LUẬN

Nghiên cứu phát hiện đột biến gen F8 trên 103 bệnh nhân bằng sử dụng kết hợp 4 phương pháp khác nhau, chúng tôi rút ra được kết luận sau:

1. Phát hiện đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A của Việt Nam.

- Tỷ lệ phát hiện được đột biến là 89,3% (92/103 bệnh nhân), trong đó tỉ lệ phát hiện đột biến ở thể nặng 90,1% (73/81 bệnh nhân), ở thể trung bình 86,7% (13/15 bệnh nhân) và ở thể nhẹ 85,7% (6/7 bệnh nhân).

- Các dạng đột biến được phát hiện bao gồm: đảo đoạn intron 22 là 38,1% (35/92 bệnh nhân), đột biến sai nghĩa là 23,9% (22/92 bệnh nhân), đột biến mất nucleotid là 9,8% (9/92 bệnh nhân), đột biến vô nghĩa là 9,8% (9/92 bệnh nhân), đột biến thêm nucleotid là 9,8% (9/92 bệnh nhân), đột biến vị trí nối exon-intron là 4,4% (4/92 bệnh nhân), đột biến mất đoạn lớn là 4,4% (4/92 bệnh nhân).

- Phát hiện đột biến mới chưa công bố: p.Gly366insStop.

2. Xây dựng được bản đồ đột biến gen F8 đối với 92 bệnh nhân hemophilia A tại Việt Nam.

- Tỉ lệ phát hiện được đột biến đảo đoạn intron 22 trong nghiên cứu này là cao nhất chiếm tỉ lệ 38,1%.

- Tỉ lệ phát hiện được đột biến ở exon 14 trong nghiên cứu này hay gặp chiếm tỉ lệ 20,7%.

- Các exon 1, 2, 3, 4, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26 gặp với tỉ lệ thấp hơn từ 1,1% - 5,4%.

- Chưa phát hiện được đột biến trên intron 1 và các exon 5, 6, 7, 10, 11, 15 và 21.

KIẾN NGHỊ

1. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về đột biến gen F8 ở người Việt Nam.
2. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về bệnh nhân và người mang gen bệnh hemophilia A.
3. Tư vấn di truyền trước hôn nhân và chẩn đoán trước sinh cho những người mang gen bệnh trước - trong quá trình mang thai.

BACKGROUND

1. Urgency of topics

Hemophilia A, also known as coagulation disorders. This is a recessive genetic disease involving the X chromosome, the disease caused by a deficiency or abnormality of factor VIII function. Vietnam is a country with an incidence in the community hemophilia A relatively high. According to research by Do Trung Phan (1996) incidence of about 25-60 / 1,000,000 people. Currently there are about 6000 hemophilia patients in Vietnam, of which only 30% are detected and treated, which treatments are mainly used factor VIII in whole blood (direct transmission or extraction) costly and ineffective, particularly at high risk for blood-borne diseases. Around the world, scientists analyzed the genomes of patients with hemophilia are types A and factor VIII gene mutations (F8) was announced. The researchers claim that different mutations cause different phenotypic characteristics. Patients with severe hemophilia A common mutation island exon 22 (accounting for 45-50%), whereas the majority of point mutations in patients with hemophilia A and mild to moderate disease (accounting for 90-95%). In Vietnam, the study of hemophilia A is primarily the study of clinical characteristics, preclinical evaluation or incidence studies evaluating the effectiveness of treatment with preparations rather how does the work ... No comprehensive study of gene mutations encoding human factor VIII in Vietnam, creating a database to build the foundation for gene mapping in patients with hemophilia A Vietnam. With the advancement of molecular biology techniques, scientists can analyze the patient's DNA to accurately identify the genetic lesion that causes hemophilia A, as well as better control of the disease by detecting the secondary female gene carriers and genetic counseling before marriage, increase effectiveness in preventing disease and improving the quality of health care in the community.

2. Objectives of the research:

1. *The findings of the F8 gene mutation hemophilia A patients in Vietnam.*
2. *Initial mapping F8 gene mutations in patients with hemophilia A in Vietnam.*

3. Practical significance and contribution of the new topics:

From the results of the mutations identified, initially build maps F8 gene mutations in patients with hemophilia A in Vietnam. Locate the F8 gene mutations in patients with hemophilia A provides many benefits for basic science and clinical applications. For patients with hemophilia A, identified mutations as a gold standard to confirm the diagnosis accuracy, in addition it also assists in predicting the severity of disease and evolution clinically, the predicted risk of developing antibodies to FVIII which method to choose the optimal treatment. Furthermore, to determine the position of the patient's mutation prerequisite for prenatal diagnosis of female gene carriers. Set the F8 gene mutation map is also very important precondition for the application of gene therapy in the future to address thoroughly the disease.

4. Structure:

The thesis is presented in 108 pages (not including references and appendices); including questioning (2 pages), literature review (33 pages), object and research methods (17 pages), research results (25 pages), discussions (29 pages), concluded (1 page), proposals (1 page).

The thesis consists of 06 tables, 01 charts, 04 charts, 35 pictures; 141 references. Appendices include illustrations and patient list.

CHAPTER 1: OVERVIEW

1.2. Characteristics of hemophilia A

1.2.1. Clinical features

Bleeding symptoms characteristic of the disease. Bleeding syndrome rarely occurs at the new-born, often appearing as toddlers, then children appear nodules or spots hematoma. In the light can hemorrhage, hemorrhage occurs when milk teeth fall out or tooth extraction. Severe hemophilia A is characterized by bruising and bleeding into joints frequent relapses, especially the knees, ankles, hips and elbows cause limited motion of the joints. If left untreated will lead to damaged joints.

1.2.2. Clinical laboratory

Prolonged clotting time may be more than 1 hour; poor quality of blood clots; Howel prolonged time. Quantification of factor VIII reduced or no. DNA tests to detect genetic mutations F8.

1.2.3. Diagnosis of the disease

Normal human FVIII concentration of 200 ng / ml. Where the disease, factor VIII activity decreased below 30%. Severe: less than 1% FVIII activity, usually several times bleeding per month. The average: 1-5% FVIII activity, just bleeding after minor injuries. The activated FVIII from 5 -30%, postoperative bleeding or severe injuries, after strong movements when playing sports.

1.2.4. Molecular pathology hemophilia A

a / Molecular pathology of severe hemophilia A

Many different models mutation responsible for severe hemophilia A, but the most common mutation is the intron 22 inversions and intron 1 of the F8 gene. Inversions on the same chromosome (chromosome): intron 22 inversions occur by recombination between copies of the int22h1 (including 9.5 kb repeat region) of intron 22 with one of two copies of the contract most located in the telomere region int22h2, int22h3; position in the first 400 kb 5 'outside the F8 gene. Inversion phenomenon leading to fracture F8 gene and the disease can cause severe consequences for the patient. This mutation accounts for 45-50% of patients with severe hemophilia A. Intron 1 inversion occurs similarly, due to recombination int1h1thuoc the intron 1 (900 bp in size) is located at position 140 kb 5 'end of the F8 gene copy int1h2 outside the F8 gene. Rare mutations than the intron 22 inversion, accounting for 1.5% of critically ill patients. Insertion and deletion mutations big stage: large deletion mutations account for 2-5% of patients with severe hemophilia A. It may take 1 or take the whole genome exon. Molecular mechanism of this mutation was found to be due to recombination process due to the Alu repeat. Insert large and mutated Alu fracture phenomena and F8 gene cause hemophilia A severe. Point mutants: the most severely ill patients is replaced by a nucleotide mutation. Nonsense mutations code generation or end nucleotide mutations

causing loss of frame translation difference not lead to protein synthesis or no synthesis function.

b/ Molecular pathology of mild and moderate hemophilia A

Point mutations causing translational bias frames and replacement nucleotide mutations (missense) is the main mechanism that causes hemophilia A mild and moderate, accounting for 90-95% of patients. Mutations in position and connect the gene promoter region was detected in some patients. The phenomenon repeats exon 13 has been described in patients with mild hemophilia A.

1.2.5. FVIII antibodies

The mechanism of antibody formation is controversial at present, some studies suggest that there is an association with the type of mutation, the severity of the disease, age of starting therapy, treatment preparations, elements portable transmission. The mechanism of antibody activity is associated with branches of clotting factors affecting the binding of these factors to other coagulation components. While many risk factors for anti-FVIII antibody has not been clearly defined, the important role of the F8 mutation increases the risk ratio has been announced. Mutations at positions between exon and intron, missense mutations are risk groups is relatively low, while approximately 21% of patients with intron 22 inversion mutations related to the development of antibodies to FVIII. The rate is the highest inhibitor group of large deletion mutations, loss of exons in the gene coding regions accounted for 88% F8.

1.3. The method detects the F8 gene mutation

1.3.1. The method detects mutations on the same chromosome inversions

- Detection of inversion intron 22 mutation: there are 3 main methods: Southern Blot, Long Distance PCR, Inversion- PCR.

- Detection of inversion intron 1 mutation: Multiplex PCR.

1.3.2. Methods to detect other mutations

- PCR method to detect exon deletions.

- Analysis of heterologous double strand (heteroduplex).

Two screening techniques commonly used mutation-based analysis method is simple double-strand high-performance liquid chromatography modified:

DHPLC: Denaturing high pressure liquid chromatography.

CSGE: Sensitive Gel electrophoresis conformation.

- League of DNA sequences.
- Methods based on RT-PCR.
- MLPA method.

Chapter 2: SUBJECTS AND METHODS

2.1. Research Subjects

- Control group: consists of 20 people (10 male, 10 female) healthy, with no family history of genetic disease sufferers.
- Group study 103 patients were diagnosed hemophilia A identified at Children's Hospital and the Central Institute of Haematology - Central Blood Transfusion.

2.2. Equipment, tools and chemical research

2.3. Methods and techniques of research: using research methodology, cross-sectional descriptive.

2.3.1. Sampling procedures

The patient was diagnosed with hemophilia A were taken 5 mL venous blood, entered in EDTA anticoagulant tubes at concentrations of 1.5 mg / mL. Blood collection procedures to ensure absolute sterility.

2.3.2. The process of extracting DNA from peripheral blood

2.3.3. Determine the F8 gene mutation

2.3.3.1. Detection inversion intron 22 mutation by technique Inversion-PCR

Technical Inversion- PCR (I-PCR) consists of three steps: (1) Cut the DNA with the enzyme BclI, (2) Connect with T4 ligate, (3) Amplification by Multiplex PCR reactions. I-PCR method has the advantage of being easy to carry out. Enzymes BclI very specific effects should cut the highly specific enzyme. PCR amplification products were easily in about 30 minutes time by short DNA fragment size (487

and 559 bp). Such tests are conducted genetic analyzes quickly, the results obtained with high reliability, easy to carry.

2.3.3.2. Detection inversion intron 1 mutation by Multiplex PCR technique

Multiplex PCR technique: two designs Multiplex PCR reaction could detect mutated patients. reaction 1 containing primers specific for int1h1 plus a sequence specific primers int1h2; reactions 2 containing primers specific for int1h2 plus a int1h1 specific primers. Based on the different sizes of the DNA fragments after electrophoresis to detect mutations. Where no intron 1 inversion mutation, only reaction 1 primer pairs int1h1 to 1908 bp in size. In reaction 2 only specific primers pairing int1h2 size 1191 bp. If mutation occurs, primer pairs with int1h2 int1h1 in response to both the size of 1323 bp and 1776 bp respectively in reaction 1 and reaction 2.

2.3.3.3. Exon deletions detected by PCR

2.3.3.4. Detection of point mutations by sequencing techniques

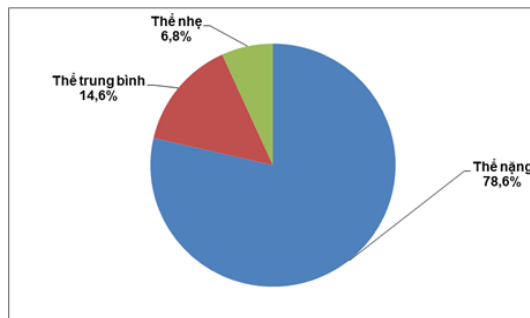
2.4. Ethical issues in research

The patients with hemophilia A families participating research groups in the spirit of volunteerism. The information about the patient and the patient's family is confidential.

Chapter 3: RESULT

3.1. General characteristics of the study subjects

The percentage of patients divided according to disease



Comment:

81/103 patients with clinically diagnosed severe occupancy rate of 78.6%; 15/103 patients the average occupancy rate to 14.6%; 7/103 patients with mild accounted for 6.8%.

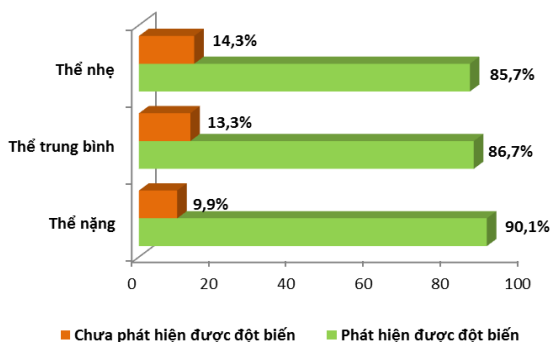
3.2. Results F8 gene mutation detection

3.2.1. The rate of mutation detection

3.2.1.1. The percentage of patients as a result of mutation detection

The study found the 92/103 case patients with F8 gene mutation that causes hemophilia A, accounting for 89.3% rate. Some patients have not detected 11/103 cases, accounting for 10.7% rate.

3.2.1.2. Mutation rates in groups according to disease detection and undetectable mutations



Distribution of mutation detection rate according to disease

Comment:

- 73/81 patients with severe mutations found accounted for 90.1%; 8/81 patients with severe undetectable mutations account for 9.9%.

- 13/15 average patients can detect mutations accounting for 86.7%; 2/15 average patient may not detect mutations accounted for 13.3%.

- 6/7 patients with mild to detect mutations accounting for 85.7%; Seventh patient may not detect mild mutations accounted for 14.3% rate.

3.2.2. Findings of the F8 gene mutation

3.2.2.1. Results inversion mutation identified

a / Define the intron 22 inversion mutation by Inversion techniques -PCR

81 patients with hemophilia A clinical diagnosis can be tested severely mutated intron 22 inversion Inversion-PCR method. Results 35/81 patients with inversion mutations accounted for 43.2% rate of severe patients.



M: Marker kích thước 100bp

ĐC: mẫu đối chứng (người bình thường)

HA33, HA38: Không có đảo đoạn intron 22

HA02, HA07, HA12, HA20, HA73 : Đột biến đảo đoạn intron 22

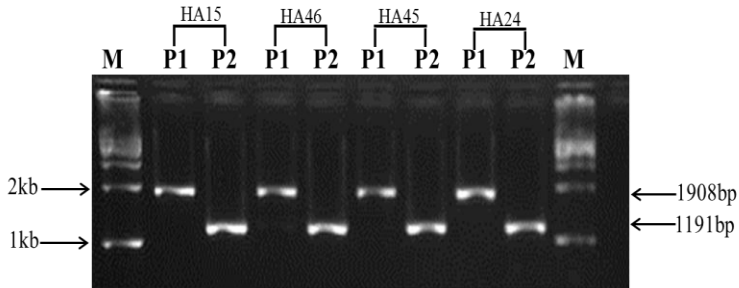
Image of PCR products identified intron 22 inversion mutation

Comment:

DNA in normal control samples (CG) when amplified by multiplex-PCR reaction with 1 band size 487 bp, respectively. If mutation occurs, the amplifier will give 1 559 bp segment size. Thus, in place of the corresponding wells with patient numbers HA33, HA38 no intron 22 inversions caused by the stripe size 487 bp DNA. In wells code HA02, HA07, HA12, HA20, HA73 is hemophilia A patients with intron 22 inversion mutation by DNA electrophoresis are outlined in size 559 bp.

b/ Determination of intron 1 inversion mutation by Multiplex PCR method

There are 35/81 patients with severe hemophilia A mutated intron 22 inversions, 46/81 patients with severe hemophilia A also continued to be screened intron 1 inversion mutation by Multiplex PCR technique. Results 46 patients not mutated intron 1 inversions.



M: Marker kích thước
 P1: Phản ứng 1 đặc hiệu cho int1h1
 P2: Phản ứng 2 đặc hiệu cho int1h2

Electrophoresis image of PCR products identified intron 1 inversions

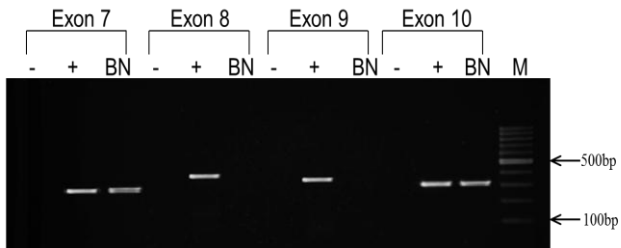
Comment:

The Multiplex PCR amplification reaction int1h1 period (P1) only for the 1908bp DNA fragment size proved primers 9F and 9cR int1h1 stage design paired together. The amplification reaction int1h2 period (P2) are the size of 1191bp primers proved only int1h int1h-2F-2R and specificity for paired together int1h2 period. Thus, there is no intron 1 mutation in patients with code HA15, HA46, HA45 and HA24.

3.2.2.2. Results exon deletions detected by polymerase chain reaction

This study 4 patients including exon deletions HA38, HA51, HA55, HA64.

- Deletions in exon 8 and exon 9 patients HA64:



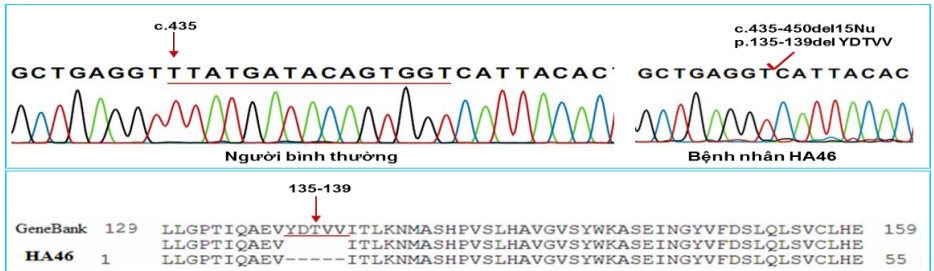
Results identify exon deletions in patients with HA64

Patients code HA64 after amplification primers entire 38 control samples with negative and positive controls in place to detect exon 8, exon 9 of the patients without DNA bar while all the remaining exons

back are outlined DNA corresponding to the positive control sample. This demonstrates that patients with exon 8 deletions and exon 9.

3.2.2.3. Results mutations detected by sequencing method

a/ Nucleotide deletion mutation

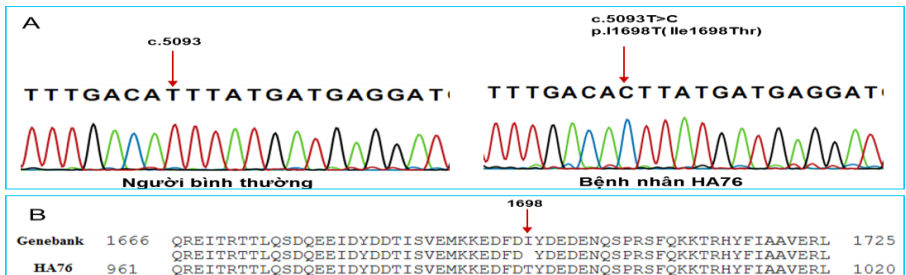


Picture mutation deletion 15 nucleotide in patient with HA46

Comment

Patients with severe HA46 code, found no inversions intron 22, intron 1 amplification primers are up 38 bar tension, clearly. Purification of DNA amplification reactions and sequencing, then compared with the normal sequence. Results found in exon 4 mutation at nucleotide position 15 c.435-450. When examining the amino acid change caused by the mutation, found in proteins from position 135 to 139 amino acid Tyrosine lost 5, asparagine, threonine, Valin, Valin (p.135-139delTyr-Val).

b/ Missense mutations:



The image mutations of the patient HA76

In patients with HA76, when checking in exon 14 mutation at nucleotide position c.5093 T was replaced by C nucleotide mutations causing amino acid Isoleucine replaced by threonine amino acids. Thus,

patients with mutations in exon 14 of the F8 gene c positions. 5093T> C (p.Ile927Thr).

c/ Add a nucleotide mutation



Image mutation add a nucleotide C of the patient HA03

Comment:

Picture sequencing showed that patients HA03 code adds a nucleotide mutation in exon 14 of the gene C F8. Check the changes identified in exon 14 is c.2777 insC, leading to the amino acid at position p.927 of the factor VIII protein from serine to lysine and cause translational frame deflection entire remaining amino acid (frameshift: fs) (p.Ser927Lys * fs).

d/ 1 nucleotide deletions

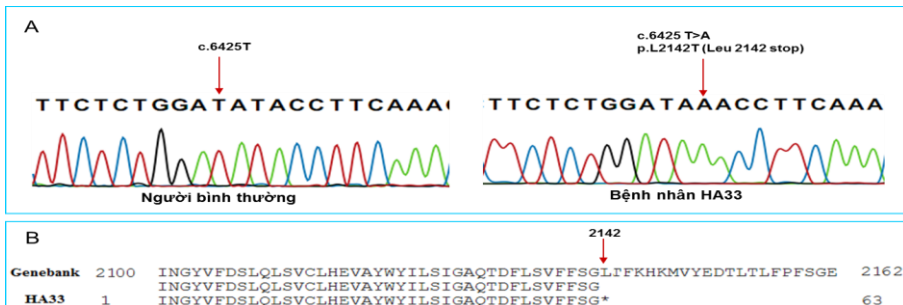


Image nucleotide deletions of patient HA39

Comment:

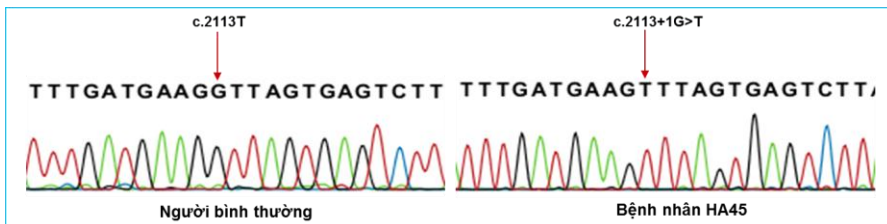
In patients with HA39, when sequenced all 26 exons found at position exon 14 mutations, loss of nucleotide G at position c.2185, nucleotide G deletions alter the amino acid Isoleucine and cause deviations Serin Services Framework then the amino acid code (p.Ser729Ile * fs).

e/ Nonsense mutations

**Image stop codon mutations stop codon of patient HA33***Comment:*

Patients HA33 code after test sequencing showed mutations: T nucleotide mutation by replacing nucleotide A at position 6425. Compared with Genebank sequences showed that this mutation alters acid leucine amino forming stop codon causing sudden stop transcription protein (p.Leu2142stop).

f/ splicing mutation

**Image splicing mutation exon /intron of patient HA45***Comment:*

With the vagaries near or at the top or bottom position is the position exon and intron between exons, we used the program to predict the position connector (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) to predict the changes in RNA and check mutation that has been announced yet. Because mutation of nucleotide change in exon positions end up not using the NCBI Blast software test amino acid changes in the protein. When Blast software CLC position connector

check that patients HA45 G nucleotide change of the first GT of the intron should be denoted c.2113 + 1.

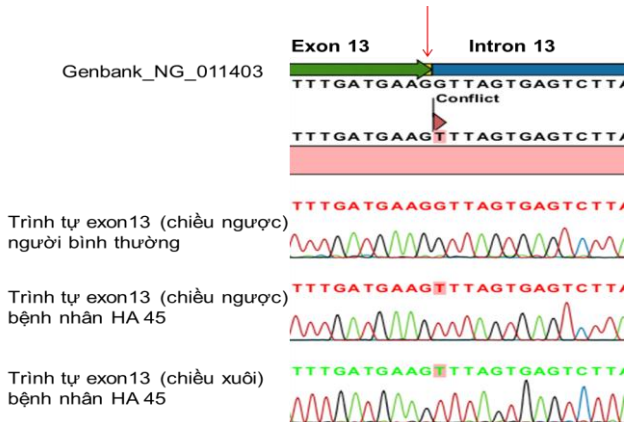
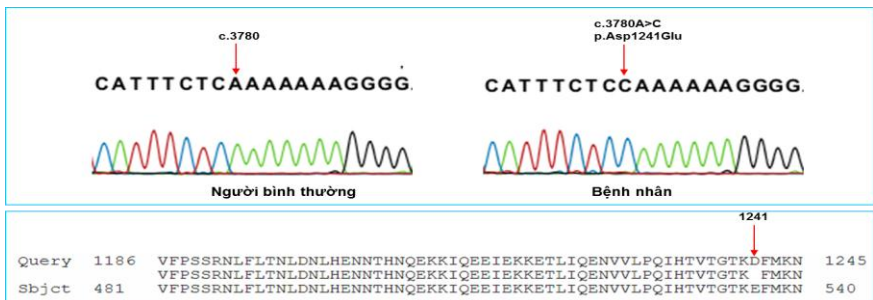


Image blast by CLC software checks mutation splicing of patient HA45
g/ Single single nucleotide polymorphisms (SNP)



Picture nucleotide mutation SNP of patient HA26

Comment:

During sequencing of exon 14 of the 26 patients with BP, HA53 compared with 011 403 NG_ Genebank sequence detection of nucleotide mutations alternative A to C at nucleotide position 3780. This mutation alters the amino acid Aspartic glutamic. However, when tested on hamsters and CDC (database of hemophilia A in the United States and the UK) it is not detected pathogenic mutations but a SNP (published code 1800292).

e/ Mutation unpublsh



Image mutation unpublsh of patient HA96

Comment:

Patient HA96 are tested mutations in exon 8 showed an additional G nucleotide at position c.1268 amino acid changes the amino acid Glycine by Aspartic then generates a stop codon at amino acid position next. When tested on a database not see Hamster and CDC announced this mutation. Using DNASTAR software(<http://www.dnastar.com/t-products-dnastar-lasergene-structural-biology.aspx>) to test the 3D image structure prediction of the protein structural changes F8.

Picture HA96 mutations in patients using DNASTAR software

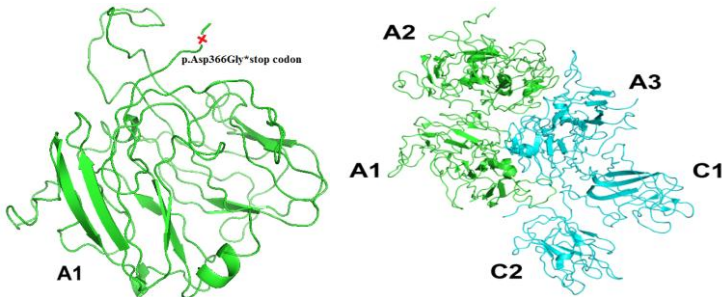


Image 3D structure protein F8 gene of patients HA96

(Position the mutant red arrow)

Comment:

Full structure of proteins F8 order includes domains A1-A2-A3-C1-C2 in which three domains A function associated Ca^{2+} , 2 domain C will associate with phospholipid and factor vWF, domain B has no official energy resolution will be.

Stop codon mutation in exon 8 generated at positions p.Asp366Gly abrupt halt transcription FVIII protein. This protein is only part of the domain A1 structure, complete loss of the domain A2, A3, C1, C2 leading to manifestation of hemophilia A patients clinically.

3.2. Mapping of F8 gene mutations causing hemophilia A in Vietnam

3.2.1. Results F8 gene mutations in patients with hemophilia A Vietnam

a/ Mutation inversion intron 22

There are 35 patients with severe hemophilia A mutated intron 22 inversions.

b/ Position mutations in exons and splicing

The result of mutations in the F8 gene cause hemophilia A

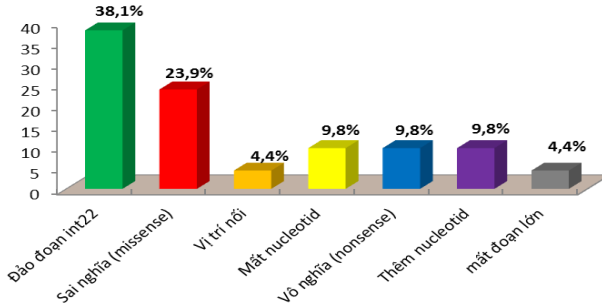
	Code	Thể bệnh	Exon	Domain	Change Nucleotid	Change acid amin	Publish paper
	HA16	Servere	1	A1/ heavy chain	c.65G>T	p.Arg22Ile	HAMSTeR
2.	HA18	Servere	1	A1/ heavy chain	c.143G>A	p.Arg48Lys	Becker J 1996
3.	HA67	Average	2	A1/ heavy chain	c.223G>T	p.Asp75Tyr	Goodeve AC 2000
4.	HA21	Servere	3	A1/ heavy chain	c.301G>C	p.Asn101His	Leuer M 2001
5.	HA10	Milde	3	A1/ heavy chain	c.386A>T	p.Glu129Val	Maugard (1998)
6.	HA15	Servere	4	A1/ heavy chain	c.446C>T	p.Pro149Leu	Margagline (2008)
7.	HA46	Servere	4	A1/ heavy chain	c.435-50 del 15nucleotid	p.135-139Tyr-Val	Vinciguerra C (2006)
8.	HA61	Average	8	A1/ heavy chain	c.1063G>A	p.Arg336Cys	Arai (1989)
9.	HA96	Servere	8	A1/ heavy chain	c.1268insG	p.Asp366Gly*Stop	Chưa công bố
10.	HA64	Servere	8,9	A1,A2	Del exon		HAMSTeR
11.	HA47	Average	12	A2/ heavy chain	c.1801A>C	p.Asn601His	Miller CH (2011)
12.	HA09	Milde	12	A2/ heavy chain	c.1832-34delCT	p.Gln611del*fs	Miller CH (2011)
13.	HA56	Average	13	A2/ heavy chain	c.1963T>C	p.Tyr655His	Ahmed R (2005)
14.	HA45	Servere	IVS13	A2/ heavy chain	c.2113+1G>T	Splicing	Ravanbod S (2011)
15.	HA51	Servere	14	heavy chain	Del exon		HAMSTeR
16.	HA39	Average	14	A2/ heavy chain	c.2185delG	p.Ser729Ile*fs	Hua B (2010)
17.	HA11	Servere	14	B/ heavy chain	c.2777-78insC	p.Ser927Lys*fs	HAMSTeR, Margagline (2008)
18.	HA03	Servere	14	B/ heavy chain	c.2777-78insC	p.Ser927Lys*fs	HAMSTeR, Margagline (2008)
19.	HA01	Average	14	B/ heavy chain	c.3388delA	p.Arg1130Gly*fs	Ma GC (2008)
20.	HA57	Servere	14	B/ heavy chain	c.3169G>A	p.Glu1057Lys	Ogata K (2011)
21.	HA54	Servere	14	B/ heavy chain	c.3263C>T	p.Thr1088Ile	Miller CH (2011)
22.	HA24	Servere	14	B/ heavy chain	c.3637insA	p.Ile1213Asn*fs	HAMSTeR, Pieneman Wc (1995)
23.	HA31	Servere	14	B/ heavy chain	c.3637insA	p.Ile1213Asn*fs	HAMSTeR, Pieneman Wc (1995)
24.	HA100	Servere	14	B/ heavy chain	c.3637insA	p.Ile1213Asn*fs	HAMSTeR, Pieneman Wc (1995)
25.	HA92	Average	14	B/ heavy chain	c.3870insA	p.Gly1272Arg*fs	Frusconi (2002)
26.	HA65	Servere	14	B/ heavy chain	c.4114A>G	p.Thr1372Ala	Margagline (2008)
27.	HA23	Servere	14	B/ heavy chain	c.4156C>T	p.Gln1386Stop	Margagline (2008)
28.	HA59	Servere	14	B/ heavy chain	c.4232delA	p.Lys1411Arg*fs	Gouw C (2011)
29.	HA62	Servere	14	B/ heavy chain	c.4288-92del	p.Asp1430Leu*fs	David D (2006)
30.	HA06	Servere	14	B/ chuỗi nặng	c.4379insA	p.Asn1460Lys*fs	Higuch (1991)
31.	HA93	Servere	14	B/ heavy chain	c.4409-18del	p.Glu1470Val*fs	HAMSTeR.

							Hiu M (2005)
32.	HA04	Severe	14	B/ heavy chain	c.4550insA	p.Asn1555Lys*fs	Higuchi (1991)
33.	HA76	Milde	14	B/ heavy chain	c.5093 T>C	p.Ile1698Thr	Liu M (1998)
34.	HA91	Severe	14	B/ heavy chain	c.5144-46delCTC	p.Phe1672del	David D (2006)
35.	HA41	Severe	14	A3/ light chain	c.5177 G>A	p.Trp1726Stop	HAMSTeR
36.	HA102	Average	IVS14		c.5220-1G>C	Splicing	Elmadmoudi H (2012)
37.	HA55	Severe	16	A3/ light chain	Del exon		HAMSTeR
38.	HA19	Milde	16	A3/ light chain	c.5543A>T	p.Glu1848Val	Green PM (2008)
39.	HA37	Severe	17	A3/ light chain	c.5665C>T	p.Gln1889Stop	Liu ML (2002)
40.	HA95	Severe	17	A3/ light chain	c.5691-2insC	p.Phe1898Leu*fs	Ravanbod S (2011)
41.	HA29	Milde	17	A3/ light chain	c.5738A>G	p.Asn1913Ser	HAMSTeR
42.	HA98	Severe	18	A3/ light chain	c.5953C>T	p.Arg1985Stop	Tud GD (1991) Dia C (1992)
43.	HA49	Severe	IVS18		c.5998+1G>A	Splicing	HAMSTeR, Freson K (1998)
44.	HA34	Severe	19	A3/ light chain	c.6016G>T	p.Gln2006Stop	Schwaab R (1993)
45.	HA68	Severe	IVS20		c.6188-1G>T	Splicing	Margagline (2008)
46.	HA36	Milde	22	C1/ light chain	c.6403C>G	p.Arg2135Gly	Miller CH (2011)
47.	HA53	Severe	22	C1/ light chain	c.6374G>C	p.Ser2125Thr	Margagline (2008)
48.	HA33	Severe	22	C1/ light chain	c.6425T>A	p.Leu2142Stop	HAMSTeR
49.	HA26	Severe	23	C1/ light chain	c.6497C>T	p.Arg2166Leu	David D (2006)
50.	HA38	Severe	23	C1/ light chain	Del exon 23		HAMSTeR
51.	HA94	Average	23	C1/ light chain	c.6537C>G	p.Ser2179Arg	Ahmed R (2005)
52.	HA63	Average	23	C1/ light chain	c.6544C>T	p.Arg2182Cys	Rainer AP (1992)
53.	HA90	Average	23	C1/ light chain	c.6545G>A	p.Arg2182His	Tuddenham (1994)
54.	HA30	Severe	24	C2/ light chain	c.6666G>A	p.Trp2222Stop	Miller CH (2011)
55.	HA99	Average	24	C2/ light chain	c.6694C>T	p.Gln2232Stop	Ahmed R (2005)
56.	HA85	Average	25	C2/ light chain	c.6825delT	p.Tyr2275*fs	Green PM (2008)
57.	HA28	Severe	26	C2/ light chain	c.7015A>T	p.Arg2339Trp	Green PM (2008)

Comment:

- The mutations are scattered throughout the genome F8.
- Mutations concentrated in exon 14.
- Each patient has a disease-causing mutations.

3.2.2. The proportion of different mutations in hemophilia A patients in Vietnam

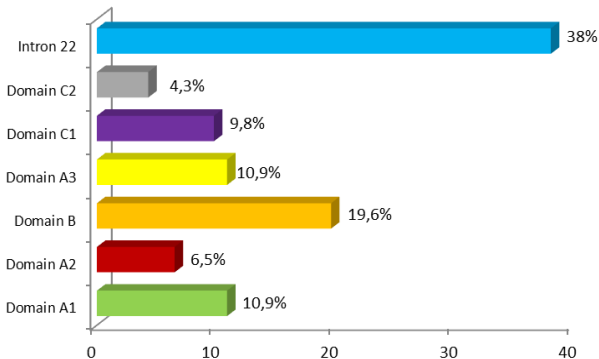


The mutations found in patients with hemophilia A

Comment:

In 92 patients with detectable mutations: mutations inversions highest percentage of 38.1% (35/92 patients). Followed by missense mutations accounted for 23.9% ratio (22/92 patients). The third highest proportion is the loss of nucleotide mutations, nonsense mutations, more mutations to nucleotide ratio of 9.8% (9/92 patients). Lowest rate mutation in exon-intron positions and connection deletion mutant large proportion of 4.4% (4/92 patients).

3.2.2. The rate of mutations in the F8 gene region



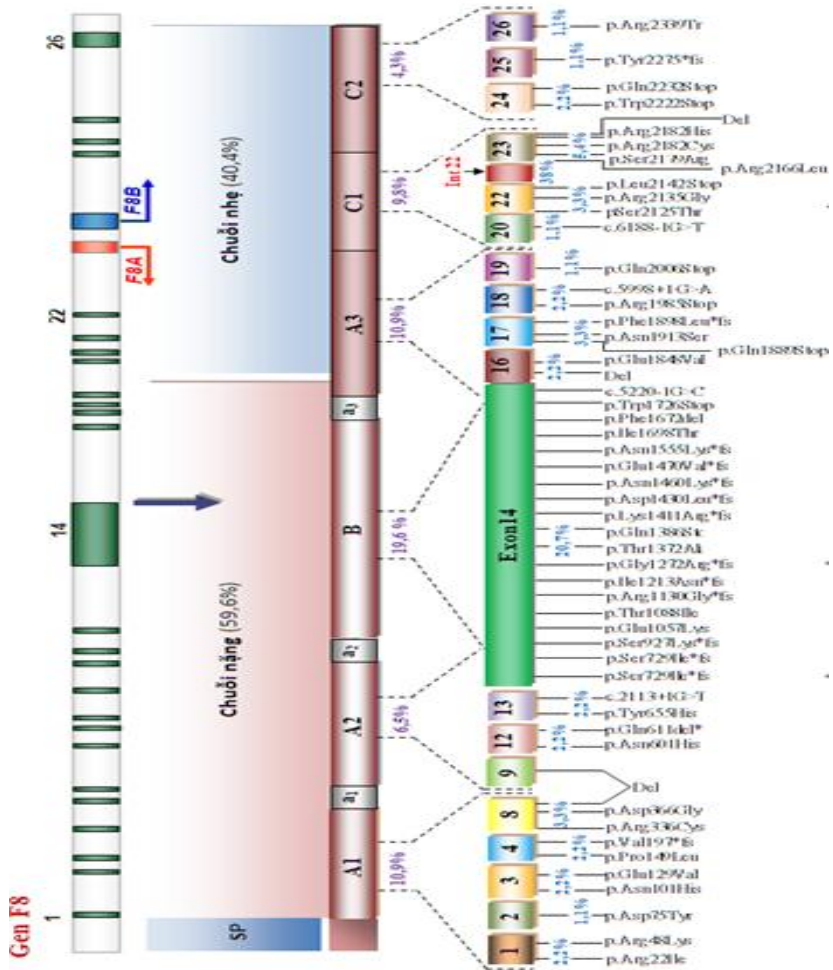
Distribution of the mutation rate in the region of the F8 gene

Comment:

On the F8 gene: intron 22 inversion mutation accounted for the highest percentage (38%); B occupies the mutation rate of 19.6%; A1 and A3 mutations accounted for 10.9% rate; C1 region mutations

accounted for 9.8% rate; A2 domain mutations account for 6.5%; mutations in the C2 lowest percentage (4.3%).

3.2.3. Map F8 gene mutation that causes hemophilia A in Vietnam



Chapter 4: DISCUSSION

Hemophilia A is a genetic disorder caused by deficiency or abnormal function of plasma clotting factors - factor VIII. Since 1984,

research has shown Gitschier full understanding of the molecular structure F8 gene factor VIII protein synthesis, paving the way for studies on the molecular mechanism of the disease and hemophilia A mutation F8 gene cause disease.

4.1. General characteristics of the study subjects

4.2. F8 gene mutations detected in patients with hemophilia A in Vietnam

- The rate of detection F8 gene mutations in patients with hemophilia A

In this study, identified mutations in the F8 gene was performed on 103 patients who had been diagnosed with hemophilia A do not have blood ties showed mutation detection rate is 89.3%, with 11 cases not detect mutations accounted for 10.7% rate. The rate of undetectable mutations is higher than our published authors is 2-7%. The reason why we can not perform a combination of different methods for the diagnosis of mutations in the intron, unidentified DNA duplication mutations by MLPA method ... However, compared to the authors only used sequencing methods to diagnose the disease detection rate also our perfect fit. The number of patients with mutations detected in this study may in each respective disease: severe 90.1%, 86.7% to the average 85.7% and mild. The rate of mutations identified in each patient can be authors performed Santacroce et al 1296 hemophilia A patients performed in Italy is 874 (89%), 146 (84%), 133 (94%) respectively patients with severe, moderate and mild. According to Bogdanova authors also used sequencing methods detect mutations result in mutations identified in each can is 100% severe, 96% moderate and 88% may be mild.

- The disease causing mutation hemophilia A in Vietnam

In this study, we conducted identified intron 22 inversion by Inversion-PCR method. There are 35 patients with severe hemophilia A was diagnosed with intron 22 inversion mutation in a total of 81 patients with severe hemophilia A proportion screened was 43.7%. This percentage is similar to the rate of intron 22 inversion mutation is the published author is 42-50% in patients with severe hemophilia A, in Taiwan, this ratio was 45.1%; 42.5 to 44.25% of India's population and 40-50% in Europe.

In our study, 46 patients with hemophilia A do not mutated intron 22 inversions of 81 patients with severe hemophilia A can be checked at the intron 1 inversion mutation by Multiplex PCR method showed no circumstances mutated intron 1 inversions we think this is a negative result may be due to our sample is not large enough to detect this mutation. In Andrikovics research also showed that the absence of intron 1 inversions when studying 104 cases of hemophilia A in Hungary. In addition, a recent study showed that the overall rate of intron 1 inversions is less than 1%. In particular, this ratio is different between the races. Studies in patients with hemophilia A in India see the intron 1 mutation rate was 2.7%, similar to studies in South Africa. The mutations identified only in black patients without finding intron 1 inversion mutation in Caucasian patients. However, intron 1 inversion mutation is an important screening, although the rate determined in white populations low.

After you obtain good quality DNA, researchers have used PCR with specific primers for 38 exon 26 of the F8 gene. With the large size of exon 14 and exon primers need 9 to 5 26 sequencing primers for all exons of this. In this study, 4 patients with exon deletions were detected by PCR amplification method alone: HA38, HA51, HA55, HA64; in which patients lost 2 HA64 mutant consecutive exons.

In this study, we detected the loss of one nucleotide mutations as patients HA01, HA39 and HA46 loss of 15 nucleotides, more mutated nucleotide A, C nucleotides found in patients HA11, HA24 ... Mutations false means that the most common and diverse in hemophilia A patients with mild and moderate: HA76, HA90, HA29 ...

To identify mutations in position between intron and exon sequences requires 3'- nucleotides at the 5 'exon-intron regions as well as the sequence of point mutations are susceptible to 18-40 bp from the 3' . Most mutations are causative connection locations, of which 10% to 15% disease-causing mutation is the point mutation at position connector. To confirm the location of the mutation in intron and exon boundaries between mutation position should connect using RT-PCR on mRNA sequencing. However, in our study, mutations at positions 4 connectors on the number of patients HA45, HA49, HA68, HA102 have been published and should be fully affirmed without checking.

In Vietnam, there was no public announcement of the mutations in the F8 gene cause hemophilia A. In this study, patients HA96 to identify suspicious locations of mutations alter the position c.1268 Aspartic amino acid amino acid Glycine, when examining mutations have been published around the world have not seen published positions of mutations. Using DNASTAR software (<http://www.dnastar.com/t-products-dnastar-lasergene-structural-biology.aspx>) to examine the structural changes FVIII protein showed normal FVIII will link with vWF factor, when it will be operational factors detached from vWF and quickly degraded in the blood. Compared with the full structure of the FVIII protein mutations only A1. Meanwhile FVIII full structure consists of three zones A, 1 B and 2 region C. Because the stop codon occurs in exon 8 so soon should not create 3 A2, C1, C2 to factors associated with vWF . Therefore, this patient's FVIII unstable and quickly decomposes whether this protein is synthesized. Combined with FVIII levels of patients with <1% with the clinical manifestations of severe hemophilia A, the result of this mutation is very suitable.

- Assess the risk of inhibitor formation

Some studies suggest that there is an association with the type of mutation, the severity of the disease, age of starting therapy, treatment preparations, genetic factors. While many risk factors for anti-FVIII antibody has not been clearly defined, the important role of the F8 mutation increases the risk ratio has been much published author. Need suspected inhibitor in the blood when clinically unresponsive to conventional treatment. The test determines the presence of inhibitors is mixtest. Measured concentrations of test inhibitor in Bethesda. The principle of this technique for patients with FVIII in plasma, if the FVIII antibodies will neutralize and agglutination. Our study of patients experiencing severe quarter with a large deletion mutations, accounting for 25%. This is a high-risk group developed inhibitors in the treatment process. Especially in the case of patients HA64, suddenly disappeared two exons 8 and 9 are the two areas A1, A2 vary so very high risk of inhibitor development. Therefore, patients should periodically check clotting factors or 6-12 months before surgery. Intron 22 inversion mutation are at risk of emergence of factor VIII inhibitors with a high proportion (21%) compared with other mutations. This is the most common mutation in patients with severe hemophilia A, F8 gene was cut into 2 segments (exons 1-22 and exons 23-26) separated 400KB

cause complete inactivation of the gene encoding factor VIII by thus causing a serious lack of factor VIII in the circulation cycle. Therefore, all included in the factor VIII treatment are new to the body and thus the risk of stimulating the immune system produced antibodies to factor VIII compared with other mutations. With 35 patients detected intron 22 inversion mutation in this study as well as patients should be monitored during treatment to early detection status inhibitors appear to have appropriate treatment regime . Mutation positions are connecting at-risk mutations do occur inhibitor (3%). This can be explained by a very small amount of factor VIII protein molecules sufficient to induce an immune response. In this study, patients with missense mutations mainly in mild and moderate, 4 cases of mutations in the connection location is detected, these patients have a risk of factor VIII inhibitors low.

4.3. Mapping of F8 gene mutations in patients with hemophilia A in Vietnam

- Position mutations causing hemophilia A

Scattered over the whole of the A1, A2, B, A3, C1, C2.

- The frequency and occurs in a number of mutations

The most common intron 22 inversion mutation: 35/103 patients accounted for 38.1% rate. In addition, two mutations occur more than 2 times in different patients: patients HA03, HA11 mutations were detected in the same position p.Ser927Lys * fs; mutation at position c.3637insA p.Ile1213Asn * fs mutations cause is detected on 3 different patients (HA24, HA31, HA100). In particular, mutations at positions c.3637insA common mutations have been published by numerous previous reports in hamsters with frequency data is 14% -16% in white patients. Our study, this mutation observed in 3/92 patients with mutations detected but accounted for only 3.2%. This difference can be explained by racial factors.

- The rate of detection of mutations in each exon

The rate of detection of mutations in exon 14 in this study is the highest proportion of 20.7%. Mutations in exon 14 and exon remains higher due to much larger sizes, with dimensions of about 3.1 Kb (from 3106 to 7227pb) itself accounts for about 43% exon 14 encoding the FVIII protein. This percentage is consistent with the research reported in Taiwan mutation in exon 14 is 21.9%, of the Italian study this ratio is

33%. This was demonstrated in the B mutation is important to the function of FVIII activity, although not involved in the complete protein structure F8. According to some studies, with a high rate of mutation in exon 14 common should immediately recommendation after determining no intron 22 inversion mutation and intron 1, the sequencing of exons 14 to screen to find the position ability to cause mutations. But according to author David mutation rate c.3637insA position in exon 14 accounts for the high rate of sequencing early, before finding the mutations in the other exons.

In this study, the remaining exon mutation rates are equal. No detectable mutations in the exons 5, 6, 7,10,11,15, 21 may be due to the limited number of patients should not find the location of this mutation on exon.

Our study confirms the correlation of the mutation rate in patients with hemophilia A. The mutations were found consistent with the rate reported results published by the authors Repesse (French), Jochen Graw (Germany), Adoracion Vencela (Spain), Rosetti (Argentina).

	France	German	Portugal	Argentina	In study
	120	845	267	260	103
Inv22	46,0	35,7	43	44	38,1
Missence	15,0	38,2	34	12,2	23,9
Splicing	7,0	2,6	2,6	3,7	4,4
Nonsense	13,0	9,3	3,7	10,2	9,8
Add nucleotid	7,0	2,6	2,0	1,9	9,8
Delete nucleotid	10,0	7,5	7,8	15,9	9,8
Delete exons	2,0	3,0	1,0	10,2	4,4

-About Rate of mutations in each patient can

In our study the most common in patients with severe hemophilia A is inverted intron 22 (38.1%). Missence met mutations in hemophilia A patients can average 46.7% and 71.4% mild. This result is consistent with the study's authors Margaglione, Becker also confirmed missense mutation rate most often in hemophilia A may be moderate and mild.

CONCLUSION

Research findings on the F8 gene mutations in 103 patients using a combination of 4 different methods, we draw the following conclusions:

1. Detection of F8 gene mutations in patients with hemophilia A Vietnam

- The rate of mutation detection was 89.3% (92/103 patients), in which the mutation detection rate in severe 90.1% (73/81 patients), to average at 86, 7% (13/15 patients) and mild in 85.7% (6/7 patients).

- The types of mutations were detected including intron 22 inversion was 38.1% (35/92 patients), missense mutations is 23.9% (22/92 patients), nucleotide deletions are 9.8% (9/92 patients), nonsense mutations was 9.8% (9/92 patients), additional nucleotide mutations was 9.8% (9/92 patients), mutation location exon-intron connection was 4.4% (4/92 patients), large deletion mutations was 4.4% (4/92 patients).

- Detection of new mutations unpublished: p.Asp366Gly * stopcodon.

2. Building the F8 gene mutation maps to the 92 patients with hemophilia A in Vietnam.

- Percentage detect intron 22 inversion mutation in this study was highest proportion of 38.1%.

- The rate of detection of mutations in exon 14 of the study or having 20.7% proportion.

- The exons 1, 2, 3, 4, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, met with a slower rate of 1.1% - 5.4%.

- No detection of mutations in exon 1 and intron 5, 6, 7,10,11,15, and 21.

RECOMMENDATIONS

1. Set up and manage a database of mutations in the F8 gene Vietnam.
2. Set up and manage a database of patients who carry the gene and hemophilia A.
3. Genetic counseling before marriage and prenatal diagnosis for these gene carriers before - during pregnancy.
- 4.