

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh tạo xương bất toàn (osteogenesis imperfecta) còn gọi là bệnh xương thủy tinh hay bệnh giòn xương với tần suất mắc bệnh $1/15.000 \div 1/25.000$. Nguyên nhân của bệnh là do đột biến gen tổng hợp collagen tít I dẫn đến thiếu hụt hoặc bất thường cấu trúc của phân tử collagen tít I gây nên giòn xương, giảm khối lượng xương và bất thường các mô liên kết. Collagen tít I là một loại protein chiếm ưu thế trong chất nền ở khoảng gian bào của hầu hết các mô, được tìm thấy ở xương, màng bọc các cơ quan, giác mạc, củng mạc mắt, gân và dây chằng, mạch máu, da, màng não, là thành phần chính của ngà răng và chiếm 30% trọng lượng cơ thể. Vì vậy, khi bị khiếm khuyết chất cơ bản ngoại bào, bệnh không chỉ biểu hiện bất thường ở xương mà còn bất thường ở các tổ chức khác như củng mạc mắt màu xanh, tạo răng bất toàn, giảm thính lực... Bệnh tạo xương bất toàn gây đau đớn, tàn phế suốt đời cho trẻ cả về mặt thể chất lẫn tâm thần với thể bệnh nhẹ. Còn với thể bệnh nặng thì gây tử vong. Bệnh là gánh nặng cho cả gia đình và xã hội. Cho đến nay, vẫn chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu đối với bệnh tạo xương bất toàn. Chủ yếu là điều trị triệu chứng, giảm đau, giảm gãy xương tái phát với mục đích giảm đến mức tối đa tỷ lệ tàn tật và suy giảm các chức năng, giúp cải thiện chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân. Với quá phân tích gen là tiền đề quan trọng giúp chẩn đoán trước sinh đối với các đối tượng có nguy cơ cao sinh con bị bệnh tạo xương bất toàn để đưa ra những tư vấn di truyền giúp ngăn ngừa và làm giảm tỉ lệ mắc bệnh. Các nghiên cứu bệnh tạo xương bất toàn ở Việt Nam vẫn còn rất ít, chủ yếu nghiên cứu về mặt lâm sàng.

2. Mục tiêu của đề tài:

1. Xác định đột biến gen COL1A1, COL1A2 trên bệnh nhân mắc bệnh tạo xương bất toàn.

2. Xác định đột biến gen COL1A1, COL1A2 ở bố mẹ bệnh nhân đã phát hiện đột biến gen COL1A1 hoặc COL1A2.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

Bệnh tạo xương bất toàn (osteogenesis imperfecta) là một bệnh di truyền nguyên nhân do đột biến gen tổng hợp collagen gây bất thường cấu trúc của phân tử collagen hoặc thiếu hụt phân tử collagen làm giòn xương, giảm khối lượng xương đưa đến gãy xương. Tổn thương mô liên kết làm cho trẻ tử vong hoặc bị tàn phế. Đây là một nhóm bệnh nan y đối với y học. Mặc dù đã có một số phương pháp điều trị phần nào hạn chế sự tiến triển của bệnh, giảm đau đớn cho bệnh nhân. Những tiến bộ vượt bậc của y sinh học, sinh hóa học, di truyền phân tử đã giúp cho nghiên cứu sâu về nguyên nhân gây bệnh để tìm ra biện pháp điều trị và phòng bệnh có hiệu quả. Đề tài đã sử dụng phương pháp di truyền phân tử hiện đại PCR, giải trình tự gen để tìm đột biến trên gen COL1A1, COL1A2 gây bệnh tạo xương bất toàn cho bệnh nhân Việt Nam. Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu đột biến gen gây bệnh tạo xương bất toàn tại Việt Nam. Đề tài nghiên cứu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Kết quả nghiên cứu đóng góp cho lâm sàng trong chẩn đoán, điều trị, phòng bệnh và tư vấn di truyền cho bệnh nhân và gia đình bệnh nhân.

4. Cấu trúc luận án:

Luận án được trình bày trong 108 trang chính (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án được chia làm 7 phần:

- + Đặt vấn đề: 2 trang
- + Chương 1: tổng quan tài liệu 32 trang
- + Chương 2: đối tượng và phương pháp nghiên cứu 15 trang
- + Chương 3: kết quả nghiên cứu 30 trang

+ Chương 4: bàn luận 28 trang

+ Kết luận: 1 trang

Luận án gồm: 3 biểu đồ, 9 bảng và 43 hình, sử dụng 110 tài liệu tham khảo gồm 11 tài liệu tiếng Việt và 99 tài liệu tiếng Anh.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Bệnh tạo xương bất toàn

Cho đến nay, các công trình nghiên cứu về bệnh tạo xương bất toàn đã được thực hiện ở nhiều quốc gia trên thế giới. Cơ chế phân tử, đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng đã dần sáng tỏ. Các phương pháp điều trị, chăm sóc nhằm hạn chế sự tiến triển bệnh và nâng cao chất lượng cuộc sống của người bệnh cũng đã được hướng dẫn và phổ biến một cách rộng rãi.

1.1.3. Lâm sàng và phân loại bệnh tạo xương bất toàn

Biểu hiện lâm sàng phụ thuộc vào từng tít của bệnh tạo xương bất toàn. Tùy theo từng người, bệnh tạo xương bất toàn có thể biểu hiện nhẹ hoặc nghiêm trọng. Xương bị giòn, dễ gãy là đặc điểm của những người mắc bệnh tạo xương bất toàn. Một số biểu hiện của người mắc bệnh tạo xương bất toàn là xương được tạo ra bất thường, người thấp, bé. Khớp lỏng lẻo. Củng mạc mắt có màu xanh da trời, hoặc màu xám. Khuôn mặt có hình tam giác. Lồng ngực hình thùng. Cong vẹo cột sống. Răng bị giòn, dễ gãy (tạo răng bất toàn). Giảm thính lực. Bất thường kết cấu của da (da nhăn mịn và mỏng). Những dấu hiệu đặc trưng khác có thể phổ biến ở nhiều tít bệnh là chảy máu các tạng (dễ gây nên những vết thâm tím) và suy hô hấp. Sillence và cộng sự (1979) đã chia bệnh tạo xương bất toàn thành bốn tít.

1.1.4. Cận lâm sàng

Xét nghiệm có giá trị trong chẩn đoán bệnh tạo xương bất toàn là chụp X-quang đơn thuần. Hầu hết các đặc trưng về chẩn đoán hình ảnh của bệnh được biểu hiện trên phim X-quang.

1.1.4.1. X-quang thông thường của bệnh tạo xương bất toàn

1.1.4.2. Tỷ trọng xương/mật độ xương

1.1.4.3. Sinh thiết xương

1.1.4.4. Xét nghiệm di truyền phân tử

- Nuôi cấy nguyên bào sợi từ da bệnh nhân để phân tích xác định cấu trúc và chất lượng của collagen týp I (độ nhạy 87% đối với thể trung bình và nhẹ; 98% đối với thể nặng).

- Phân tích trình tự gen COL1A1 và COL1A2 để phát hiện đột biến gen.

1.1.6. Di truyền học bệnh tạo xương bất toàn

Tạo xương bất toàn là một bệnh di truyền trội hoặc lặn trên nhiễm sắc thể thường. Khoảng trên 90% trường hợp bệnh là di truyền trội, do đột biến gen COL1A1 và COL1A2. Bệnh gặp ở nam và ở nữ với nguy cơ mắc như nhau. Khi người bố hoặc người mẹ bị bệnh, nguy cơ con bị bệnh là 50% và không bị bệnh là 50%. Trong trường hợp bệnh tạo xương bất toàn di truyền theo quy luật alen trội thì trẻ chỉ cần nhận một alen của người mẹ hoặc người bố đã biểu hiện bệnh.

1.1.7. Chẩn đoán

Chẩn đoán bệnh tạo xương bất toàn dựa vào các biểu hiện lâm sàng, triệu chứng X-quang, tiền sử gãy xương và tiền sử gia đình. Chẩn đoán bệnh không phức tạp ở những cá nhân có tiền sử gia đình hoặc biểu hiện bệnh nặng, nhưng có thể khó khăn ở những người không có tiền sử gia đình và khi gãy xương không kết hợp với các bất thường ngoài xương. Hoặc nếu chỉ dựa vào các dấu hiệu lâm sàng thì nguy cơ nhầm lẫn với các bệnh lý khác về xương tương đối cao. Bởi vậy, các phương pháp nghiên cứu di truyền và xác định đột biến gen góp phần chẩn đoán xác định và tiên lượng bệnh tạo xương bất toàn.

1.1.8. Điều trị bệnh tạo xương bất toàn

Cho đến nay, vẫn chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu đối với bệnh tạo xương bất toàn. Hầu hết các biện pháp đều tập trung vào điều trị hỗ trợ nhằm mục đích giảm đau, giảm gãy xương tái phát, từ đó giảm đến mức tối đa tỷ lệ tàn tật và sự suy giảm các chức năng khác, giúp

cải thiện chất lượng sống cho bệnh nhân. Lý do là chưa có thể thay thế lại được cấu trúc của chất collagen trong cơ thể cũng như hiện nay chưa có phương thức nào kích thích cho cơ thể tăng tổng hợp số lượng collagen.

1.2. Cơ chế phân tử bệnh tạo xương bất toàn

1.2.2.1. Vị trí của gen COL1A1, COL1A2

Gen COL1A1 nằm trên cánh dài NST 17 ở vị trí 21.33 (17q21.33).

Gen COL1A2 nằm trên cánh dài NST 7 ở vị trí 22.1 (7q22.1).

1.2.2.2. Cấu trúc và chức năng của gen COL1A1, COL1A2

Gen COL1A1 gồm 51 exon với chiều dài 18 kb, mã hóa 5 kb cho chuỗi pro- α 1 (procollagen tít I alpha 1) tham gia cấu trúc phân tử collagen tít I. Các exon từ 6 tới 49 mã hóa chuỗi xoắn kép alpha. Hầu hết các exon này có chiều dài khoảng 45 bp, 54 bp hoặc bội số của 45 hoặc 54 bp. Gen COL1A1 mã hóa chuỗi pro- α 1 gồm 1464 acid amin. Cấu trúc gen chia thành 3 vùng chính: vùng promoter, vùng chứa exon và intron, đuôi poly A. Để tổng hợp chuỗi procollagen, đầu tiên gen COL1A1 sẽ thực hiện phiên mã tổng hợp phân tử mRNA tiền thân. Phân tử mRNA này trải qua quá trình cắt các intron và nối các exon với nhau để tạo ra phân tử mRNA hoàn thiện. Phân tử mRNA hoàn thiện được sử dụng làm khuôn dịch mã tổng hợp chuỗi pro- α 1.

Gen COL1A2 gồm 52 exon với chiều dài 38kb, mã hóa 5kb cho chuỗi pro- α 2 (procollagen tít I alpha 2) tham gia cấu trúc phân tử collagen tít I.

1.2.2.3. Các đột biến gen COL1A1 và COL1A2

Các đột biến trên gen COL1A1 gây bệnh tạo xương bất toàn gồm đột biến thay thế nucleotid, đột biến mất nucleotid, đột biến thêm nucleotid, đột biến tại vị trí nối exon-intron. Trong đó đột biến thay thế nucleotid là phổ biến nhất, chiếm khoảng 82% các đột biến trên gen COL1A1. Trong các đột biến thay thế nucleotid thì phổ biến nhất là đột biến thay thế nucleotid nào đó dẫn đến thay thế acid amin glycin bằng một acid amin khác.

1.3. Phương pháp phát hiện đột biến gen COL1A1, COL1A2

PCR được dùng để khuếch đại 51 exon của gen COL1A1 và 52 exon của gen COL1A2 trước khi tiến hành giải trình tự gen xác định đột biến. Kỹ thuật này đòi hỏi phải tối ưu điều kiện PCR để có thể đưa ra sản phẩm PCR đặc hiệu, không có sản phẩm phụ, vạch rõ nét, giúp giải trình tự gen thu được kết quả tốt và không bị nhiễu.

1.3.1. Phương pháp PCR

1.3.2. Phương pháp giải trình tự gen

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Nhóm bệnh

2.1.1.1. Nhóm 1

50 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh tạo xương bất toàn tại Bệnh viện Nhi Trung ương.

2.1.1.2. Nhóm 2

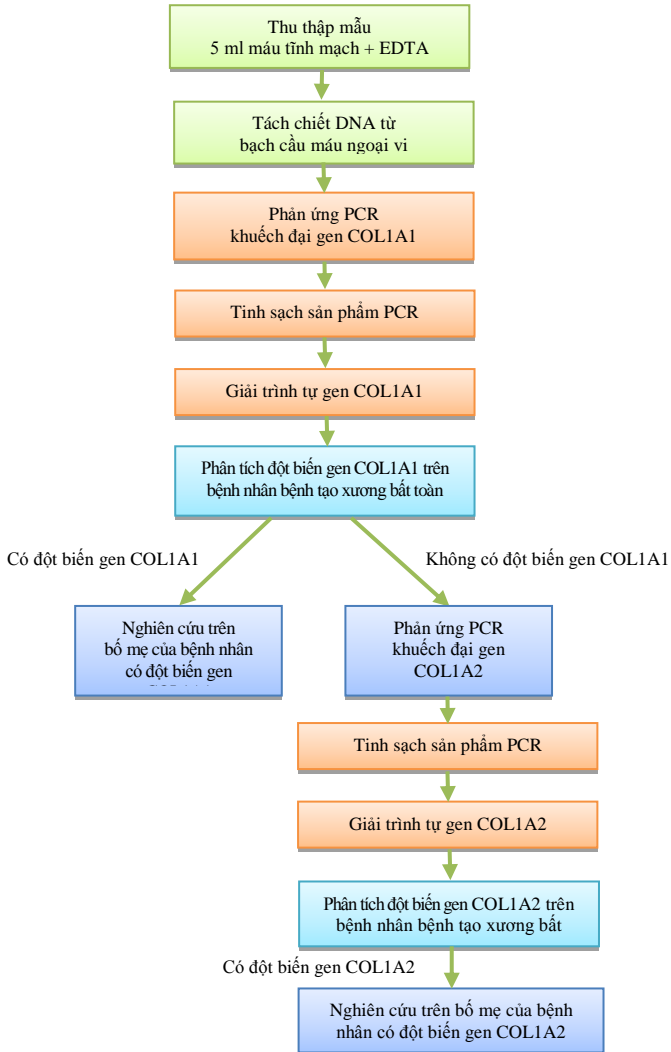
Bố mẹ của bệnh nhân tạo xương bất toàn được xác định có đột biến gen COL1A1 hoặc gen COL1A2.

2.2. Trang thiết bị, dụng cụ và hóa chất

Đều được mua ở các hãng nổi tiếng và đạt độ tinh khiết cao đảm bảo cho quá trình phân tích.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu



2.3.2. Nội dung nghiên cứu

- Xác định đột biến gen COL1A1, COL1A2 ở bệnh nhân tạo xương bất toàn.
- Xác định đột biến gen COL1A1, COL1A2 ở bố mẹ bệnh nhân tạo xương bất toàn đã phát hiện đột biến gen COL1A1 hoặc COL1A2.

2.3.3. Địa điểm nghiên cứu

Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội

2.3.4. Quy trình và các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.3.4.1. Quy trình lấy mẫu

2.3.4.2. Kỹ thuật tách chiết DNA

2.3.4.3. Đánh giá chất lượng DNA sau khi được tách chiết

2.3.4.4. Điện di DNA sau tách chiết

2.3.4.5. Xác định đột biến gen COL1A1 và gen COL1A2

** Thiết kế các cặp mồi đặc hiệu*

Sử dụng chương trình Beacon designer với sự bắt cặp tốt nhất trên mỗi đoạn trình tự DNA, chiều dài các sản phẩm PCR dao động từ 250 đến 1500 bp.

- Với những sản phẩm 300 ÷ 500 bp, sử dụng Takara ExTaq Kit.

- Với những sản phẩm >500 ÷ 1500 bp, sử dụng Primer STAR DNA polymerase Kit.

2.3.4.6. Kỹ thuật giải trình tự gen

Giải trình tự trực tiếp

Sản phẩm PCR được tiến hành giải trực tiếp sau khi tinh sạch DNA từ gel agarose. Giải trình tự gen theo phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

Phương pháp phân tích kết quả:

Kết quả giải trình tự gen được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. 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. So sánh trình tự gen của bệnh nhân với trình tự gen chuẩn của GeneBank (National center for biotechnology information, NCBI) và phân tích theo phương pháp ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems).

2.4. Đề tài luận thủ chặt chẽ đạo đức nghiên cứu trong Y học

Chương 3

KẾT QUẢ

3.2. Kết quả xác định đột biến gen COL1A1, COL1A2 trên nhóm bệnh nhân tạo xương bất toàn

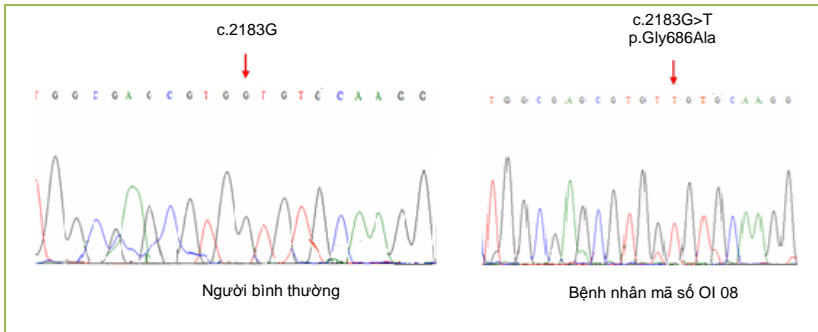
3.2.1. Kết quả xác định đột biến gen COL1A1

3.2.1.1. Đột biến xảy ra tại vùng exon

Đột biến thay thế một nucleotid (đột biến missense)

- Đột biến thay thế nucleotid G thành nucleotid T:

(A)



(B)

Sequence ID: lc|3515 Length: 130 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 130 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
235 bits(127)	8e-66	129/130(99%)	0/130(0%)	Plus/Plus
GeneBank 2141	CCTCTGGAGCAAGAGGCGAGAGAGGTTTCCTGGCGAGCGTGGTGTGCAAGGTCCCCCTG			↓
OI 08 1	CCTCTGGAGCAAGAGGCGAGAGAGGTTTCCTGGCGAGCGTGGTGTGCAAGGTCCCCCTG			60
2201	GTCCTGCTGGTCCCGAGGGGCCAACGGTGCTCCCGGCAACGATGGTGTCAAGGTTGATG			2260
GeneBank 61	GTCCTGCTGGTCCCGAGGGGCCAACGGTGCTCCCGGCAACGATGGTGTCAAGGTTGATG			120
OI 08 2261	CTGGTGCCCC	2270		
121	CTGGTGCCCC	130		

(C)

Sequence ID: |c|1471 Length: 120 Number of Matches: 34

Range 1: 1 to 120 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
201 bits(511)	5e-64	Compositional matrix adjust.	119/120(99%)	119/120(99%)	0/120(0%)

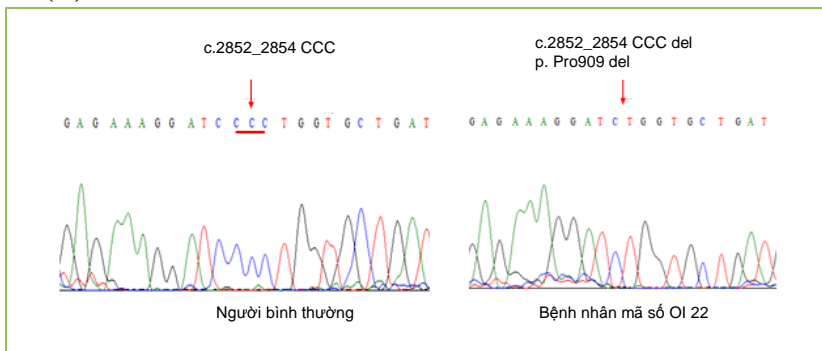
GeneBank 661	QGVPDGLGAPGSPGARGERGFPPGERGVQGGPPGAPRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGS	720
O108 1	QGVPDGLGAPGSPGARGERGFPPGER VQGGPPGAPRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGS	60
GeneBank 721	QGAPGLQGMPPGERGAAGLPGPKGDRGDAGPKGADGSPGKDGVRGLTGP IGPFPAGAPGD	780
O108 61	QGAPGLQGMPPGERGAAGLPGPKGDRGDAGPKGADGSPGKDGVRGLTGP IGPFPAGAPGD	120

Hình 3.3. Hình ảnh đột biến thay thế nucleotid G thành nucleotid T
 Mùi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mùi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi. (A) Hình ảnh giải trình tự exon 31 trên gen COL1A1; (B) Hình ảnh đột biến thay thế nucleotid G thành nucleotid T; (C) Hình ảnh đột biến thay đổi acid amin glycine thành acid amin alanin.

Nhận xét: Hình ảnh giải trình tự nucleotid của đoạn DNA chứa exon từ 30 đến exon 32 ở bệnh nhân mã số OI08 cho thấy: có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid G thành nucleotid T (G>T) trên exon 31 của gen COL1A1. So sánh với trình tự Genebank thấy trên exon 31 c.2183 G>T dẫn đến thay đổi acid amin tại vị trí p.686 của protein từ acid amin glycine chuyển thành acid amin alanin (p.Gly686Ala).

Đột biến mất nucleotid

(A)



(B)

Sequence ID: lc 1453 Length: 117 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 117 Graphics					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
202 bits(109)	7e-56	117/120(98%)	3/120(2%)	Plus/Plus	
GeneBank	2761	GCTGCTGGCCGAGTCGGTCTCTGGCCCTCTGGAAATGCTGGACCCCTGGCCCTCCT			2820
	1	GCTGCTGGCCGAGTCGGTCTCTGGCCCTCTGGAAATGCTGGACCCCTGGCCCTCCT			60
			↓↓↓		
	2821	GGTCTGTGGCAAAGAAGCGGCAAAGTCCCGTGGTGGACTGGCCCTGCTGGACGT			2880
GeneBank					
	61	GGTCTGTGGCAAAGAAGCGGCAAAGT---CGTGGTGGACTGGCCCTGCTGGACGT			117

(C)

Sequence ID: lc 2389 Length: 119 Number of Matches: 46					
Range 1: 1 to 119 Graphics					
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
191 bits(484)	2e-60	Compositional matrix adjust.	119/120(99%)	119/120(99%)	1/120(0%)
GeneBank	901	AGKEGGKGRGETGPAGRPGEVGGPPPPGAGEKGS PGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRGV			960
		AGKEGGKGRGETGPAGRPGEVGGPPPPGAGEKGS PGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRGV			
	1	AGKEGGKGRGETGPAGRPGEVGGPPPPGAGEKGS PGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRGV			59
	961	VGLPGQRGERGFPLPGPSGEPGKQGPSPGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAFPA			1020
GeneBank		VGLPGQRGERGFPLPGPSGEPGKQGPSPGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAFPA			
	60	VGLPGQRGERGFPLPGPSGEPGKQGPSPGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAFPA			119

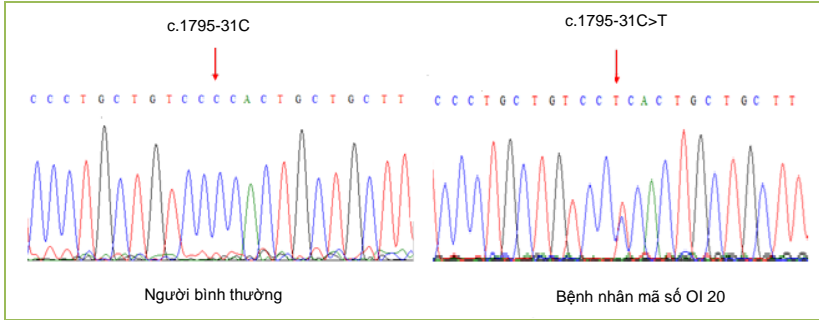
Hình 3.6. Hình ảnh đột biến mất nucleotid

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi: (A) Hình ảnh giải trình tự exon 39 trên gen COL1A1; (B) Hình ảnh đột biến mất ba nucleotid CCC; (C) Hình ảnh đột biến mất acid amin prolin.

Nhận xét: Ở bệnh nhân mã số OI22, khi giải trình tự ở exon 39 phát hiện mất ba nucleotid C từ vị trí 2852 đến vị trí 2854 (2852÷2854 CCC del). Khi kiểm tra trình tự acid amin thấy cả ba nucleotid này mã hóa một acid amin prolin. Do đó, đột biến làm mất acid amin này tại vị trí p.909 (p. Pro909del), các acid amin còn lại mã hóa bình thường.

3.2.1.2. Đột biến xảy ra tại vùng intron

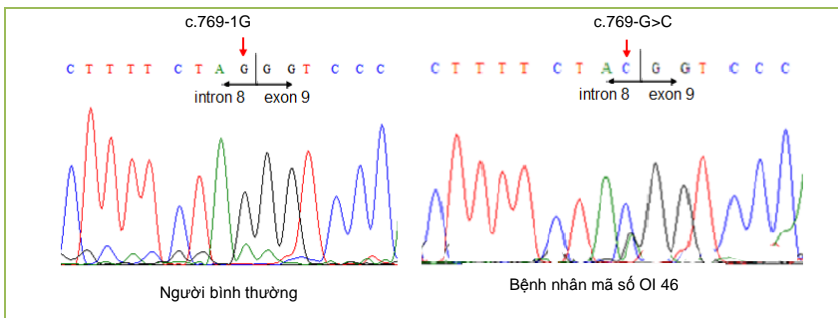
Một số hình ảnh đột biến tại vị trí nối



Hình 3.7. Hình ảnh đột biến tại vị trí nối của bệnh nhân mã số OI20

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi

Nhận xét: Giải trình tự gen COL1A1 phát hiện bệnh nhân mã số OI20 bị đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid C thành T tại vị trí cách 31 nucleotid về phía trái (intron 24) so với vị trí nucleotid khởi đầu là 1795 của exon 25. Đây là vị trí quan trọng cho sự cắt nối gen trong quá trình phiên mã (branch site).



Hình 3.9. Hình ảnh đột biến tại vị trí nối của bệnh nhân mã số OI46

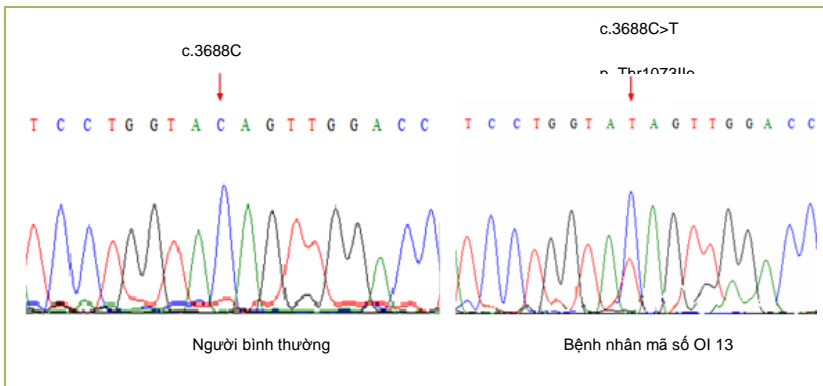
Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi

Nhận xét: Giải trình tự gen COL1A1 phát hiện bệnh nhân mã số OI46 bị đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid G thành C tại vị trí cách một nucleotid về phía trái (intron 8) so với vị trí nucleotid khởi đầu là 769 của exon 9. Đây là vị trí quan trọng cho quá trình cắt nối gen trong quá trình phiên mã (acceptor site).

3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen COL1A2

Sản phẩm PCR tiếp tục được giải trình tự gen để phát hiện đột biến. Kết quả phát hiện ba bệnh nhân có đột biến điểm dạng dị hợp tử nằm ở vùng exon.

(A)



(B)

Sequence ID: |c|20599 Length: 120 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	2e-60	119/120(99%)	0/120(0%)	Plus/Plus
GeneBank ₃₆₀₁	CCTGGCTCCGTGGGTCTGCTGGTCTAGGGGCCCTGGTGGTCTTCTGGCCCTGCTGGA	3660		
OI13 ¹	CCTGGCTCCGTGGGTCTGCTGGTCTAGGGGCCCTGGTGGTCTTCTGGCCCTGCTGGA	60		
3661	AAAGATGGTCGCACCTGGACATCCTGGTACAGTTGGACCTGCTGGCATTGAGGCCCTCAG	3720		
GeneBank ₆₁	AAAGATGGTCGCACCTGGACATCCTGGTATAGTTGGACCTGCTGGCATTGAGGCCCTCAG	120		

(C)

Sequence ID: c 38897 Length: 120 Number of Matches: 42						
Range 1: 1 to 120 Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match			
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
222 bits(565) 2e-71 Compositional matrix adjust. 119/120(99%) 119/120(99%) 0/120(0%)						
GeneBank1021		GLKGHNGLQGLPGIAGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGPSGPAGKDGRTGHPGTVGPAGIR				1080
	1	GLKGHNGLQGLPGIAGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGPSGPAGKDGRTGHPG VGPAGIR				60
	1081	GPQGHQGPAGPPGPPGPPGPPGVSGGGYDFGYDGDIFYRADQPRSAPSLRPKDYEV DATLK				1140
GeneBank61		GPQGHQGPAGPPGPPGPPGPPGVSGGGYDFGYDGDIFYRADQPRSAPSLRPKDYEV DATLK				120

Hình 3.11. Hình ảnh đột biến thay thế nucleotid C thành nucleotid T

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi: (A) Hình ảnh giải trình tự exon 28 trên gen COL1A2; (B) Hình ảnh đột biến thay thế nucleotid C thành nucleotid T; (C) Hình ảnh đột biến thay đổi acid amin threolin chuyển thành acid amin isoleucin.

Nhận xét: Hình ảnh giải trình tự ở bệnh nhân mã số OI13 cho thấy: có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid C thành nucleotid T (C>T) trên exon 28 của gen COL1A1. So sánh với trình tự Genebank thấy trên exon 28 c.3688C>T dẫn đến thay đổi acid amin tại vị trí p.1073 của protein gen COL1A2 từ threolin chuyển thành isoleucin (p.Thr1073Ile).

3.2.3. Kết quả đột biến trên gen COL1A1, COL1A2**Bảng 3.2. Đột biến của gen COL1A1 và gen COL1A2**

Đột biến gen COL1A1, COL1A2	Số đột biến
Gen COL1A1	39
Gen COL1A2	3
Không phát hiện đột biến	8
Tổng số	50

Nhận xét: 50 bệnh nhân tạo xương bất toàn phân tích đột biến gen có 42 bệnh nhân có đột biến gen COL1A1 và COL1A2, trong đó 39 bệnh nhân có đột biến gen COL1A1, 3 bệnh nhân có đột biến gen COL1A2 và 8 bệnh nhân không phát hiện được đột biến gen COL1A1 và COL1A2.

3.2.4. Kết quả các đột biến tại vùng exon, intron trên gen COL1A1, COL1A2

Bảng 3.3. Tỷ lệ đột biến exon và intron trên gen COL1A1, COL1A2

Kết quả đột biến	Số đột biến		Tổng số
	COL1A1	COL1A2	
Vùng exon	13	3	16
Vùng intron	26	0	26
	39	3	42

Nhận xét: 42 bệnh nhân tạo xương bất toàn được phát hiện có đột biến gen COL1A1, COL1A2, có 16 trường hợp đột biến tại vùng exon và có 26 trường hợp tại vùng intron.

3.2.4.1. Kết quả đột biến tại vùng exon trên gen COL1A1, COL1A2

Bảng 3.4. Các đột biến trong vùng exon gen COL1A1, COL1A2

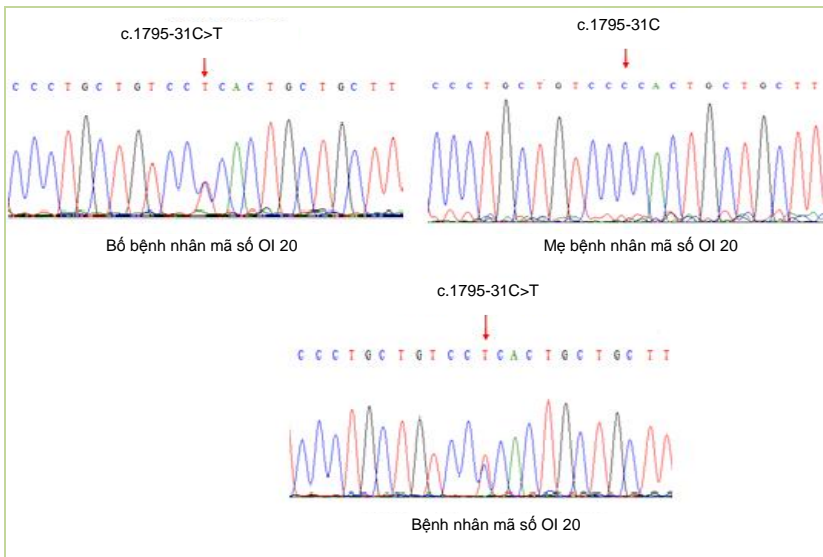
Các đột biến vùng exon	Số đột biến		Tổng số
	COL1A1	COL1A2	
Thay thế nucleotid	11	3	14
Tạo mã kết thúc sớm (stop codon)	1	0	1
Mất nucleotid	1	0	1
	13	3	16

Nhận xét: 16 bệnh nhân phát hiện có đột biến vùng exon, trong đó 14 bệnh nhân có đột biến thay thế nucleotid, 1 bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm và 1 bệnh nhân có đột biến mất nucleotid.

3.3. Kết quả xác định đột biến ở bố mẹ của bệnh nhân tạo xương bất toàn đã phát hiện đột biến COL1A1 hoặc COL1A2

42/50 bệnh nhân được chẩn đoán tạo xương bất toàn dựa vào triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng điển hình đến khám và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương đã phát hiện có đột biến gen COL1A1, COL1A2. 42 cặp bố mẹ của các bệnh nhân đã được xác định là có đột biến gen COL1A1, COL1A2 được phân tích gen tìm đột biến.

* Kết quả phân tích gen của gia đình bệnh nhân mã số OI20

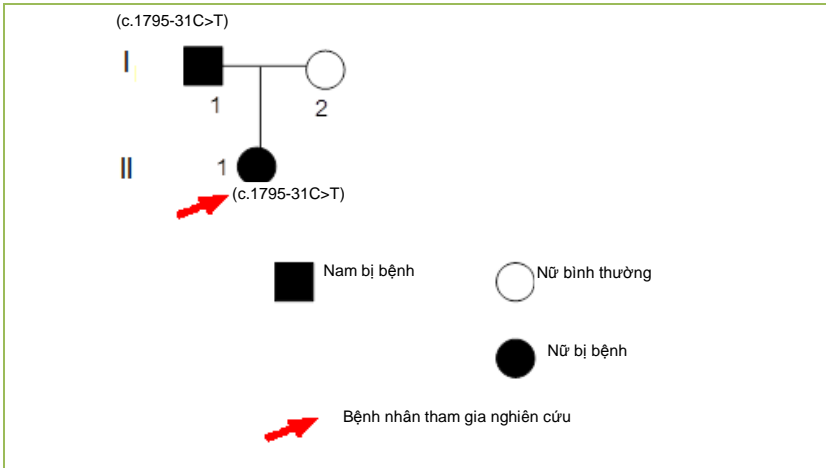


Hình 3.16. Hình ảnh giải trình tự gen COL1A1 của bố mẹ bệnh nhân mã số OI20

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi.

Nhận xét: Kết quả phân tích gen COL1A1 ở gia đình bệnh nhân số OI20 cho thấy người bố bị đột biến dị hợp tử c.1795-31C>T tại intron 24, người mẹ không có đột biến. Bệnh nhân có đột biến c.1795-31C>T dị hợp tử tại intron 24 do nhận một alen đột biến từ người bố.

- Gia đình bệnh nhân mã số OI20 (sau khi phân tích gen)



Hình 3.17. Sơ đồ gia đình mã số OI20 (sau khi phân tích gen).

Nhận xét: Sau khi tiến hành phân tích gen COL1A1 của bố mẹ bệnh nhân cho thấy người mẹ không có đột biến, người bố đột biến dị hợp tử. Như vậy bệnh nhân mã số OI20 có đột biến dị hợp tử do nhận một alen đột biến từ người bố.

Bảng 3.7. Đột biến gen COL1A1, COL1A2 ở bố mẹ bệnh nhân tạo xương bất toàn (42 cặp bố mẹ bệnh nhân)

Kết quả	n
Người bố có đột biến gen	20
Người mẹ có đột biến gen	21
Người bố/mẹ không đột biến gen	1
Tổng cộng	42

Nhận xét: Phân tích gen COL1A1, COL1A2 từ 42 cặp bố mẹ của bệnh nhân tạo xương bất toàn có đột biến gen cho thấy có 20/42 bệnh nhân nhận đột biến từ người bố, 21/42 bệnh nhân nhận đột biến từ người mẹ và 1/42 bệnh nhân có đột biến mới phát sinh.

Chương 4

BÀN LUẬN

Kết quả xác định đột biến gen COL1A1, COL1A2 trên nhóm bệnh nhân tạo xương bất toàn

Ở nhiều nước cũng như trong điều kiện Việt Nam hiện nay chưa thực hiện được nuôi cấy nguyên bào sợi từ da bệnh nhân. Bên cạnh đó, các nghiên cứu trên thế giới cho thấy có thể phát hiện được 90% đột biến gen tổng hợp collagen tít I bằng phương pháp giải trình tự gen. Do đó việc xác định đột biến gen gây bệnh tạo xương bất toàn là cần thiết. Phân tích trình tự gen COL1A1 và COL1A2 có giá trị chẩn đoán phân biệt bệnh với các rối loạn tương tự. Năm 2001, Ward và cộng sự đã phân tích gen của 33 bệnh nhân tạo xương bất toàn tít I ÷ tít IV người Canada, các tác giả đã phát hiện được hầu hết các đột biến là do chuyển acid amin glycin thành một acid amin khác. Năm 2004, Hartikka H. và cộng sự đã tiến hành phân tích gen của 54 bệnh nhân tạo xương bất toàn, các tác giả đã phát hiện được 49 đột biến khác nhau, trong đó có 38 đột biến trên gen COL1A1 và 11 đột biến trên gen COL1A2. Năm 2006, Pollitt R. và cộng sự đã tiến hành phân tích gen trên 83 bệnh nhân tạo xương bất toàn người Anh, các tác giả đã phát hiện được 62 đột biến khác nhau trên cả hai gen. Trong khi chẩn đoán bệnh tạo xương bất toàn vẫn còn dựa trên cơ sở lâm sàng và X-quang, có một nhu cầu ngày càng tăng về các đặc tính phân tử của các đột biến gây bệnh. Các nghiên cứu khác nhau cho thấy hơn 90% đột biến cả hai gen COL1A1 và COL1A2 gây bệnh tạo xương bất toàn. Ngoài ra, các đột biến ở các gen khác chưa được phát hiện ở

bệnh nhân tạo xương bất toàn. Trong nghiên cứu của chúng tôi đã tiến hành phân tích gen trên 50 bệnh nhân tạo xương bất toàn đã phát hiện được 42 đột biến khác nhau trên cả hai gen. Điều này cũng tương tự với các báo cáo trên thế giới, góp phần thực hiện việc phân tích đột biến và chẩn đoán trước sinh trên một số bệnh lý di truyền khác trong đó có bệnh tạo xương bất toàn để tiến tới xây dựng một quy trình chuẩn trong chẩn đoán các bệnh lý di truyền ở Việt Nam và đưa ra áp dụng một cách rộng rãi để nâng cao chất lượng điều trị, giảm tỷ lệ mắc bệnh trong cộng đồng người dân. Trong trường hợp có đột biến collagen týp I có thể khẳng định chẩn đoán bệnh tạo xương bất toàn. Tuy nhiên, trong trường hợp không phát hiện được đột biến của gen mã hóa collagen týp I thì tồn tại khả năng có đột biến collagen týp I nhưng không phát hiện được. Vì vậy không có đột biến collagen týp I cũng không loại trừ bệnh tạo xương bất toàn do có tỷ lệ nhỏ các đột biến lặn có thể xảy ra trên các gen khác như BMP1, CRTAP, FKBP10, LEPRE1, PLOD2, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, SP7.

Đột biến gen COL1A1: Đột biến thường gặp là dạng thay đổi một acid amin chiếm khoảng 82% các đột biến trên gen COL1A1 phá vỡ cấu trúc bộ ba Gly-X-Y dẫn đến mất tính bền vững của protein; những đột biến khác như mất đoạn, lặp đoạn hoặc bổ sung nucleotid hiếm gặp hơn. Kết quả nghiên cứu của nhóm cho thấy có 13 bệnh nhân tạo xương bất toàn có đột biến gen COL1A1 xuất hiện đột biến trên vùng gen mã hóa cho protein COL1A1. Trong đó có 11 bệnh nhân có đột biến thay thế nucleotid, 1 bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm và 1 bệnh nhân có đột biến mất nucleotid.

Bệnh nhân tạo xương bất toàn mã số OI23 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid G thành nucleotid A (G>A) trên exon 36 của gen COL1A1. So sánh với trình tự Genebank thấy trên exon 36 c.2587 G>A dẫn đến thay đổi acid amin tại vị trí p.821 của protein gen COL1A1 từ glycin chuyển thành serin (p.Gly821Ser), đây là đột biến được công bố 13 lần ở châu Âu, châu Á và châu Mỹ với tỷ lệ khoảng 11% trong tổng số đột biến tìm thấy trên gen COL1A1. Đột biến này liên quan đến hầu hết các thể của bệnh tạo xương bất toàn (I, II, III, IV).

Khi tiến hành giải trình tự gen COL1A1 của bệnh nhân mã số OI22 với cặp mồi exon 39 - exon 41, phát hiện được đột biến mất ba nucleotid C từ vị trí 2852 đến vị trí 2854 trên exon 39 (2852÷2854 CCC del) của mRNA gen COL1A1 (NM_000088.3), làm cho bộ ba tại vị trí 909 mã hóa acid amin prolin bị mất (p. Pro909del). Đột biến mất nucleotid là đột biến phổ biến đứng hàng thứ hai sau đột biến thay thế. Trên ngân hàng dữ liệu thế giới về bệnh bệnh tạo xương bất toàn, hiện nay có 176 đột biến mất nucleotid được công bố; chiếm 13,58% tổng số đột biến trên gen COL1A1 trong đó có 147 đột biến mất nucleotid xảy ra trên exon chiếm 14% số đột biến trên exon. Theo nghiên cứu này, tỷ lệ đột biến mất nucleotid trên exon là 1/50. Tuy nhiên do cỡ mẫu nhỏ nên chúng tôi không đưa ra tỷ lệ chính xác đột biến này ở Việt Nam.

11 điểm đột biến gen COL1A1 được tìm thấy trên bệnh nhân bệnh tạo xương bất toàn trong nghiên cứu này. Trong đó có 5 điểm đột biến ở vùng intron, tức là vùng không mã hóa gen nhưng lại không thể thiếu để hoàn thiện mRNA và bảo tồn thông tin di truyền. Các đột biến này đều cách từ 1 đến 40 nucleotid quanh vị trí 5' và 3' tận của exon, nghĩa là nằm trong vùng cho (donor site) và vùng nhận

(acceptor site) của intron. Đây là hai vùng quan trọng nhất, chứa các motif đặc hiệu liên kết với các tiểu đơn vị phức hợp protein – RNA như U1 và U2.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phát hiện đột biến c.1795-31C>T dị hợp tử tại intron 24 xuất hiện ở 5 bệnh nhân. Đột biến này cách đầu 5' của exon 25 khoảng 31 nucleotid, có thể gây nhiễu vị trí cắt nối giữa exon 24 và exon 25. Tuy nhiên theo thống kê trong ngân hàng dữ liệu về bệnh tạo xương bất toàn hầu hết các đột biến gây bệnh tạo xương bất toàn nằm trên intron đều nằm rất gần đầu 5' hoặc 3' của exon. Việc tìm thấy đột biến ở vị trí cách đầu 5' của exon 25 tới 31 nucleotid cần phải được kiểm tra lại chính xác bằng RT-PCR để xác định ảnh hưởng của nó tới quá trình cắt nối hoàn thiện mRNA. Bệnh phẩm cần phải lấy từ nơi có biểu hiện là da hoặc xương bệnh nhân, đem tách chiết RNA, tổng hợp cDNA; từ đó thực hiện RT-PCR và giải trình tự cDNA thu được. Do nghiên cứu của chúng tôi chỉ được thực hiện trong thời gian có hạn nên nghiên cứu chỉ dừng lại ở phát hiện đột biến trên gen COL1A1, COL1A2 ở mức độ DNA của bệnh nhân. Một đột biến dị hợp tử khác tại intron 36 là c.2686-18G>C, xuất hiện ở 12 bệnh nhân. Vị trí đột biến cách đầu 5' của exon 37 khoảng 18 nucleotid. Sự thay đổi này có thể gây ảnh hưởng quá trình cắt nối giữa exon 36 và exon 37.

Đột biến gen COL1A2: Gen COL1A2 mã hóa cho sợi một trong hai dạng tiền collagen tít 1, đó là pro- α 2 (I). Gen này chứa 52 exon, trong đó vùng hình thành chuỗi helix bậc 3 với hai sợi pro- α 1 (I) trải dài từ exon 6 đến exon 48. Vùng này có bộ ba acid amin Gly-X-Y với X là acid amin prolin và Y là acid amin hydroxyprolin, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn hình dạng chuỗi xoắn; sự thay đổi

các acid amin sẽ ảnh hưởng tới sự bảo tồn đó. Bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp, phát hiện 3 bệnh nhi bệnh tạo xương bất toàn có đột biến trên gen COL1A2, đều là đột biến missense thay thế nucleotid C thành nucleotid T tại vị trí 3688 thuộc exon 48, làm cho bộ ba tại vị trí 1073 mã hóa acid amin threonin chuyển thành acid amin isoleucin (p.Thr1073Ile) làm cấu trúc chuỗi helix bậc ba có thể bị thay đổi. Đột biến này chưa được công bố tại ngân hàng dữ liệu về bệnh bệnh tạo xương bất toàn. Threonin là một acid amin phân cực do có chứa một gốc $-OH$ và isoleucin là một acid amin có tính chất không phân cực; những acid amin không phân cực nằm bên trong lõi chuỗi helix và bao bọc bên ngoài là các acid amin phân cực, đặc biệt là bộ ba Gly-X-Y. Như vậy đột biến missense thay đổi acid amin threonin chuyển thành acid amin isoleucin có thể là nguyên nhân gây rối loạn cấu trúc C-tận của procollagen, làm giảm chất lượng và tính bền vững của protein này.

Kết quả xác định đột biến ở bố mẹ của bệnh nhân tạo xương bất toàn đã phát hiện đột biến COL1A1 hoặc COL1A2

Phần lớn bệnh tạo xương bất toàn là bệnh di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường. Do vậy, chỉ cần người có một alen mang gen đột biến đã có thể mắc bệnh. Người bố hoặc người mẹ bị bệnh thì khả năng 50% sinh con mắc bệnh tạo xương bất toàn giống bố hoặc mẹ. Cho đến nay, hầu hết các đột biến ở các gen COL1A1 và COL1A2 gây ra tạo xương bất toàn đều riêng biệt và hiếm khi xuất hiện lại trong các gia đình khác, thể hiện những biểu hiện phức tạp của căn bệnh này. Nghiên cứu phát hiện thấy 42 bệnh nhân tạo xương bất toàn có mang đột biến gen COL1A1 hoặc COL1A2; 20 trường hợp do di truyền từ người bố (bố mắc bệnh) và 21 trường hợp do di truyền từ người mẹ (mẹ mắc bệnh). Duy nhất một trường hợp mắc bệnh tạo xương bất

toàn do đột biến mới phát sinh, người bố và người mẹ không mắc bệnh, nhưng người con bị đột biến gen COL1A1. Bệnh tạo xương bất toàn là một nhóm không đồng nhất các rối loạn di truyền có ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của mô liên kết. Vì tạo xương bất toàn là một bệnh di truyền không thể điều trị đặc hiệu được, liệu pháp tế bào và liệu pháp gen đang được nghiên cứu như là phương pháp điều trị tiềm năng. Tác giả Niyibizi C. và cộng sự hiện đang xem xét khả năng phát triển liệu pháp gen để điều trị một mô hình chuột được gây bệnh tạo xương bất toàn sử dụng các tế bào mô đệm tủy xương như phương tiện giao gen mã hóa collagen bình thường đến xương. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cho thấy việc chẩn đoán trước sinh là rất quan trọng cũng như công tác tư vấn di truyền với mục đích trao đổi, giải đáp các nguyên nhân, cơ chế liên quan đến các bệnh di truyền. Có thể nói có một số trung tâm tư vấn uy tín như Khoa Di truyền và Sinh học phân tử của Bệnh viện Nhi Trung ương có mối liên hệ mật thiết với các bác sỹ di truyền lâm sàng, các chuyên gia tư vấn ở các trung tâm tư vấn di truyền uy tín ở trong nước như Trường Đại học Y Hà Nội, Trung tâm chẩn đoán trước sinh tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. Từ nghiên cứu này và các nghiên cứu khác đã được thực hiện tại Trung tâm Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội đối tượng tư vấn di truyền là những người nghi ngờ mắc bệnh lý di truyền hoặc trong gia đình có người mang bệnh lý di truyền, những phụ nữ mang thai có nguy cơ mang các dị tật bẩm sinh được xác định bằng siêu âm thai nhi hoặc xét nghiệm sàng lọc huyết thanh mẹ ở ba tháng đầu hoặc ba tháng giữa của thai kì, phụ nữ mang thai mang trên 35 tuổi hoặc gia đình những em bé được sinh ra mắc dị tật bẩm sinh.

KẾT LUẬN

Sau khi tiến hành giải trình tự toàn bộ gen COL1A1, COL1A2 trên 50 bệnh nhân tạo xương bất toàn, chúng tôi đưa ra các kết luận sau:

1. Đột biến gen COL1A1 và COL1A2 trên bệnh nhân tạo xương bất toàn

- Phát hiện 42/50 bệnh nhân tạo xương bất toàn có đột biến trên gen COL1A1 hoặc COL1A2. Trong đó 39 bệnh nhân được phát hiện trên gen COL1A1, 3 bệnh nhân được phát hiện trên gen COL1A2.

- Các đột biến trên gen COL1A1 và COL1A2 gồm:

+ Tại vùng exon: 14 đột biến thay thế nucleotid, 1 đột biến tạo mã kết thúc sớm, 1 đột biến mất nucleotid.

+ Tại vùng intron: 26 đột biến tại vị trí nối exon-intron.

2. Đột biến gen COL1A1, COL1A2 trên bố mẹ bệnh nhân tạo xương bất toàn

Trong số 42 cặp bố mẹ của 42 bệnh nhân có đột biến gen COL1A1 hoặc COL1A2 đã phát hiện 41/42 trường hợp có đột biến trong đó: 20 trường hợp là bố mang đột biến và 21 trường hợp là mẹ mang đột biến truyền bệnh cho người con.

BACKGROUND

1. Urgency of the theme

The disease called osteogenesis imperfecta is also known as brittle bone or bone glass disease with disease incidence of 1/15,000-1/25,000. It is caused by mutation of type I collagen synthesis leading to a deficiency or abnormality of the molecular structure of collagen type I which is the reason for brittle bones, reduced bone mass and abnormal connective tissue. Collagen type I is a protein substrate which dominates in the interstitial space of most tissues found in bones, organs membrane, cornea, sclera eyes, scales and ligaments, blood vessels, leather, meningitis. It is a major component of dentin and accounts for 30% of the body weight. So when defective extracellular basic substance, the disease remains not only in abnormal bones but also other parts such as the sclera blue eyes, imperfect teeth-creating, hearing loss... The osteogenesis imperfecta causes pain and lifelong disability for children both physically and mentally to be milder and in a way, fatal. The disease is a burden to the family and society. So far, there is no specific treatment method for the patients with osteogenesis imperfecta; mainly symptoms-treating, pain-killing, fractures-moderating with the aim of reducing to the minimum rate of disability and functional decline; improving the life quality for patients. With genetic analysis which is an important prerequisite for prenatal diagnosis for subjects at high risk of having another baby with disease osteogenesis imperfecta, it is easier to give genetic counseling to help prevent and reduce the incidence. Situation study osteogenesis imperfecta disease in Vietnam is still very little, mostly clinical studies.

2. Objectives of the research:

1. Determine the COL1A1 gene mutation, COL1A2 in patients with osteogenesis imperfecta.
2. Determine the COL1A1 gene mutation, COL1A2 in the patients' parents discovered COL1A1 or COL1A2 gene mutations.

3. Scientific significance and practice of topics:

The osteogenesis imperfecta is a genetic disease caused by gene mutations due to abnormal collagen synthesis molecular structure of collagen or collagen molecule deficient brittle bones, reduced bone mass leading to fractures. Connective tissue damage causes the child's death or disability. This is a group for terminally ill medicine. Although there are some treatments somewhat limiting the progression of the disease, reducing pain for patients. The remarkable progress of biomedicine, biochemistry, and molecular genetics has helped close study of the cause in order to find treatments and effective prevention. The study has used genetic methods of modern molecular PCR, gene sequencing to find mutations in the gene COL1A1, COL1A2 disease osteogenesis imperfecta patient Vietnam. This is the first study of gene mutations causing disease osteogenesis imperfecta in Vietnam. Research topics are meaningful and practical science contributing to clinical diagnosis, treatment, prevention and genetic counseling for patients and families of patients.

4. The structure of the thesis:

The thesis is presented in 108 pages (excluding references and appendices). The thesis is divided into 7 sections:

- + Background: 2 pages
- + Chapter 1: overview document 32 pages
- + Chapter 2: objects and methods of research 15 pages
- + Chapter 3: results 30 pages
- + Chapter 4: discussion 28 pages
- + Conclusions: 1 page

The thesis consists of: 3 charts, 43 tables and 9 forms and uses 110 reference documents (11 Vietnamese and 99 English documents).

Chapter 1 OVERVIEW

1.1. The disease osteogenesis imperfecta

So far, many studies on osteogenesis imperfecta were carried out in many countries around the world. Molecular mechanisms, clinical features, subclinical have gradually come to light. The treatment and care to limit disease progress and improve the patients' quality of life have been guided and widely disseminated.

1.1.3. Clinical and classify the disease: osteogenesis imperfecta

Clinical manifestations depend on the type of the disease also very different. Signs and symptoms of the osteogenesis imperfecta include blue sclera eye, hearing, teeth incompleteness, loose joints, abnormal skin texture (smooth and thin skin). The other distinctive sign which can common in many types of this disease is bleeding diathesis (easily causing bruising) and respiratory distress. Silience et al (1979) have divided patients into four osteogenesis imperfecta types.

1.1.4. Subclinical

Tests have been valued in diagnosing osteogenesis imperfecta as X-rays alone. Most of the features on imaging of the disease are reflected in the film X-rays.

1.1.4.1. X-rays of patients usually osteogenesis imperfecta

1.1.4.2. Bone Density / BMD

1.1.4.3. Bone biopsy

1.1.4.4. Molecular genetic testing

- A culture of skin fibroblasts from patients for analysis to determine the structure and quality of collagen type I (87% sensitivity for light to medium; 98% for severe).

- Analysis of COL1A1 and COL1A2 gene sequencing to detect gene mutations.

1.1.6. Osteogenesis imperfecta genetics

Osteogenesis imperfecta is considered as a dominant or recessive genetic disease on chromosome often. Approximately 90% of cases are hereditary dominant, due to COL1A1 and COL1A2 gene mutations. The disease occurs in men and women with a similar risk. When the father or the mother is sick, sick human risk was 50% and 50% are not sick. In cases of osteogenesis imperfecta as rule hereditary dominant alleles, the child only received one allele of the mother or the father who has manifested disease, so patients manifest in many generations.

1.1.7. Diagnose

To diagnose osteogenesis imperfecta is to basically depend on clinical signs, symptoms of X-ray, a history of fractures and family history. Diagnosing is not complicated in individuals with a family history or severe disease manifestations, but it can be difficult in people with no family history and the fracture is not associated with abnormal bones apart. Or if only based on clinical signs, the risk of confusion with other diseases of bone is relatively high. Therefore, the genetic research methods and determined gene mutations contribute to definitive diagnosis and prognosis osteogenesis imperfecta.

1.1.8. Treatment for osteogenesis imperfecta

So far, there is no specific treatment method for patients with osteogenesis imperfecta. Most of the measures are focused on supportive treatment which aims to reduce pain, reduce fractures recur, thereby reduce to the maximum rate and the decline disabled other functions or help improve quality life for patients. The reason is not to

replace the structure of collagen in the body and there is currently no method that stimulates the body to increase the amount of collagen synthesis. The interventions in genetic structure are still just an idea.

1.2. Molecular mechanism of disease osteogenesis imperfecta

1.2.2.1. Location of the gene COL1A1, COL1A2

COL1A1 gene located on the long arm of chromosome 17 at position 21.33 (17q21.33).

COL1A2 gene located on the long arm of chromosome 7 at position 22.1 (7q22.1).

1.2.2.2. The structure and function of the gene COL1A1, COL1A2

COL1A1 gene includes 51 exons with 18kb in length, encoding pro- α 1 chain 5kb (procollagen type I alpha 1) participated in the molecular structure of collagen type I. The exon 6 to 49 encodes alpha double helix. Most of this exon is about 45 bp, 54 bp or 45 or multiples of 54 bp in length. COL1A1 gene encodes pro- α 1 chain consists of amino acid 1464. The genetic structure divided into 3 main areas: the promoter, exon and intron regions contain, tail poly A. The procollagen synthesis chain, COL1A1 gene will first perform synthetic molecules transcribed mRNA precursor. This mRNA molecules undergo cutting the intron and exon linking together to create complete mRNA molecules. Complete mRNA molecules are used as molds translational pro- α 1 chain synthesis. COL1A2 gene exon 52 is 38kb in length, sequences coding for pro- α 2 5kb (procollagen type I alpha 2) participated in the molecular structure of collagen type I.

1.2.2.3. The gene mutations of COL1A1 and COL1A2

COL1A1 gene mutations on osteogenesis imperfecta substitution mutations include nucleotides, nucleotide deletions, mutations more nucleotides, mutations in exon-intron connected location. In

particular, nucleotide substitution mutation is the most common, accounting for about 82% of the COL1A1 gene mutations. In alternate nucleotide mutations, the mutations most commonly are replaced by an amino acid glycine other.

1.3. Methods of detecting gene mutations COL1A1, COL1A2

PCR is used to amplify exon 51 of the gene COL1A1 and COL1A2 gene exon 52 prior to sequencing the gene mutations identified. This technique requires optimal PCR conditions to be able to offer products specific PCR, no byproducts, sharp lines, help sequenced obtained good results and without interference.

1.3.1. PCR

1.3.2. Gene sequencing method

Chapter 2

SUBJECTS AND METHODS

2.1. Research subjects

2.1.1. Group diseases

2.1.1.1. Group 1

50 patients were diagnosed with osteogenesis imperfecta at National Paediatrics Hospital.

2.1.1.2. Group 2

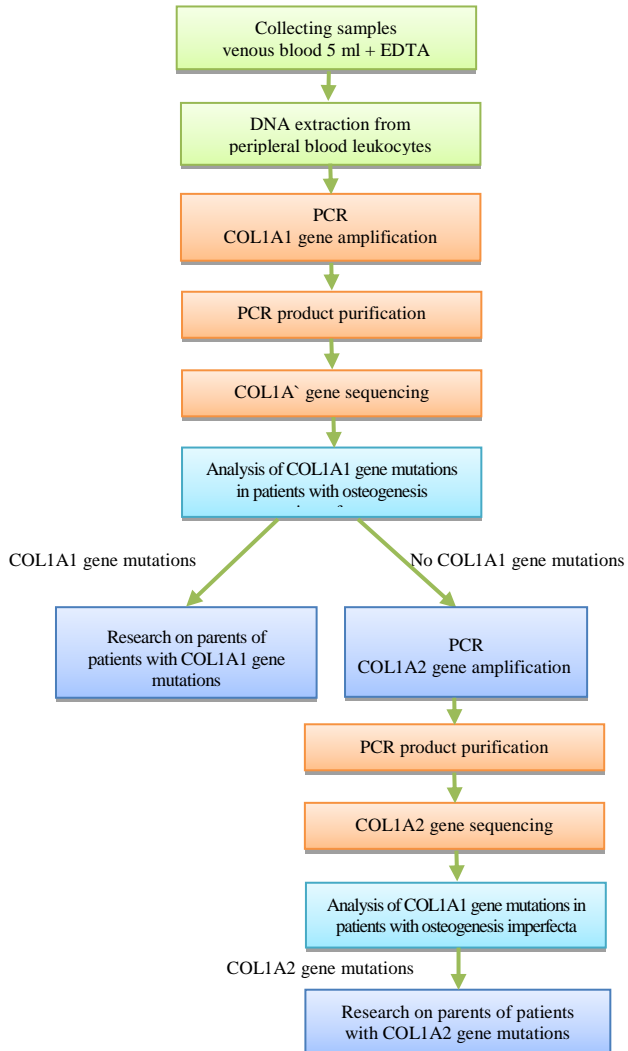
Parents of the patients with osteogenesis imperfecta identified with gene mutations COL1A1 or COL1A2 gene.

2.2. Equipment, tools and chemicals

Purchased from well-known brands and achieving high purity to ensure the analysis process.

2.3. Research methods

2.3.1. Study design



Schematic design study

2.3.2. Research content

- Determine the COL1A1 gene mutation, COL1A2 in the patients with osteogenesis imperfecta.
- Determine the COL1A1 gene mutation, COL1A2 in the patients with osteogenesis parents imperfectaion found COL1A1 or COL1A2 gene mutations.

2.3.3. Study sites

Department of Biochemistry

Research Center for Gene - Protein, Hanoi Medical University

2.3.4. Processes and techniques used in research

2.3.4.1. Sampling process

2.3.4.2. DNA extraction techniques

2.3.4.3. Assessing the quality of extracted DNA after

2.3.4.4. DNA electrophoresis after extraction

2.3.4.5. Determining the genetic mutation gene COL1A1 and COL1A2

* The design of specific primers

Use the Beacon program designer with the best pairs on each segment of the DNA sequence, the length of the PCR products range from 250 to 1500 bp.

- For products 300 ÷ 500 bp, using Takara ExTaq Kit.
- With products > 500 ÷ 1500 bp, using DNA polymerase STAR Primer Kit.

2.3.4.6. Technical sequenced

Direct sequencing

PCR products were conducted directly after the purification of DNA from agarose gel. Find the genetic sequence according to BigDye terminator sequencing method (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Methods of analysing results:

Gene sequencing results were analyzed using CLC Main Workbench software. The nucleotides in the gene will be expressed by the peak (peak) with 4 colors equivalent to 4 types of nucleotides A, T, G, C. Comparing gene sequences of patients with the genetic sequences of the GeneBank standards (National center for biotechnology information, NCBI) and analysis by ABI Prism 3100 genetic method analyzer (Applied Biosystems).

2.4. Subject adhere research ethics in medicine

Chapter 3

RESULTS

3.2. The results identify genetic mutations COL1A1, COL1A2 on patients of osteogenesis imperfecta

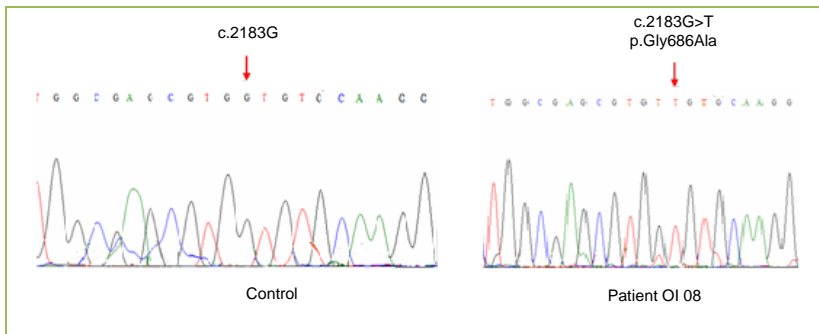
3.2.1. The results identify genetic mutations COL1A1

3.2.1.1. The mutation occurs in exon regions

Replacing a nucleotide mutation (missense mutation)

- G nucleotide substitution mutation into a nucleotide T:

(A)



(B)

Sequence ID: |c|3515 Length: 130 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 130 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
235 bits(127)	8e-66	129/130(99%)	0/130(0%)	Plus/Plus
GeneBank 2141	CCTCTGGAGCAAGAGGCGAGAGAGGTTCCCTGGCGAGCGTGGTGTGCAAGGTCCCCCTG			
OI 08 1	CCTCTGGAGCAAGAGGCGAGAGAGGTTCCCTGGCGAGCGTGGTGTGCAAGGTCCCCCTG			
GeneBank 2201	GTCCTGCTGGTCCCGAGGGGCCAACGGTGCTCCCGGCAACGATGGTGCTAAGGGTGATG			
OI 08 61	GTCCTGCTGGTCCCGAGGGGCCAACGGTGCTCCCGGCAACGATGGTGCTAAGGGTGATG			
GeneBank 121	CTGGTGCCCC			
OI 08 2261	CTGGTGCCCC			

(C)

Sequence ID: |c|1471 Length: 120 Number of Matches: 34

Range 1: 1 to 120 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
201 bits(511)	5e-64	Compositional matrix adjust.	119/120(99%)	119/120(99%)	0/120(0%)

GeneBank 661	QGVPGDLGAPGPPSGARGERGFPGERGVQPPPGAPRPGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGS	720
0108 1	QGVPGDLGAPGPPSGARGERGFPGER VQGGPPGAPRPGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGS	60
GeneBank 721	QGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGDRGDAGPKGADGSPGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAPGD	780
0108 61	QGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGDRGDAGPKGADGSPGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAPGD	120

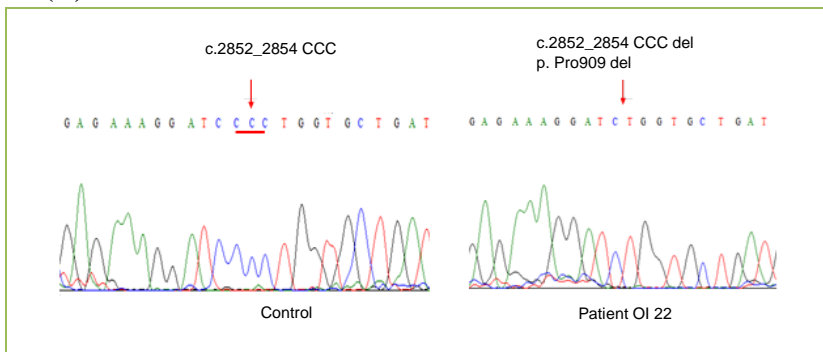
Figure 3.3. Photos G nucleotide substitution mutations into nucleotide T

Vertical arrow indicates the location mutations, the digits on the arrow pointing nucleotide and amino acid position changes. (A) Pictures sequenced exon 31 of the gene COL1A1; (B) Image G nucleotide substitution mutations into nucleotide T; (C) Photo mutations change the amino acid alanine amino acid glycine converted.

Comment: photos sequencing in patient OI08 showed heterozygous mutations of nucleotide substitution of nucleotide T G (G>T) in exon 31 of the COL1A1 gene. Compared to Genebank sequences found on exon 31, c.2183 G>T leads to changes in the amino acid position of the protein the gene COL1A1 p.686 from glycine amino acid converted into amino acid alanine (p.Gly686Ala).

Nucleotide deletions

(A)



3.2.1.2. Mutations occur in the introns

Some photos of mutation at splicing site

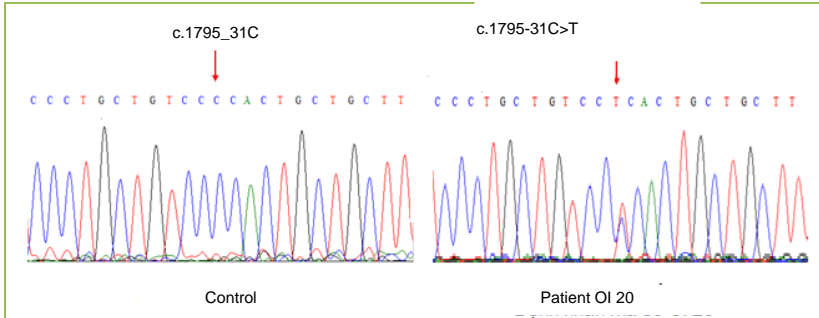


Figure 3.7. Photos of mutation at splicing site of the patient OI20

Vertical arrow indicates the location mutations, the digits on the arrow pointing nucleotide and amino acid position changes

Comment: COL1A1 gene sequence detects patient OI20 heterozygous mutated nucleotide C to T substitution at nucleotide position 31 from the left (intron 24) compared with starting nucleotide position 1795 of exon 25. This is an important position for splicing the genes in transcription (branch site).

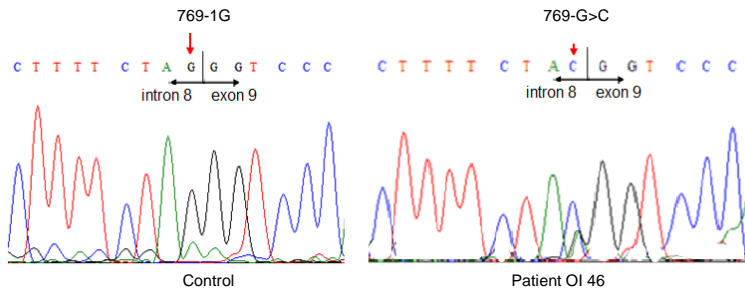


Figure 3.9. Photos of mutation at splicing site of the patient OI46

Vertical arrow indicates the location mutations, the digits on the arrow pointing nucleotide and amino acid position changes

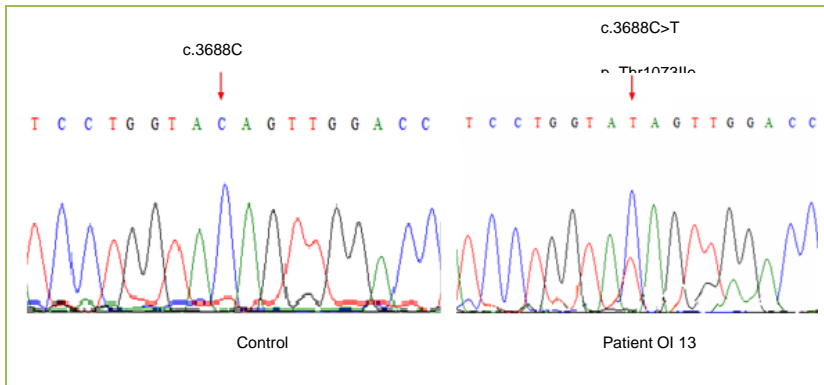
Comment: Good COL1A1 gene sequence detection codes OI46

patients heterozygous mutated nucleotide G to C substitution at nucleotide position by a leftward (intron 8) compared with the starting position is 769 nucleotides of exon 9. This position is important for gene splicing process of transcription (acceptor site).

3.2.2. The results identify genetic mutations COL1A2

PCR products continue to be sequenced to detect mutations. The results revealed that three patients have point mutations heterozygous form located in the exons.

(A)



(B)

Sequence ID: |c|20599 Length: 120 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 120 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	2e-60	119/120(99%)	0/120(0%)	Plus/Plus
GeneBank ₃₆₀₁	CCTGGCTCCGTGGGTCTGCTGGTCCTAGGGGCCCTGCTGGTCCTTCTGGCCCTGCTGGA			3660
OI13 ₁	CCTGGCTCCGTGGGTCTGCTGGTCCTAGGGGCCCTGCTGGTCCTTCTGGCCCTGCTGGA			60
GeneBank ₃₆₆₁	AAAGATGGTCGCACCTGGACATCCTGGTACAGTTGGACCTGCTGGCATTTCGAGGCCCTCAG			3720
GeneBank ₆₁	AAAGATGGTCGCACCTGGACATCCTGGTATAGTTGGACCTGCTGGCATTTCGAGGCCCTCAG			120

(C)

Sequence ID: cl 38897 Length: 120 Number of Matches: 42						
Range 1: 1 to 120 Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match			
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
222 bits(565)	2e-71	Compositional matrix adjust.	119/120(99%)	119/120(99%)	0/120(0%)	
GeneBank1021	1	GLKGHNGLQGLPGIAGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGPSGPAKGDRGTGHPGTVGPAGIR				1080
		GLKGHNGLQGLPGIAGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGPSGPAKGDRGTGHPG VGPAGIR				60
OI13	1081	GLKGHNGLQGLPGIAGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGPSGPAKGDRGTGHPGIVGPAGIR				
		GPQGHQGFAGPPGPPGPPGPPGVSGGGYDFGYDGDIFYRADQPRAPSRLRPKDYEVDTLTK				1140
GeneBank61		GPQGHQGFAGPPGPPGPPGPPGVSGGGYDFGYDGDIFYRADQPRAPSRLRPKDYEVDTLTK				120

Figure 3.11. Photos of nucleotide substitution mutations into nucleotide C T

Vertical arrow indicates the location mutations, the digits on the arrow pointing nucleotide and amino acid position change: (A) Photo sequenced exon 28 of the gene COL1A2; (B) Image of nucleotide substitution mutations into nucleotide C T; (C) Image mutations change the amino acid threolin converted into amino acid isoleucine.

Comment: Photos sequencing in patient OI13 showed heterozygous mutations replacing a nucleotide T nucleotides C (C>T) in exon 28 of the COL1A1 gene. Compared to Genebank sequences found in exon 28 c.3688C>T leads to changes in the amino acid position of the protein the gene COL1A2 p.1073 from threolin converted to isoleucine (p.Thr1073Ile).

3.2.3. Results mutation of COL1A1, COL1A2 genes

Table 3.2. Mutations of the gene COL1A1 and COL1A2

Gene mutations COL1A1, COL1A2	Mutations
COL1A1	39
COL1A2	3
Not detect mutations	8
Total	50

Comment: out of 50 patients with osteogenesis imperfecta, there are 42 patients with COL1A1 and COL1A2 gene mutations, in which, 39 patients with COL1A1 gene mutations, 3 patients with COL1A2 gene mutations and 8 patients undetected with COL1A1 and COL1A2 gene mutations

3.2.4. Results mutations in the exons, introns in gene COL1A1, COL1A2

Table 3.3. Rate exon and intron mutation on gene COL1A1, COL1A2

Results mutation	Mutations		Total
	COL1A1	COL1A2	
Exon region	13	3	16
Intron region	26	0	26
	39	3	42

Comment: 42 patients with osteogenesis imperfecta detected gene mutations COL1A1, COL1A2, 16 cases of mutations in the exons and intron regions in 26 cases.

3.2.4.1. Results mutations in COL1A1 gene exon region, COL1A2

Table 3.4. The mutation in exon region gene COL1A1, COL1A2

Mutations in exon	n		Total
	COL1A1	COL1A2	
Missense mutation	11	3	14
Stop codon	1	0	1
Nucleotide deletion	1	0	1
	13	3	16

Comment: 16 patients with mutated exon regions, including 14 patients with mutations of nucleotide substitution, 1 patient with stop codon and 1 patient with sudden loss of nucleotides.

3.3. The results identify genetic mutations COL1A1, COL1A2 on the patients' parents with osteogenesis imperfecta

42/50 patients diagnosed osteogenesis imperfecta based on clinical symptoms and access to typical clinical examination and treatment at the Central Children's Hospital have discovered gene mutations COL1A1, COL1A2. 42 pairs of the patients' parents were identified as having mutated genes COL1A1, COL1A2 were analyzed to find the mutation.

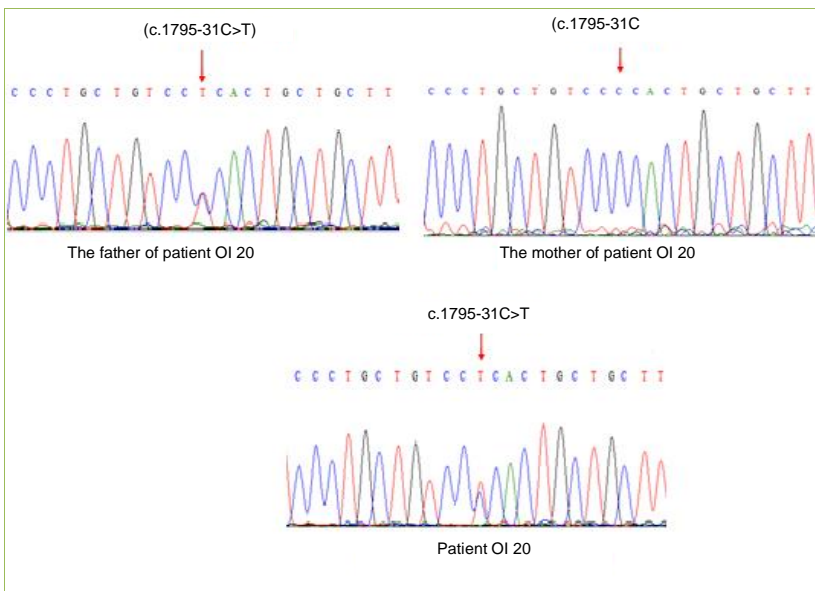


Figure 3.16. Photos of the COL1A1 gene sequencing of the patients' parents code OI20.

Vertical arrow indicates the location mutations, the digits on the arrow pointing nucleotide and amino acid position changes
 Comment: The results of analysis COL1A1 gene in the patient's family to see father OI20 mutant heterozygotes 1795-31C>T in intron 24, the mother did not have the mutation. Patients with mutations 1795-31C>T heterozygous in intron 24 by receiving a mutant allele from the father.

- Family code OI20 (after genetic analysis)

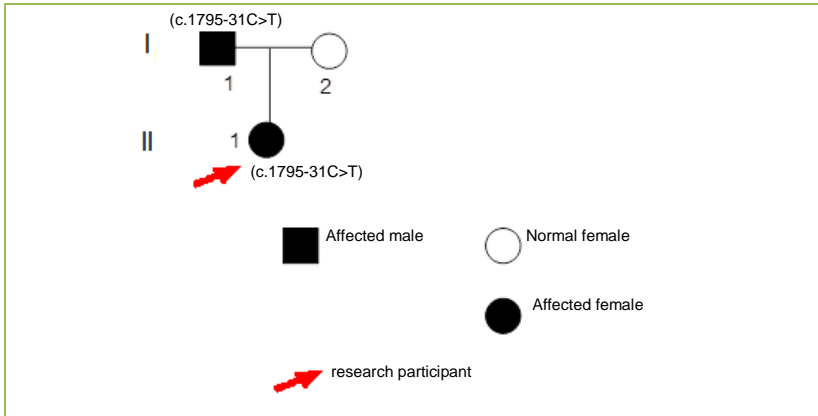


Figure 3.17. Chart family code OI20 (after genetic analysis)

Comment: After analyzing the COL1A1 gene in family members of patients, it showed no mutations in the mother, but heterozygous mutations in the father. Such patients have mutations OI20 code heterozygous mutant alleles by receiving one from the father.

Table 3.7. Gene mutations COL1A1, COL1A2 in patients with osteogenesis parental incompetence

Results	n
The father had mutations	20
The mother had mutations	21
The father/ mother no mutation	1
Total	42

Reviews: Analyzing gene COL1A1, COL1A2 from 42 pairs of parents of patients with osteogenesis imperfecta mutation showed 20/42 patients received mutation from the father, 21/42 patients received mutation from the mother and 1/42 patients with mutations arise.

Chapter 4

DISCUSSION

The results identify genetic mutations COL1A1, COL1A2 on patients' osteogenesis imperfecta

In many countries, as well as in the context of Vietnam at present it is contextually unable to do any cultured skin fibroblasts from patients. Besides, studies show that the world can detect 90% of gene mutations in type I collagen synthesis method of gene sequencing. Hence the determination of genetic mutations cause disease osteogenesis imperfecta is necessary. Analysis of COL1A1 and COL1A2 genes sequences value differential diagnosis of patients with similar disorders. In 2001, Ward and his colleagues analyzed the genomes of 33 patients with type I osteogenesis imperfecta ÷ Canadians with type IV, the authors have discovered most of the mutations is due to amino acid glycine to an amino acid other. In 2004, H. et al Hartikka conducted a genetic analysis of 54 patients with osteogenesis imperfecta, the authors have discovered 49 different mutations, including mutations in the gene COL1A1 38 and 11 mutations COL1A2 gene. In 2006, R. Pollitt and his colleagues conducted a genetic analysis on 83 English patients with osteogenesis imperfecta, the authors have discovered 62 different mutations in both genes. While the diagnosis of osteogenesis imperfecta still bases on clinical and X-rays, there is a growing demand for the molecular characterization of disease-causing mutations. Different studies show that over 90% of both gene mutations COL1A1 and COL1A2 disease osteogenesis imperfecta. In addition, mutations in other genes have not been detected in patients with osteogenesis imperfecta. In our

study, conducted genetic analysis on 50 patients with osteogenesis imperfecta discovered 42 different mutations in both genes. This is similar to the reports in the world, contributing to the analysis of mutations and prenatal diagnosis on a number of other genetic diseases including osteogenesis imperfecta disease to progress to build a regulation standard procedure in the diagnosis of genetic diseases in Vietnam and widely introduced to improve the quality of treatment and reduce morbidity in communities. In the case of type I collagen mutations can confirm diagnosis of osteogenesis imperfecta. However, in the absence of detectable mutation of the gene encoding collagen type I, the possibility exists of type I collagen mutations but undetectable. So there is no mutation of collagen type I also do not exclude disease osteogenesis imperfecta due to the small proportion of recessive mutations can occur in other genes as BMP1, CRTAP, FKBP10, LEPRE1, PLOD2, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, SP7.

COL1A1 gene mutations: Mutations are frequently changed forms account for 82% of amino acid mutations in COL1A1 gene structural break Gly-XY triplet sustainability leads to loss of protein; the other mutations, such as deletion, duplication, or additional nucleotides rarer. The study results showed that the group of 13 patients with osteogenesis imperfecta COL1A1 gene mutations occurring mutation in the COL1A1 gene coding for the protein, including 11 patients with mutations of nucleotide substitution, 1 patient with sudden premature end code generator and 1 patient with sudden loss of nucleotides.

Patients with osteogenesis imperfecta code OI23 heterozygous mutations replaces the nucleotides A nucleotide G (G> A) in exon 36 of the COL1A1 gene. Compared to Genebank sequences found on

exon 36 c.2587 G> A guide to change the amino acid at position p.821 of COL1A1 gene protein serine from glycine converted (p.Gly821Ser), is mutated published 13 times in Europe, Asia and the Americas at the rate of 11% of the total genetic mutation found in COL1A1. This mutation related to most of the disease osteogenesis imperfecta (I, II, III, IV).

When conducting the COL1A1 gene sequencing of patient numbers with primers OI22 exon 39 - exon 41 mutations detected lost three positions nucleotide C from 2852 to 2854 in exon 39 position (2852 ÷ 2854 CCC del) COL1A1 gene mRNA (NM_000088.3), making the trio at position 909 encoding the amino acid proline missing (p. Pro909del). Nucleotide deletions are common mutation is second after replacement mutations. On the data bank of sick world osteogenesis imperfecta, now has 176 nucleotide deletions are published; accounting for 13.58% of all mutations in COL1A1 gene mutation which has lost 147 nucleotides occurs in exon 14% of the mutations on exon. According to this study, the rate of loss of nucleotides in exon mutation is 1/50. However, due to the small sample size, we did not give the exact mutation rate in Vietnam.

11 COL1A1 gene mutations were found in patients with osteogenesis imperfecta in this study. While 5 mutations in intron regions, ie: gene coding region but not indispensable to perfection mRNA and conservation of genetic information. These mutations are within 1 to 40 nucleotides with the location of the 5' and 3' end of exon, that is located in the area (the donor site) and the receiver (acceptor site) of the intron. This is the second most important region, containing the specific motif associated with subunit protein complex - as U1 and U2 RNAs.

The results of our study revealed a mutation c.1795-31C> T heterozygous in intron 24 appeared in 5 patients. This mutant from the 5 'end of exon 25 of about 31 nucleotides may interfere with the cutting position between exon 24 and exon 25. However, according to statistics in a data bank of osteogenesis imperfecta ill most of the mutations disease osteogenesis imperfecta located in introns are located very near the 5 'or 3' end of exon. The mutations found in the position from the 5 'end of exon 25 to 31 nucleotides need to be checked accurately by RT-PCR to determine its influence on this process of improvement mRNA splicing. Specimens should be taken from where the skin or bone manifestations of patients, providing RNA extraction, cDNA synthesis; thereby performing RT-PCR and sequencing cDNA obtained.

Due to our study which was only done in a limited time, the the study just stopped at detecting mutations in the gene COL1A1, COL1A2 in the level of patient DNA. A heterozygous mutation in intron 36 is another c.2686-18G>C, occurring in 12 patients. Location mutations are from the 5 'end of exon 37 of about 18 nucleotides. This change may affect splicing process of exon 36 and exon 37 between.

COL1A2 gene mutations: COL1A2 gene coding for fiber pre-form either type 1 collagen is pro- α 2 (I). This gene contains 52 exons, in which the Level 3 helix formation with two fiber pro- α 1 (I) extends from exon 6 to exon 48. This region has the amino acid Gly-XY three X is the amino acid proline with and Y is the amino acid hydroxyproline, plays an important role in preserving the helix shape; change the amino acid would affect particular conservation. By means of direct sequencing, detection of pediatric patients 3

osteogenesis imperfecta COL1A2 gene mutation, missense mutations are nucleotide substitution C to T nucleotide at position 3688 of exon 48, making the trio in position encoding amino acid threonine 1073 transformed into the amino acid isoleucine (p.Thr1073Ile) as ternary helix structure can be changed.

This mutation has not been published in a data bank of sick disease osteogenesis imperfecta. Threonine is an amino acid containing a polarized by OH radicals and isoleucine is an amino acid non-polar nature; the nonpolar amino acid is located inside the core and wrapped helix outside the polarized amino acids, especially the Gly-XY triplet. Such those mutations change the amino acid threonine missense converted into amino acids isoleucine may cause structural disorders of procollagen C-terminal, reducing the quality and sustainability of this protein.

Results identified mutations in family members of patients with osteogenesis imperfecta

Most osteogenesis imperfecta disease is a genetic disease on chromosome usually excels. So, just who have a gene mutation alleles carrying could get sick. The father or the mother is sick, the ability of 50% childbirth disease osteogenesis imperfecta parent breeds. So far, most of the mutations in COL1A1 and COL1A2 genes cause osteogenesis imperfecta are separate and rarely appear in other families, reflecting the complex manifestations of the disease. The study found that 42 patients with osteogenesis imperfecta bearing COL1A1 or COL1A2 gene mutations; 20 cases inherited from the father (dad disease) and 21 cases inherited from the mother (maternal illness).

Only one case of disease osteogenesis imperfecta due to the new mutations arise, although the father and mother do not get sick, the child mutated COL1A1 gene. Osteogenesis imperfecta disease is a heterogeneous group of genetic disorders that affect the integrity of connective tissue. For osteogenesis imperfecta is a genetic disease can not be special treatment, cell therapy and gene therapy are being studied as potential treatments. Author Niyibizi C. and his colleagues are currently considering the possibility of developing gene therapy to treat a disease mouse models were created imperfecta bones, using bone marrow stromal cells as vehicles gene encoding collagen normally to the bone. Besides, the research results suggest that prenatal diagnosis is very important as well as genetic counseling for the purpose of exchange, answer the causes, mechanisms related to genetic diseases. We can say with some reputable counseling centers like Department of Genetics and Molecular Biology of the Central Children's Hospital has an intimate relationship with the physicians' clinical genetics, the consultants in the middle genetic counseling center in domestic reputation as Hanoi Medical University, Center for prenatal diagnosis at the Central Obstetrics Hospital. This study and other studies have been conducted at the Center for Gene - Protein, Hanoi Medical University genetic counseling to those suspected genetic condition or in families with an infected person genetic reasons, pregnant women are at risk bearing birth defects, are determined by fetal ultrasound or serum screening in the first trimester maternal or second trimester of pregnancy, in pregnant women brings over 35 years of age or family of the baby being born with birth defects.

CONCLUSION

Based on these results, researchers can conclude the following:

1. Mutated gene COL1A1 and COL1A2 gene in patients with osteogenesis imperfecta

- 42 patients with COL1A1 and COL1A2 gene mutations, in which, 39 patients with COL1A1 gene mutations, 3 patients with COL1A2 gene mutations and 8 patients undetected with COL1A1 and COL1A2 gene mutations

- The genetic mutation on COL1A1 and COL1A2 genes:

+ In the region of exon: 14 mutations of nucleotide substitution, 1 stop codon and 1 nucleotide deletions.

+ In the region of intron: 26 mutations at splicing sites.

2. Mutated gene COL1A1 and COL1A2 gene in the parents' patients with osteogenesis imperfecta

20/42 patients received mutation from the father, 21/42 patients received mutation from the mother and 1/42 patients with mutations arise.

