

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hemophilia hay còn gọi là bệnh rối loạn đông máu. Đây là một bệnh di truyền do thiếu hụt hay bất thường chức năng của các yếu tố đông máu huyết tương, như các yếu tố VIII, IX hay XI. Bệnh đặc trưng bởi thời gian đông máu kéo dài và tăng nguy cơ chảy máu; biểu hiện lâm sàng chủ yếu là xuất huyết, xuất huyết có thể tự nhiên hoặc sau chấn thương nhẹ. Đặc điểm xuất huyết là đám máu bầm dưới da, tụ máu trong cơ, chảy máu ở các khớp. Tỷ lệ mắc ở các nước có thể là khác nhau nhưng tần suất chung khoảng 30-100/1.000.000 dân [1]. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về bệnh hemophilia và dự kiến sẽ có khoảng 550.000 người bị bệnh hemophilia vào năm 2020, ở Việt Nam hiện nay có khoảng 6000 bệnh nhân trong đó chỉ có 30% được phát hiện và điều trị [2].

Hemophilia là bệnh di truyền lặn liên quan đến giới tính, gen bệnh nằm trên nhiễm sắc thể X. Người mẹ mang gen bệnh có khả năng truyền bệnh cho 50% con trai của họ, do vậy chủ yếu bệnh nhân là nam. Có 3 loại hemophilia, sự giảm yếu tố VIII gây ra bệnh hemophilia A, thiếu hụt yếu tố IX gây hemophilia B và bất thường yếu tố XI sẽ gây bệnh hemophilia C. Trong đó hemophilia A chiếm 80-85%, hemophilia B chiếm 15-20%, hemophilia C chiếm tỉ lệ rất ít, phổ biến chủ yếu ở người Do Thái với tỉ lệ mắc đồng hợp tử khoảng 1-3‰ người Do Thái [3]. Ở bệnh nhân thể nặng, nồng độ protein yếu tố VIII trong máu rất thấp, chỉ  $\leq 1\%$  so với người bình thường (nồng độ yếu tố VIII bình thường là 200 ng/ml).

Việt Nam là một nước có tỉ lệ mắc bệnh hemophilia A trong cộng đồng khá cao. Theo nghiên cứu của Đỗ Trung Phần và cộng sự năm 1996 tỷ lệ mắc bệnh khoảng 25 – 60/1.000.000 người [4], trong khi đó phương pháp điều trị

hiện nay ở nước ta 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%) [5].

Ở Việt Nam, đã có nhiều công trình nghiên cứu về bệnh hemophilia A, chủ yếu là các 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.

Do vậy, đề tài này được thực hiện với hai mục tiêu:

- 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.***

## **Chương 1**

### **TỔNG QUAN**

#### **1.1. LỊCH SỬ NGHIÊN CỨU BỆNH HEMOPHILIA A**

Từ thời kỳ cổ đại loài người đã biết đến bệnh máu khó đông, tuy nhiên không có tên gọi chính thức cho nó. Trong các văn tự cổ của người Do thái từ thế kỷ thứ II trước công nguyên đã miêu tả những đứa trẻ chết do chảy máu không cầm được sau khi cắt bao quy đầu (theo tục lệ của người Do Thái: trẻ em trai sinh ra được cắt bao quy đầu). Bác sỹ người Ả rập- Albucasis cũng miêu tả những đứa trẻ bị chết do chảy máu vì những vết thương nhỏ. Bệnh máu khó đông được nhận thấy là có tính di truyền hàng trăm năm qua các thế hệ trong một gia đình. Vào những năm 1880 người ta đã phát hiện bệnh máu khó đông di truyền liên kết với giới tính, các nhà khoa học nhận thấy chỉ có nam giới mắc bệnh và không có khả năng truyền bệnh cho con trai, người mẹ mang gen bệnh và truyền cho con trai mình.

Bệnh hemoliphia còn được biết đến như căn bệnh của hoàng gia vì nữ hoàng Anh Victoria (1838-1901) mang gen bệnh này và truyền bệnh cho nhiều Hoàng Gia khác [6].

Xu hướng chảy máu của bệnh ưa chảy máu ban đầu được cho là do thành mạch yếu, dễ bị vỡ khi tổn thương. Vào những năm 30 của thế kỉ XX, bất thường của tiểu cầu được cho là nguyên nhân có khả năng nhất gây bệnh ưa chảy máu. Năm 1937, Patek và Taylor phát hiện ra rằng họ có thể kiểm soát những khiếm khuyết của quá trình đông máu bằng cách thêm một chất chiết xuất từ huyết tương, chất này được gọi là globulin chống chảy máu. Năm 1944, Pavlosky nghiên cứu ở Buenos Aires cho thấy máu của một bệnh nhân hemophilia có thể điều trị triệu chứng rối loạn đông máu của bệnh nhân hemophilia khác và ngược lại, khi tình cờ ông gặp hai bệnh nhân bị thiếu hụt

hai protein khác nhau - yếu tố VIII và yếu tố IX [7]. Những phát hiện này cho phép chẩn đoán chính xác và xây dựng cơ sở khoa học cho việc điều trị bệnh rối loạn đông máu di truyền.

## **1.2. BỆNH HỌC BỆNH HEMOPHILIA A**

### **1.2.1. Bệnh hemophilia A**

Bệnh hemophilia A là bệnh rối loạn đông máu di truyền do khiếm khuyết gen tổng hợp yếu tố VIII dẫn đến giảm nồng độ hoạt tính yếu tố VIII trong máu [8].

#### ***1.2.1.1. Đại cương về đông máu***

Đông máu là một quá trình máu chuyển từ thể lỏng thành thể đặc, do sự chuyển fibrinogen thành fibrin không hòa tan. Các sợi fibrin sẽ trùng hợp với nhau tạo ra mạng lưới fibrin giam giữ các thành phần của máu và máu sẽ đông lại. Cục máu đông hình thành sẽ có tác dụng bịt kín chỗ tổn thương [9].

Bình thường trong máu và trong mô có chất gây đông và chất chống đông, những chất gây đông ở dạng tiền chất không hoạt động nên máu không đông được. Khi mạch máu bị tổn thương sẽ hoạt hóa các yếu tố đông máu làm cho máu đông lại.

#### ***1.2.1.2. Các yếu tố đông máu***

Hội nghị quốc tế năm 1959 về đông máu, đã quy định tên gọi của các yếu tố đông máu bằng các chữ số La mã. Có 12 yếu tố đông máu:

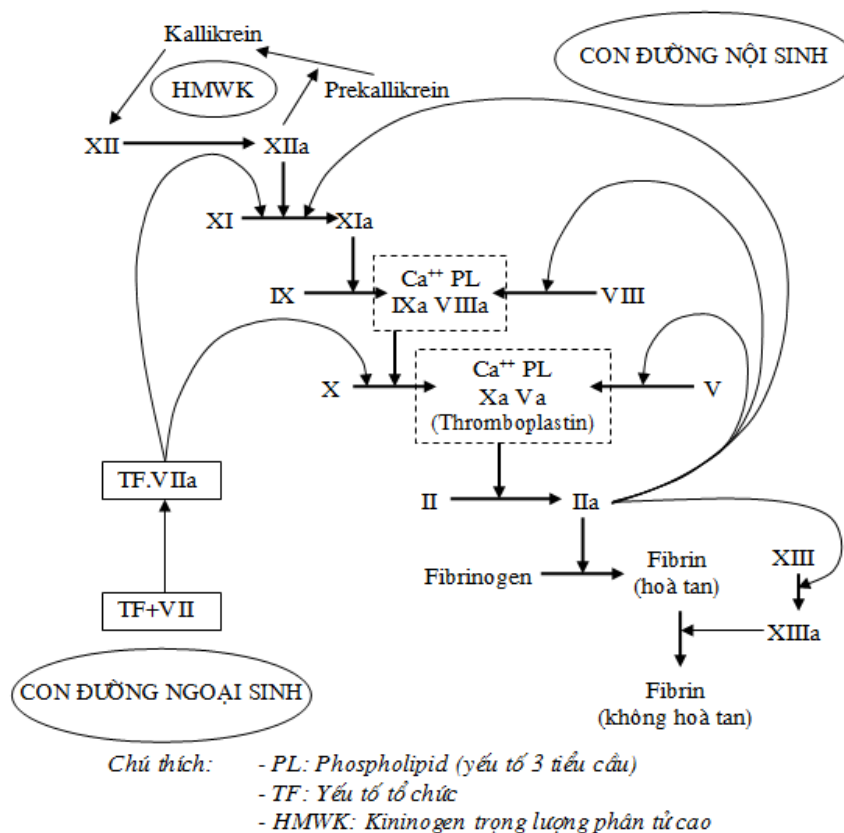
- Yếu tố I: Fibrinogen
- Yếu tố II: Prothrombin
- Yếu tố III: Prothrombin của mô hoặc các yếu tố mô
- Yếu tố IV: Ion canxi
- Yếu tố V: Proaccelerin (yếu tố không ổn định)
- Yếu tố VII: Proconvectin (yếu tố ổn định)
- Yếu tố VIII: Yếu tố chống hemophilia
- Yếu tố IX: Yếu tố chống hemophilia B (yếu tố Christmas)

- Yếu tố X: Yếu tố Stuart
- Yếu tố XI: Yếu tố tiền thromboplastin huyết tương  
(Yếu tố chống hemophilia C)
- Yếu tố XII: Yếu tố Hageman- yếu tố chống hemophilia D  
(Yếu tố ổn định fibrin)

Gần đây, đã phát hiện hai protein của huyết tương mới được xếp vào các nhóm yếu tố đông máu huyết tương:

- Prekallikrein.
- Kininogen trọng lượng phân tử cao.

Quá trình đông máu của huyết tương là sự kết hợp giữa hai con đường đông máu nội sinh và đông máu ngoại sinh. Các hoạt động kế tiếp nhau của các enzym trong chuỗi các phản ứng nối tiếp dẫn tới hình thành thrombin và chuyển fibrinogen thành fibrin, trong đó yếu tố VIII tham gia như một đồng yếu tố.



**Hình 1.1. Sơ đồ đông máu theo con đường nội và ngoại sinh [10]**

### 1.2.1.3. Chẩn đoán bệnh hemophilia A

#### a/ Chẩn đoán xác định

- Tiền sử gia đình có người mắc bệnh.
- Triệu chứng lâm sàng: thể hiện khác nhau giữa các bệnh nhân, nhưng 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 càng nặng thì triệu chứng xuất huyết xuất hiện càng sớm. 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. Bệnh nhân có thể chảy máu từ 20 – 30 lần/ năm; chảy máu có thể tự phát hoặc sau một chấn thương nhỏ. Tuy nhiên, chảy máu từ vết cắt hoặc vết trầy xước được cầm máu tương đối nhanh chóng. Đây là nguyên nhân phổ biến bệnh nhân hemophilia A có thể chảy máu đến chết sau một chấn thương nhỏ. Vấn đề khó khăn nhất ở các bệnh nhân này chính là chảy máu trong nội tạng. Chảy máu có thể xảy ra sau chấn thương hoặc tiêm vaccin (Hình 3A). Tổn thương nhẹ ở các thành mạch nhỏ có thể dẫn đến xuất huyết não hoặc mô mềm (Hình 3B, C) dẫn đến biến chứng nghiêm trọng.



**Hình 1.2. Hình ảnh tổn thương ở những bệnh nhân hemophilia A [11]**

*A: Tổn thương bầm tím (h) khi trẻ tập lẫy dẫn đến sự nghi ngờ bệnh rồi loạn đông máu ở trẻ 4 tháng tuổi.*

*B: Chảy máu vào các mô mềm xung quanh mắt trái ở bệnh nhân 1 tuổi.*

*C: Xuất huyết nội tạng (khớp vai và khớp háng) ở bệnh nhân 4 tuổi.*

Điều trị nhanh chóng để chấm dứt chảy máu là quan trọng đối với việc bảo tồn các khớp, sự hiện diện của máu trong ổ khớp dễ dẫn đến viêm màng hoạt dịch cấp tính. Các trường hợp chảy máu lặp đi lặp lại nhiều lần trong ổ khớp sẽ vượt quá khả năng loại bỏ các xâm nhập của đại thực bào và dẫn đến màng hoạt dịch bị phá hủy tiến tới hỏng khớp [11].

- 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 (FVIII) giảm hoặc không có.

+ Xét nghiệm DNA phát hiện đột biến gen F8.

+ Yếu tố Von- Willebrand bình thường.

+ Số lượng tiểu cầu bình thường.

#### *b/ Chẩn đoán thể bệnh hemophilia A theo mức độ yếu tố VIII*

Bình thường nồng độ FVIII ở người là 200 ng/ml. Trường hợp bị bệnh, lượng yếu tố VIII giảm dưới 30%. Hemophilia A được chia làm ba thể: nặng, trung bình và nhẹ.

+ Thể nặng: hoạt tính FVIII dưới 1%, những bệnh nhân này thường bị chảy máu vài lần trong tháng.

+ Thể trung bình: hoạt tính FVIII từ 1-5%, những bệnh nhân này chỉ bị chảy máu sau những chấn thương nhẹ.

+ Thể nhẹ: hoạt tính FVIII từ 5-30% so với mức bình thường, những người này chỉ bị chảy máu sau phẫu thuật hoặc những chấn thương nặng, sau những động tác mạnh khi chơi thể thao [12].

#### *c/ Chẩn đoán phân biệt*

- Bệnh Von-Willebrand:

+ Bệnh di truyền nhiễm sắc thể thường nên gặp ở cả nam và nữ.

+ Chủ yếu chảy máu ở niêm mạc.

- + Thời gian máu chảy kéo dài.
- + Yếu tố VIII: C thấp hơn 30%.
- + Yếu tố vWF: Ag giảm.
- + Ngung tập tiểu cầu giảm.
- Hemophilia mắc phải:
  - + Cơ chế bệnh sinh: do cơ thể người trưởng thành sinh ra tự kháng thể gây bất hoạt FVIII.
  - + Bệnh gặp ở độ tuổi trung niên, gặp cả ở nam và nữ.
  - + Biểu hiện chính là xuất huyết ở da và mô mềm; có thể đái ra máu, xuất huyết dạ dày-ruột, xuất huyết hậu sản kéo dài; ít gặp xuất huyết ở khớp.
  - + Xét nghiệm: APTT kéo dài, FVIII thấp hơn 30%, có chất ức chế FVIII theo thời gian; số lượng tiểu cầu bình thường.
- Những rối loạn di truyền khác gây kéo dài APTT: bao gồm giảm yếu tố XI, XII, prekallikrein và kininogen trọng lượng phân tử cao, phân biệt dựa vào định lượng yếu tố VIII, IX.
- Bệnh lý lưu hành kháng yếu tố VIII và yếu tố IX: trong một số bệnh tự miễn (lupus) APTT kéo dài, nồng độ yếu tố VIII, IX giảm. Phân biệt bằng cách trộn huyết tương bệnh nhân với huyết tương người bình thường, APTT không được cải thiện trong trường hợp có kháng đông lưu hành.
- Rối loạn đông máu do tăng tiêu thụ yếu tố đông máu: gặp ở cả nam và nữ, thường là biểu hiện rối loạn đông máu do một số bệnh khác như nhiễm trùng, chấn thương nặng; ngoài giảm yếu tố VIII, các yếu tố khác cũng giảm do tăng tiêu thụ.



#### **1.2.1.4. Điều trị thay thế FVIII**

##### *a/ Huyết tương tươi đông lạnh*

Huyết tương tươi đông lạnh được chiết tách từ máu tươi toàn phần trong thời gian < 6 tháng kể từ khi lấy ra khỏi cơ thể người cho, sau đó bảo quản ở nhiệt độ - 30<sup>0</sup> C. Nồng độ FVIII trong huyết tương tươi đông lạnh vào khoảng 0,6 – 0,8 đơn vị/ml [6]. Vì vậy, để truyền cho bệnh nhân hemophilia A thì thể tích đưa vào lớn, nguy cơ lây nhiễm các bệnh truyền qua đường máu cao [13].

##### *b/ Tủa lạnh yếu tố VIII (tủa VIII, cryoprecipitate)*

Tủa lạnh yếu tố VIII được điều chế bằng cách làm tan huyết tương tươi đông lạnh ở 4<sup>0</sup>C, ly tâm lấy tủa và hòa tan trong 10- 15 ml huyết tương. Tuy nhiên, tủa lạnh FVIII cũng chưa tinh khiết, còn nguy cơ lây nhiễm các bệnh truyền qua đường máu [14].

##### *c/ Yếu tố VIII cô đặc*

Yếu tố VIII cô đặc được sản xuất từ huyết tương sau đó cô đặc và bất hoạt virus, có thời gian bán hủy là 12-18 giờ. Các sản phẩm này đã hạn chế được việc lây lan các bệnh truyền máu qua đường máu, tuy nhiên chưa loại trừ được 100% các nguy cơ này. Sản phẩm FVIII cô đặc dễ bảo quản nhưng quá trình sản xuất đòi hỏi phải có trang thiết bị, giá thành sản phẩm cao.

##### *d/ Yếu tố VIII tái tổ hợp*

Yếu tố VIII tái tổ hợp được sản xuất từ kháng thể đơn dòng. Sản phẩm có hiệu quả cao trong điều trị do có hàm lượng FVIII cao. Điều trị an toàn, không có khả năng lây truyền các bệnh qua đường máu. Tuy nhiên, sản phẩm có giá thành khá cao, bảo quản khó khăn (ở -20<sup>0</sup>C) nên chế phẩm này chỉ có sẵn ở những trung tâm hay bệnh viện lớn [15].

##### *e/ Liệu pháp điều trị gen*

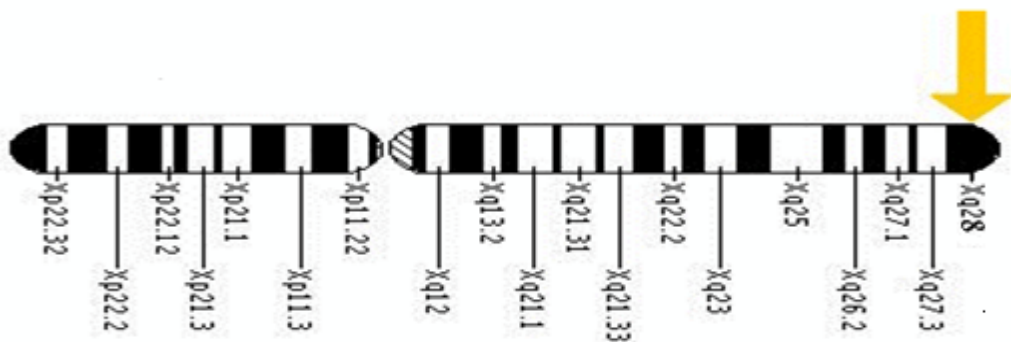
Phương pháp điều trị gen đã được nghiên cứu thông qua quá trình chuyển đoạn DNA mã hóa đoạn gen FVIII vào cơ thể người bệnh. Điều trị

bệnh ưa chảy máu bằng liệu pháp gen hứa hẹn nhiều lợi ích vì bệnh được gây ra bởi khiếm khuyết gen, có thể điều trị để biến đổi một dạng bệnh từ thể nặng thành thể nhẹ của bệnh ưa chảy máu. Sử dụng liệu pháp gen có thể kích hoạt lên đến 150% hoạt động của FVIII [16]. Với nguồn cung cấp liên tục của các sản phẩm gen, liệu pháp gen có thể chữa khỏi bệnh ưa chảy máu. Hiện nay các nghiên cứu thực nghiệm trên chuột và chó đã chứng minh sự thành công khi sử dụng liệu pháp gen điều trị [17]. Các nghiên cứu thực nghiệm lâm sàng đang được tiến hành.

## 1.2.2. Vị trí, cấu trúc, chức năng của gen F8

### 1.2.2.1. Vị trí và cấu trúc của gen F8

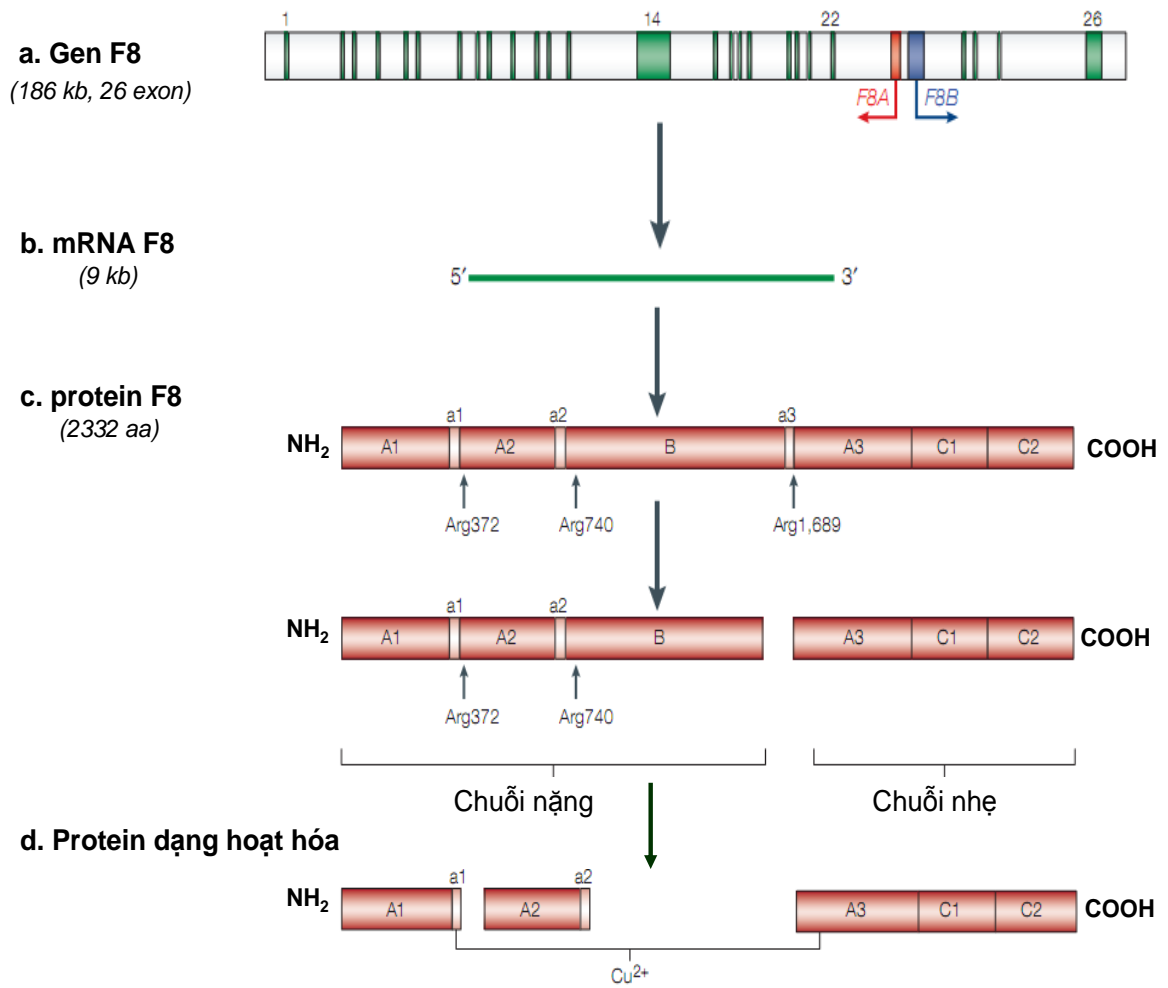
Gen quy định tổng hợp FVIII nằm ở vị trí Xq28 trên NST giới tính X.



**Hình 1.3. Vị trí của gen tổng hợp FVIII [18].**

### 1.2.2.2. Chức năng của gen F8

Gen F8 là một trong những gen lớn nhất cơ thể, có kích thước 186 kb gồm 26 exon trong đó 24 exon có kích thước từ 62 bp - 262 bp và 2 exon lớn nhất exon 14 (3106 bp) và exon 26 (1958 bp) [18], [19] (Hình 1.3).



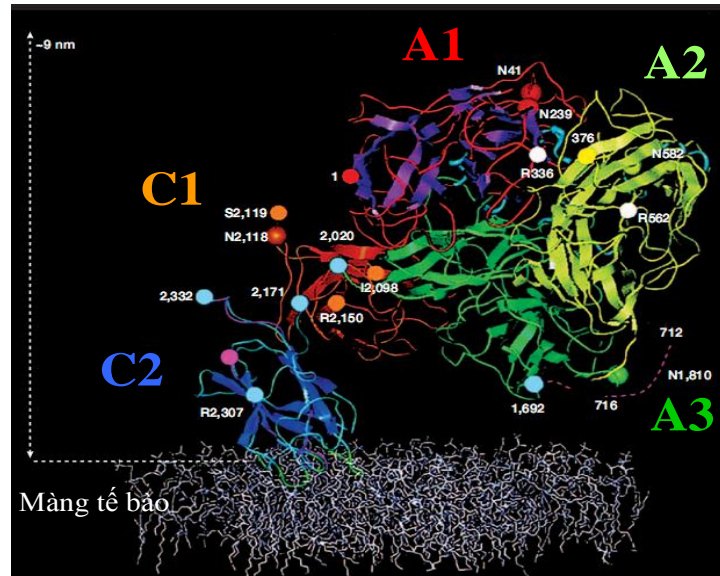
**Hình 1.4. Cấu trúc gen và protein FVIII [19]**

a) Gen F8 bao gồm 25 intron và 26 exon trong đó phần lớn exon 26 mã hóa cho vùng 3' UTR; vùng intron 22 chứa 2 gen F8A và F8B. b) Phân tử mRNA được phiên mã có kích thước 9 kb và các bước hoàn thiện phân tử protein F8 thành một FVIII hoàn chỉnh được hoạt hóa c),d).

Protein FVIII là một glycoprotein lớn có chức năng như một đồng yếu tố cần thiết cho sự kích hoạt phân giải protein của yếu tố X kích hoạt bởi yếu tố IX trong con đường đông máu nội sinh. Gen F8 mã hóa cho protein FVIII gồm 2332 acid amin và có trọng lượng phân tử khoảng 300 kD. Chuỗi nặng có kích thước 200 kD trong một phức hợp ion kim loại, với chuỗi nhẹ có kích

thước 80 kD [20]. FVIII được tổng hợp như một polypeptid chuỗi đơn với cấu trúc vùng A1- a1- A2-a2-B-a3-A3- C1-C2 với chữ in nghiêng biểu thị chuỗi nặng vùng có tính acid và peptid hoạt hóa chuỗi nhẹ. Cấu trúc này cũng tương đồng với yếu tố V. Cấu trúc của phức hợp này được giữ ổn định nhờ sự tương tác giữa các liên kết ưa nước và kỵ nước với yếu tố von Willebrand (vWF - là một kháng nguyên liên quan đến yếu tố VIII) và  $Ca^{2+}$  [21], [22]. Chuỗi nặng có đầu cuối là N, gồm các vùng A1-A2-B, chuỗi nhẹ có đầu cuối là C, gồm các vùng A3-C1-C2 [23], [24] (Hình 1.4). Các vùng A chia sẻ 35% đến 40% tính acid và tương đồng với ceruloplasmin và yếu tố V. Vùng C cũng hiển thị 35-40% tính acid và tương đồng với các protein có khả năng ràng buộc phospholipid mang điện tích âm, cho thấy một vai trò trong tương tác phospholipid.

Vùng B được mã hóa bởi một exon lớn và không có sự tương đồng với bất kỳ gen nào đã biết. Khi thủy phân hoàn toàn vùng B tạo thành Asparagin, Serin và Threonin [19]. Vùng B không cần cho chức năng của FVIII và sau quá trình dịch mã, vùng B bị cắt khỏi chuỗi nặng của FVIII [25]. FVIII được sản xuất chủ yếu từ tế bào gan, ngoài ra còn sản xuất tại thận, lách. Hàm lượng FVIII trong huyết tương thấp (20-50 mg/ml). Đầu tiên, FVIII được tổng hợp như một chuỗi đơn gồm 2351 acid amin ở lưới nội bào, sau đó được chuyển vào thể Golgi [26]. Tại đây đã xảy ra các phản ứng để hình thành phân tử của FVIII. Nó được lưu thông dưới dạng tiền “cofactor” không hoạt động. FVIII được hoạt hóa nhờ quá trình xúc tác phân giải bởi thrombin hoặc yếu tố Xa với nguyên lý hoạt động cắt yếu tố VIII ở vị trí Arg 372 (chỗ nối A1-A2), vị trí Arg 740 (chỗ nối A2-B) và vị trí Arg 1689 (chỗ nối B-A3) (Hình 1.4 và 1.5). Khi vùng A2 tương tác với phức hợp A1/A3-C1-C2 thì FVIII thực sự được hoạt hoá.



**Hình 1.5. Mô hình cấu trúc phân tử 3-D của yếu tố VIII hoàn chỉnh [19].**

Vùng A (A1, A2, A3) là nơi bám của các ion  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  và các yếu tố IX, X trong quá trình đông máu. Vùng C (C1, C2) là vị trí bám cho yếu tố vWF, X và của các phân tử phospholipid một khi FVIII được hoạt hóa. Vùng B chứa vị trí cắt của thrombin đã được loại bỏ trong phân tử FVIII trong quá trình hoạt hóa FVIII.

Khi gen F8 bị đột biến, tế bào giảm hoặc mất khả năng tổng hợp protein FVIII gây nên bệnh hemophilia A [25].

### 1.2.2.3. Vai trò FVIII trong đông – cầm máu

FVIII bình thường có 3 hoạt tính: điều chỉnh thời gian đông huyết tương đó là đặc trưng của VIII: C; bị tủa bởi một kháng thể dị loại đặc biệt, hoạt tính này mang tên là VIII – R: Ag (Factor VIII Related Antigen: kháng nguyên liên quan yếu tố VIII); điều chỉnh thời gian chảy máu ở người bị Willerbrand gọi là hoạt tính VIII – R: WF (Factor VIII Related Willebrand). Ngày yếu tố VIII càng được coi như 1 chất trung gian quan trọng trong các phản ứng giữa tiểu cầu và thành mạch, do đó nó có vai trò gây ra xơ vữa động mạch.

Hoạt tính VIII: C ứng với yếu tố được gọi là kháng hemophilia A là yếu tố được kiểm soát bởi gen nằm trên thể nhiễm sắc X. Đây là yếu tố thu hoạch được khi tủa lạnh, giúp vào việc hoạt hóa yếu tố X bởi yếu tố IXa trong đông máu nội sinh, yếu tố này bị trung hòa bởi một kháng thể lưu hành có ở một số người bị hemophilia A [27].

Hoạt tính VIII – R : Ag khi tiêm FVIII tinh khiết vào người hemophilia A thì sẽ tạo được kháng thể chống VIII : C. Ở người bị bệnh hemophilia A kháng nguyên VIII – R : Ag vẫn bình thường, như vậy là hoạt tính VIII : C, VIII – R : Ag không cùng có một cấu trúc protein như nhau. Người ta cho rằng sự tổng hợp VIII – R : Ag được kiểm soát bởi 1 gen nằm trên thể nhiễm sắc thường [28].

Hoạt tính của Von – Willebrand hay yếu tố VIII – R: WF đó là 1 yếu tố huyết tương mà thiếu nó được coi như do một sự thiếu hụt của tiểu cầu hoặc thành mạch [29].

Cả 3 yếu tố trên tạo thành một phức hệ đại phân tử, dùng enzym để phân lập có thể tách được thành những đơn vị có hoạt tính VIII – R : Ag, VIII – R : WF còn VIII : C thì lượng ít hơn.

Đối với hemophilia A người ta biết rằng ở những người bệnh này vị trí kháng nguyên của yếu tố VIII vẫn bình thường vì nó tuy phản ứng với kháng thể nhưng vị trí hoạt tính thì tổng hợp không bình thường, có thể là do một acid amin thiếu hoặc bị thay thế hoặc bị ức chế [30].

### **1.2.3. Bệnh học phân tử bệnh hemophilia A**

Cơ sở phân tử của hemophilia A được phân tích trong nhiều năm và rất nhiều dạng đột biến gen F8 gây bệnh đã được công bố. Các nghiên cứu khẳng định dạng đột biến khác nhau sẽ gây những kiểu hình đặc trưng khác nhau [18]. Bệnh nhân hemophilia A thể nặng thường gặp dạng đột biến đảo đoạn intron 22 (chiếm 45-50%), trong khi đó đột biến điểm chiếm đa số ở bệnh nhân hemophilia A thể bệnh vừa và nhẹ 90-95% [5].

### **1.2.3.1. 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 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 [31]. 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 [32]. Đột biến này hiếm gặp hơn so với đảo đoạn intron 22, chiếm khoảng 1,5% bệnh nhân nặng [33],[34].

**Đột biến mất đoạn và chèn đoạn lớn:** đột biến mất đoạn lớn chiếm 2-5% bệnh nhân hemophilia A thể nặng [35]. Có thể mất 1 exon hoặc mất toàn bộ gen [36]. 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 [37], [38], [39]. Đột biến chèn đoạn lớn và hiện tượng Alu làm đứt gãy gen F8 và gây hemophilia A thể nặng [40], [41].

**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. Đột biến tại vị trí nối intron và exon đã được các tác giả công bố. Nhiều đột biến thay thế ảnh hưởng đến dinucleotid CpG được phát hiện trên một số bệnh nhân, ví dụ đột biến c.6496C>T dẫn đến chuyển thành Arg2147X (Tại vị trí 6496 trên trình tự Genebank nucleotid C

thay bằng nucleotid T làm thay đổi protein Arginine ở vị trí 2147 tạo thành stop codon) [42]. Mất đoạn và chèn đoạn nhỏ cũng thường thấy trong hemophilia A thể nặng, thay đổi từ 1-55 nucleotid. Phổ biến nhất là mất hoặc chèn nucleotid A vào exon 14 [43], thường xảy ra trong vùng từ c.3637 đến c.4379 [42].

### **1.2.3.2. 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 [5].

### **1.2.4. Mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình**

Thông thường, các trường hợp nam giới bị đột biến gen F8 thể nặng gây bệnh hemophilia A trong cùng một gia đình có những biểu hiện lâm sàng nặng nề tương tự nhau. Tuy nhiên, hiệu ứng di truyền và môi trường khác nhau có thể thay đổi mức độ biểu hiện lâm sàng của bệnh [44].

Các nghiên cứu đã chỉ ra 10-15% bệnh nhân với “kiểu hình đặc trưng” chảy máu mức độ nặng (khi nồng độ FVIII hoạt động <1%) có biểu hiện triệu chứng tương đối nhẹ trên lâm sàng [45], [46], [47]. Không phải tất cả những bệnh nhân hemophilia A thể nặng thường xuyên chảy máu tự phát, thậm chí trong số những người bị chảy máu, mức độ nặng của bệnh cũng khác biệt đáng kể. Cơ sở cho sự khác biệt này vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn [48], [49].

#### **1.2.4.1. Mối liên quan giữa đột biến trên gen F8 và kiểu hình lâm sàng**

Đột biến gen F8 là yếu tố quyết định quan trọng nhất của kiểu hình trong bệnh hemophilia A [49], [48].

Đột biến gặp thường xuyên nhất trên bệnh nhân hemophilia A thể nặng là đột biến đảo đoạn intron 22 và intron 1 với biểu hiện kiểu hình chảy máu mức



độ nặng nề. Đột biến mất đoạn gen lớn quan sát thấy trong khoảng 5% số bệnh nhân hemophilia A thể nặng. Các trường hợp hemophilia A thể nặng còn lại và tất cả các trường hợp hemophilia A thể trung bình và thể nhẹ là kết quả của nhiều đột biến điểm, đột biến thêm/mất đoạn nhỏ chiếm một phần ba số trường hợp [45], [50]. Đột biến vô nghĩa tạo stop codon chiếm số lượng lớn những bệnh nhân có biểu hiện lâm sàng nặng nề. Đột biến ở vị trí nối giữa exon và intron thường biểu hiện triệu chứng nặng nề nhưng có thể có những trường hợp biểu hiện kiểu hình của một bệnh nhân thể nhẹ, tùy thuộc cụ thể vào từng vị trí nối exon-intron [51]. Các vị trí đột biến trong gen F8 đã được mô tả trong các quần thể khác nhau, ở các nhóm dân số cụ thể cho thấy: không có vùng chỉ điểm hay gặp các đột biến trong gen F8, ngoại trừ trường hợp đột biến đảo đoạn intron 22 và intron 1 gặp trong hemophilia A thể nặng [52].

#### ***1.2.4.2. Mối liên quan giữa đồng thừa kế gen thrombophilia và kiểu hình lâm sàng***

Trong bệnh hemophilia A thể nặng, đột biến gen thrombophilia có thể đóng vai trò quan trọng trong biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn [53]. Đột biến gen thrombophilia trong bệnh hemophilia A dẫn đến kiểu hình nhẹ hơn được mô tả bao gồm thiếu hụt protein C, protein S và kháng thể thrombin, yếu tố V Leiden, tetrahydrofolate... [53], [54], [55].

Năm 2001, Ettingshausen và cộng sự [56] đã nghiên cứu 92 bệnh nhân hemophilia A thể nặng, trong đó báo cáo một số trường hợp đột biến có các yếu tố liên quan đến gen thrombophilia (6 trường hợp đột biến yếu tố V Leiden, 1 trường hợp thiếu protein C). Các trường hợp này đã trì hoãn khởi phát triệu chứng chảy máu (1,6 năm so với 0,9 năm). Các nghiên cứu khác mô tả tác dụng bảo vệ của gen (đột biến yếu tố V Leiden [57] và protein S [57], protein S [58], [59]) làm giảm tần số chảy máu hàng năm và mức độ nghiêm trọng của bệnh khớp ở bệnh nhân hemophilia A.

Có ý kiến cho rằng các đột biến prothrombin có thể bù đắp cho mức độ yếu tố VIII thấp, dẫn đến hoạt hóa thrombin hiệu quả hơn và tiếp theo là sự suy giảm của triệu chứng lâm sàng của bệnh [53], [55].

Tuy nhiên, mối liên quan giữa các gen prothrombin và bệnh hemophilia A thể nhẹ đã không được xác nhận bởi các nghiên cứu khác [47], [60]. Yếu tố nguy cơ prothrombin dường như ảnh hưởng đến kiểu hình nhưng có thể chỉ một phần nhỏ. Nhiều nghiên cứu cho rằng nguồn gốc của tính không đồng nhất của các kiểu hình trong bệnh ưa chảy máu thể nặng là do đa yếu tố [61].

#### ***1.2.4.3. Khả năng biểu hiện kiểu hình khác của hemophilia A***

Một số nghiên cứu đã được chứng minh mối liên quan giữa nhóm máu, yếu tố von Willebrand và thời gian bán hủy của FVIII. Bệnh nhân có nhóm máu O và có nồng độ kháng nguyên von Willebrand thấp sẽ làm giảm đáng kể thời gian bán hủy của FVIII [62], [63].

Vai trò của con đường tiêu sợi huyết không đồng nhất giữa lâm sàng và kiểu hình của bệnh hemophilia A đã được công bố bởi các tác giả Grunewald, Shetty [64], [65]. Tác giả Grunewald đưa ra giả thuyết rằng quá trình cầm máu không hiệu quả của hệ thống tiêu sợi huyết giống như một vòng tròn luẩn quẩn, dường như gây ra khuynh hướng chảy máu nhiều hơn tại nơi chảy máu.

Theo nghiên cứu của Jayandharan, phản ứng viêm trong màng hoạt dịch có thể sẽ ảnh hưởng đến mức độ nghiêm trọng của tổn thương khớp ở bệnh nhân hemophilia A [49].

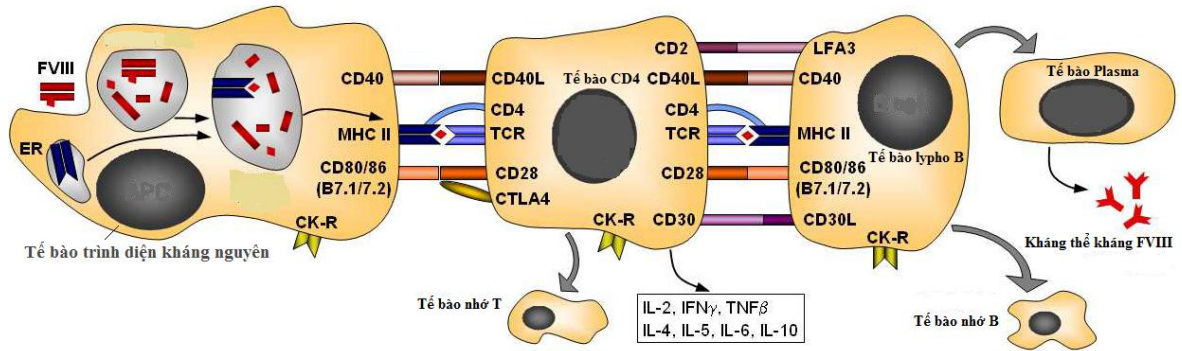
### 1.2.5. Yếu tố ức chế FVIII

Cơ chế hình thành kháng thể hiện nay còn nhiều bàn cãi, song 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 bao gồm tiền sử gia đình xuất hiện các chất ức chế, chủng tộc và dân tộc, cũng như các đột biến và đa hình trong các gen phản ứng miễn dịch, ví dụ như HLA alen [66]. Cơ chế hoạt động của những kháng thể này là gắn với các nhánh của yếu tố đông máu làm ảnh hưởng tới sự gắn kết của các yếu tố này với các thành phần đông máu khác [67].

Phương pháp phát hiện kháng thể kháng VIII là Bethesda [68]. Một đơn vị Bethesda là lượng kháng thể có khả năng trung hòa 50% lượng yếu tố VIII có trong 1 ml huyết tương bình thường. Điều trị cho bệnh nhân có chất ức chế phụ thuộc vào nồng độ chất ức chế cao hay thấp. Một số trường hợp chất ức chế chỉ xuất hiện thoáng qua và tự động mất đi không cần điều trị ức chế miễn dịch [69].

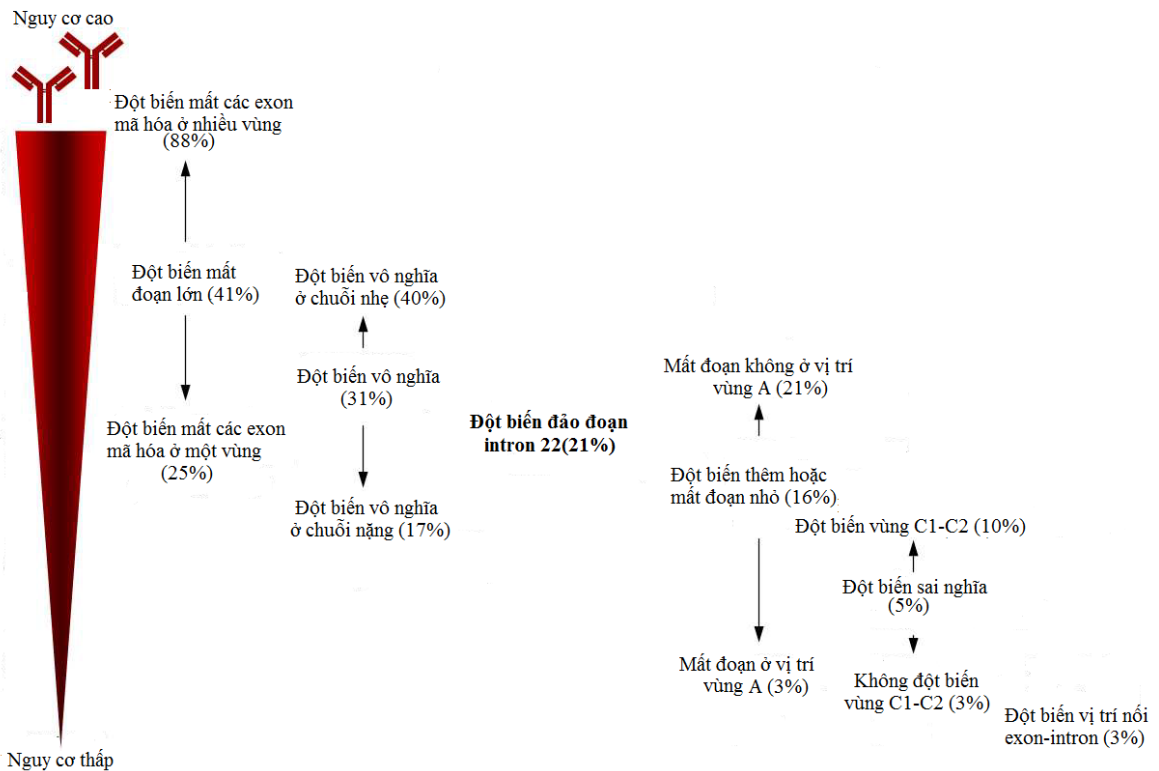
Kháng thể kháng protein FVIII liên quan đến một loạt các tế bào miễn dịch: từ tế bào trình diện kháng nguyên (MHC) cho đến tế bào lympho T và tế bào lympho B (Hình 1.6) [70]. Sau khi phân hủy protein trong nội bào và tổng hợp với túi golgi, các mảnh vỡ peptid có thể liên kết tương thích với lớp mô chính. Sau đó, phức hợp MHC-peptid trên bề mặt tế bào trình diện kháng nguyên được công nhận bởi các thụ thể tế bào lympho T trên bề mặt tế bào CD4. Tín hiệu đồng kích thích được thông qua bởi sự tương tác của tế bào CD80/86 với CD28 kích hoạt đầy đủ các tế bào CD4 và giải phóng cytokin. Các thụ thể trên bề mặt tế bào lympho B và C bao gồm CD2, CD4, CD40L, CD28 tương tác với các protein tương ứng LFA3, CD30L, CD40, CD80/86 gây ra sự tăng sinh tế bào lympho B, biệt hóa thành tế bào plasma và sản xuất

ra kháng thể kháng FVIII [71]. Các kháng thể kháng FVIII tồn tại trong tủy xương, lách, hạch bạch huyết [72].



**Hình 1.6. Cơ chế hình thành kháng thể kháng FVIII [70]**

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 (Hình 1.7) [67]. 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 ở bệnh hemophilia A là nhóm đột biến mất đoạn lớn, mất các exon mã hóa nhiều vùng trong gen F8 chiếm 88% [73].



**Hình 1.7. Ảnh hưởng của các dạng đột biến gen F8 đến nguy cơ phát triển chất ức chế FVIII [67]**

### 1.2.6. Di truyền học và tỷ lệ mắc bệnh hemophilia A

Hemophilia A là bệnh di truyền lặn liên kết với giới tính X không có alen tương ứng trên NST Y. Tỷ lệ mắc bệnh là 1/5000 nam giới trên thế giới, không bị ảnh hưởng bởi yếu tố dân tộc hay địa lý [74]. Mặc dù tỷ lệ này không thay đổi nhiều giữa các quần thể, tuy nhiên khả năng phát hiện bệnh ở các nước đang phát triển có nhiều hạn chế do đó bệnh nhân thực sự được điều trị còn thấp. Đa số các trường hợp hemophilia A có tiền sử gia đình mắc bệnh. Khoảng 30% đột biến mới phát sinh trong quá trình tạo giao tử ở bố hoặc mẹ. Tỷ lệ đột biến gây bệnh hemophilia xảy ra là  $3 \times 10^6$  trên gen và trên một giao tử trong một thế hệ. Tỷ lệ đột biến mới xảy ra ở tế bào mầm sinh dục của nam cao hơn 3,6 lần so với tế bào mầm sinh dục của nữ. Gần đây người ta đã chứng minh được tần suất đột biến theo giới tùy thuộc vào loại đột biến. Tỷ lệ đảo đoạn

intron 22 ở tế bào mầm sinh dục nam nhiều hơn 15 lần ở tế bào mầm sinh dục nữ. Đối với đột biến điểm ở tế bào sinh dục nam cao hơn gấp 5 – 10 lần, còn đột biến mất đoạn cao hơn 5 lần so với tế bào mầm sinh dục nữ [73]. Hiện tượng này giải thích cho sự vắng mặt nhiễm sắc thể thứ hai tạo điều kiện thuận lợi cho hiện tượng đảo đoạn trong quá trình phân bào giảm nhiễm ở nam.

Hemophilia là bệnh rối loạn đông máu di truyền hay gặp nhất. Theo thống kê của tổ chức hemophilia thế giới, hiện nay có khoảng 250.000 bệnh nhân mắc bệnh hemophilia và chỉ có khoảng 50.000 được điều trị đặc hiệu. Tại Việt Nam, hiện tại có khoảng 6000 bệnh nhân hemophilia trong đó chỉ có 20-30% được phát hiện và điều trị. Ở Miền Bắc Việt Nam theo điều tra từ 1994-1996 cho thấy tỷ lệ bệnh hemophilia là 25-60/1.000.000 dân [2]. Bệnh hemophilia A hay gặp nhất, chiếm tới 85%, hemophilia B chỉ chiếm 14%. Tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, cùng với sự ra đời của Trung tâm điều trị hemophilia, số bệnh nhân đến khám và điều trị tăng lên đáng kể. Đến nay trung tâm đã quản lý khoảng 500 bệnh nhân hemophilia ở các địa phương khác nhau, trong đó hemophilia A chiếm 85%; 13,16% là hemophilia B và còn lại là các bệnh nhân bị các bệnh rối loạn đông máu khác [7].

### **1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN TRÊN GEN F8**

Các phương pháp phát hiện đột biến gen F8 gây bệnh hemophilia A như phương pháp phát hiện đột biến trực tiếp, sàng lọc gián tiếp được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán xác định bệnh, phát hiện người lành mang gen và chẩn đoán trước sinh. Phương pháp phát hiện đột biến trực tiếp là xét nghiệm cung cấp một cách chính xác nhất trong tầm soát bệnh hemophilia A. Tuy nhiên, tính chất không đồng nhất của đột biến và sự phức tạp của gen F8

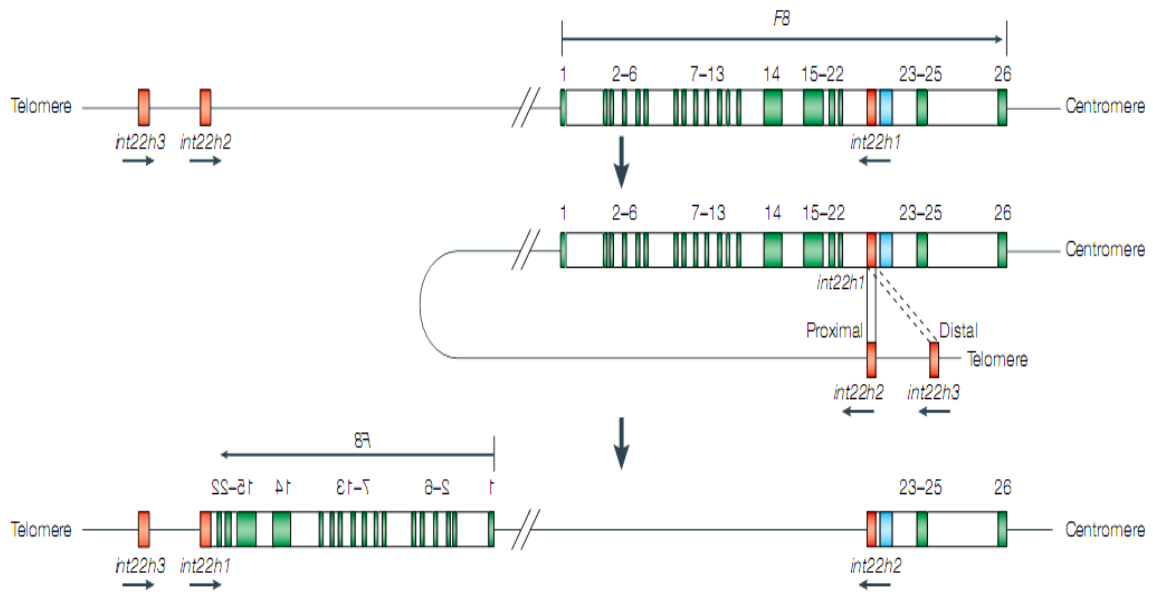
làm cho việc phát hiện đột biến bằng phương pháp trực tiếp khó khăn [74]. Phương pháp phát hiện bằng sàng lọc gián tiếp có thể có ích hơn và bổ sung kết quả chẩn đoán trong những trường hợp này.

Kết quả đột biến DNA cần phải được giải thích một cách thận trọng, do những nguy cơ tiềm ẩn của thể khảm trong gia đình có tiền sử bệnh hemophilia A chiếm khoảng 10% có thể gây ra sự chẩn đoán không chắc chắn về tình trạng mang gen bệnh [75]. Do đó, chọc ối để xét nghiệm DNA thai nhi là quan trọng trong chẩn đoán trước sinh, vì nó ảnh hưởng đến quyết định sản khoa và việc lựa chọn phương pháp điều trị, chăm sóc sớm khi gia đình quyết định không chấm dứt thai kỳ [76].

### **1.3.1. Phương pháp phát hiện đột biến đảo đoạn intron**

#### *a/ Phương pháp phát hiện đột biến đảo đoạn intron 22*

Dạng đột biến đảo đoạn phổ biến nhất là đảo đoạn intron 22, chiếm hơn 45% các thể bệnh nặng [5]. Cách gen F8 một đoạn 500kb về phía đầu telomere, nhiễm sắc thể X tồn tại hai vùng *int22h2* và *int22h3* có trình tự tương đồng đến 99,9% với một đoạn thuộc intron 22 gen F8 (vùng *int22h1*) có kích thước 9,5kb. Quá trình tái tổ hợp tương đồng giữa vùng *int22h1* và một trong hai vùng *int22h2* hoặc *int22h3* chia cắt gen F8 thành 2 đoạn (exon 1- 22 và exon 23- 26) cách nhau 400 kb gây bất hoạt hoàn toàn gen mã hóa yếu tố VIII (Hình 1.8).



**Hình 1.8. Cơ chế đột biến đảo đoạn intron 22 [5]**

Do bệnh nhân hemophilia A thể nặng đột biến đảo đoạn intron 22 chiếm tỉ lệ cao. Vì vậy, việc tìm ra một phương pháp xác định đột biến đảo đoạn intron 22 có kết quả nhanh, chính xác và thuận tiện là rất quan trọng.

Ba kĩ thuật chính được sử dụng để phát hiện đột biến đảo đoạn intron 22 gồm:

+ *Kỹ thuật Southern Blot*

Phương pháp Southern Blot là phương pháp hữu hiệu trong chẩn đoán các bệnh lý di truyền chung và bệnh hemophilia A nói riêng. Phương pháp này cho phép xác định những đoạn DNA có kích thước lớn với một nồng độ nhỏ trong hỗn hợp mà khó có thể xác định được bằng các phương pháp khác.

Phương pháp Southern Blot ứng dụng trong chẩn đoán đột biến đảo đoạn intron 22 được miêu tả bởi Lakich và cộng sự năm 1993 [31]. Thủy phân DNA bằng enzym *BclI*, sử dụng mẫu dò đánh dấu phóng xạ P32 để xác định đột biến. Ở người bình thường, enzym sẽ cắt DNA làm 3 đoạn có kích thước 21,5kb; 16kb và 14kb. Nếu kết quả có kích thước 20kb; 17,5kb; 14kb hay 20kb; 16kb; 15,5kb tương ứng với đột biến đảo đoạn intron 22 typ 1 (int22h2) và typ 2 (int22h3).



#### + Kỹ thuật Long Distance PCR

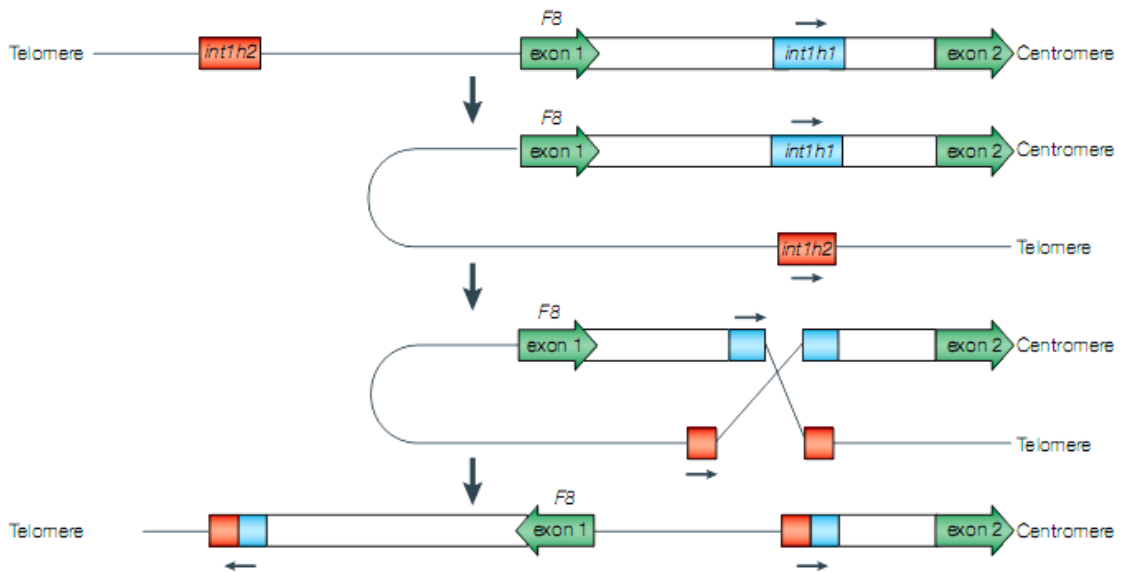
Phương pháp *Long Distance PCR* (LD-PCR) được thiết kế bằng các phản ứng PCR đặc biệt để có thể khuếch đại một đoạn gen F8 rất dài  $\geq 10$  kb và đặt tên là phản ứng Long Distance PCR [77]. Sử dụng cặp mồi PQ được thiết kế bám đặc hiệu với vùng intron 22h1 và cặp mồi AB được thiết kế đặc hiệu cho 2 vùng intron 22h2 và intron 22h3. Hình ảnh điện di trên gel Agarose 0,6% trong 6-8 giờ sản phẩm khuếch đại LD-PCR với mẫu DNA người bình thường cho 2 băng có kích thước 10 kb và 12 kb, với người bị đột biến đảo đoạn intron 22 cho 2 băng kích thước 10 và 11kb, với người lành mang gen cho 3 băng kích thước 10, 11 và 12 kb.

#### + Kỹ thuật Inversion- PCR

Phương pháp *Inversion - PCR* (I-PCR) được miêu tả bởi Rosetti và cộng sự năm 2005 [78]. Quy trình gồm 3 bước: (1) *Cắt DNA bằng enzym BclI*, (2) *Nối bằng T4 ligate*, (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.

#### b/ Phương pháp phát hiện đột biến đảo đoạn intron 1

Hiện tượng tái tổ hợp cũng diễn ra tương tự giữa *int1h1* (nằm trong intron 1) có kích thước 900 bp và vùng trình tự tương đồng *int1h2* cách gen F8 một đoạn 140 kb về phía đầu mút telomere gây nên dạng đột biến đảo đoạn intron 1 xuất hiện ở 5% các thể bệnh nặng [7], [8].



**Hình 1.9. Cơ chế đột biến đảo đoạn intron 1 [5]**

Phương pháp xác định đảo đoạn intron 1 được mô tả bởi Bagnal và cộng sự năm 2002 [32]:

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.

### 1.3.2. Phương pháp phát hiện các dạng đột biến khác

#### a/ Phương pháp PCR phát hiện đột biến mất exon

PCR là phương pháp kinh điển và đơn giản nhất để chẩn đoán các bệnh di truyền. Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại đoạn gen đặc hiệu từ phân tử DNA của tế bào.

### ***Ứng dụng trong chẩn đoán bệnh hemophilia A***

Các tác giả thiết kế và sử dụng những cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại từng exon của gen F8 bằng phản ứng PCR, sau đó điện di trên gel agarose, mẫu bệnh nhân được tiến hành song song với mẫu đối chứng. Nếu mẫu đối chứng xuất hiện vạch DNA tương ứng với kích thước của exon được khuếch đại, trong khi mẫu bệnh nhân không xuất hiện vạch thì bệnh nhân bị đột biến mất đoạn exon đó. Nếu các mẫu đều lên đầy đủ các vạch DNA thì các sản phẩm PCR sẽ được tinh sạch để chuẩn bị cho bước giải trình tự toàn bộ các exon này.

#### ***b/ 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) và CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis). DHPLC hiện là kỹ thuật được sử dụng rộng rãi nhất để phân tích gen F8. DNA dị sợi kép, tạo ra bằng cách trộn, biến tính và tái bắt cặp sản phẩm PCR của bệnh nhân nam và mẫu chứng nam (mẫu control) rồi được gắn vào cột. Dị sợi kép hình thành do sự bắt cặp tại vùng đột biến hoặc đa hình đơn nucleotid (SNP) sẽ gắn lên cột yếu hơn đồng sợi kép (homoduplexes) và bị rửa đầu tiên khi dùng gradient dung môi chạy qua cột. Nhiệt độ nóng chảy khác nhau cần thiết cho mỗi phản ứng và cho hiệu quả phát hiện đột biến tối đa, một phản ứng có thể cần nhiều chu trình nhiệt khác nhau. DNA tách rửa và phát hiện bằng sự hấp thụ tia cực tím. Các thiết bị cần thiết để thực hiện phương pháp này đắt tiền nhưng khi duy trì tốt có thể phát hiện 98% đột biến F8 [79].

Phương pháp CSGE là quá trình phân tích dị sợi kép được thực hiện trong một giếng lớn và được biến tính trong gel polyacrylamid [80]. Điện di sản phẩm qua đêm và nhuộm bằng ethidium bromid. Phương pháp CSGE phát hiện sự thay đổi kích thước DNA so với mẫu chứng. Hiệu quả phát hiện

từ 85 đến 90% đột biến gen FVIII [81]. Trong quá trình phân tích ở nhiệt độ cao, sợi DNA nhuộm huỳnh quang sẽ được khuếch đại và biến tính hoàn toàn. Sự thay đổi huỳnh quang sẽ cho thấy sự khác biệt giữa sợi đơn và sợi kép DNA. Mặc dù đòi hỏi tốn kém về thiết bị chuyên môn, tuy nhiên quá trình thực hiện nhanh chóng và rẻ tiền [82].

### *c/ Giải trình tự DNA*

Đoạn DNA cần giải trình tự được sử dụng như trình tự mẫu cho phản ứng khuếch đại gen (PCR) bắt đầu từ vị trí gắn môi. Hỗn hợp của cả deoxy- và dideoxynucleotid được sử dụng trong phản ứng với nồng độ sao cho các dideoxynucleotid sẽ gắn vào mỗi vị trí mà các deoxynucleotid thường gắn trên đoạn DNA đang được tổng hợp. Sự gắn của các dideoxynucleotid sẽ làm gián đoạn quá trình kéo dài các đoạn DNA được tổng hợp, kết quả sẽ tạo ra hỗn hợp các sợi DNA có kích thước khác nhau. Nucleotid tận cùng trên mỗi sợi DNA có thể được xác định bằng cách chạy đồng thời bốn phản ứng riêng biệt trong đó mỗi phản ứng chứa một loại dideoxynucleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) hoặc bởi một phản ứng hỗn hợp nhưng từng loại dideoxynucleotide được đánh dấu bằng các chất phát huỳnh quang đặc hiệu khác nhau. Kết quả là hỗn hợp các sợi DNA tổng hợp từ sợi khuôn được phân tách bằng điện di trên gel acrylamid có độ phân giải cao, cho phép phân biệt được các sợi đơn DNA hơn kém nhau 1 nucleotid. Trình tự các nucleotid được xác định tương ứng với trình tự của các vạch trên gel ứng với mỗi loại dideoxynucleotid [83].

Do phần lớn các đột biến gây bệnh là đột biến điểm vì vậy đến nay phương pháp giải trình tự gen vẫn được coi là một tiêu chuẩn vàng trong việc phát hiện các đột biến gen F8 [84].

#### *d/ Phương pháp dựa trên RT-PCR*

DNA genome được hầu hết các phòng thí nghiệm lựa chọn, nhưng phiên mã ngược (RT) mRNA gen F8 bất thường thu được từ bạch cầu thành cDNA bằng nested PCR (RT-PCR) có lợi thế hơn so với phân tích gDNA. Đột biến vị trí nối (splicing) bị bỏ qua khi phân tích gDNA có thể được phát hiện khi phân tích mRNA. cDNA khuếch đại có thể được phân tích đột biến bằng nhiều phương pháp: phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn [83] và phân cắt hóa học [84]. Phân tích đòi hỏi phải có chất lượng RNA tốt, điều này là rất khó khăn cho những bệnh nhân ở xa phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, gần đây đã có ống PAXgene hoặc ống Trisone được thiết kế đặc biệt để duy trì RNA còn nguyên vẹn, tạo điều kiện phân tích cũng như vận chuyển mẫu [85].

#### *e/ Phương pháp MLPA*

Trong những năm gần đây, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) là phương pháp được ưu tiên chọn lựa trong chẩn đoán đột biến mất đoạn, lặp đoạn gen F8. Ngoài ra, MLPA còn giúp chẩn đoán dị hợp tử với độ chính xác cao, cho kết quả nhanh chóng [85].

Để chẩn đoán đột biến mất đoạn và lặp đoạn gen, người ta thiết kế các probe gắn đặc hiệu với 26 exon của gen. Trong mỗi phản ứng PCR, chúng ta có thể khuếch đại đồng thời các probe đặc hiệu cho 26 exon của gen mà chỉ sử dụng duy nhất 1 cặp mồi. Như vậy chỉ cần tiến hành 2 phản ứng PCR, chúng ta có thể khảo sát đột biến ở các exon của gen F8.

Nghiên cứu của Losrt và cộng sự năm 1996, khi phân tích mẫu DNA của 80 bệnh nhân hemophilia A bằng phương pháp MLPA (Kit P178, MRC Hà Lan, Amsterdam, Hà Lan) để phát hiện những trường hợp đột biến lặp đoạn, mất đoạn [86]. Nghiên cứu của Losrt sử dụng 44 probe để khuếch đại toàn bộ 26 exon trong gen F8. Với đột biến mất đoạn, các đỉnh tương ứng với từng exon sẽ bị mất trong khi đó với đột biến lặp đoạn, kết quả được tính toán dựa

vào tỉ lệ RPA (Relative Peak Area) tương ứng với từng exon so với mẫu chứng, RPA của mỗi exon được tính bằng cường độ tín hiệu tương ứng (A) chia cho tổng cường độ tín hiệu của 44 đỉnh trong probemix ( $\Sigma A$ ), exon lặp đoạn khi mà tỉ lệ RPA lớn hơn 1,6.

Dựa vào tính chất định lượng để phát hiện các dạng đột biến của phương pháp MLPA. Do đó, phương pháp này được lựa chọn để phát hiện các trường hợp phụ nữ mang gen có đột biến lặp đoạn hay mất đoạn trong gen F8.

## **1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC**

### **1.4.1. Nghiên cứu trên thế giới**

Ở các nước phát triển, các nghiên cứu tập trung vào phát triển những hướng điều trị tích cực để cải thiện chất lượng cuộc sống của bệnh nhân. Sự phát triển của các chế phẩm hiện nay cho phép bệnh nhân hemophilia có cuộc sống như người bình thường và tiến tới có thể chữa khỏi hoàn toàn. Vấn đề chính hiện nay ở bệnh ưa chảy máu là sự khởi đầu của các kháng thể bất hoạt các yếu tố đông máu, mặc dù các chất ức chế miễn dịch cũng được tiêm cùng trong quá trình truyền bổ xung các yếu tố đông máu có thể loại trừ các chất ức chế trong khoảng hai phần ba số bệnh nhân. Các chất ức chế này làm cho liệu pháp điều trị thay thế kém hiệu quả, hạn chế đáp ứng điều trị trên bệnh nhân và làm tăng nguy cơ mắc bệnh và tử vong [87].

Trong thập kỷ qua mục tiêu cuối cùng của các nhà nghiên cứu là tìm kiếm phương pháp có thể điều trị dứt điểm bệnh ưa chảy máu. Phương pháp điều trị gen đã được nghiên cứu thông qua quá trình chuyển đoạn DNA mã hóa đoạn gen FVIII vào cơ thể người bệnh. Ngoài ra, một thách thức lớn của các phác đồ điều trị hiện nay là thời gian bán hủy ngắn làm cho nhu cầu tiêm tĩnh mạch thường xuyên. Do đó khuyến khích những nỗ lực hơn nữa trong việc sản xuất các yếu tố đông máu có sinh khả dụng kéo dài hơn. Các chế phẩm đang

nghiên cứu và thực nghiệm lâm sàng trước khi đưa vào sử dụng như: Gắn kết gốc PEG (polyethylene glycol) là một chế phẩm mới có khả năng kéo dài thời gian bán hủy của sản phẩm protein [88]. Hợp nhất Fc có chức năng bảo vệ IgG và albumin từ quá trình dị hóa, làm trung gian vận chuyển IgG trên tế bào biểu mô [89]. Các thụ thể này có khả năng kéo dài thời gian bán hủy của IgG và albumin đã định hướng cho các phương pháp điều trị mới. Hợp nhất Albumin có chu kỳ bán rã khoảng 20 giờ, sử dụng albumin thường không xuất hiện miễn dịch, do đó nó được sử dụng như một sản phẩm an toàn. Đây là sản phẩm được lựa chọn để kéo dài thời gian bán hủy bằng cách kết hợp các yếu tố đông máu với albumin người... [90].

Ở những nước đang phát triển, để tiếp cận được các phương pháp điều trị mới giúp điều trị cho bệnh nhân hemophilia A gặp nhiều khó khăn do kinh phí điều trị khá tốn kém. Sự ra đời và phát triển của sinh học phân tử giúp phát hiện ra các dạng, các vị trí đột biến trên gen F8 gây bệnh hemophilia A. Hiện nay, hàng năm có rất nhiều đột biến mới được công bố trên cơ sở dữ liệu HAMSTeRS (Hemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site) là trang quản lý thông tin về bệnh hemophilia A của nước Anh: đến tháng 1/2013 đã có 2158 đột biến ở các vị trí khác nhau trên gen F8 được công bố [42]; hay trên cơ sở dữ liệu của CDC (The Centers for Disease Control and Prevention) là trung tâm kiểm soát và phòng chống bệnh dịch của Hoa Kỳ công bố về bệnh hemophilia A có tổng số 2556 vị trí đột biến gây bệnh [91].

Các nghiên cứu về đột biến trên gen F8 gần đây ngoài báo cáo các dạng đột biến mới chưa được công bố còn phân tích đánh giá các nguy cơ phát triển chất ức chế FVIII. Theo nghiên cứu của tác giả Nair năm 2010, khi nghiên cứu phát hiện đột biến trên gen FVIII đã công bố 11 đột biến mới [92]. Còn theo nghiên cứu của Reiter cũng trong năm 2010, khi nghiên cứu trên 69 bệnh nhân

hemophilia A thể nặng ở Australia đã công bố 38 vị trí đột biến mới và đánh giá mối liên quan vị trí đột biến với sự phát triển yếu tố ức chế FVIII [93].

Trong nghiên cứu của Samatha và cộng sự năm 2012 trên 5.383 bệnh nhân hemophilia A thể nặng trong đó 1.209 bệnh nhân có chất ức chế FVIII trong máu. Nghiên cứu sử dụng các thuật toán thống kê tính toán tỉ lệ nguy cơ phát triển chất ức chế ở các dạng, các vị trí đột biến trên gen F8 [94].

Trong nghiên cứu của Schwaab năm 2013 trên 1.135 bệnh nhân hemophilia A đã phát hiện 195 đột biến mới chưa được công bố trên cơ sở dữ liệu HAMSTeRS. Nghiên cứu này còn đánh giá nguy cơ phát triển chất ức chế, so sánh giữa nhóm đột biến ở vùng C1/C2 với các vùng còn lại [95].

Ngoài ra, từ các vị trí đột biến có thể phát hiện người lành mang gen bệnh trên các thành viên nữ trong gia đình người bệnh và các đối tượng liên quan. Với những thành viên nữ mang gen cần sớm đưa ra lời khuyên di truyền trước khi kết hôn để họ tăng cường nhận thức, làm giảm tỷ lệ mang thai và tỷ lệ trẻ sinh ra bị mắc bệnh hemophilia A, tăng hiệu quả trong việc phòng ngừa bệnh tật đồng thời nâng cao chất lượng chăm sóc sức khỏe cho cộng đồng xã hội. Ngoài ra, việc phát hiện vị trí, dạng đột biến còn có ý nghĩa lớn trong việc lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp ngay từ khi bắt đầu đối với những bệnh nhân có nguy cơ cao có kháng thể kháng FVIII.

#### **1.4.2. Nghiên cứu tại Việt Nam**

Các nghiên cứu tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào các biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng và đánh giá hiệu quả điều trị của một số chế phẩm thay thế FVIII.

Năm 1991, Bạch Quốc Tuyên nghiên cứu đề tài “Nhân một trường hợp hemophilia A có kháng thể kháng FVIII- Bàn về: vấn đề kháng thể kháng đông lưu hành”. Đề tài mô tả một trường hợp có kháng thể kháng



FVIII trong quá trình điều trị và bước đầu nghiên cứu về sự hình thành kháng thể kháng FVIII [12].

Năm 1993, Tác giả Trần Ngọc Trân nghiên cứu điều chế và sử dụng tua lạnh giàu yếu tố VIII trong điều trị bệnh hemophilia A. Đây là giai đoạn phát triển của quá trình điều trị tại Việt Nam khi có thể tự điều chế chế phẩm điều trị thay thế có nồng độ FVIII cao hơn và an toàn hơn [96].

Nguyễn Thị Hương Quế có đề cập tới những tác dụng không mong muốn ở bệnh nhân hemophilia người lớn được truyền các chế phẩm máu từ năm 2004 đến 2008 [7]. Có một số đề tài nghiên cứu các lĩnh vực khác của hemophilia như tổn thương khớp, đánh giá hiểu biết của người nhà bệnh nhân về bệnh hemophilia.

Năm 2008, trong những nghiên cứu tiên phong về bệnh hemophilia A ở mức độ phân tử nhóm nghiên cứu tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội đã thành công trong việc tách dòng gen mã hóa yếu tố VIII của người bình thường. Đồng thời, nhóm nghiên cứu cũng đã thành công trong việc tạo ra FVIII bị xóa vùng gen B và vẫn giữ nguyên hoạt tính. Nhóm nghiên cứu đã thiết kế vector, biểu hiện và tinh chế thành công FVIII người trên đối tượng *E.coli*, vector thuộc hệ retrovirus mang gen mã FVIII tái tổ hợp cũng đã được thiết kế thành công mở đường cho các nghiên cứu ứng dụng liệu pháp điều trị gen sau này ở Việt Nam [97].

Hiện nay, nghiên cứu xác đột biến gây bệnh hemophilia A tại Việt Nam là rất ít. Viện Huyết học truyền máu, trong một đề tài cấp Bộ y tế đang nghiên cứu xác định đảo đoạn intron 22 và intron 1 trên bệnh nhân hemophilia A. Tuy nhiên, nghiên cứu này sử dụng phương pháp LD-PCR để xác định đột

biến đảo đoạn intron 22, phương pháp này khó thực hiện, thời gian điện di lâu. Nghiên cứu này cũng chỉ tập trung sàng lọc nhóm bệnh nhân thể nặng, khoảng 50% bệnh nhân không có đột biến đảo đoạn intron sẽ không phát hiện được đột biến.

Trong nghiên cứu của Phạm Quang Vinh và cộng sự, bước đầu đã ứng dụng phương pháp PCR-RFLP với vị trí cắt của enzym *BclI* tại intron 18 để chẩn đoán người mang gen bệnh trong gia đình bệnh nhân hemophilia A. Phương pháp này dựa trên cơ sở có nhiều đột biến DNA trên gen F8 không gây bệnh, những đột biến này là các chỉ điểm để phát hiện các trường hợp mang gen bệnh. Tuy nhiên đây cũng chỉ là phương pháp phát hiện gián tiếp, không phát hiện được vị trí đột biến thực sự gây bệnh hemophilia A [98].

### **1.5. NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN TỒN TẠI**

Không có kỹ thuật sinh học phân tử nào có thể xác định đột biến ở 100% bệnh nhân hemophilia A. Một số đột biến nằm trong gen F8 không phân tích được bằng những kỹ thuật phân tích đột biến hiện nay. Phương pháp giải trình tự DNA của toàn bộ gen F8, có thể được coi là "tiêu chuẩn vàng" để xác định các đột biến điểm vẫn không thể phát hiện đột biến trong mọi trường hợp. Theo nghiên cứu của Goodeve năm 2008, tỉ lệ không phát hiện được đột biến chiếm 2-7% tổng số bệnh nhân hemophilia A [5].

Tại Italy, khi Margaglione và cộng sự nghiên cứu trên 1.296 bệnh nhân hemophilia A, chỉ có 1.153 trường hợp phát hiện đột biến chiếm tỉ lệ 89%. Tỷ lệ này có thể thay đổi tùy theo tính chính xác trong chẩn đoán lâm sàng và hiệu quả phát hiện đột biến [51].

Trong nghiên cứu này, do điều kiện thời gian, trang thiết bị máy móc và kinh phí hạn hẹp chưa thể phối hợp hết các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại để chẩn đoán đột biến gen F8. Tuy nhiên, phương pháp I-PCR phát hiện đột biến đảo đoạn intron 22, kết hợp với kỹ thuật giải trình tự toàn bộ 26 exon để phát hiện đột biến là phương pháp mới nhất, thông dụng nhất để sàng lọc phát hiện đột biến ở bệnh nhân hemophilia A trong giai đoạn hiện nay.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- **Nhóm đối chứng:** 20 người (10 nam, 10 nữ) khỏe mạnh, tiền sử gia đình không có người mắc bệnh di truyền. Nhóm chứng được dùng để chuẩn hóa kỹ thuật và làm mẫu đối chứng cùng với mẫu nghiên cứu khi thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử để phân tích gen.

- **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.

#### **Tiêu chuẩn chẩn đoán hemophilia A:**

+ Lâm sàng:

- Chảy máu: Chảy máu khó cầm sau chấn thương, va chạm hay chảy máu tự nhiên.
- Vị trí: Chảy máu trong khớp, cơ hoặc một số vị trí khác.
- Tính chất: Thường chảy máu tái phát.
- Tiền sử: có tiền sử chảy máu kéo dài hoặc trong gia đình có người thân bị chảy máu khó cầm.

+ Cận lâm sàng:

- APTT kéo dài.
- Định lượng FVIII giảm dưới 30%.
- Thời gian máu chảy bình thường.
- Số lượng tiểu cầu và độ tập trung tiểu cầu bình thường.
- Prothrombin bình thường.
- Yếu tố von Willebrand bình thường.

#### **Tiêu chuẩn loại trừ :**

- + Bệnh nhân mắc bệnh Von-Willebrand.
- + Các bệnh lý di truyền gây kéo dài APTT: giảm yếu tố XI, XII, prekallikrein.
- + Bệnh lý lưu hành kháng FVIII: bệnh tự miễn (luput).

### **Tiêu chuẩn xác định có kháng thể kháng FVIII:**

- Xét nghiệm Mixtest (là xét nghiệm để xác định sự có mặt của chất ức chế): trộn huyết tương bệnh nhân với huyết tương của người bình thường với tỷ lệ 1:1 và ủ trong 2 giờ ở 37°C. Đo thời gian APTT của người bình thường và APTT của mẫu trộn sau 2 giờ. Nếu APTT ở mẫu máu trộn kéo dài hơn mẫu người bình thường là có kháng thể trong máu bệnh nhân.

- Xét nghiệm Bethesda (là xét nghiệm đo nồng độ chất ức chế): 1 đơn vị Bethesda là lượng kháng thể có thể trung hoà 50% của 1 đơn vị FVIII thêm vào ủ trong 2 giờ ở 37 độ C.

*Chẩn đoán có kháng thể kháng VIII:* xét nghiệm Mixtest dương tính và định lượng có kháng thể kháng VIII bằng xét nghiệm Bethesda.

## **2.2. DỤNG CỤ, TRANG THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU**

### **2.2.1. Dụng cụ**

- Ống Eppendorf 1,5 mL; 0,5 mL; 0,2 mL
- Ống lấy máu chống đông EDTA
- Máy Gene Amp PCR System 9700 (USA)
- Pipet, đầu côn các loại
- Tủ lạnh sâu: -30°C; -80°C (SANYO)
- Máy điện di: Mupid (Nhật Bản)
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động: Chemidoc EQ-Bio-Rad (USA)
- Máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm để bàn Eppendorf (Đức)
- Lò vi sóng
- Máy đọc trình tự gen ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Hoa Kỳ)

### **2.2.2. Hoá chất**

#### **\* Hóa chất dùng để tách chiết DNA:**

- Dung dịch Lysis buffer
- Dung dịch SDS 10%
- Dung dịch K

- Proteinase K
- Dung dịch phenol: chloroform: isoamyl (tỷ lệ 25 : 24 : 1)
- Dung dịch chloroform: isoamyl ( tỷ lệ 24 : 1)
- Sodium acetate 3M, pH=5,2
- Ethanol 100%; ethanol 70%

**\* Hoá chất để thực hiện kỹ thuật PCR**

- + Buffer 10x
- + dNTP 10 mM
- + Taq polymerase
- + Các cặp mồi

**\* Hoá chất để điện di sản phẩm PCR**

- + Agarose
- + Dung dịch TBE 10X
- + Loading buffer 10X
- + Ethidium bromide

**\* Hoá chất để đọc trình tự gen**

*BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) gồm BigDye Terminator v3.0 (dATP, dCTP, dGTP và dUTP), BigDye buffer, cặp mồi đặc hiệu, dung dịch formamide.

**\* Hóa chất để tinh sạch DNA**

- Dung dịch phenol: chloroform: isoamyl với tỷ lệ 25 : 24 : 1
- Dung dịch chloroform: isoamyl với tỷ lệ 24 : 1
- Ethanol 100%; ethanol 70%
- Hòa tan bằng nước tinh khiết

**\* Hóa chất để cắt DNA:**

- + Enzym *BclI*
- + Buffer *BclI*

**\* Hóa chất để nối DNA:**

+ T4 ligate

+ Buffer T4

**2.2.3. Trình tự môi cho các phản ứng PCR**

**- Trình tự môi của phản ứng Inversion – PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 22 của gen F8 [78]**

Tên môi	Trình tự
ID (môi xuôi trong gen F8)	ACATACGGTTTAGTCACAAGT
IU (môi ngược trong gen F8)	CCTTTCAACTCCATCTCCAT
ED (môi xuôi ngoài gen F8)	TCCAGTCACTTAGGCTCAG

**- Trình tự môi của phản ứng PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 1 của gen F8 [99]**

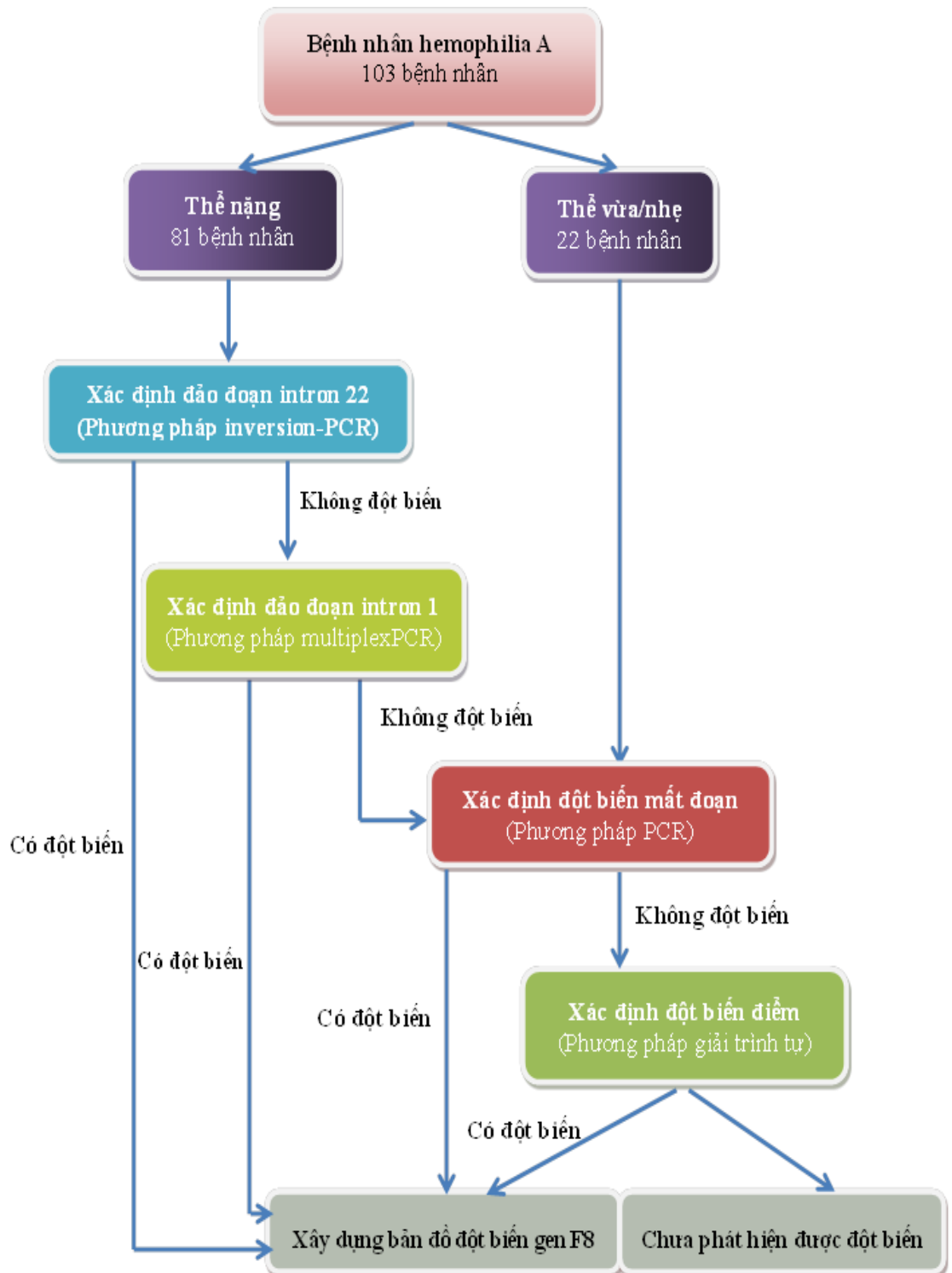
Tên môi	Trình tự
9F	GTTGTTGGGAATGGTTACGG
9cR	CTAGCTTGAGCTCCCTGTGG
Int1h-2F	GGCAGGGATCTTGTTGGTAAA
Int1h-2R	TGGGTGATATAAGCTGCTGAGCTA

**- Trình tự môi của phản ứng PCR khuếch đại 26 exon của gen F8**

Thiết kế 38 cặp môi riêng biệt để khuếch đại 26 exon David 1994 [100]. Trong đó exon 14 có kích thước lớn nhất 3,1 kb nên cần 9 cặp môi; exon 26 kích thước cần 5 cặp môi để khuếch đại toàn bộ các exon này.

### 2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### *Sơ đồ nghiên cứu*



**Hình 2.1. Quy trình xác định đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A**



Các kiểu hình khác nhau trên lâm sàng được chứng minh là do các dạng đột biến khác nhau gây nên. Dựa vào đặc điểm này, chúng tôi thiết kế mô hình xác định đột biến của các thể hemophilia A như hình 2.1:

- Đối với bệnh nhân thể nặng, do đột biến đảo đoạn intron 22 chiếm đa số nên đầu tiên cần tiến hành xác định hiện tượng đảo đoạn intron 22 bằng phương pháp inversion PCR. Không phát hiện được đột biến đảo đoạn intron 22 ta tiến hành tiếp trên intron 1 bằng phương pháp multiplexPCR xem có hiện tượng đột biến đảo đoạn intron 1 hay không. Nếu vẫn không xác định được thì ta khuếch đại toàn bộ 26 exon tìm đột biến mất exon. Nếu các exon đều lên vạch tương ứng kích thước DNA người bình thường thì phân tích đột biến điểm trên 26 exon hoặc tại các vị trí nối bằng phương pháp giải trình tự. Các vị trí đột biến xác định được sẽ xây dựng bản đồ gen F8.

- Đối với những bệnh nhân thể vừa và thể nhẹ do không bị đột biến đảo đoạn nên chỉ sử dụng phương pháp PCR khuếch đại 26 exon tìm đột biến, nếu không có đột biến mất exon thì giải trình tự gen trực tiếp để phát hiện các dạng đột biến điểm. Các vị trí đột biến xác định được sẽ xây dựng bản đồ gen F8.

### **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**

- Máu tươi chống đông EDTA cần tách trong vòng 24 giờ.

- Cho 0,5 mL máu tươi toàn phần chống đông bằng EDTA vào ống Eppendorf 1,5 mL, thêm vào 0,5 mL dung dịch Lysis buffer rồi ủ trên đá trong 10 phút.

- Ly tâm 8000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ dịch nổi và thu cặn. quá trình này được lặp lại 3 lần.

- Cho vào 0,5 mL dung dịch K, ly tâm 10 phút tốc độ 8000 vòng/ phút ở 4 °C, loại bỏ dịch nổi và thu cặn.

- Cho 0,5 mL Lysis buffer; 12,5  $\mu$ L SDS 10%; 10  $\mu$ L proteinase K, sau đó ủ 2h ở 56 °C.

- Cho 0,5 mL phenol: chloroform: isoamyl, ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C, hỗn hợp được chia làm 3 phần: lớp dung dịch phía trên có chứa DNA, lớp ở giữa là cặn tế bào, lớp dưới cùng là dịch chiết. Hút lấy phần dịch chứa DNA trên cùng.

- Cho 0,5 mL chloroform: isoamyl, ly tâm mẫu ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C, hút lấy phần dịch trên cùng.

- Tủa DNA bằng 1 mL cồn tuyệt đối, cho thêm 50  $\mu$ L sodium acetat, để lạnh ở -20 °C trong 4 giờ.

- Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4 °C, đổ dịch nổi phía trên, thu tủa.

- Rửa tủa bằng cồn 70 °C. Tủa DNA được hoà tan bằng 30 mL nước tinh khiết.

Phân tử DNA thu được sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm và điện di trên gel agarose 0,8%.

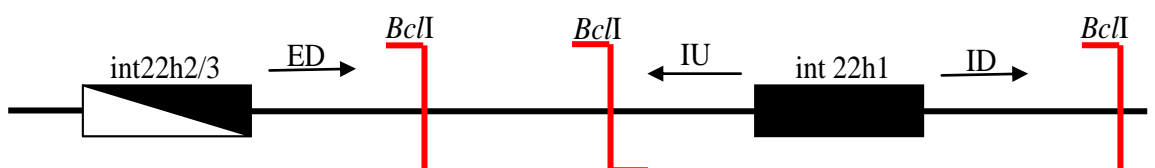
+ Nếu  $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1,8 - 2$  thì DNA được coi là tinh sạch.

+ Chất lượng của DNA tốt khi điện di cho vạch rõ nét, băng gọn. Ngược lại, phân tử DNA bị đứt gãy, lẫn nhiều protein hoặc các tạp chất khác thì hình ảnh điện di là một vệt trải dài không tạo thành băng gọn.

### 2.3.3. Quy trình phát hiện đảo đoạn intron

#### 2.3.3.1. Kỹ thuật Inversion – PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 22 của gen F8

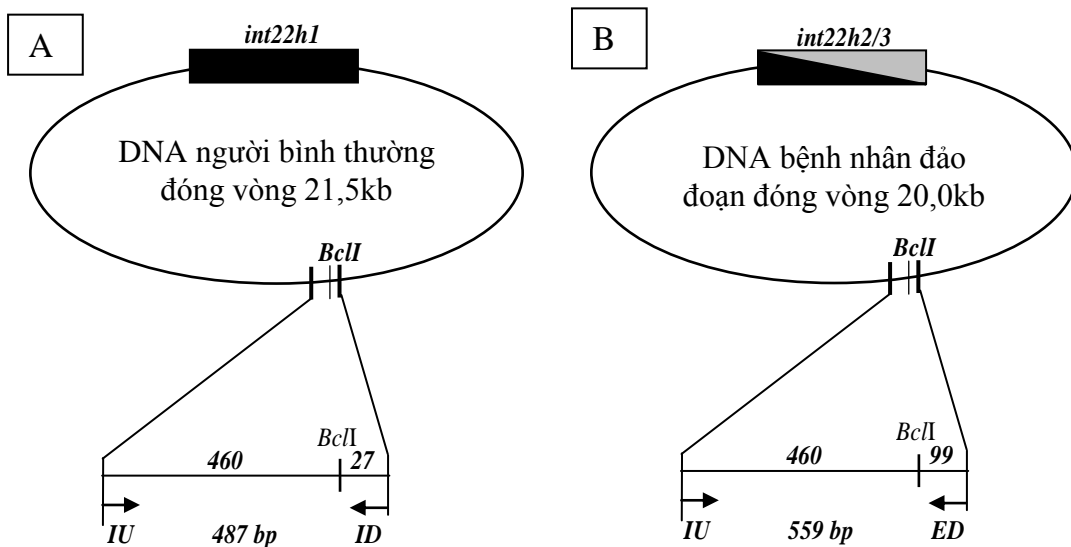
Phản ứng multiplex PCR với trình tự ba môi được thiết kế dựa vào trình tự hệ gen người và vị trí của enzym cắt *Bcl*I đã được chứng minh bằng phương pháp Southern Blot PCR.



Hình 2.2. Vị trí của enzym cắt *Bcl*I và các môi IU, ID, ED.

Các môi IU, ID, ED được thiết kế có chứa trình tự enzyme cắt giới hạn *Bcl*I nằm ở hai đầu của *int22h1* và một đầu của *int22h2/3* (hình 2.2).

Sau khi cắt sản phẩm DNA bằng enzyme cắt giới hạn *Bcl*I, 2 đầu DNA được nối lại bằng enzyme T4 ligate sẽ cho 2 sản phẩm DNA vòng có kích thước 21,5 và 20 kb.



**Hình 2.3. Các đoạn DNA đóng vòng sau khi nối bằng T4 ligate**

Ở người bình thường, mỗi IU bắt cặp với mỗi ED tạo ra DNA đóng vòng kích thước là 21,5 kb; chứa đoạn *int22h1* ở vùng BX842559 trên Genbank, có vị trí của enzyme cắt giới hạn *Bcl*I: base 36204 trên mỗi IU và base 14595 trên mỗi ID (hình 2.3.A). Khi khuếch đại bằng phản ứng multiplex PCR sẽ cho đoạn DNA có kích thước 487 bp.

Khi hiện tượng đảo đoạn xảy ra, đoạn *int22h1* nằm trong gen F8 được thay thế bằng đoạn *int22h2* hoặc *int22h3* nằm ngoài gen F8 cách đầu telomere 500kb, do đó DNA vòng có kích thước là 20 kb (hình 2.3.B). Lúc này mỗi IU sẽ bắt cặp với mỗi ED (mỗi ED được thiết kế nằm cạnh *int22h2* và intron 22h3 có chứa trình tự enzyme cắt giới hạn *Bcl*I). So sánh trình tự mỗi ED trên Genbank ở vùng BX 276110 thấy vị trí *Bcl*I trên *int22h3* là base 14703 và

vùng BX 683327 có vị trí *BclI* trên int22h2 là base 15265. Đột biến đảo đoạn sẽ khuếch đại đoạn DNA có kích thước 559 bp.

Sản phẩm sau khi khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5% với marker 100bp và nhuộm bởi ethidium bromid để kiểm tra đột biến đảo đoạn.

Quy trình kỹ thuật gồm 3 bước theo mô tả của Rosetti và cộng sự [78]:

**Bước 1: Cắt DNA bằng enzym *BclI*:**

Thành phần phản ứng	Thể tích ( $\mu$ l)
Enzym <i>BclI</i>	1,2
Buffer <i>BclI</i> 10X	3,0
DNA	4,0
Nước cất PCR	21,8
Tổng thể tích	30,0

Ủ ở 50<sup>o</sup> C trong 4h.

**Tinh sạch sản phẩm cắt:**

- Cho 0,2 mL Phenol: Chloroform: Isoamyl và 0,3 mL nước tinh khiết vào 30 $\mu$ L sản phẩm sau khi cắt. Trộn đều sau đó ly tâm 15000 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C. Hút lấy phần dịch chứa DNA trên cùng.

- Cho 0,5 mL chloroform: isoamyl, ly tâm mẫu ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C, hút lấy phần dịch trên cùng.

- Tủa DNA bằng 1 mL cồn tuyệt đối, cho thêm 50  $\mu$ L sodium acetat, ly tâm 15.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C, đổ dịch nổi phía trên và thu tủa.

- Rửa tủa bằng cồn 70°C. Tủa DNA được hoà tan bằng 20 mL nước tinh khiết.

Phân tử DNA thu được sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm.

**Bước 2:** Nối DNA bằng T4 ligate:

Thành phần phản ứng	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )
T <sub>4</sub> ligate	3,0
Buffer T <sub>4</sub> 10X	4,0
DNA	20,0
Nước cất PCR	13,0
<b>Tổng thể tích</b>	<b>40,0</b>

Ủ ở 16<sup>0</sup> C trong 8h.

**Tinh sạch sản phẩm sau nối:** tương tự như tinh sạch sản phẩm sau cắt.

**Bước 3:** Khuếch đại DNA bằng phản ứng multiplex PCR

*Thành phần phản ứng multiplex PCR*

Thành phần	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )
Nước cất PCR	11,3
Buffer 10X	2,0
dNTP (2,5 mM)	2,0
Môi IU (10 pM)	0,5
Môi ID (10 pM)	0,5
Môi ED (10 pM)	0,5
<i>Taq</i> polymerase (5 u/ $\mu\text{l}$ )	0,2
DNA	3,0
<b>Tổng</b>	<b>20,0</b>

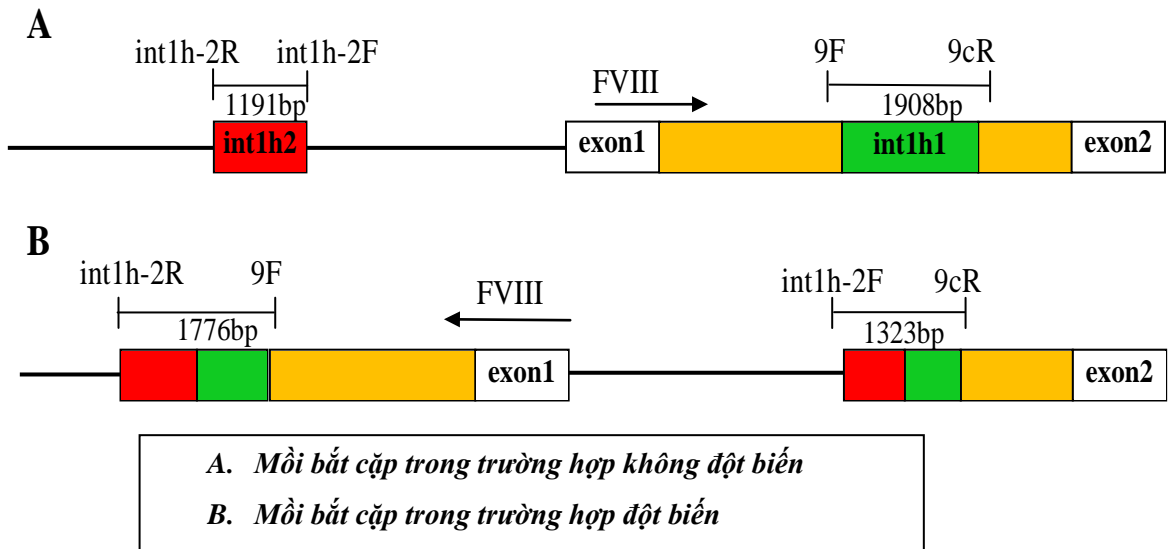
*Chu trình nhiệt của phản ứng multiplex PCR :*

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 10 phút		
2 – 34	95°C - 50 giây	58°C - 50 giây	72°C - 2 phút
35			72°C - 10 phút
Bảo quản ở 10°C			

Sản phẩm PCR khuếch đại được điện di kiểm tra độ biến đảo đoạn trên gel agarose 1,5% với marker 100bp và nhuộm bởi ethidium bromid.

### 2.3.3.2. Kỹ thuật PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 1 của gen F8

Theo quy trình chuẩn của Tizzano và cộng sự [99]: DNA được khuếch đại bằng hai phản ứng multiplex-PCR cho 2 đoạn *int1h1* và *int1h2* với các mồi tương ứng: *9F*, *9cR*, *int1h-2F* và *int1h-2R*, *int1h-2F*, *int1h-2R*, *9F* (Hình 2.4).



**Hình 2.4. Hình ảnh vị trí thiết kế mồi đoạn intron1h1 và intron1h2**

Ở người không có đột biến đảo đoạn intron 1, trong phản ứng *int1h1*, mồi *9F* và *9cR* thiết kế đặc hiệu cho đoạn *int1h1* nằm trong gen F8 bắt cặp với nhau khuếch đại 1 đoạn có kích thước 1908 bp. Ở phản ứng *int1h2*, mồi *int1h-2F*, *int1h-2R* thiết kế đặc hiệu cho đoạn *int1h2* là bản sao tương đồng của intron 1 nằm ngoài gen F8 bắt cặp với nhau khuếch đại 1 đoạn kích thước 1191bp (Hình 2.4 A). Nếu đột biến đảo đoạn intron 1 xảy ra, *int1h2* tái tổ hợp với *int1h1* dẫn đến các mồi sẽ cạnh tranh nhau trong phản ứng multiplex-PCR. Khi khuếch đại phản ứng *int1h1* mồi *int1h-2F* bắt cặp với mồi *9cR* cho đoạn DNA kích thước 1323 bp và ở phản ứng khuếch đại đoạn *int1h2* mồi *9F* và *int1h-2R* bắt cặp với nhau cho đoạn DNA kích thước 1776bp (Hình 2.4 B).

*Thành phần của phản ứng:*

***Phản ứng 1: Khuếch đại đoạn int1h1***

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
Nước cất PCR	11,4
Buffer 10X	2,0
dNTP (2,5 mM)	2,0
Môi 9cR (10 pM)	0,5
Môi 9F (10 pM)	0,5
Môi int1h-2F (10 pM)	0,5
<i>Taq</i> polymerase (5 u/ $\mu\text{l}$ )	0,1
DNA	3,0
Tổng	20,0

***Phản ứng 2: Khuếch đại đoạn int1h2***

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
Nước cất PCR	11,4
Buffer 10X	2,0
dNTP (2,5 mM)	2,0
Môi int1h-2F (10 pM)	0,5
Môi 9F (10 pM)	0,5
Môi int1h-2R (10 pM)	0,5
<i>Taq</i> polymerase (5 u/ $\mu\text{l}$ )	0,1
DNA	3,0
Tổng	20,0

*Chu trình nhiệt của phản ứng*

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 10 phút		
2 – 34	95°C - 50 giây	55°C - 50 giây	72°C - 2 phút
35			72°C - 10 phút
Bảo quản ở 10°C			

Sản phẩm PCR khuếch đại được điện di kiểm tra độ biến đảo đoạn trên gel agarose 1,5% với marker 1000bp và nhuộm bởi ethidium bromid.

**2.3.4. Kỹ thuật PCR khuếch đại các exon***Thành phần phản ứng PCR*

Thành phần	Thể tích (µl)
Nước cất PCR	11,9
Buffer 10X	2,0
dNTP (2,5 mM)	2,0
Môi xuôi	0,5
Môi ngược	0,5
<i>Taq</i> polymerase (5 u/µl)	0,1
DNA	3,0
Tổng	20,0

*Chu trình nhiệt phản ứng PCR như sau:*

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 10 phút		
2 – 34	95°C - 50 giây	55°C - 50 giây	72°C - 2 phút
35			72°C - 10 phút
Bảo quản ở 10°C			

Kiểm tra độ biến trên gel agarose 1,5%. Nếu điện di trên gel agarose không lên vạch, nghi ngờ có đột biến. Khuếch đại lại đoạn DNA đó với PCR ống chứng âm và chứng dương để khẳng định độ biến. Nếu tất cả các vạch DNA đều lên vạch thì tinh sạch các sản phẩm PCR để giải trình tự.



### 2.3.5. Kỹ thuật điện di trên gel agarose

#### Cách chuẩn bị gel agarose 1,5%

- Cân 1,5 g agarose hoà tan trong 10 mL boric acid EDTA (TBE). Sử dụng lò vi sóng để agarose tan, sau khi agarose tan hết để nguội 55-60°C, đổ vào khuôn gel. Để bản gel đông lại và ổn định hoàn toàn mới sử dụng.

- Gỡ lược, đặt bản gel vào bể điện di chứa sẵn đệm TBE 10X sao cho đệm ngập hoàn toàn bản gel.

- Pha dung dịch TBE 10X (Tris; acid boric; EDTA)

Tris 0,89 M; acid boric 0,89 M; EDTA 2,02 M

#### Tiến hành kỹ thuật điện di

- Đưa gel agarose vào máy điện di, cho TBE ngập gel.

- Dùng pipet và đầu côn nhỏ hút lần lượt dung dịch ở mỗi ống đưa vào giếng (5 µL/giếng).

- Sử dụng máy điện di 80-100V (Mupid- Nhật), điện di ở hiệu điện thế 100V khoảng 30 phút.

- Sau điện di, gel được ngâm vào ethidium bromide 10 phút, rửa qua nước cất và đưa vào soi dưới đèn UV, chụp ảnh dưới ánh sáng tử ngoại.

### 2.3.6. Giải trình tự gen

#### 2.3.6.1. Tinh sạch DNA (sử dụng Kit QIAGEN)

- Cho 500 µl dung dịch PB vào ống chứa 100 µl plasmid, lắc đều, để ở nhiệt độ phòng 30 phút.

- Hút hết dịch cho qua cột tinh sạch (do hãng Qiagen cung cấp).

- Quay ly tâm 10000 v/p trong 30 giây, đổ bỏ dịch ở đáy ống.

- Cho tiếp 750 µl PE vào cột.

- Ly tâm 10000 v/p trong 30 giây, đổ bỏ dịch phía đáy ống.

- Ly tâm tiếp thêm 60 giây để loại bỏ hết dịch trong cột.
- Lấy cột ra, cho vào ống eppendorf 1,5 mL.
- Cho 50  $\mu$ l dung dịch EB (gồm 10 mM Tris-Cl, pH 8,5).
- Để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, ly tâm 10000 v/p trong 60 giây.
- Dịch thu được ở đáy ống là dịch chứa DNA đã được tinh sạch.

### 2.3.6.2. Quy trình thực hiện giải trình tự gen:

Thực hiện theo qui trình và sử dụng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

#### + Giai đoạn 1: Chuẩn bị master mix cho phản ứng giải trình tự gen

- Chuẩn bị eppendorf 0,2ml đã đánh dấu sẵn thứ tự các mẫu
- Chuẩn bị hóa chất để thực hiện phản ứng
- Làm tan hoàn toàn hóa chất, trộn đều sau đó ly tâm nhẹ để toàn bộ dịch trên nắp ống rơi xuống
- Tiến hành pha master mix theo bảng sau:

Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
Sản phẩm sau PCR đã được tinh sạch	1,0
Big Dye Buffer 5X	3,0
Big Dye terminator V3.1 (2,5X)	2,0
Nước cất	13,0
Môi đơn (5pmol/ $\mu$ l)	1,0
Tổng	20

#### **Chú ý:**

- Toàn bộ khâu chuẩn bị master mix phải được thực hiện trên khay đá
- Các hóa chất phải được làm tan và trộn đều trước khi sử dụng

- Big dye 2,5X phải được bảo quản tránh ánh sáng
- Mỗi DNA thực hiện hai phản ứng với môi xuôi và môi ngược

### + **Giai đoạn 2: Thực hiện phản ứng sequencing**

- Sau khi chuẩn bị master mix cho phản ứng xong, ly tâm nhanh các ống PCR để toàn bộ dịch dính trên thành và nắp ống xuống dưới và làm tan bọt.

- Xếp các ống master mix vào máy PCR

- Chọn chương trình nhiệt đã được cài đặt sẵn trong máy theo chu trình đã được tối ưu hóa.

- Kiểm tra lại toàn bộ chu trình nhiệt:

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	96°C - 1 phút		
2 – 26	96°C - 10 giây	50°C - 5 giây	60°C - 4 phút
Bảo quản ở 10°C			

- Ấn nút “Start” cho máy bắt đầu chạy chương trình.

- Sau khi chạy xong chương trình đưa máy về chế độ nghỉ và tắt máy

- Lấy mẫu ra khỏi máy PCR

- Các sản phẩm sau khi được khuếch đại bằng Big dye kit sẽ được tinh sạch bằng big Dye temination để loại bỏ toàn bộ big dye thừa và đem đọc trên máy giải trình tự gen ABI (Applied Biosystem)

- 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

### **2.3.7. Phương pháp phân tích kết quả**

So sánh trình tự gen của bệnh nhân với trình tự gen chuẩn của Gen Bank (National center for biotechnology information, NCBI) NC\_000023.11 bằng phần mềm CLC.

So sánh trình tự các acid amin của bệnh nhân với trình tự acid amin chuẩn của Genebank NP\_000123.1 bằng phần mềm Blast của NCBI. Trong đó alanine là acid amin đầu tiên của protein F8 trưởng thành được đánh số 01. 19 acid amin trước đó bắt đầu từ methionin bị loại bỏ trong quá trình hoàn thiện protein F8 không được đánh số.

Khi phát hiện vị trí nghi ngờ đột biến, tìm các vị trí đột biến tương ứng trên cơ sở dữ liệu HAMSTeR và CDC. Nếu đột biến đã công bố thì khẳng định bệnh nhân có đột biến gây bệnh. Trường hợp đột biến ở bệnh nhân chưa thấy công bố thì phân tích tiếp khả năng gây bệnh dựa trên phần mềm cấu trúc không gian 3D DNASTAR.

## **2.4. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU**

- Bệnh nhân sẽ được thông báo kết quả xác định vị trí đột biến gen thông qua bác sĩ điều trị.
- Bệnh nhân có trách nhiệm cung cấp đầy đủ các thông tin liên quan đến tình hình bệnh tật của mình.
- Các xét nghiệm phân tích gen chỉ thực hiện khi có sự đồng ý của bệnh nhân.
- Các thông tin về bệnh nhân, kết quả chẩn đoán được hoàn toàn giữ bí mật. Nghiên cứu được tiến hành hoàn toàn vì mục đích khoa học, không vì bất kỳ mục đích nào khác.

## Chương 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA CÁC ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

##### 3.1.1. Đặc điểm về tuổi

Trong nghiên cứu này, do bệnh nhân chủ yếu là nam giới bị bệnh nên có 101/103 bệnh nhân nam giới chiếm tỷ lệ 98,1%. Tuy nhiên trong quá trình thu thập mẫu, hai nữ giới có đầy đủ các triệu chứng chảy máu, có nồng độ yếu tố VIII thấp được chẩn đoán hemophilia A tại viện Nhi và viện Huyết học – Truyền máu trung ương đảm bảo tiêu chuẩn lựa chọn mẫu. Như vậy, nữ giới chiếm tỷ lệ 1,9%.

**Bảng 3.1. Đặc điểm về tuổi của các đối tượng nghiên cứu**

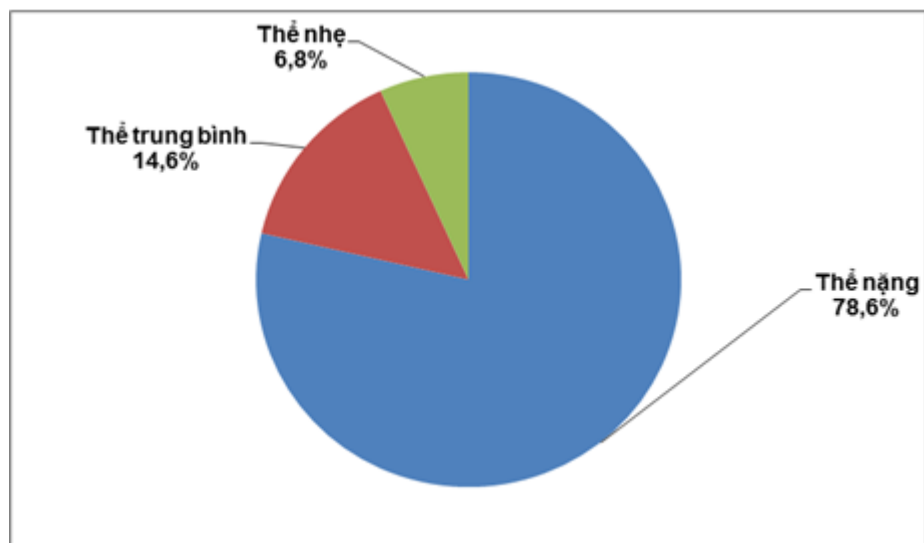
Đặc điểm		n	Tỷ lệ %
<b>Tuổi phát hiện bệnh</b>	Dưới 1 tháng	3	2,9
	1-6 tháng	36	34,9
	> 6 tháng-12 tháng	32	31,1
	> 12 tháng -24 tháng	19	18,4
	> 24 tháng	13	12,6
	Chẩn đoán trước sinh	0	0
	trung bình ( $\bar{x} \pm SD$ )(tháng)	32 ± 10,6	
<b>Tuổi trung bình bệnh nhân</b> ( $\bar{x} \pm SD$ ) (Năm)	8,2 ± 5,1		

#### *Nhận xét:*

Có 36/103 bệnh nhân hemophilia A được phát hiện bệnh ở lứa tuổi 1 – 6 tháng chiếm tỷ lệ cao nhất (34,9%); 32/103 bệnh nhân được phát hiện bệnh ở

lứa tuổi 7 - 12 tháng chiếm tỷ lệ 31,1%; 19/103 bệnh nhân được phát hiện bệnh ở lứa tuổi 12 - 24 tháng chiếm tỷ lệ 18,4%; 13/103 bệnh nhân được phát hiện bệnh ở lứa tuổi 12 - 24 tháng chiếm tỷ lệ 12,6%; 3/103 bệnh nhân được phát hiện bệnh ở lứa tuổi dưới 1 tháng chiếm tỷ lệ 2,9% và không có bệnh nhân nào được phát hiện bệnh nhờ chẩn đoán trước sinh.

### 3.1.2. Tỷ lệ bệnh nhân chia theo thể bệnh



**Biểu đồ 3.1. Phân bố tỷ lệ bệnh nhân 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%.

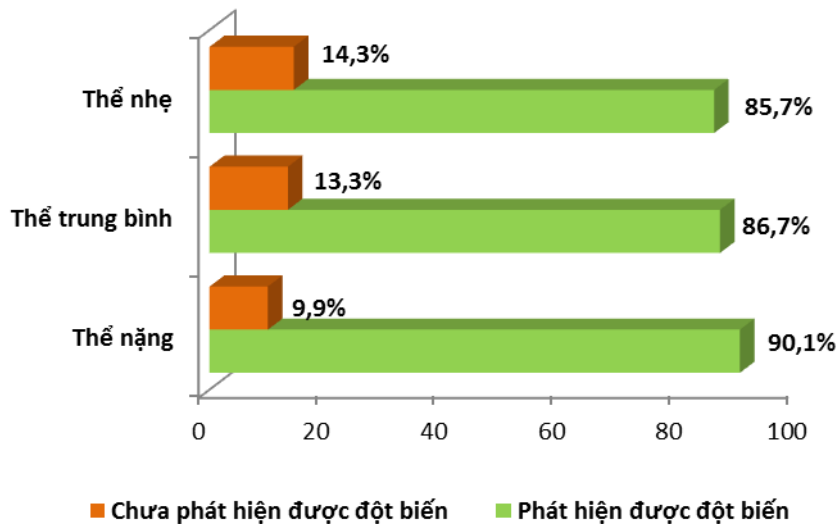
## 3.2. KẾT QUẢ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN F8

### 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%, bao gồm: HA14, HA27, HA32, HA35, HA43, HA48, HA52, HA58, HA60, HA66, HA69.

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



**Biểu đồ 3.2. Phân bố tỷ lệ phát hiện đột biến theo thể bệnh**

#### *Nhận xét:*

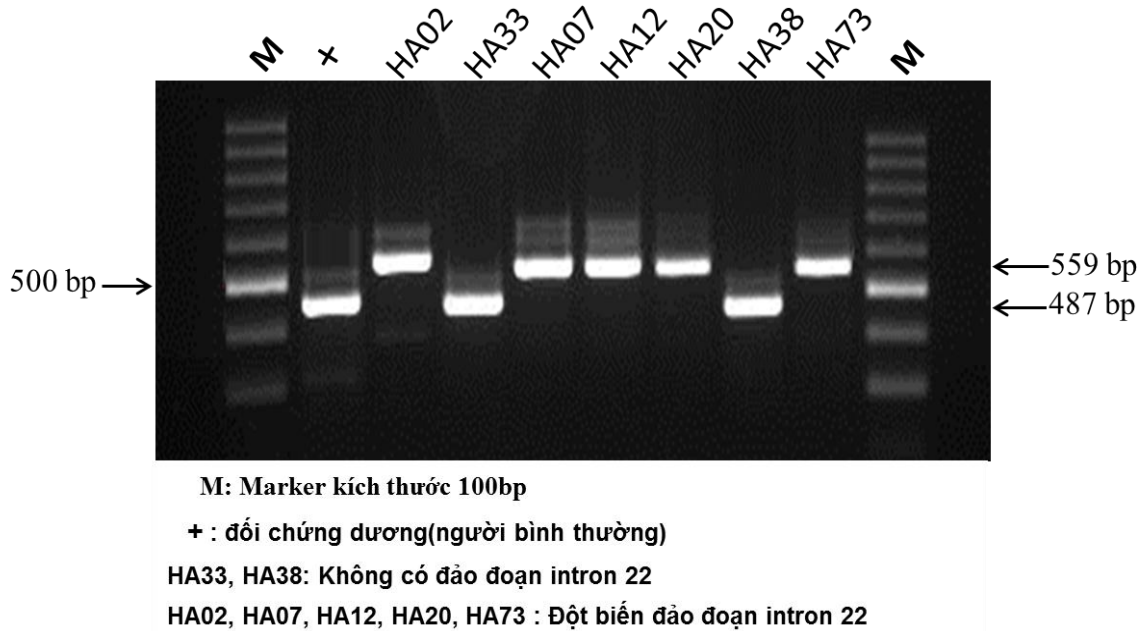
- 73/81 bệnh nhân thể nặng phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 90,1%; 8/81 bệnh nhân thể nặng không phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 9,9%.
- 13/15 bệnh nhân thể trung bình phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 86,7%; 2/15 bệnh nhân thể trung bình không phát hiện được đột biến chiếm tỷ lệ 13,3%.
- 6/7 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 ở bệnh nhân hemophilia A

### 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.



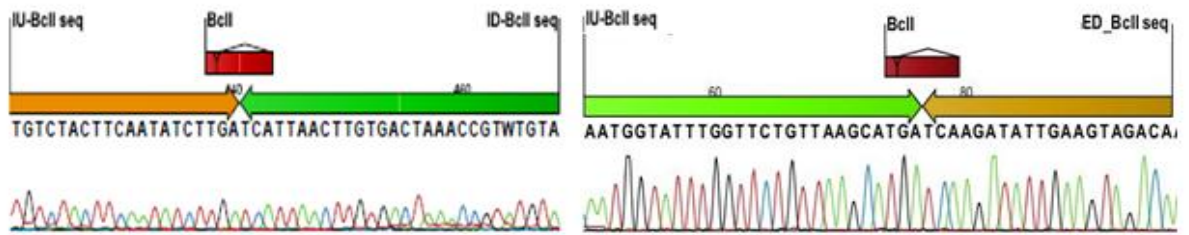
**Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 22**

***Nhận xét:***

DNA người bình thường ở mẫu đối chứng dương (+) 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 (hình 3.1) do điện di đều có vạch DNA kích thước 559 bp.

Để đảm bảo chính xác các vạch DNA trên đúng là đoạn DNA cần tìm, gel có chứa đoạn DNA kích thước 559 bp, kích thước 487 bp ở mẫu bệnh nhân trình tự nucleotid HA02 và HA33 được cắt để tinh sạch rồi giải trình tự sau đó kiểm tra so sánh với trình tự Genebank (hình 3.2). Kết quả các đoạn gen kiểm tra có đầy đủ trình tự vị trí bám của môi, trình tự của enzym *BclI* và các vị trí này tương ứng với các vị trí đã được Rossetti và cộng sự công bố [78].

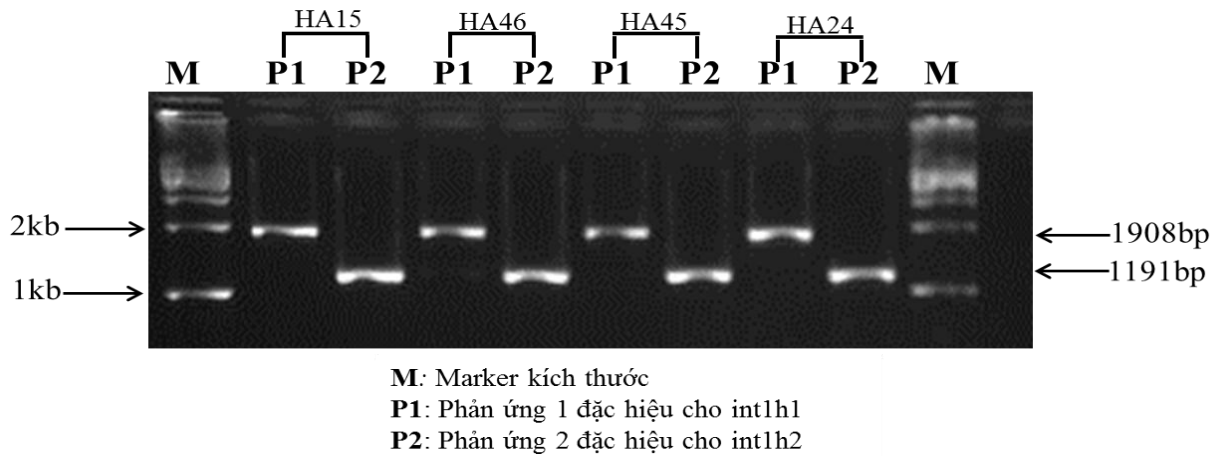




**Hình 3.2. Hình ảnh giải trình tự 2 đoạn DNA kích thước 487bp (mỗi IU-ID) và đoạn 559bp (mỗi IU-ED)**

*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 theo phương pháp được mô tả bởi Tizzano và cộng sự [99]. Kết quả 46 bệnh nhân này không bị đột biến đảo đoạn intron 1.



**Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định đảo đoạn intron 1**

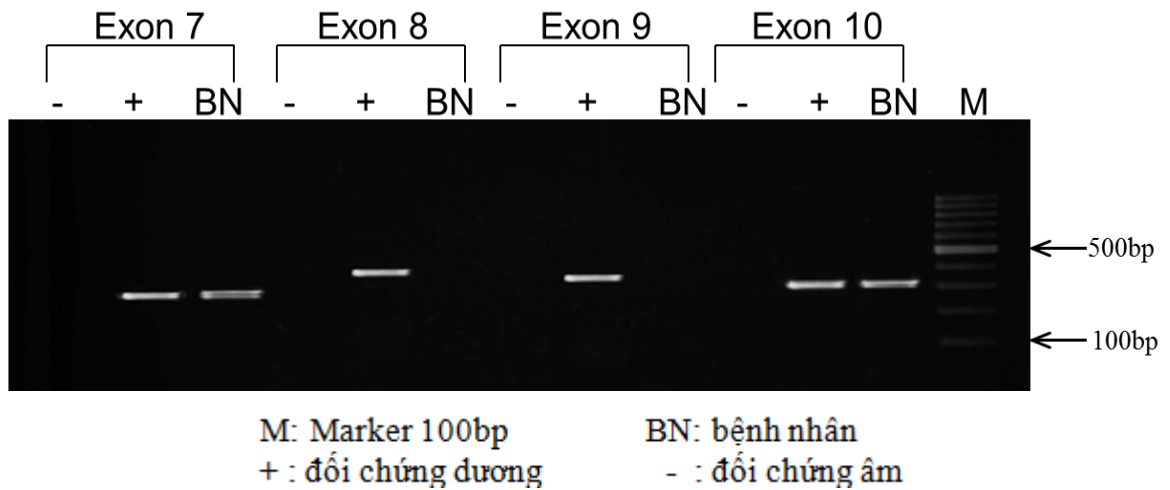
**Nhận xét:**

Trong kết quả ở hình 3.3, 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:

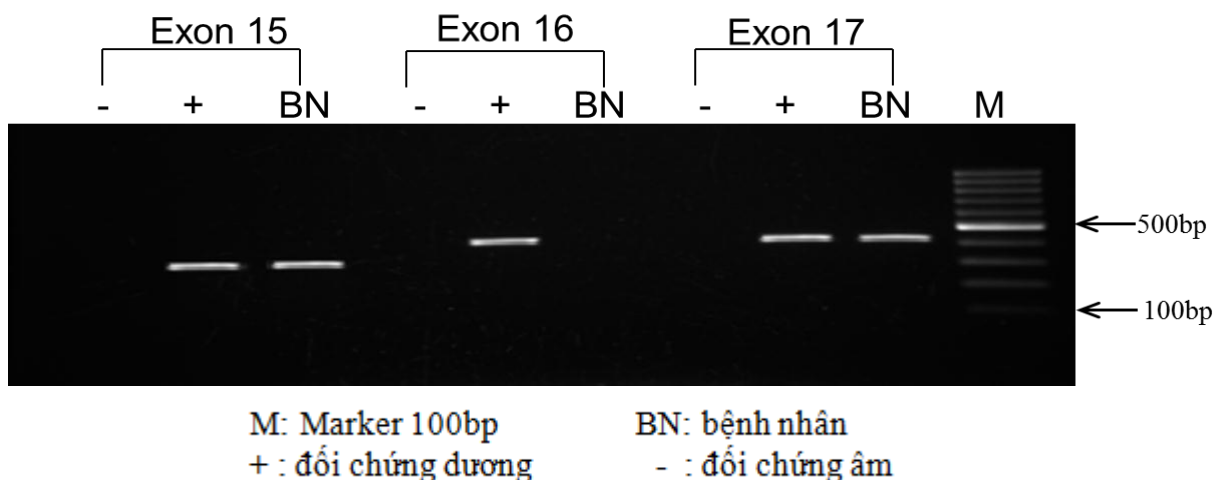


**Hình 3.4. Kết quả PCR xác định đột biến mất exon ở bệnh nhân HA64**

#### *Nhận xét:*

Bệnh nhân mã số HA64 sau khi được khuếch đại toàn bộ 38 cặp mồi 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.

- Đột biến mất exon 16 ở bệnh nhân HA55:



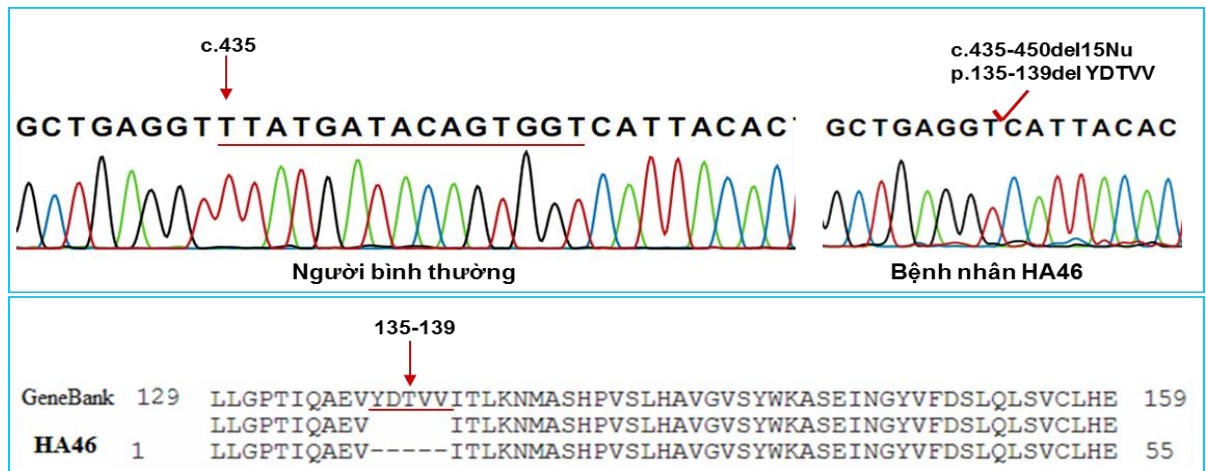
**Hình 3.5. Kết quả PCR xác định đột biến mất exon ở bệnh nhân HA55**

**Nhận xét:**

Kết quả hình 3.5 cho thấy ở bệnh nhân HA55 các mẫu chứng dương đều lên vạch DNA, mẫu đối chứng âm không có vạch DNA, ở exon 15 và exon 17 của bệnh nhân đều có vạch DNA kích thước tương ứng với mẫu chứng dương trong khi ở exon 16 không có vạch DNA chứng tỏ rằng bệnh nhân HA55 đột biến mất exon 16 gây bệnh hemophilia A.

**3.2.2.3. Kết quả phát hiện đột biến bằng phương pháp giải trình tự****a/ Đột biến mất đoạn nucleotid**

- Đột biến mất 15 nucleotid

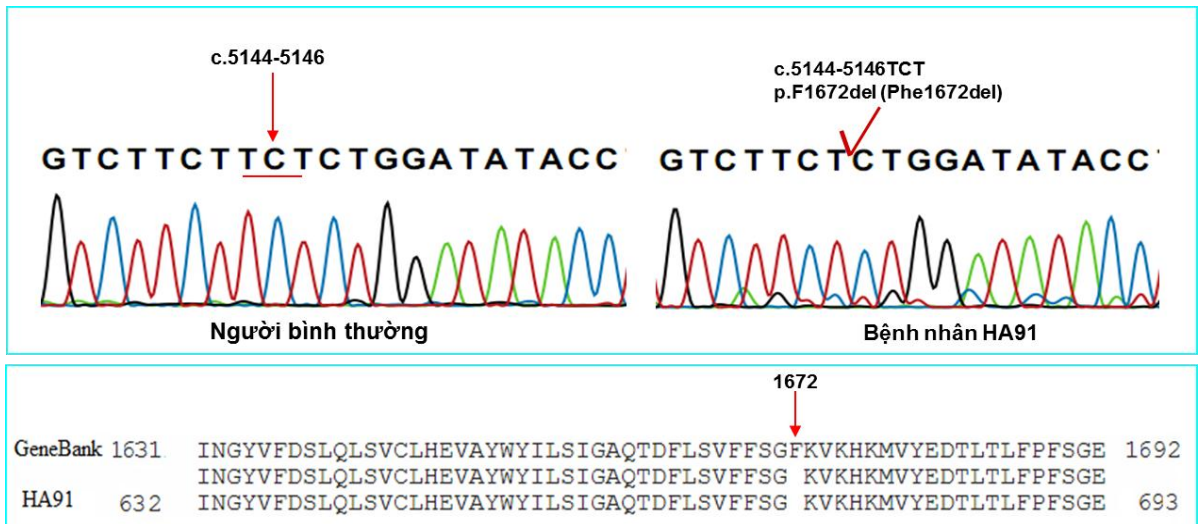


**Hình 3.6. Hình ảnh đột biến mất đoạn 15 nucleotid ở bệnh nhân HA46**

**Nhận xét**

Bệnh nhân mã số HA46 thể nặng, không phát hiện thấy đảo đoạn intron 22, intron 1. Khuếch đại 38 cặp mỗi 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, Aspartic, Threonin, Valin, Valin (p.135-139delTyr-Val).

- Đột biến mất 3 nucleotid:

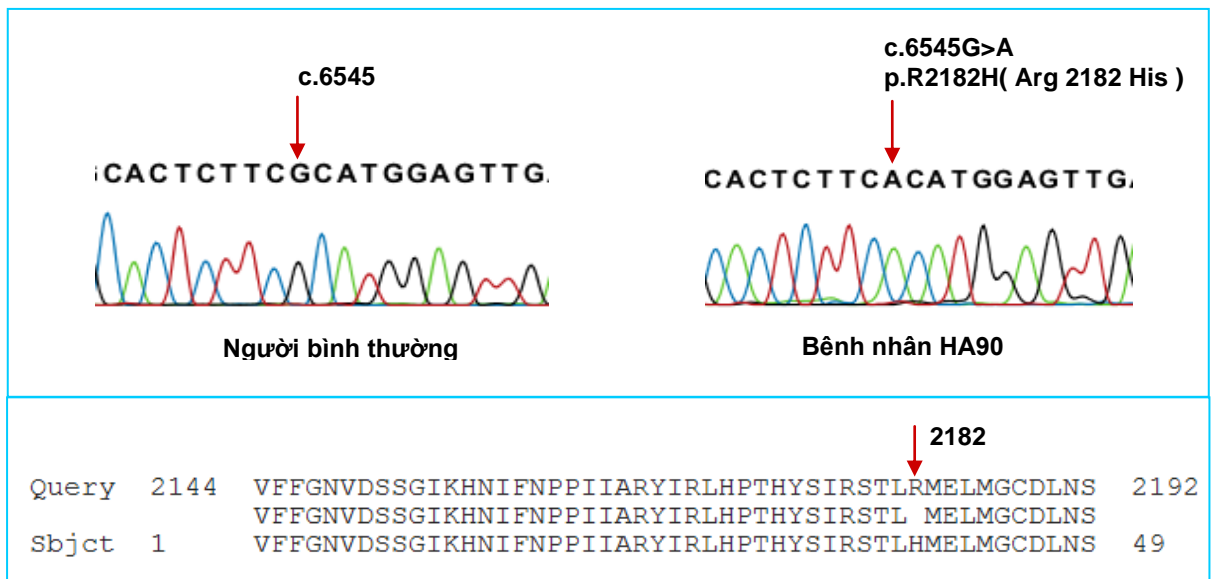


**Hình 3.7. Hình ảnh đột biến mất 3 nucleotid ở bệnh nhân HA91**

**Nhận xét:**

Bệnh nhân HA91 khi giải trình tự ở exon 14 phát hiện mất 3 nucleotid TCT. Khi kiểm tra trình tự acid amin thấy cả ba nucleotid này mã hóa trong một acid amin Phenylalanin. Do đó, đột biến chỉ làm mất acid amin này ở vị trí p.1672, các acid amin còn lại vẫn mã hóa bình thường (p.Phe1672del).

*b/ Đột biến sai nghĩa:*

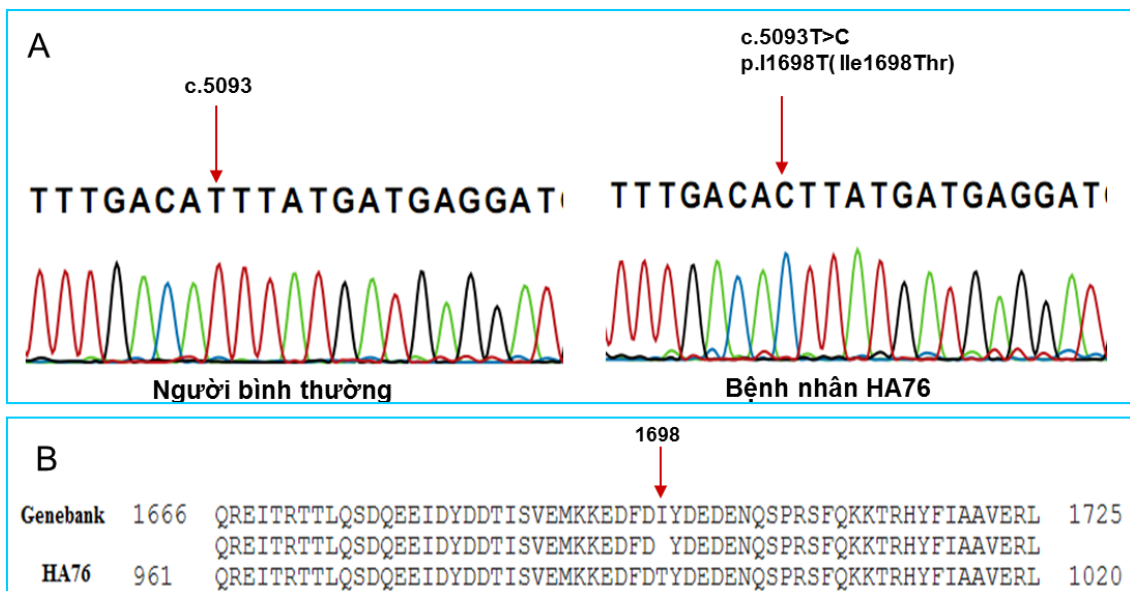


**Hình 3.8. Hình ảnh đột biến ở bệnh nhân mã số HA90**

**Nhận xét:**

Hình ảnh giải trình tự ở bệnh nhân mã số HA90 cho thấy: có đột biến thay thế nucleotid G thành nucleotid A (G>A) trên exon 23 của gen F8. So sánh với trình tự Genebank thấy trên exon 23 vị trí c.6545 G>A, dẫn đến thay đổi acid amin vị trí p.2182 của protein gen F8 từ Arginin thành Histidin (p.Arg2182His).

- Đột biến sai nghĩa: thay thế nucleotid T thành nucleotid C



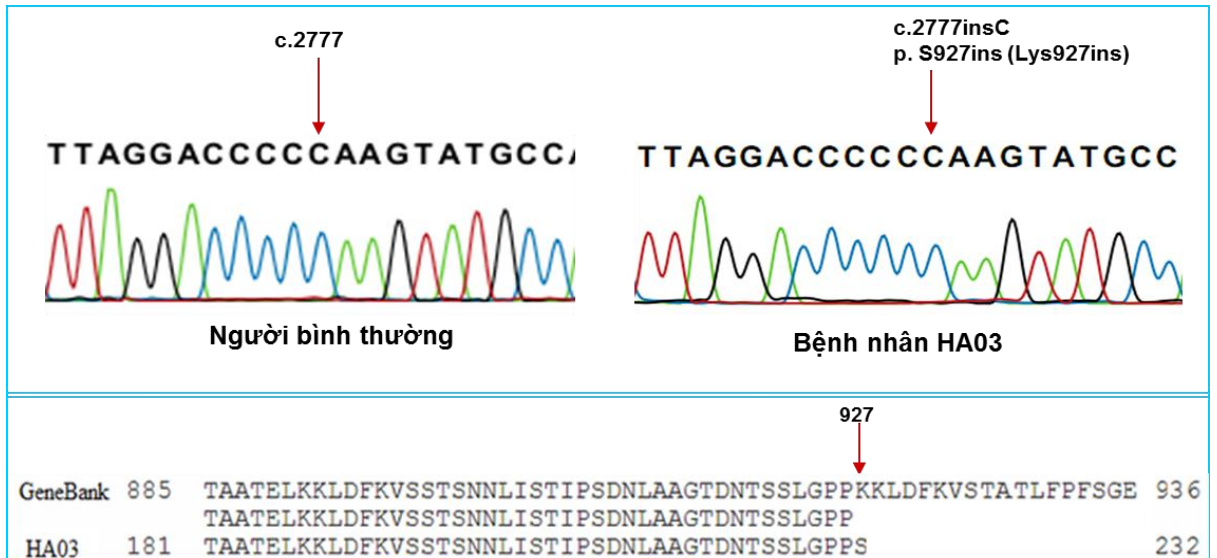
**Hình 3.9. Hình ảnh đột biến của bệnh nhân HA76**

**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*

- Đột biến thêm nucleotid C:

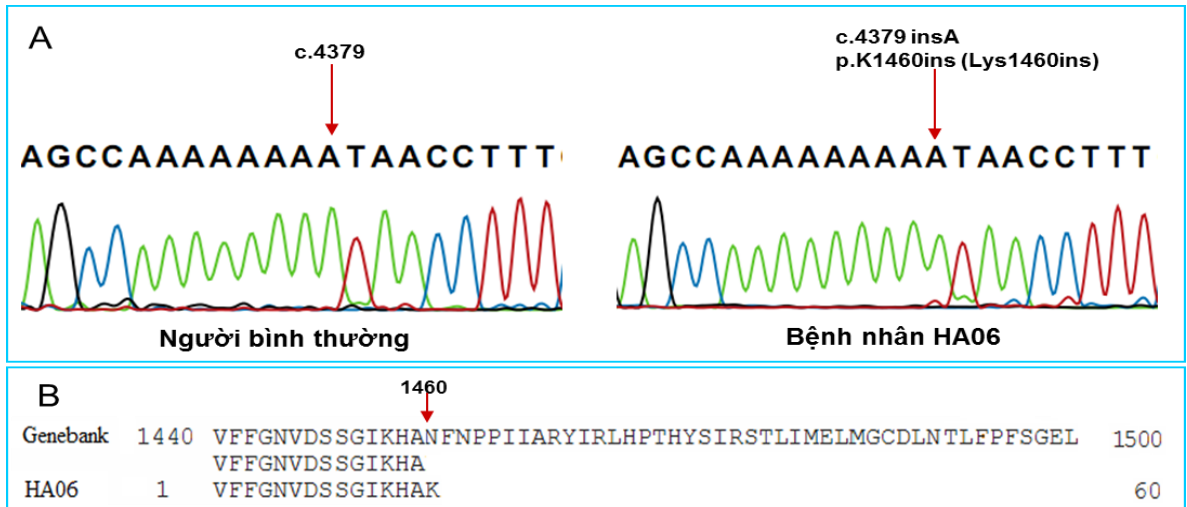


**Hình 3.10. Hình ảnh đột biến thêm nucleotid C của bệnh nhân HA03**

**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).

- Thêm nucleotid A:



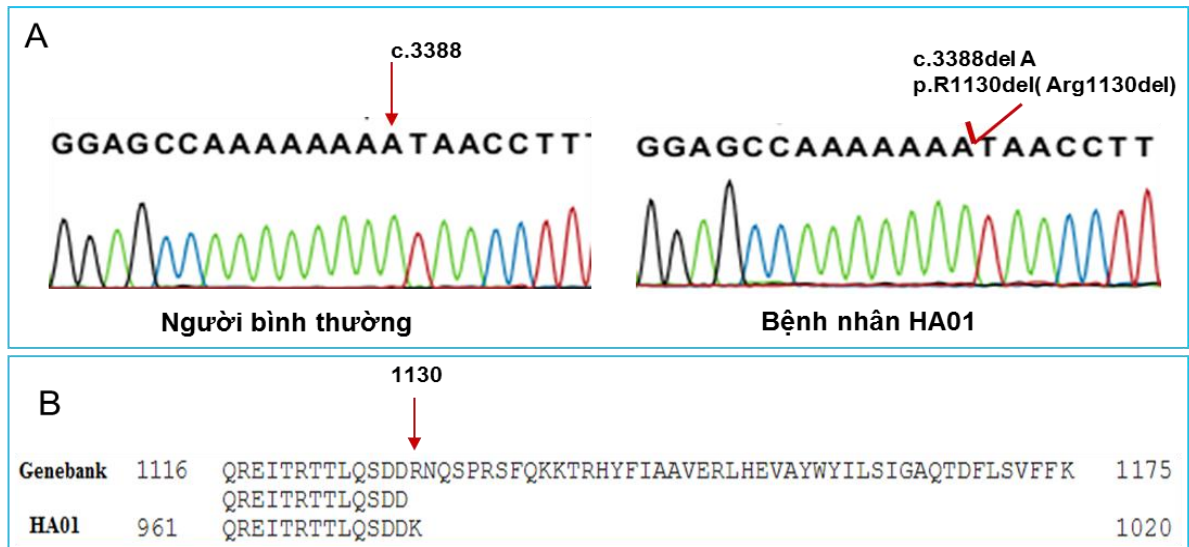
**Hình 3.11. Hình ảnh đột biến thêm nucleotid A của bệnh nhân HA06**

**Nhận xét:**

Bệnh nhân mã số HA06 được giải trình tự thấy có đột biến thêm nucleotid A ở vị trí c.4379. Đột biến này gây dịch khung dịch mã toàn bộ acid amin còn lại từ vị trí p.1460 (p.Lys1460ins).

**d/ Đột biến mất 1 nucleotid**

- Đột biến mất nucleotid A

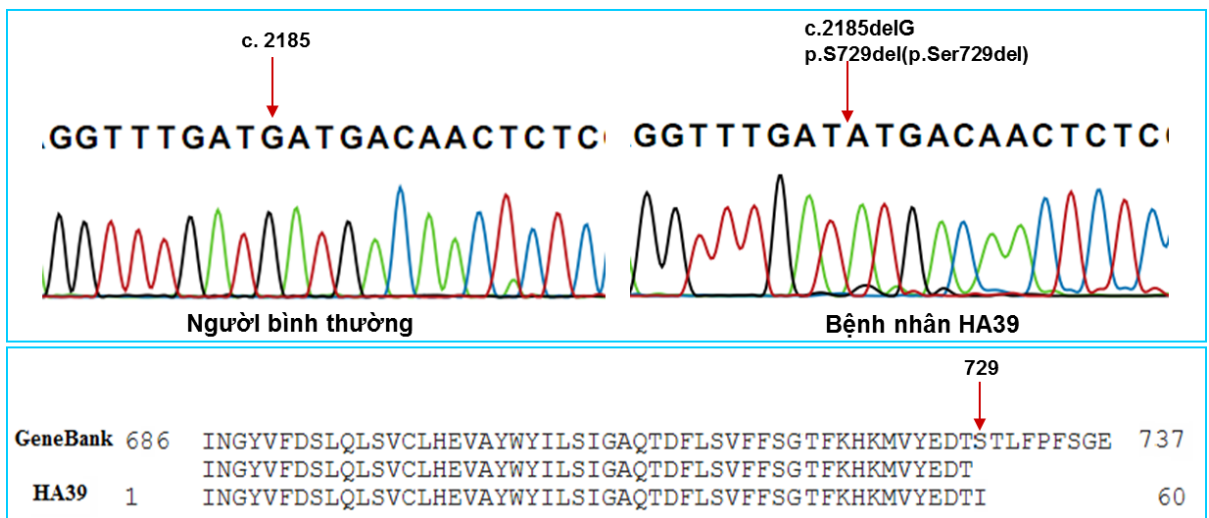


**Hình 3.12. Hình ảnh đột biến mất nucleotid của bệnh nhân HA01**

**Nhận xét:**

Hình ảnh giải trình tự cho thấy bệnh nhân HA01 có đột biến mất một nucleotid A trên exon 14 của gen F8. So sánh với trình tự Genebank thấy mất một nucleotid A tại vị c.3388, dẫn đến protein yếu tố VIII bị lệch khung dịch mã toàn bộ acid amin từ vị trí p.1130 (p.Arg1130del).

- Đột biến mất nucleotid G:



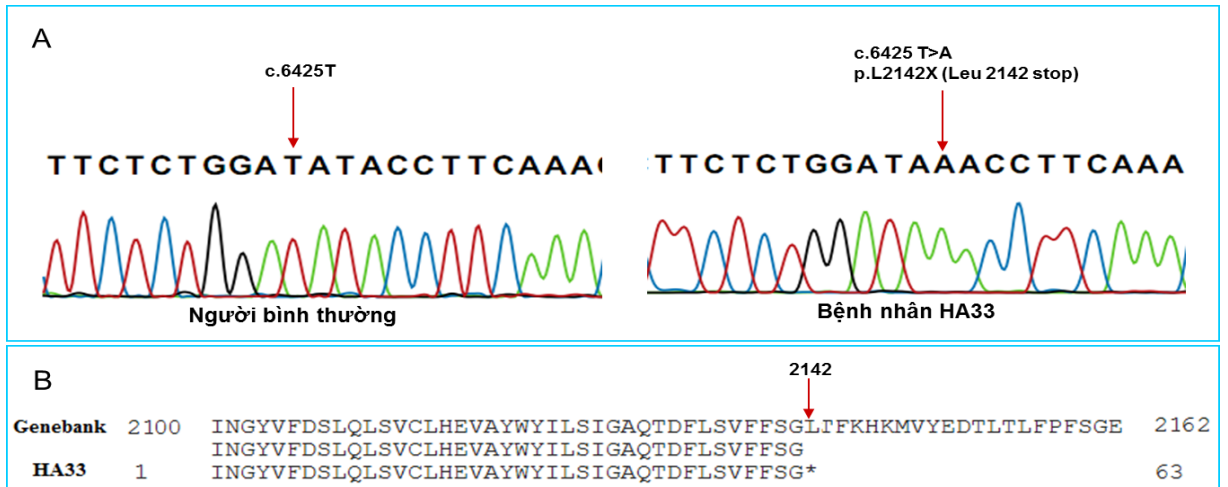
**Hình 3.13. Hình ảnh đột biến mất nucleotid của bệnh nhân HA39**

**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

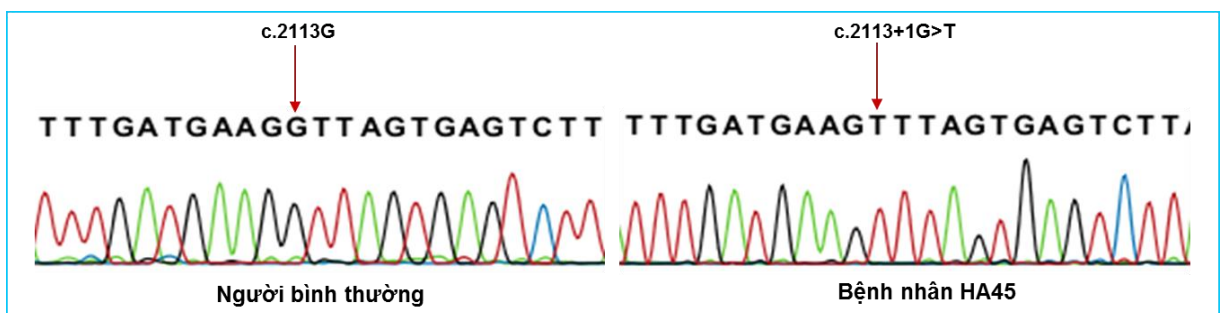


**Hình 3.14. Hình ảnh đột biến tạo stop codon của bệnh nhân HA33**

**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).

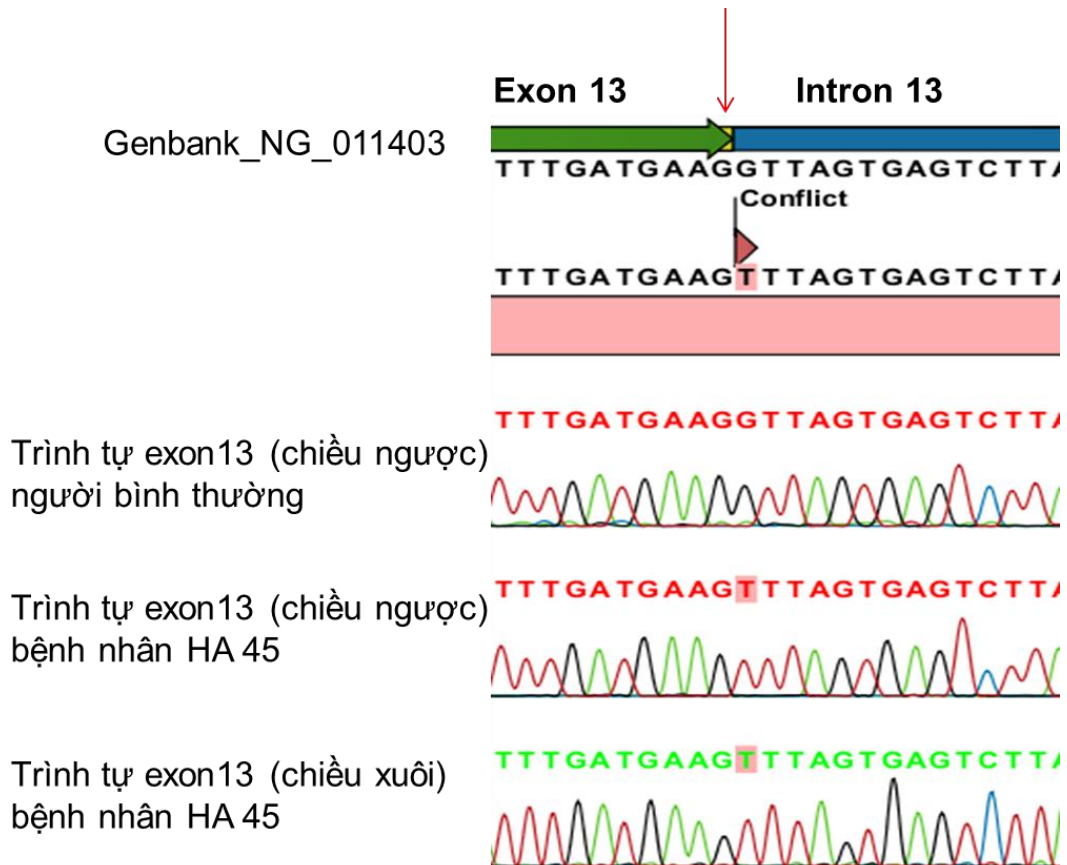
f/ Đột biến tại vị trí nối



**Hình 3.15. Hình ảnh đột biến tại vị trí nối exon/intron của bệnh nhân HA45**

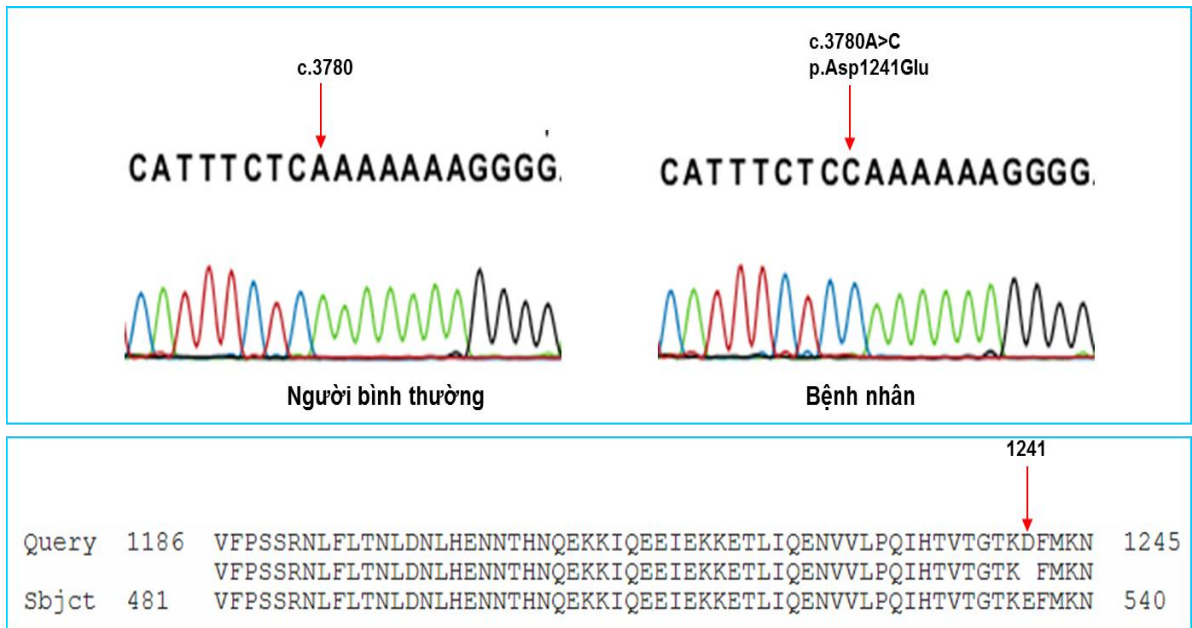
**Nhận xét:**

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](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 3.16. 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 3.17. 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 cơ sở dữ liệu Hamster và CDC phát hiện đây không phải là đột biến gây bệnh mà là một SNP (đã được công bố mã số 1800292).

rs1800292 [Homo sapiens]  
2508.

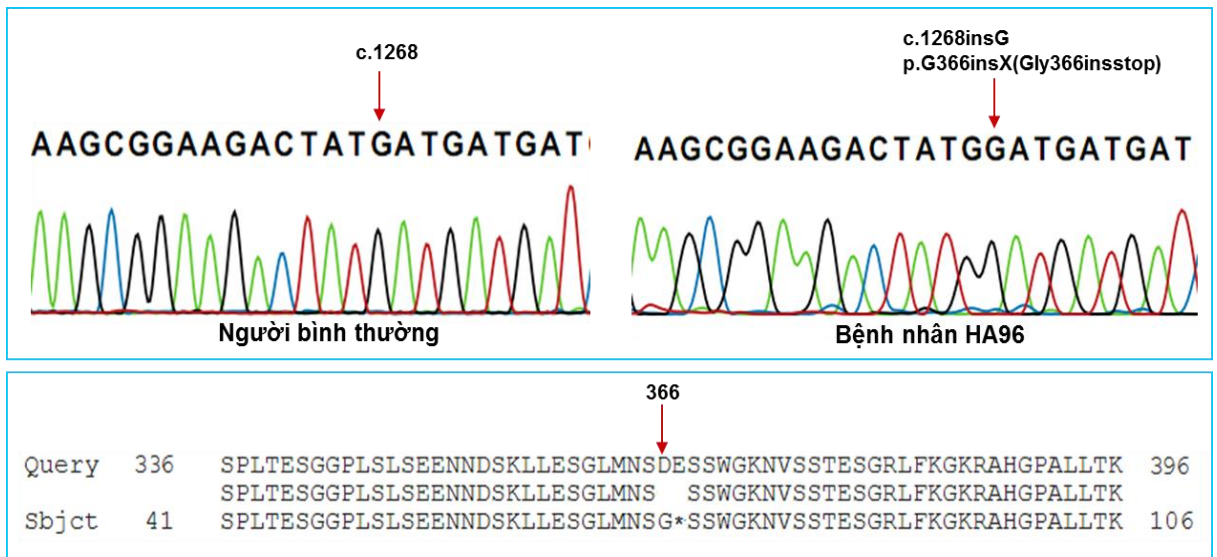
ACAAAGAAACACACAGCTCATTCTC [A/C] AAAAAAGGGGAGGAAGAAACTTGG

MapView VarView PubMed GeneView SeqView No 3D No OMIM

Allele Origin: A-Germline C-  
MAF/MinorAlleleCount: G=0.1046/173  
Clinical Significance: non-pathogenic  
HGVS Names: [ NC\_000023.10:g.154158201T>G ] [ NG\_011403.1:g.97798A>C ] [ NM\_000132.3:c.3864A>C ]  
[ NW\_003871103.2:g.2403047T>G ]  
ID: 1800292

**Hình 3.18. Hình ảnh SNP đã được công bố (sử dụng phần mềm DNASTAR)**

*e/ Đột biến mới chưa được công bố*

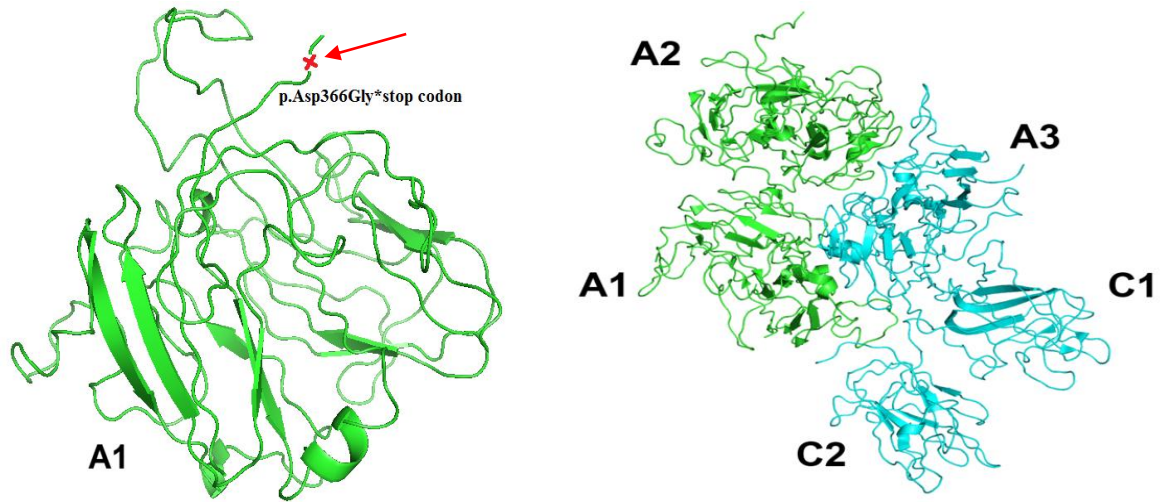


**Hình 3.19. Hình ảnh đột biến mới chưa được công bố của bệnh nhân HA96**

**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 3.20. 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 phần cấu trúc vùng A1, mất hoàn toàn các vùng A2, A3, C1, C2 dẫn đến biểu hiện của bệnh hemophilia A trên lâm sàng.

### 3.2.3. Đánh giá nguy cơ phát triển chất ức chế yếu tố VIII

**Bảng 3.2. Phân bố tỷ lệ bệnh nhân có chất ức chế yếu tố VIII theo các dạng đột biến**

Dạng đột biến	Chất ức chế				Tổng	
	Có chất ức chế		Không có chất ức chế			
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %
Đảo đoạn int22	10	28,6	25	71,4%	35	100%
Sai nghĩa	2	9,1	20	91,9	22	100%
Vị trí nối	0	0	4	100	4	100%
Mất 1 nucleotid	1	11,1	8	88,9	9	100%
Thêm 1 nucleotid	1	11,1	8	88,9	9	100%
Vô nghĩa	2	22,2	7	77,8	9	100%
Xóa đoạn lớn	1	25	3	75	4	100%
Không phát hiện đột biến	1	9,1	10	90,9	11	100%
Tổng	18	17,5	85	82,5	103	100%

**Nhận xét:**

Có 18/103 bệnh nhân có chất ức chế yếu tố VIII chiếm tỷ lệ 17,5%.

Trong đó ở các bệnh nhân có đột biến đảo đoạn intron 22 có 12 bệnh nhân có chất ức chế yếu tố VIII chiếm tỷ lệ cao nhất 28,6%.

Sau đó là bệnh nhân đột biến xóa đoạn lớn (25%) và đột biến vô nghĩa (22%).

**Bảng 3.3. Phân bố tỷ lệ bệnh nhân có chất ức chế yếu tố VIII theo các vùng đột biến trên gen F8**

Dạng đột biến	Chất ức chế				Tổng	
	Có chất ức chế		Không có chất ức chế			
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %
Chuỗi nặng (Vùng A1, A2, B)	5	10	45	90	50	100
Chuỗi nhẹ (Vùng A3, C1, C2)	12	28,6	30	71,4	42	100
Không phát hiện đột biến	1	9,1	10	90,9	11	100
Tổng	18	17,5	85	82,5	103	100

**Nhận xét:**

12/42 bệnh nhân có đột biến trên chuỗi nhẹ gen F8 (vùng A3, C1, C2) có chất ức chế yếu tố VIII (chiếm tỷ lệ 28,6%).

5/50 bệnh nhân có đột biến trên chuỗi nặng gen F8 (vùng A1, A2, B) có chất ức chế yếu tố VIII (chiếm tỷ lệ 10%).

**Bảng 3.4. Liên quan giữa các dạng đột biến và yếu tố ức chế**

			Chất ức chế		OR, 95%CI, p
			Có chất ức chế	Không có chất ức chế	
Dạng đột biến	Đảo đoạn intron 22	Có	10	25	3,0 (1 – 9,6), <0,05
		Không	8	60	
	Nonsense	Có	2	7	>0,05
		Không	16	78	
	Xóa đoạn lớn	Có	1	3	>0,05
		Không	17	82	
Vùng đột biến	Chuỗi nhẹ		12	30	3,6 (1 – 13,2), <0,05
	Chuỗi nặng		5	45	

**Nhận xét:**

Ở bệnh nhân có đột biến đảo đoạn intron 22, nguy cơ xuất hiện chất ức chế VIII cao hơn so với nhóm không có đảo đoạn intron 22 là 3,0 lần (OR=3,0; 95%CI (1 – 9,6), p<0,05).

Vùng đột biến: có 92/103 bệnh nhân phát hiện được đột biến nên chỉ phân tích được vùng đột biến của 92 bệnh nhân. Trong đó bệnh nhân có đột biến trên chuỗi nhẹ gen F8 (vùng A3,C1,C2) có nguy cơ xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII cao hơn so với nhóm bệnh nhân có đột biến trên chuỗi nặng gen F8 (vùng A1,A2,B ) là 3,6 lần (OR=3,6; 95%CI (1 - 13,2), p <0,05).



### 3.3. LẬP BẢN ĐỒ ĐỘT BIẾN GEN F8 GÂY BỆNH HEMOPHILIA A Ở VIỆT NAM

#### 3.3.1. Kết quả các 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 xác định có đột biến đảo đoạn intron 22: HA02, HA05, HA07, HA08, HA12, HA13, HA17, HA20, HA22, HA25, HA40, HA42, HA44, HA50, HA70, HA71, HA72, HA73, HA74, HA75, HA77, HA78, HA79, HA80, HA81, HA82, HA83, HA84, HA86, HA87, HA88, HA89, HA97, HA101, HA103.

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

**Bảng 3.5. 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.135-139Tyr-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.Gly366insStop	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.2777-78isnC	p.Lys927ins	HAMSTeR, Margagline (2008)

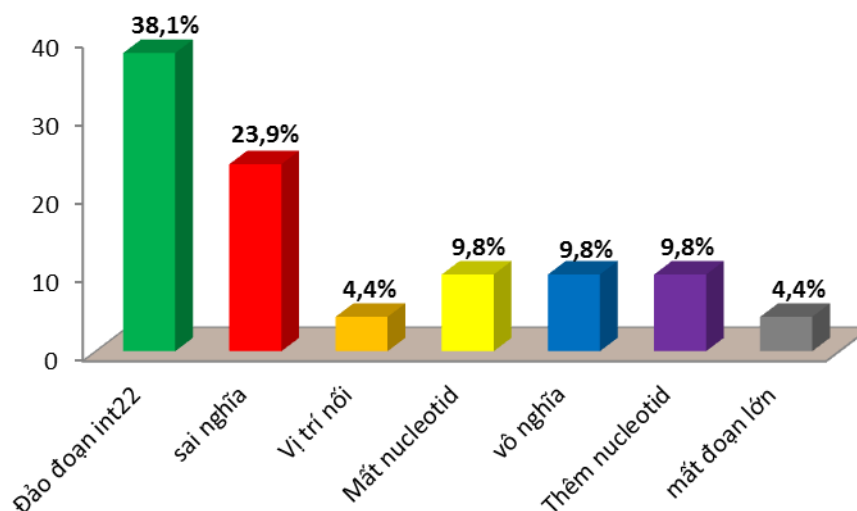
18.	HA03	Nặng	14	B/chuỗi nặng	c.2777-78insC	p. Lys927ins	HAMSTeR, Margagline (2008)
19.	HA01	Trung bình	14	B/chuỗi nặng	c.3388delA	p.Arg1130del	Ma GC (2008)
20.	HA57	Nặng	14	B/chuỗi nặng	c.3169G>A	p.Glu1057Lys	Ogata K (2011)
21.	HA54	Nặng	14	B/chuỗi nặng	c.3263C>T	p.Thr1088Ile	Miller CH (2011)
22.	HA24	Nặng	14	B/chuỗi nặng	c.3637insA	pAsn1213ins	HAMSTeR, Pieneman Wc (1995)
23.	HA31	Nặng	14	B/chuỗi nặng	c.3637insA	pAsn1213ins	HAMSTeR, Pieneman Wc (1995)
24.	HA100	Nặng	14	B/chuỗi nặng	c.3637insA	pAsn1213ins	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.Lys1555del	Higuchi (1991)
33.	HA76	Nhẹ	14	B/ chuỗi nặng	c.5093T>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.5177G>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.

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



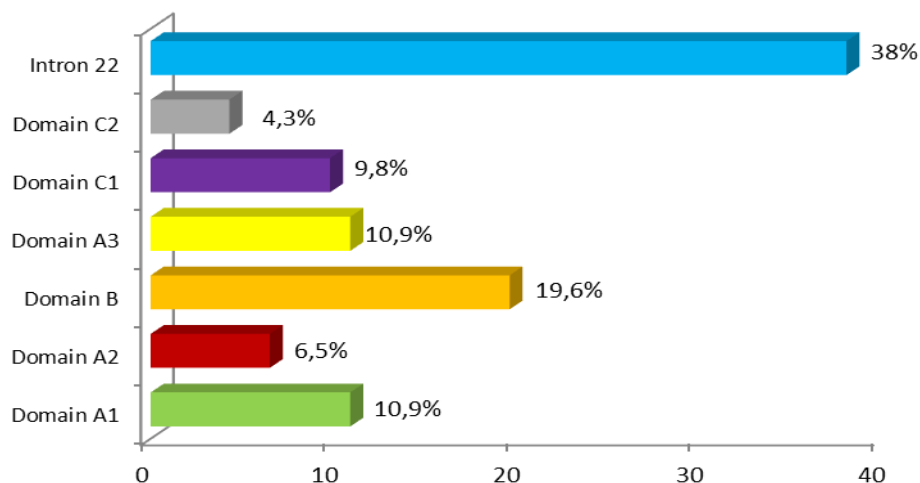
**Biểu đồ 3.3. Các dạng đột biến phát hiện được trên bệnh nhân hemophilia A**

**Nhận xét:**

Trong 92 bệnh nhân phát hiện được đột biến có: đột biến đảo đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất 38,1% (35/103 bệnh nhân). Tiếp theo là đột biến sai nghĩa chiếm tỷ lệ 23,9% (22/103 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% (9/103 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% (4/103 bệnh nhân).

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



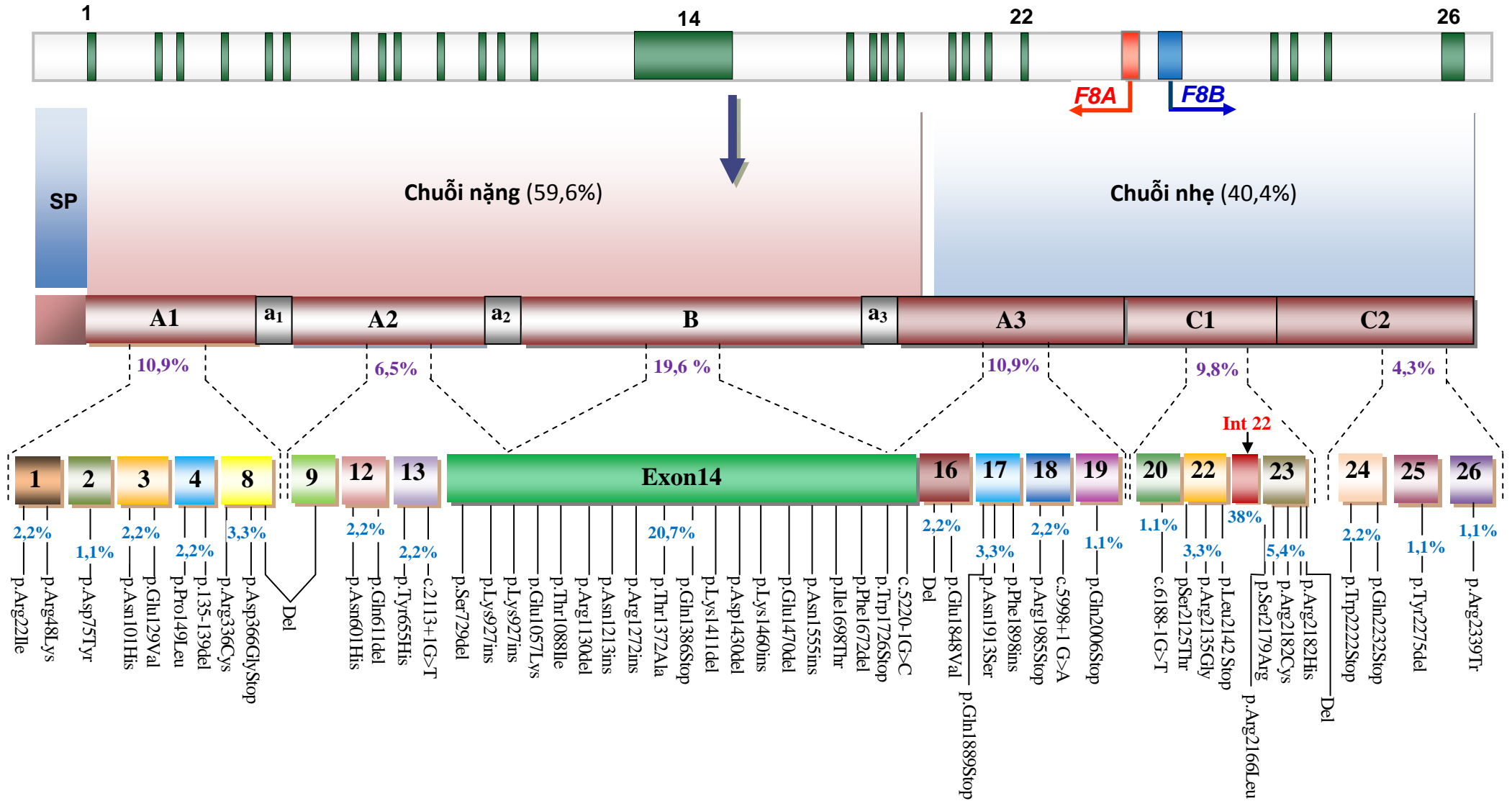
**Biểu đồ 3.4. Phân bố tỷ lệ các dạng đột biến trên các vùng của gen F8**

#### *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%).

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

**Gen F8**



**Hình 3.21. Bản đồ vị trí đột biến gen F8 gây bệnh hemophiia 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 [101].

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 [51], 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.

#### **4.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG VỀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU**

##### ***- Đặc điểm về giới***

Nghiên cứu tiến hành trên 103 bệnh nhân hemophilia A đã được chẩn đoán trên lâm sàng. Trong đó bệnh nhân chủ yếu là nam (98,1%), chỉ có 2

trường hợp bệnh nhân là nữ (chiếm tỷ lệ 1,9%). Kết quả này của chúng tôi được giải thích dựa vào đặc điểm di truyền của bệnh. Hemophilia A là bệnh di truyền lặn liên kết với nhiễm sắc thể giới tính X và không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể Y. Nam giới có cặp nhiễm sắc thể giới tính XY, vì vậy nam giới bị bệnh tức là mang trong mình nhiễm sắc thể X bị thương tổn, có thể đó là do hậu quả của một quá trình di truyền phá hệ hoặc do đột biến. Ngược lại ở nữ giới, do nhiễm sắc thể X tương đồng (cặp thể nhiễm sắc giới tính của nữ là XX) nên phụ nữ mang một thể nhiễm sắc X thương tổn vẫn không biểu hiện bệnh vì đã được bù trừ. Thường là những phụ nữ không thể hiện một kiểu hình hemophilia A do có sự hiện diện của nhiễm sắc thể X thứ hai bình thường. Tuy nhiên, trong trường hợp rất hiếm, bệnh được biểu hiện lâm sàng ở phụ nữ. Các biểu hiện kiểu hình của bệnh ở phụ nữ có thể là kết quả của các cơ chế khác nhau. Sai lệch của nhiễm sắc thể X dẫn đến biểu hiện chủ yếu của alen đột biến là kết quả của một bất hoạt gen F8 thể hoang dại liên kết với nhiễm sắc thể X [102]. Ở nữ cũng có thể biểu hiện kiểu hình bệnh hemophilia A trong trường hợp có một cấu trúc nhiễm sắc thể X bất thường trong hội chứng Turner [103] hoặc trong hội chứng Swyer kết hợp với đột biến ở gen F8 [98].

Trường hợp đồng hợp tử đột biến gen F8 (hiếm gặp) hoặc đột biến dị hợp tử nhưng ảnh hưởng đến cả hai alen gen F8 cũng là các cơ chế di truyền của biểu hiện lâm sàng bệnh hemophilia A có thể xảy ra ở nữ.

### ***- Về tuổi phát hiện bệnh***

Có 36/103 bệnh nhân hemophilia A được phát hiện bệnh ở lứa tuổi 1 - 6 tháng chiếm tỷ lệ cao nhất (34,9%); sau đó là bệnh nhân được phát hiện bệnh ở lứa tuổi 7 - 12 tháng chiếm tỷ lệ 31,1%; 19/103 bệnh nhân được phát hiện bệnh ở lứa tuổi 12 - 24 tháng chiếm tỷ lệ 18,4%. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm tuổi 1- 6 tháng tỷ lệ phát hiện bệnh cao nhất, đặc biệt đối với thể bệnh nặng. Điều này cũng là hợp lý bởi đây là lứa tuổi trẻ bắt đầu tập lẫy, tập bò tạo nhiều hoạt động gây chấn thương, tụ máu hoặc chảy máu không cầm. Lúc đó gia đình mới biết có những bất thường ở trẻ và đưa đi khám bệnh. Tỷ lệ bệnh nhân được phát hiện dưới 1 tháng tuổi rất thấp, chỉ có 3 bệnh nhân chiếm tỉ lệ 2,9%; các trường hợp này đều là bệnh nhân hemophilia A thể nặng khi được tiêm vắc xin đã xuất hiện triệu chứng bầm tím, lâu cầm máu tại vị trí tiêm nên gia đình cho đi khám do đó phát hiện bệnh sớm. Đặc biệt không có trường hợp nào được chẩn đoán trước sinh. Hơn nữa lại có đến 12,6% bệnh nhân được phát hiện bệnh ở lứa tuổi 12-24 tháng, thậm chí còn cao hơn nữa như đối với bệnh nhân hemophilia A thể nhẹ. Kết quả này là do trình độ học vấn, kiến thức và hiểu biết của người dân về các bệnh lý di truyền không có, các cơ sở y tế thiếu phương tiện để chẩn đoán phát hiện bệnh.

Tại Hoa Kỳ bệnh hemophilia được chẩn đoán ở độ tuổi rất trẻ, có đến 69,7% trẻ bị hemophilia A được phát hiện từ lúc dưới 1 tháng tuổi, 2,8% được phát hiện nhờ chẩn đoán trước sinh trong đó tuổi trung bình lúc chẩn đoán là 36 tháng đối với những trẻ bị hemophilia A thể nhẹ, 8 tháng cho những trẻ có bệnh hemophilia A thể trung bình và 1 tháng cho những người bị bệnh



hemophilia thể nặng. Với một số bệnh bẩm sinh, chẩn đoán sớm để có các biện pháp điều trị sớm sẽ giúp trẻ có cuộc sống bình thường [91]. Tuy nhiên không phải quốc gia nào cũng có điều kiện để thực hiện được công việc đó đặc biệt là các nước nghèo và đang phát triển trong đó có Việt Nam.

#### **- Thời gian xuất hiện bệnh**

Trong một số trường hợp, thời gian xuất hiện bệnh có liên quan đến mức độ nặng của bệnh. Đặc biệt với nhiều bệnh nhân có đột biến đảo đoạn intron 22, lâm sàng biểu hiện mức độ nặng và thường xuất hiện sớm. Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi có những trường hợp bệnh nhân hemophilia A thể nặng có đột biến đảo đoạn intron 22 nhưng vẫn sống khỏe mạnh, xây dựng gia đình và sinh hoạt bình thường, ít khi phải vào viện. Ngoài ra, mức độ nặng và thời gian xuất hiện bệnh còn phụ thuộc vào ý thức phòng bệnh của gia đình và bản thân người bệnh cũng như điều kiện chăm sóc y tế tại nơi bệnh nhân điều trị. Chính vì vậy, có những trường hợp bệnh nhân thể trung bình hoặc thể nhẹ, các vị trí đột biến chỉ là thay thế nucleotid tương ứng với thể bệnh nhưng bệnh nhân không được chẩn đoán sớm và điều trị hợp lý cũng có thể dẫn đến nguy hiểm đến tính mạng.

Chẩn đoán, phát hiện sớm bệnh hemophilia A, xác định chính xác dạng đột biến gen F8 gây bệnh ở bệnh nhân là những thông tin rất quan trọng giúp cho người thầy thuốc lâm sàng đưa ra phác đồ điều trị cũng như dự phòng chảy máu thích hợp nhất đối với mỗi bệnh nhân hemophilia A. Chẩn đoán sớm, điều trị kịp thời, dự phòng đúng cách là những yếu tố góp

phần cải thiện chất lượng cuộc sống, hạn chế được tối đa các di chứng ở cơ, ở khớp có thể do chảy máu ở những bệnh này.

## **4.2. PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN F8 Ở BỆNH NHÂN HEMOPHILIA A CỦA VIỆT NAM**

### **4.2.1. Tỷ lệ phát hiện đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A**

Tỉ lệ không phát hiện được đột biến ít nhất chiếm 2-7% tổng số bệnh nhân hemophilia A [80], mặc dù đã được phân tích đột biến đảo đoạn intron, tất cả các exon và vị trí nối giữa intron/exon, giải trình tự vùng promoter để kiểm tra đột biến. Tỷ lệ này có thể thay đổi tùy theo tính chính xác của chẩn đoán bệnh hemophilia A và hiệu quả phát hiện đột biến của các phương pháp sử dụng. Các đột biến không phát hiện được có thể nằm trong intron, một phương pháp xác định đột biến nằm sâu ở trong vùng intron là phân tích mRNA [44]. Tuy nhiên, phân tích mRNA vẫn thất bại trong việc xác định đột biến trong một nhóm gồm 11 bệnh nhân không tìm thấy đột biến ở mức độ DNA mặc dù bệnh nhân có nồng độ FVIII thấp và có biểu hiện triệu chứng chảy máu trên lâm sàng [104].

Một trong những bệnh khó chẩn đoán phân biệt là bệnh von Willebrand (vWD) type 2N với hemophilia A thể nhẹ. Do đó, một tỉ lệ đột biến không phát hiện được có thể do chẩn đoán nhầm hai bệnh này [105]. Xét nghiệm ELISA dựa trên nồng độ vWF-FVIII (vWF: FVIII:B) có thể phân biệt hai bệnh này nhưng xét nghiệm này không phổ biến rộng rãi. Yếu tố vWF liên kết với FVIII có tác dụng bảo vệ FVIII khỏi quá trình phân giải protein sớm. Có hai vị trí đột biến hay gặp: đột biến thứ nhất có thể do một sự thay thế

nucleotid làm mất sự liên kết vWF-FVIII. Hầu hết các đột biến này nằm từ exon 17-27 của vWF. Đột biến thứ hai cũng có thể ảnh hưởng đến sự gắn kết của FVIII dẫn đến chỉ có VWF được sản xuất mà không có khả năng gắn kết FVIII, đột biến có thể xuất hiện ở bất cứ vị trí nào trong gen VWF. Có một số trường hợp, thiếu cả FV và thiếu FVIII (F5F8D) cũng biểu hiện như bệnh nhân hemophilia A thể nhẹ có nồng độ FVIII: 5-30 IU/dL do đột biến di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường các gen LMAN1 hoặc MCFD2. Gen LMAN1 và MCFD2 kết hợp với nhau để vận chuyển FV và FVIII. Với những trường hợp này cần xác định nồng độ FV có thể loại trừ bệnh lý này [106].

Các phương pháp phối hợp với giải trình tự trực tiếp để xác định đột biến như phương pháp phân tích dị sợi kép: Hai kỹ thuật 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) và CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) làm tăng khả năng phát hiện đột biến, hầu hết các phòng thí nghiệm có tỷ lệ thành công từ 80 đến 95%. Các kỹ thuật này được sử dụng để sàng lọc phát hiện những vị trí đột biến, với bệnh nhân không phát hiện được đột biến khi sử dụng phương pháp trên thì sử dụng tiếp giải trình tự gen trực tiếp. Tuy nhiên, những phương pháp này rất nhạy cảm với điều kiện phòng thí nghiệm. Do đó, tối ưu hóa các điều kiện là một quá trình khó khăn và tốn thời gian, kinh phí nên không phải phòng thí nghiệm nào cũng triển khai thực hiện được.

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%. Tỷ 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 tỷ 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%. Tỷ lệ xác định được đột biến ở từng thể bệnh được tác giả Santacrose và cộng sự thực hiện trên 1296 bệnh nhân hemophilia A thực hiện ở Italia là 874 (89%), 146 (84%), và 133 (94%) tương ứng với bệnh nhân thể nặng, trung bình và thể nhẹ [51]. 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 [35]. Tỷ lệ các dạng đột biến khác nhau trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hay gặp nhất là đảo đoạn intron 22 (38,1%), tiếp đến là dạng đột biến sai nghĩa 23,9%, đột biến mất /thêm nucleotid và đột biến vô nghĩa có cùng tỷ lệ 9,85%; đột biến vị trí nối và đột biến mất đoạn lớn có tỷ lệ là 4,4%.

#### **4.2.2. Các dạng đột biến gây bệnh hemophilia A ở Việt Nam**

Để áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử ứng dụng trong chẩn đoán các bệnh lý di truyền thì tách chiết DNA là khâu quan trọng nhất. Nếu các phân tử DNA được tách tốt, không đứt gãy, không bị tạp nhiễm thì các phản

ứng tiếp theo mới có độ chính xác cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp tách chiết DNA theo quy trình phenol/chloroform. Theo Adelli K, quy trình phenol/chloroform mất nhiều thời gian và công sức, tuy nhiên các phân tử DNA thu được có độ tinh sạch và nồng độ DNA rất cao [107]. Để kiểm tra độ tinh sạch của 103 mẫu DNA bệnh nhân, chúng tôi tiến hành đo mật độ quang trên máy phổ kế *Nano-drop* của Nhật Bản. Tỷ lệ mật độ quang của các mẫu DNA đo ở bước sóng 260/280 nm luôn nằm trong khoảng 1,8-1,95 (Phụ lục 3) chứng tỏ các mẫu DNA tách chiết có độ tinh sạch cao đảm bảo chất lượng tốt cho các kỹ thuật PCR tiếp theo. Nồng độ DNA thu được từ 480-1300 ng/ml đảm bảo thỏa mãn yêu cầu cần nồng độ DNA cao chuẩn bị cho kỹ thuật phát hiện đảo đoạn intron 22.

Dạng đột biến đảo đoạn intron 22 và intron 1 chỉ gặp ở các trường hợp hemophilia A chẩn đoán thể nặng trên lâm sàng: những bệnh nhân này có biểu hiện khởi phát quá trình chảy máu tự nhiên, tái phát nhiều lần. Vị trí chảy máu thường là ở cơ, khớp. Xét nghiệm thấy hoạt tính FVIII < 1% [7].

#### ***a/ Xác định đột biến đảo đoạn intron 22***

Gen quy định F8 được phát hiện và mô tả từ những năm 1982 và 1984. Vào thời điểm đó đây là gen lớn nhất được mô tả. Gen F8 chứa 26 exon, có chiều dài thay đổi từ 69 đến 3.106 bp. Trình tự intron có kích thước là 177,9 kb. Intron được loại bỏ trong quá trình phiên mã để tạo thành mRNA trưởng thành có chiều dài khoảng 9 kb và tổng hợp protein gồm 2332 acid amin. Có nhiều intron kích thước lớn hơn 14kb như intron 1, 6,13, 14, 22, 25 trong đó intron 22 lớn nhất với kích thước là 32,8 kb [101].

Năm 1990, Levinson và cộng sự khi nghiên cứu gen liên quan đến một số bệnh rối loạn thần kinh trong khu vực q28 của NST X, các tác giả xác định một đảo CpG trong intron lớn nhất của gen F8. Đảo CpG này nằm cách đoạn đầu gen F8 khoảng 1.8 kb phân chia gen F8 thành gen A (F8A). Trong đó, gen F8A có hướng phiên mã ngược chiều của gen F8 [107]. Sau đó, đến năm 1992 tác giả Freije đã chứng minh rằng nhiễm sắc thể X có hai bản sao của gen F8A nằm ngoài gen F8, cách khoảng 500 kb gần đầu tận telomer [108].

Năm 1992, Levinson và cộng sự mô tả một đoạn có kích thước 2,5 kb gọi tên là F8B, có điểm xuất phát tại vị trí đảo CpG như F8A. Tuy nhiên có hướng phiên mã ngược chiều với F8A, cùng một hướng như gen F8. Vị trí bắt đầu của gen F8A và gen F8B nằm cách nhau 122 pb. Tại vị trí đầu 5' exon gen F8B của intron 22 có khả năng mã hóa cho tám acid amin và được nối với exon 23 đến exon 26 của gen F8.

Từ kết quả của các nhà nghiên cứu trước, năm 1993 tác giả Lakich và cộng sự chỉ ra rằng intron 22 là intron lớn nhất trong gen F8. Intron 22 cũng chứa một đảo CpG, nằm ở khoảng 10 kb phía đoạn dưới của exon 22. Đảo CpG này xuất hiện như là một promoter hai chiều đối với các gen F8A và F8B, cả hai đoạn gen này biểu hiện trong các mô khác nhau [31]. Năm 2001, gen F8A được biểu hiện mã hóa cho protein huntingtin có kích thước 40 kD, gọi là HAP40 [109] và được cho là liên quan đến protein huntingtin trong bệnh Huntington. Chức năng của F8B không được biết. Vì không có F8B tương đương trong hệ gen của chuột, những con chuột biến đổi gen biểu hiện gen F8B người bình thường dưới sự kiểm soát của một promoter cytomegalovirus

đã được sử dụng để hiểu chức năng của nó. Điều đáng ngạc nhiên là những con chuột biến đổi gen F8B cho thấy: chậm phát triển, đầu nhỏ và khuyết tật ở mắt nghiêm trọng, do đó cần nhiều nghiên cứu sâu hơn về protein này.

Năm 1993, hai nhóm nghiên cứu trong đó một nhóm được dẫn đầu bởi Jane Gitschier tại Hoa Kỳ và một nhóm khác do Francesco Giannelli thực hiện tại Anh thực hiện quan sát một cách độc lập nhận thấy rằng: một nửa số bệnh nhân Hemophilia A thể nặng không phát hiện thấy đột biến trong các promoter, trình tự gen mã hóa gen F8 hay ở các vị trí nối giữa các intron và exon [96], [109]. Tuy nhiên, họ nhận thấy duy nhất một khiếm khuyết trên mRNA ngăn cản sự khuếch đại nằm ở vùng ranh giới giữa exon 22 và 23. Sự bất thường này nằm trong khu vực nội bộ của intron 22 và một mô hình xác định nguyên nhân đã được đề xuất dựa trên sự tái tổ hợp giữa chuỗi F8A nằm ở intron 22 và hai bản sao tương đồng nằm ngoài gen F8. Sự tái tổ hợp giữa các bản sao tương đồng đã dẫn đến hiện tượng đảo ngược của DNA và tạo ra sự gián đoạn của gen F8.

Năm 1993, Lakich và cộng sự mô tả phương pháp Southern blot dựa vào enzym cắt giới hạn *BclI* và sử dụng đầu dò F8A để phát hiện sự thay đổi kích thước của hai trong ba đoạn DNA ở những bệnh nhân bị đột biến đảo đoạn intron 22. Tác giả xác định tỉ lệ bệnh nhân đột biến đảo đoạn intron 22 chiếm khoảng 45% bệnh nhân HA thể nặng [31]. Cả hai nhóm Hoa Kỳ và Anh phát hiện ra rằng đột biến này xảy ra với tỉ lệ khoảng  $4 \times 10^{-6}$  trên mỗi gen, mỗi giao tử, mỗi thế hệ.

Phương pháp Southern Blot được coi là tiêu chuẩn vàng và là phương pháp đầu tiên có thể phát hiện được đảo đoạn intron 22. Đây là kỹ thuật cho kết quả chính xác, ngoài ra còn cho phép phát hiện tình trạng mang gen bệnh như trong trường hợp được mô tả bởi Oldenburg [109]. Tuy nhiên, kỹ thuật này đòi hỏi thực hiện từ 8-10 ngày mới có kết quả. Ngoài ra, phương pháp này đòi hỏi sử dụng chất phóng xạ để đánh dấu ảnh hưởng đến sức khỏe.

Từ sự bất cập của phương pháp Southern Blot, nhu cầu phát triển phương pháp khác đơn giản, nhanh chóng và ít tốn kém hơn để phát hiện đảo đoạn intron 22 là điều cần thiết. Liu và cộng sự đã thiết kế một xét nghiệm PCR đơn ống với các đoạn DNA có kích thước lớn (Long distance - PCR) để xác định đột biến đảo đoạn intron 22 ở bệnh nhân hemophilia A thể nặng. Phương pháp mới đơn giản, nhanh chóng và tương đối rẻ tiền và do đó trở thành phương pháp được lựa chọn trong nhiều phòng thí nghiệm trên toàn thế giới [77].

Tuy nhiên phương pháp LD-PCR thực hiện khó khăn do khuếch đại các đoạn DNA có kích thước  $> 10$  kb trong đó bao gồm một đoạn 3,3 kb với 79% là nucleotid C và G. Do đó phương pháp này phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng DNA tách chiết, nhiệt độ gắn mồi và điều kiện thuốc thử. Với mục tiêu nâng cao hiệu quả xác định đột biến đảo đoạn intron 22, Bowen và cộng sự sử dụng phương pháp LD-PCR cải tiến gồm bốn phản ứng LD-PCR riêng biệt cho từng cặp mồi [110]. Sự tách biệt này cho phép khuếch đại dễ dàng hơn cho mỗi cặp mồi.



Để khắc phục những vấn đề liên quan đến khuếch đại trực tiếp của các đoạn DNA có kích thước rất dài, Rossetti đã thiết kế một phương pháp tiếp cận thay thế để xác định đảo đoạn intron 22 dựa trên một biến thể xác định đột biến đảo đoạn cổ điển được thiết kế bởi Ochman công bố năm 1988. Phương pháp này có ưu điểm tiến hành nhanh chóng, kết quả thu được có độ tin cậy cao, dễ thực hiện do sản phẩm PCR được khuếch đại các đoạn DNA có kích thước ngắn (487 và 559 bp) [78].

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 [31], ở Đài Loan tỉ lệ này là 45,1% [111], 42,5 - 44,25% dân số ở Ấn Độ [112] và 40-50% ở châu Âu [110]

Đột biến đảo đoạn intron 22 vẫn là đột biến phổ biến trong bệnh hemophilia A thể nặng. Do đó, đây vẫn là đột biến quan trọng cần kiểm tra đầu tiên trong phân tích xác định đột biến ở bệnh nhân hemophilia A.

#### ***b/ Xác định đột biến đảo đoạn intron 1***

Các nghiên cứu trên thế giới chứng minh tỉ lệ đột biến đảo đoạn intron 1 là 1-5% [99], [113], [114]. Theo tác giả Naylor, tỉ lệ đột biến đảo đoạn intron 1 thấp hơn một phần mười đột biến đảo đoạn intron 22 phần lớn là do kích thước của bản sao int1h1 nhỏ hơn gần 10 lần so với int22h1 (1041 bp so với

9503 bp). Ngoài ra int1h1 chỉ có một bản sao tái tổ hợp, trong khi int22h1 có hai bản sao tái tổ hợp làm cho khả năng đột biến của int22h1 cao hơn int1h1. Sự giống nhau giữa các bản sao của int1h1 là rất cao (99,9%) cũng là một lý do làm cho khả năng đột biến đảo đoạn ít gặp hơn so với đột biến đảo đoạn int22h1 [115]. Trong nghiên cứu này, 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 của tác giả Bagnal theo mô tả ở mục 2.3.3.2 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 [116]. Ngoài ra, một nghiên cứu gần đây cho thấy tỷ lệ tổng thể của đảo đoạn intron 1 là thấp hơn 1% [28]. 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% [117], tương tự như của nghiên cứu ở Nam Phi [117]. 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.

### ***c/ Đột biến mất đoạn lớn***

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 môi và exon 26 cần 5 cặp môi 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 (Hình 3.4).

***d/ Đột biến thêm/ mất / thay thế nucleotid, vị trí nối exon-intron***

Giải trình tự trực tiếp DNA từ các sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được áp dụng cho những bệnh nhân không có đột biến đề cập ở trên. Dạng đột biến này gặp nhiều trong các bệnh nhân hemophilia A thể trung bình và thể nhẹ. Bệnh nhân được chẩn đoán thể bệnh trung bình khi hoạt tính FVIII từ 1-5%, chảy máu đôi khi xuất hiện tự nhiên nhưng thường xuất hiện sau chấn thương hoặc phẫu thuật. Với bệnh nhân chẩn đoán thể bệnh nhẹ khi hoạt tính FVIII từ 5-30%, bệnh nhân thường không có triệu chứng lâm sàng trừ khi bị chấn thương nặng hoặc phẫu thuật [7]. Trong nhiều nghiên cứu đã báo cáo, không có điểm nóng (hotspot) về sự phân bố của các đột biến trong gen F8 [35], [36]. Do đó, tất cả 26 exon và các vị trí nối giữa exon- intron được phân tích bao phủ bởi phương pháp giải trình tự. Một trong những trình tự môi hữu ích đã được David và cộng sự thiết kế năm 1994 [100]. Những môi này chứa khoảng 10-15 nucleotide của intron phía đầu và cuối các exon. Để phát hiện các đột biến tại các điểm nối giữa exon và intron cần phân tích trình tự mRNA của F8 vì đột biến này không phát hiện được nếu chỉ sử dụng vật liệu DNA [115], [44]. Chúng tôi chỉ áp dụng phân tích giải trình tự trực tiếp DNA cho từng sản phẩm PCR sử dụng tham chiếu trình tự gen F8 ở Genbank

(NG\_011403), trình tự mRNA (NM\_000132.3). Kết quả giải trình tự được phân tích với các chương trình đa dạng như DNASTAR, phần mềm CLC, phân tích trên NCBI và kiểm tra đột biến trên cơ sở dữ liệu HAMSTeRS (Hemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site) là trang quản lý thông tin về bệnh hemophilia A của nước Anh và cơ sở dữ liệu của CDC (The Centers for Disease Control and Prevention) là trang quản lý thông tin của Hoa Kỳ về bệnh hemophilia A.

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' [44]. 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 [116]. 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 lại trên mRNA.

### ***e/ Đa hình nucleotid đơn***

Single nucleotide polymorphism (SNP) chỉ sai khác một nucleotid của trình tự DNA, xuất hiện với tần suất cao khi sàng lọc SNP của đa số các hệ gen. Nghiên cứu của Liu và cộng sự năm 2007 cho thấy cứ khoảng 225 bp là tìm thấy 1 SNP trên bộ gen gà và khoảng 1.250 bp là sàng lọc được 1 SNP cho bộ gen người [117]. Trong nghiên cứu này, một SNP được xác định trong vùng B tại vị trí c.3780 trên exon 14, đột biến làm thay đổi acid amin Aspartic thành Glutamic (p.Asp1241Glu). Trong nghiên cứu của Casana và cộng sự ở chủng tộc người da trắng đưa ra giả thuyết rằng có khoảng 5% bệnh nhân đột biến Asp1241Glu có nguy cơ chảy máu do giảm nồng độ FVIII [118]. Scanavini cũng đã tiến hành một nghiên cứu bệnh chứng và chứng minh rằng đa hình nucleotid đơn Asp1241Glu có liên quan với giảm hoạt động FVIII [119]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hai bệnh nhân HA26 và HA53 đều có đột biến ở vị trí này, tuy nhiên đều phát hiện vị trí đột biến gây bệnh đã được công bố.

### ***f/ Đột biến chưa được công bố***

Gen F8 là một trong những gen có kích thước lớn nhất với đặc thù các đột biến nằm rải rác trên toàn bộ chiều dài của gen. Hiện nay, hàng năm có rất nhiều đột biến mới được công bố trên cơ sở dữ liệu HAMSTeRS hay trên cơ sở dữ liệu của CDC [42], [91]. Theo nghiên cứu của tác giả Hua Baolai năm 2010, khi nghiên cứu trên 18 bệnh nhân hemophilia A thể nặng ở Trung Quốc đã công bố 7 vị trí đột biến mới [120]. Hay theo tác giả Elmahmoudi

công bố năm 2012, khi nghiên cứu ở Tunisian phát hiện 8 đột biến mới trên gen F8 [121].

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 (Hình 3.19), 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 yếu tố VIII 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.

#### **4.2.3. Đánh giá nguy cơ hình thành chất ức chế**

Có 18/103 bệnh nhân có chất ức chế yếu tố VIII chiếm tỷ lệ 17,5%. Tỷ lệ này thấp hơn so với số liệu của Liên đoàn hemophilia Thế giới là 20-30% có thể do bệnh nhân của chúng tôi do chưa được tiếp cận nhiều với điều trị so với các nước khác trên thế giới [73].

Trong đó các bệnh nhân đột biến đảo đoạn intron 22 có 12 bệnh nhân xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII chiếm tỷ lệ cao nhất 28,6%, sau đó là bệnh nhân đột biến xóa đoạn lớn (25%) và đột biến vô nghĩa (22%).

Nghiên cứu của Keuz W và Scharrer I từ thập kỷ 90 đã nhận thấy ở khoảng 30% bệnh nhân hemophilia A xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII trong quá trình điều trị [122], [123].

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.

Cơ chế hoạt động của những kháng thể này là gắn với các nhánh của yếu tố đông máu làm ảnh hưởng tới sự gắn kết của các yếu tố này với các thành phần đông máu khác. 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 [81].

Tại sao chỉ có 1/3 số bệnh nhân có tổn thương nặng gen F8 xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII trong huyết thanh, trong khi có đến 2/3 bệnh nhân không phát hiện được? Điều gì giúp cho nhóm này có thể chống lại sự hình thành của chất ức chế? Cơ chế hoạt động của vị trí gắn kháng nguyên trên bề

mặt protein yếu tố VIII và cái gì làm cho chất ức chế xuất hiện với nồng độ cao thấp khác nhau hoặc đôi khi chỉ là thoáng qua? Nghiên cứu của J.Oldenburger và cộng sự (2002) đã lý giải những câu hỏi này bằng kết quả nghiên cứu trên cơ sở phân tích vai trò của các dạng đột biến gen F8, vai trò của các gen tổng hợp protein tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch và vai trò của các vị trí gắn kháng thể protein yếu tố VIII [67].

Khi nghiên cứu về mối liên quan giữa kiểu gen và nguy cơ xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII, Schwaab R (1995) chia bệnh nhân thành 2 nhóm: một nhóm có tổn thương gen F8 nặng dẫn đến không tổng hợp được yếu tố VIII gọi là đột biến “rỗng” (null-mutation), đó là những trường hợp đột biến mất đoạn lớn, đột biến vô nghĩa và đột biến đảo đoạn intron 22 và ở bệnh nhân có những dạng đột biến này tỷ lệ xuất hiện chất ức chế trên 30%; nhóm thứ hai là nhóm bệnh nhân có đột biến mất đoạn nhỏ, đột biến thay thế nucleotid hoặc đột biến ở vị trí nối...những dạng đột biến mà chỉ làm giảm chức năng yếu tố VIII huyết thanh thì tỷ lệ xuất hiện chất ức chế dưới 10% [124]. 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.

Đột biến gây bệnh xảy ra trên chuỗi nhẹ của gen F8 (40%) làm tăng nguy cơ xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII hơn so với đột biến xảy ra trên chuỗi



nặng (17%) mặc dù protein yếu tố VIII sẽ bị cắt ngắn đi nhiều hơn khi đột biến xảy ra trên chuỗi nặng mà cho đến nay người ta vẫn chưa lý giải được hiện tượng này [94]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như vậy, xác định được 12/42 bệnh nhân đột biến trên chuỗi nhẹ gen F8 có chất ức chế yếu tố VIII (chiếm tỷ lệ 28,6%) cao hơn tỷ lệ bệnh nhân đột biến trên chuỗi nặng gen F8 (5/50 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 10%).

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 gây bất hoạt hoàn toàn gen F8, do vậy gây thiếu trầm trọng yếu tố VIII lưu thông trong vòng tuần hoàn [67]. 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.

Trong khi đó, nghiên cứu của Schwaab R cho thấy dạng đột biến đáng chú ý của nhóm có nguy cơ thấp xuất hiện chất ức chế là dạng đột biến thêm hoặc mất đoạn nhỏ với tỷ lệ 7,4% [124]. Bản chất của dạng đột biến này là việc thêm hoặc mất một hay vài nucleotid làm lệch khung dịch mã hoặc tạo stop codon trên protein yếu tố VIII, do vậy dự kiến sẽ có nguy cơ xuất hiện chất ức chế tương tự như với dạng đột biến vô nghĩa. Điều này được giải thích bởi nghiên cứu của Young M năm 2013, do có một loại enzym có thể sửa lỗi

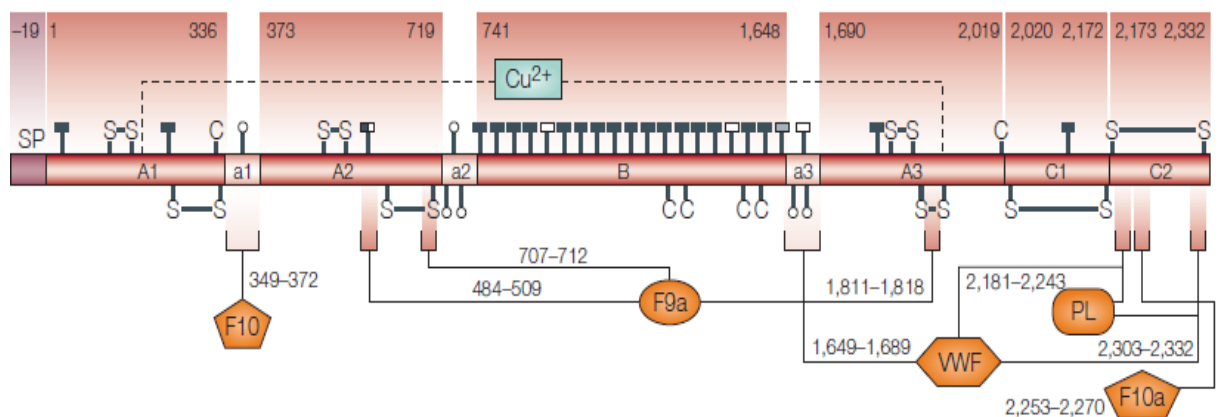
trong quá trình phiên mã hoặc dịch mã ở bệnh nhân bị mất hoặc thêm nucleotid ở những vị trí có các nucleotid Adenin liên tiếp trên các exon gen F8. Kết quả là đã giúp cho nhiều bệnh nhân có dạng đột biến này không xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII trong huyết thanh [125]. Với dạng đột biến sai nghĩa tỷ lệ xuất hiện chất ức chế ở nhóm bệnh nhân này là 4,3%. Điều này được giải thích là do đột biến sai nghĩa chủ yếu gây thể bệnh nhẹ trên lâm sàng (chiếm 80-90%), còn những trường hợp gây bệnh thể nặng thì với những phân tử protein yếu tố VIII đã mất chức năng không còn đủ để gây ra đáp ứng miễn dịch làm xuất hiện chất ức chế yếu tố VIII. 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 [69]. 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**

#### **4.3.1. Vị trí đột biến gây bệnh hemophilia A**

Trình tự acid amin của protein FVIII con người đã được phân tích từ chuỗi cDNA [101]. Những vùng chính của protein trưởng thành gồm 3 loại: vùng A, vùng B và vùng C. Trong đó 3 vùng A (A1, A2, A3) có cấu trúc tương đồng với những yếu tố đông máu khác như yếu tố V và ceruloplasmin, vùng B không tương đồng đáng kể với các chuỗi khác, 20% amino acid ở

vùng C tương đồng với các lectin discoidin. Ba vùng nhỏ hơn (a1, a2 và a3) nằm giữa các vùng chính tương ứng với A1-A2, A2-B và B-A3. Ngoài ra, còn có các ion ràng buộc như:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  và các vị trí của glycosyl hóa được quan sát thấy trong cấu trúc protein FVIII (Hình 4.1). Ion  $\text{Cu}^{2+}$  đóng vai trò quan trọng trong quá trình liên kết, ràng buộc giữa vùng A1 và vùng A3, ion này có chức năng quan trọng trong nhận dạng và xác định đúng vị trí sắp xếp của các vùng sau khi vùng B bị loại bỏ trong quá trình hoàn thiện protein FVIII. Các ion  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  được biết đến như yếu tố chuyển tiếp giữa các vùng có chức năng gắn kết với các đồng yếu tố khác trong quá trình đông máu, tăng khả năng linh động của phân tử protein [126].



*SP: peptide tín hiệu tại vị trí N tận*

*PL phospholipid*

*F9a: kích hoạt yếu tố đông máu IX*

*S-S cầu disulfua*

*A1, A2, B, A3, C1, C2: các vùng chính*

*VWF: von Willebrand factor*

*F10a: kích hoạt yếu tố đông máu X*

*C: Cys tự do*

**Hình 4.1. Cấu trúc và các vị trí tương tác của protein FVIII đông máu [19]**

**a/ Đột biến ở vị trí vùng A (A1, A2, A3)**

Theo các đột biến được công bố trên HAMSTeR, trong tổng số các đột biến nằm ở vùng A thì một nửa số các đột biến nằm ở gen F8 nằm chủ yếu ở vùng A1 và A2, điều đó chứng tỏ tầm quan trọng của các vùng này trong hoạt động của protein FVIII và các khu vực này rất dễ bị đột biến. Hơn nữa, các đột biến ở khu vực này một phần nào đó mất đi sự năng động của quá trình FVIII tương tác với các yếu tố khác, do đó dẫn đến sự mất ổn định của các yếu tố kích hoạt FVIII [126]. Một số đột biến ảnh hưởng đến vị trí liên kết giữa các giao diện trong vùng A: Arg336Cys giao diện giữa vùng A1-A2 (HA61), Ser729del tại giao diện vùng A2-B (HA39). Những đột biến này tạo thuận lợi cho phân ly của tiểu đơn vị A2, xảy ra một cách tự nhiên gây bất hoạt các protein F8 [127]. Ở giữa vùng A1 và A2, tại vị trí acid amin 351-365 được chứng minh là vị trí nối của F8 với yếu tố đông máu FX [128]. Do đó, đột biến Arg336Cys làm mất khả năng kết nối FVIII với FIX gây biểu hiện bệnh hemophilia A. Nghiên cứu này cũng xác nhận rằng đột biến ở vùng này gặp nhiều là thể nhẹ và thể trung bình. Vị trí đột biến p.Asp75Tyr (HA67) hay gặp ở những bệnh nhân Hemophilia A thể trung bình. Asp75 nằm ở vị trí S5 có chức năng gắn  $\text{Cu}^{2+}$  ở cầu nối giữa vùng A1 và A3 [129], [130]. Đột biến thay thế Asp75 bằng Tyr có thể làm thay đổi cấu trúc bình thường của vùng A. Việc thay thế Glu1848 bởi Val1848 (HA19) dẫn đến dẫn đến mở một khoang bên trong lõi kỵ nước làm giảm sự tương tác với các đồng yếu tố khác như FIXa. Điều này có thể giải thích sự giảm nồng độ của đồng yếu tố chức năng [131]. Đột biến p.Asn601His ở bệnh nhân mã số HA47 gây ra một dư

lượng cysteine có thể tạo ra một cầu nối disulfua mới làm sửa đổi lại cấu trúc vùng A2, gây bất thường trong quá trình biểu hiện protein FVIII. Đây là vị trí acid amin tham gia mạnh mẽ vào sự ổn định của protein hình cầu. Việc thay thế các axit amin của các bệnh nhân khác nhau về đặc tính hóa học có thể làm thay đổi cấu tạo protein FVIII [132]. Đột biến thay thế p.Arg48Lys (HA18) thường được gặp ở bệnh nhân hemophilia A thể nặng. Acid amin này nằm ở vị trí tiếp xúc với bề mặt S2 của vùng A3. Do đó, đột biến thay thế này làm thay đổi điện tích bề mặt của vùng A3. Acid amin Glutamat ở vị trí protein 129 nằm trong khu vực gắn với các ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) cần thiết cho hoạt động đồng yếu tố FVIII. Vì vậy, đột biến p.Glu129Val (HA10) có thể làm giảm các ion  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mn}^{2+}$  do các ion này bị mất vị trí gắn [130].

Trong nghiên cứu này, các đột biến của vùng A3 hay gặp dạng đột biến tạo stop codon (p.Trp1726Stop, p.Gln1889Stop, p. Arg1985stop) dẫn đến biểu hiện kiểu hình của hemophilia A thể nặng.

#### ***b/ Đột biến ở vị trí vùng B***

Vùng B được mã hóa chủ yếu bởi một exon 14 có kích thước lớn từ axit amin 741 đến 1648 và không có sự tương đồng với bất kỳ gen nào đã biết [19]. Vùng B không cần cho chức năng của FVIII và sau quá trình dịch mã, vùng B bị cắt khỏi chuỗi nặng của FVIII. Trong nghiên cứu của Tạ Thành Văn và cộng sự trong quá trình thiết kế vector FVIII, toàn bộ vùng B bị cắt và chỉ có các vùng A1A2A3C1C2 nối với nhau. Một số nghiên cứu cho thấy rằng, sự mất bỏ vùng B sẽ tạo thành phân tử yếu tố VIII có chức năng, mà không ảnh hưởng

đến hoạt tính hay tính kháng nguyên của protein yếu tố VIII và yếu tố VIII cũng được biểu hiện hiệu quả hơn so với yếu tố VIII thể hoang dại [133].

Mặc dù vùng B chỉ là vùng kết nối, không trực tiếp cần thiết cho hoạt động đông máu của FVIII, các nghiên cứu mới cho thấy vùng B rất quan trọng cho sự kết nối vùng A2 và vùng A3, ngoài ra vùng B tham gia vào tương tác trong tế bào. Vùng B có chức năng điều tiết, kiểm soát chất lượng, có khả năng kích hoạt và liên kết với tiểu cầu. Các đột biến sai nghĩa trong vùng B gây bệnh hemophilia A chỉ khi chúng ảnh hưởng đến các vị trí nối hoặc các vị trí chia tách thrombin ràng buộc với các vùng gần đó. Đột biến tạo stop codon trong domain B, dẫn đến việc chấm dứt sớm quá trình dịch mã protein, luôn luôn ảnh hưởng đến toàn bộ protein F8 và gây bệnh hemophilia A [134]. Các Arg ở vị trí 372 thường hay bị đột biến điểm từ đó dẫn đến thay thế bằng acid amin hoặc là Pro, His hay Cys; Vị trí acid amin 1689 có chức năng rất quan trọng như là một vị trí phân cắt thrombin có tỉ lệ đột biến rất cao. Đột biến thay thế các acid amin này gặp chủ yếu ở bệnh nhân hemophilia A thể nhẹ, trong khi thay thế Arg bằng Cys dẫn đến các thể bệnh trung bình và đôi khi gặp thể nặng, có thể là do sự hình thành không chính xác của các cầu nối disulfua. Trong nghiên cứu này, một đột biến ở bệnh nhân HA76 với thể bệnh nhẹ được xác định dạng đột biến p.Ile1689Thr hoàn toàn tương tự về cả kiểu gen và kiểu hình như của tác giả Youssoufian công bố [135].

### ***c/ Đột biến ở vùng C(C1, C2)***

Vùng C1, C2 nằm trong chuỗi nhẹ của phân tử protein FVIII, trong đó vùng C2 có cấu trúc lỏng lẻo, có khả năng chuyển động linh hoạt đáng kể, còn

vùng C1 gắn kết với vùng A3 bằng một giao diện các liên kết ưa nước và kỵ nước rộng lớn và hai vùng này gần như cố định với nhau bởi các liên kết này. Vùng giao diện A3-C1 đóng vai trò quan trọng, do đó có nhiều đột biến sai nghĩa ở vùng này gây bệnh hemophilia A thể trung bình và thể nhẹ như: đột biến thay thế acid amin Leucin ở vị trí protein 1752; thay thế acid amin Asparagin ở vị trí protein 2015; thay thế Tyroxin ở vị trí protein 2017 hay 2105; thay thế Arginin ở vị trí 2116, thay thế Threonin ở vị trí 2122. Các đột biến này được công bố trong nhiều nghiên cứu của Nair, Reiter, Schwaab [92], [93], [95]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, không phát hiện được trường hợp nào có đột biến ở các vị trí này, có thể sự khác biệt này do yếu tố chủng tộc.

Với các đột biến p.Ser2179Arg (HA94), p.Arg2182His (HA90), p.Arg2182Cys (HA63) đã được tìm thấy ở bệnh nhân hemophilia A thể trung bình [136]. Cơ chế của đột biến này làm giảm lưu thông FVIII trong huyết tương do mất sự tương tác của FVIII với yếu tố vWF hoặc phospholipid. Đột biến ở vị trí p.2339 là acid amin nằm ở vị trí S18 tương ứng với miền C1 và C2. Các khu vực này được biết đến là nơi tham gia vào gắn kết với yếu tố vWF (yếu tố làm tăng tính bền vững của protein FVIII) và tương tác với các phospholipid [137]. Đột biến thay thế acid amin p.Arg2166Leu (HA26) làm thay đổi mạnh mẽ tính kỵ nước do Arg2166 nằm trong vùng trung tâm của miền C1 [126]. Với các đột biến thay thế nucleotid dẫn đến thay đổi acid amin tạo stop codon: p.Arg2222Stop (HA30), p.Gln2232stop (HA99) ở miền C2 dẫn đến thay đổi cấu trúc của protein F8. Tuy nhiên ở bệnh nhân HA99 kiểu hình

chỉ là bệnh nhân hemophilia A thể trung bình có thể do sự thay thế nucleotid ở miền C2 không ảnh hưởng nhiều đến chức năng của F8. Đột biến ở vị trí p.Arg2339Trp (HA28) là acid amin ở vị trí đầu tận cùng vùng C, nơi tương tác với cả yếu tố vWF và photpholipid [138]. Vai trò quan trọng của bề mặt phospholipid là tập trung các thành phần của phức hợp Xase. Đột biến ở vị trí này sẽ làm ảnh hưởng đến khả năng gắn kết của các yếu tố đông máu.

#### **4.3.2. 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 [42]. 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.

#### **4.3.3. Tỉ 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% [111], nghiên cứu của Italia tỉ lệ này là 33% [51]. 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 [86], [136]. 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 [52].

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, Jochen Graw, Adoracion Vencela, Rosetti.

**Bảng 4.1. So sánh các dạng đột biến với các nghiên cứu khác trên thế giới**

	Pháp[139] 120 BN	Đức[19] 845 BN	Tây Ban Nha [140] 267 BN	Argentina [141] 260 BN	Nghiên cứu này 103 BN
Inv22	46,0%	35,7%	43%	44%	38,1%
Sai nghĩa	15,0%	38,2%	34%	12,2%	23,9%
Vị trí nối	7,0%	2,6%	2,6%	3,7%	4,4%
Vô nghĩa	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 sai nghĩa 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 [51], [106] .

## 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%, ở thể trung bình 86,7% và ở thể nhẹ 85,7%.

- 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.**

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

- Tỷ 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, 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.

**CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ  
ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Lưu Vũ Dũng, Trần Văn Khánh, Nguyễn Trọng Tuệ, Nguyễn Viết Tiến, Tạ Thành Văn (2012), “Chẩn đoán trước sinh bệnh Hemophilia A”, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 80(3C), 2012, tr 15-20.
2. Lưu Vũ Dũng, Trần Văn Khánh, Nguyễn Trọng Tuệ, Nguyễn Viết Tiến, Tạ Thành Văn (2013), “Xác định đột biến đảo đoạn intron 22 trên bệnh nhân Hemophilia A bằng kỹ thuật inversion PCR”, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 83(3), 2013, tr 14 - 19.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Moss P, Hoffbrand AV, Pettit JE. (2006). Coagulation Disorders. *Essential Haematology*, 5th edi, 290-302.
2. Đỗ Trung Phần và cộng sự (1996). Chăm sóc bệnh nhân Hemophilia. *Hội thảo thành lập Hội Hemophilia*. Viện Huyết học truyền máu Hà Nội.
3. Pettit JE, Hoffbrand AV. (1993). Coagulation Disorder. *Essential Hematology*. third Edition(Blackwell Scientific publication), 332-349.
4. Đỗ Trung Phần, Bùi Thị Mai Anh (1996). Tình hình nhiễm virus qua truyền máu ở bệnh nhân Hemophilia. *Hội thảo Hemophilia lần một*, 56-59.
5. Anne Goodeve. (2008). Molecular Genetic Testing of Hemophilia A. *Thrombosis and hemostasis*, 34(6), 491-501
6. McKusick VA. (1965). The Royal Hemophilia. *Scient Am*, 213, 88-95.
7. Nguyễn Thị Hương Quê (2008). *Nghiên cứu tác dụng không mong muốn ở bệnh nhân Hemophilia A được truyền chế phẩm máu tại viện Huyết học truyền máu Trung ương giai đoạn 2004-2008*. Luận văn thạc sĩ. Trường đại học Y Hà Nội.
8. Phạm Quang Vinh (2006). Bệnh Hemophilia A, *Bài giảng Huyết học - truyền máu*. Nhà xuất bản y học, 270-279.
9. Nguyễn Anh Trí (2000). Sinh lý quá trình đông máu. *Đông máu ứng dụng trong lâm sàng*. Nhà xuất bản y học, 40-63.
10. Dahlback (2005). Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med*, 257, 209-223.
11. Linas A, Mulder K. (2004). The target joint. *Haemophilia*. 10(4), 152-156.
12. Bạch Quốc Tuyên (1991). Nhân một trường hợp Hemophilia A có kháng thể kháng VIII- Bàn về kháng đông lưu hành. *Bài giảng huyết học*, 189-198.

13. Joan CG, Jay EM, Robert RM. (1995). Preparation and clinical use of plasma and plasma fractions. *William hematology*. 5th edit, 1649-1659.
14. Rusel L. (2001). Transfusion of cryoprecipitate - Between risk and benefit. *Transfusion - Clinique Biologique*, 8(1), 525-530.
15. Kaan Kavakli. (2001). Treatment of inhibitor patients in developing countries. *Comprehensive Haemophilia care in developing counties*. WFH, 121-131.
16. Schutgens RE, Mannucci PM, Santagostino E, Mauser-Bunschoten EP. (2009). How I treat age-related morbidities in elderly persons with hemophilia. *Blood*, 5256-5263.
17. Katherine A. (2012). The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet. *Blood*, 120, 375-381.
18. Radal J, Kaufman. (1995). Structure and Biology of factor VIII. *Hematology: Basic principles and practice*, 2, 1276-1284.
19. Hans Hermann, Brackmann, Jochen Graw, Johannes Oldenburg. (2005). Hemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nature reviews Genetics*, 6, 488-501.
20. Lindley P, Pemberton S, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G. (1997). A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood*, 89, 2413-2421.
21. Bauer M, Brandstetter H, Huber R. (1995). X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and haemophilia B. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92, 9796-9800.

22. Nguyễn Minh Hiệp. (1999). *Đặc điểm lâm sàng và phân loại bệnh Hemophilia ở trẻ em tại viện Nhi khoa*. Luận văn thạc sỹ. Trường đại học Y Hà Nội.
23. Gale AJ, Pellequer JL, Griffin JH, Getzoff ED. (1998). Homology models of the C domains of blood coagulation factors V and VIII: a proposed membrane binding mode for FV and FVIII C2 domains. *Blood*, 24, 448-461.
24. Shen BW, Pratt KP, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard B. (1999). Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature reviews Genetics*, 402, 439-442.
25. Rodriguez H, Eaton D, Vehar GA. (1986). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*, 25, 505-512.
26. Zhou Z, Wakabayashi H, Nogami K (2006). pH-dependent association of factor VIII chains: enhancement of affinity at physiological pH by  $\text{Cu}^{2+}$ . *Biochim Biophys Acta*, 1764, 1094-1101.
27. Edgington TS, Zimmerman IS. (1973). Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like antigen: Independent molecular entities. *Med*, 138, 1015-1020.
28. Brockway WI, Olson ID, Fass DN, Bowie JW, Mann KG. (1977). Purification of porcine and human ristocetin-Willebrand factor. *LabClin Med*, 89, 1278-1294.
29. Trabold NC, Tuddenham GD, Collins IA, Hoyer LW. (1979). The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoadsorbent chromatography. *J Lab Clin Med*, 93, 40-53.



30. Weiss H, Sussman . (1978). Dissociation of factor VIII in the presence of proteolytic inhibitors. *Thromb Haemostas*, 40, 316-325.
31. Kazazian HH, Jr Lakich D, Antonarakis SE, Gitschier J. (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet*, 5, 236-241
32. Waseem N, Bagnall RD, Green PM, Giannelli F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, 99, 168-174.
33. Cumming AM. (2004). The factor VIII gene intron 1 inversion mutation: prevalence in severe hemophilia A patients in the UK. *J Thromb Haemost*, 2, 205-206.
34. Zenker M, Muhle C, Chuzhanova N, Schneider H. (2007). Recurrent inversion with concomitant deletion and insertion events in the coagulation factor VIII gene suggests a new mechanism for X-chromosomal rearrangements causing hemophilia A, 28, 1045.
35. Markoff A, Bogdanova N, Pollmann H. (2005). Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat*, 26, 249-254.
36. Aquila M, Santacroce R, Belvini D. (2008). Identification of 217 unreported mutations in the F8 gene in a group of 1,410 unselected Italian patients with hemophilia A. *J Hum Genet*, 53, 275-284.
37. Williams R, Van de Water N, Ockelford P, Browett P. (1998). A 20.7 kb deletion within the factor VIII gene associated with LINE-1 element insertion, 79, 938-942.
38. Dunbar T, Ganguly A, Chen P, Godmilow L, Ganguly T. (2003). Exon skipping caused by an intronic insertion of a young Alu Yb9 element leads to severe hemophilia A. *Hum Gene*, 113, 348-352.

39. Dimovski AJ, Sukarova E, Tchacarova P, Petkov GH, Efremov GD. (2001). An Alu insert as the cause of a severe form of hemophilia A. *Acta Haematol*, 106, 126-129.
40. Goodeve A, Rossetti LC, Larripa IB, De Brasi CD. (2004). Homeologous recombination between AluSx-sequences as a cause of hemophilia. *Hum Mutat* 2004, 24, 440.
41. Hsu TC, Nakaya SM, Geraghty SJ, Manco-Johnson MJ, Thompson AR. (2004). Severe hemophilia A due to a 1.3 kb factor VIII gene deletion including exon 24: homologous recombination between 41 bp within an Alu repeat sequence in introns 23 and 24. *J Thromb Haemost*, 2, 1941-1945.
42. HAMSTeRS. (2008). The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site. Available at, <http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm>. Accessed January 10.
43. Markoff A, Bogdanova N, Pollmann H (2002). Prevalence of small rearrangements in the factor VIII gene F8C among patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat*, 20, 236-237.
44. Herbiniaux O, Graw J, Schroder J, Terzic A, Watzka M. (2005). Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost*, 3, 332-339.
45. D'Argenio V, Castaldo G, Nardiello P, Zarrilli F, Sanna V, Rocino A. (2007). Haemophilia A: molecular insights. *Clin Chem Lab Med*, 45(4), 450-461.
46. Schroder J, Oldenburg J, Graw J, Ivaskevicius V, Brackmann H, Schramm W, Muller CR, Seifried E, Schwaab R. (2003). Significance of mutation analysis in patients with haemophilia A, 23(1), 6-12.

47. Montagnana M, Franchini M, Targher G, Veneri D, Zaffanello M, Salvagno GL. (2009). Interpatient phenotypic inconsistency in severe congenital hemophilia: a systematic review of the role of inherited thrombophilia. *Semin Thromb Hemost*, 35(3), 307-312.
48. Mancuso ME, Santagostino, Tripodia, Chantarankul, Clerici M. (2010). Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile. *J Thromb Haemost*, 8, 737-748.
49. Srivastava A, Jayandharan GR. (2008). The phenotypic heterogeneity of severe hemophilia. *Semin Thromb Haemost*, 34, 128-142.
50. Belvini D, Salviato R, Radossi P, Sartori R, Pierobon F, Zanotto DL. (2007). F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia*, 13(4), 361–372.
51. Castaman G, Margaglione M, Morfini M, Rocino A, Santagostino E, Tagariello G, Mannucci PM. (2008). The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica*. 93(5), 722-728.
52. Ventura C, David D, Moreira I, Diniz MJ, Antunes M, Tavares A. (2006). The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica*, 91, 840-843.
53. Mannucci PM, Franchini M. (2008). Interactions between genotype and phenotype in bleeding and thrombosis. *Haematologica*, 93(5), 649-562.
54. Shetty S, Ghosh K, Mohanty D. (2001). Milder clinical presentation of haemophilia A with severe deficiency of factor VIII as measured by one-stage assay. *Haemophilia*, 7, 9-12.
55. Lippi G, hini M. (2010), Factor V Leiden and hemophilia. *Thromb Res*, 125(2), 119-123.

56. Halimeh S, Ettingshausen CE, Kurnik K, Schobess R, Wermes C, Junker R. (2001). Symptomatic onset of severe hemophilia A in childhood is dependent on the presence of prothrombotic risk factors. *Thromb Haemost*, 85, 218-200.
57. Kreuz W, Kurnik K, Horneff S, Durig C, Schobess R, Bidlingmaier C. (2007). Effects of the factor V G1691 A mutation and the factor II G20210A variant on the clinical expression of severe hemophilia A in children – results of a multicenter study. *Haematologica*, 92(7), 982-985.
58. Soria JM, Tizzano EF, Coll I, Guzmán B, Cornet M, Altisent C. (2002). The prothrombin 20210A allele influences clinical manifestations of hemophilia A in patients with intron 22 inversion and without inhibitors. *Haematologica*, 87(3), 279-285.
59. Eelde A, Schulman S, Holmstrom M, Stahlberg G, Odeberg J, Blomback M. (2008). Validation of a composite score for clinical severity of hemophilia. *J Thromb Haemost*, 6, 1113–1121.
60. Baykara O, Ar MC, Buyru AN, Baslar Z. (2009). The impact of prothrombotic mutations on factor consumption in adult patients with severe hemophilia. *Clin Appl Thromb Hemost*, 15(6), 660-665.
61. De Groot P, van den Berg, Fischer K. (2007). Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. *J Thromb Haemost*. 5(1), 151-156.
62. Mannucci PM, Franchini M. (2009). Multiple gene interaction and modulation of hemostatic balance. *Clin Chem Lab Med*, 47(12), 1455–1460.
63. Mauser EP, Vlot AJ, Zarkova AG, Haan E. (2000) The half-life of infused factor VIII is shorter in hemophiliac patients with blood group O than in those with blood group A. *Thromb Haemost*, 83(1), 65-69.
64. Siegemund A, Gru newald M, Gru newald A, Konegan A, Kokschi M, Griesshammer M. (2002). Paradoxical hyperfibrinolysis is associated with a more intensely haemorrhagic phenotype in severe congenital haemophilia. *Haemophilia*, 8(6), 768-675.

65. Vora S, Shetty S, Kulkarni B, Mota L, Vijapurkar M, Quadros L, Ghosh K. (2007). Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of haemophilia patients. *Br J Haematol*, 138(4), 541-544.
66. Navarrete AM, Dasgupt S, Delignat S, Wootla B, Andre S, Nagaraja V, Lacroix S, Kaveri SV. (2007). Immune response against therapeutic factor VIII in hemophilia A patients-A survey of probable risk factors. *Immunol Lett*, 110, 23-28.
67. El-Maarri O, Oldenburg J, Schwaab R. (2002). Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia*, 8(2), 23-29.
68. Graaf MS, Fulcher CA, Zimmerman TS. (1987). FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood*, 69, 1475-1480.
69. Helden PM, Reipert BM, Schwarz HP, Hausl C. (2007). Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br J Haematol*, 136, 12-25.
70. Lollar P. (2004). Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J Thromb Haemost*, 2, 1082-1095.
71. Aichinge G, Lechler R, Lightstone L. (1996). The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*, 15(1), 51-79.
72. Astermark J. (2006). Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemophilia*, 12(3), 52-60.
73. Schroder J, Oldenburg J, Brackmann HH, Muller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. (2004). Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. *Semin Hematol*, 41, 82-88.

74. Mittal B, Pandey GS. (2001). Molecular diagnosis of Haemophilia A. *Journal of Postgraduate Medicine*, 47, 274-280.
75. Jayandharan G, Peyvandi F, Chandy M. (2006). Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia*, 12, 82-89.
76. Drayna D, Baty BJ, Leonard CO. (1986). Prenatal diagnosis of factor VIII deficiency to help with the management of pregnancy and delivery. *Lancet*, 1, 207-210.
77. Nozari G, Liu Q, Sommer S.S. (1998). Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood*, 92, 1458–1459.
78. Radic CP, Rossetti LC, Larripa IB, De Brasi CD. (2005). Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem*, 51, 154-158.
79. Giannelli F, Bagnall RD, Green PM. (2005). Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: A complex picture. *Thromb Haemost. Haemost* (3), 2598-2599.
80. Ivaskevicius V, Oldenburg J, Rost S (2001). Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. *J Biochem Biophys Methods*, 47, 39-51.
81. Williams I, Goodeve AC, Bray GL, Peake IR. (2000). Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate). *Recombinate PUP Study Group. Thromb Haemost* (83), 844-848.
82. Smith MP, Laurie AD, George PM. (2007). Detection of factor VIII gene mutations by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*, 53, 2211-2214.

83. Bagnall R, Waseem NH, Green PM, Giannelli F. (1999). Start of UK confidential haemophilia A database: analysis of 142 patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. *Thromb Haemost*, 8, 900-905.
84. Oelmueller U, Rainen L, Jurgensen S (2002). Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem*, 48, 1883-1890.
85. MRC-Holland. MRC-Holland MLPA homepage. (2008). Available at <http://www.mlpa.com/pages/indexpag.html>. Accessed February 26.
86. Shaji RV, Jayandharan G, George B, Chandy M, Srivastava A. (2004). Informativeness of linkage analysis for genetic diagnosis of haemophilia A in India. *Haemophilia*, 10, 553-559.
87. Mannucci PM, Franchini M. (2011). Inhibitors of propagation of coagulation (factors VIII, IX and XI): a review of current therapeutic practice. *Br J Clin Pharmacol*, 234-251.
88. Bjelke JR, Ostergaard H, Hansen L, Petersen LC, Pedersen AA, Elm T. (2011). Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide. *Blood*, 118, 2333-2341.
89. Baker K, Kuo TT, Yoshida M, Qiao SW, Aveson VG, Lencer WI. (2010). Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. *J Clin Immunol*, 30, 777-789.
90. Erik Berntorp, Karin Knobe. (2012). New treatments in hemophilia: insights for the clinician. *Therapeutic Advances in Hematology*, 165-175.
91. CDC. (2013). The Centers for Disease Control and Prevention Hemophilia A Mutation Project. *CHAMP F8 Mutation List*, <http://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>.

92. Shetty S, Nair PS, Kulkarni B, Ghosh K. (2010). Molecular pathology of haemophilia A in Indian patients: identification of 11 novel mutations. *Clin Chim Acta*, 411, 2004-2008.
93. Sturme R, Reiter S, Horvath B, Freitaaq M. (2010). Spectrum of causative mutations in patients with haemophilia A in Austriath. *Thromb Haemost*, 104, 78-85.
94. Marijke H, van den Berg, Samantha C, Oldenburg J, Astermark J, Philip G. (2012). F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*, 119(12), 2922-2934.
95. Pavlova A, Schwaab R, Albert T, Caspers M, Oldenburg J. (2013). Significance of F8 sai nghĩa mutations with respect to inhibitor formation. *Thromb Haemost*, 109, 464-470.
96. Trần Ngọc Trân (1993). Điều chế và sử dụng tua lạnh giàu yếu tố VIII trong điều trị bệnh Hemophilia A. *Y học Việt Nam*, Số 1, 44-47.
97. Tạ Thành Văn (2009). Thiết kế vector mang gen mã hóa tổng hợp yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp. *Đề tài nghiên cứu cấp Bộ y tế*.
98. Phạm Quang Vinh (2007). Ứng dụng phương pháp PCR-RFLP với vị trí cắt của enzym BclI chẩn đoán người mang gen bệnh trong gia đình bệnh nhân hemophilia A Việt Nam. *Nghiên cứu y học*, 4, 1-7.
99. Domenech M, Tizzano EF, Baiget M. (1995). Inversion of intron 22 in isolated cases of severe hemophilia A. *Thromb. Haemost*, 73(6-9).
100. Moreira I, David D, Lalloz MR, Rosa HA, Schwaab R, Morais SD. (1994). Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 14, 257-264.



101. Wood WI, Gitschier J, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 312, 326-330.
102. Dyack S, Renault NK, Dobson MJ, Costa T, Lam WL, Greer WL, (2007). Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. *Eur J Hum Gene*, 15, 628-637.
103. Aquila M, Panarello C, Caprino D, Gimelli G, Pecorara M, Mori PG. (1992). Concomitant Turner syndrome and hemophilia A in a female with an idic(X)(p11) heterozygous at locus DXS52. *Cytogenet Cell Genet*, 59, 241-242.
104. Singer H, El-Maarri O, Klein C. (2006). Lack of F8 mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A. *Blood*, 107, 59-65.
105. Budde U, Schneppenheim R, Krey S. (1996). Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thromb Haemost*, 76, 598-602.
106. Schwaab R, Becker J, Möller-Taube A, Schwaab U, Schmidt W, Brackmann HH, Grimm T, Olek K, Oldenburg J. (1996). Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequency. *Am J Hum Genet*, 58(4), 657-670.
107. Kenwrick S, Levinson B, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J. (1990). A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics*, 7, 1-11.
108. Schlessinger DA, Freije D. (1992). 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *Am. J. Hum. Gene*, 51, 66-80.

109. Rost S, Oldenburg J, El-Maarri O, Leuer M, Olek K, Müller CR, Schwaab R. (2000). De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood*, 96, 2905-2906.
110. Keeney S, Bowen DJ. (2003). Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb. Haemost*, 89, 201-202.
111. Chang SP, Ma GC, Chen M, Kuo SJ, Chang CS, Shen MC. (2008). The spectrum of the factor 8 (F8) defects in Taiwanese patients with haemophilia A. *Haemophilia*, 14, 787-795.
112. Faridi NJ, Kumar P, Husain N, Soni P, Goel SK. (2013). Study of intron 22 inversion mutation in north India with review. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 24(2), 120-124.
113. Pasino M, Aquila M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, Bicocchi MP. (2003). Frequency of factor VIII intron 1 inversion in a cohort of severe hemophilia A Italian patients. *Hematologica*, 88, 17-23.
114. Candela M, Rossetti LC, Bianco RP, de Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, De Brasi CD. (2004). Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe hemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 15, 569-572.
115. Buck D, Naylor JA, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. (1995). Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet*, 4, 1217-1224.
116. Klein I, Andrikovics H, Bors A, Nemes L, Marosi A, Váradi A. (2003). Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A. *Hematologica*, 88, 778-784.

117. Yang T, Liu W, Zhao W, Chase GA. (2007). Accounting for Genotyping Errors in Tagging SNP Selection. *Annals of Human Genetics*, 71(4), 467-479.
118. Martinez F, Casana P, Cabbera N, Aznar. (2008). Founder haplotype associated with the factor VIII Asp1241Glu polymorphism in a cohort of mild hemophilia A patients. *Thrombosis and Haemostasis*, 6(8), 1428-1430.
119. Legnani C, Scanavini D, Lunghi B, Mingozzi F, Palareti G, Bernardi F. (2005). The factor VIII D1241E polymorphism is associated with decreased factor VIII activity and not with activated protein C resistance levels. *Thromb Haemost*, 93(3), 453-456.
120. Yan ZY, Hua BL, Liang Y, Yan M, Fan LK, Li KX, Xiao B, Liu JZ, Zhao YQ. (2010). Identification of seven novel mutations in the factor VIII gene in 18 unrelated Chinese patients with hemophilia A. *Chin Med J (Engl)*, 123(3), 305-310.
121. Khodjet H, Elmahmoudi H, Wigren E, Jlizi A, Zahra K, Pellechia D, Vinciguerra C, Meddeb B, Elgaaied AB, Gouider E. (2012). First report of molecular diagnosis of Tunisian hemophiliacs A: identification of 8 novel causative mutations. *Diagn Pathol*, 93, 1746-1753.
122. Becker S, Keuz W, Lenz E, Martinez I, Escuriola C, Funk M, Ehrenfoth S, Auerswald G, Kornhuber B. (1995). Factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A: epidemiology of inhibitor development and induction of immune tolerance for factor VIII. *Semin Thromb Hemost*, 21(4), 382-329.
123. Neutzling O, Scharrer I. (1993). Incidence of inhibitor in haemophiliacs. A review of the literature. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 4, 753-758.

124. Brackmann HH, Schwab R, Meyer C, Seehafer J. (1995). Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost*, 74(6), 1402-1406.
125. Young G, Char W. (2013). Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. *Hematologica*, 4(1), 59-72.
126. Brown S, Hay CR, Collins PW, Keeling DM, Liesner R. (2006). The diagnosis and management of factor VIII and IX. *Br J Haematol*, 133, 591-605
127. Lavend R, Jacquemin M, Benhida A, Vanzielegem B, Oiron R, Lavergne JM, Brackmann HH. (2000). A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood*, 96, 958-965.
128. Miao H, Hakeos WH, Sirachainan N. (2002). Hemophilia A mutations within the factor VIII A2–A3 subunit interface destabilize factor VIIIa and cause one-stage/two-stage activity discrepancy. *Thromb. Haemost*, 88, 781-787.
129. Andrikovics H, Ananyeva NM, Klein I. (2004). Inhibitors in hemophilia A: mechanisms of inhibition, management and perspectives. *Blood Coag. Fibrinol*, 15, 109-124.
130. Koszelak ME, Wakabayashi H, Mastro M, Fay PJ. (2001). Metal ion independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and intersubunit affinity. *Biochemistry*, 40, 293-300.
131. Freas J, Wakabayashi H, Zhou Q, Fay PJ. (2005). Residues 110-126 in the A1 domain of factor VIII contain Ca<sup>2+</sup> binding site required for cofactor activity. *J Biol Chem*, 279, 677-884.

132. Chivian D, Kim DE, Baker D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res*, 32, 526-531.
133. Beattie T, Fay PJ, Huggins CF, Regan LM. (1994). Factor VIIIa A2 subunit residues 558–565 represent a factor IXa interactive site. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 522-527.
134. Knopf JL, Toole JJ, Wozney JM, Sultzman LA. (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*, 332-342.
135. Ananyeva NM, Oldenburg J, Saenko EL. (2004). Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia*, 10, 133-139.
136. Antonarakis SE, Youssoufian H, Bell W, Griffin AM, Kazazian HH. (1988). Vô nghĩa and sai nghĩa mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides. *Am J Hum Genet*, 42(5), 718-725.
137. Ivaskevicius V, Ahmed RP, Kannan M, Seifried E, Oldenburg J, Saxena R. (2005). Identification of 32 novel mutations in the factor VIII gene in Indian patients with hemophilia A. *Haematologica*, 90(2), 283-284.
138. Scandella D, Saenko EL. (1997). The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 272, 7-14.
139. Repesse Y, Slaoui M, Ferrandis M, Gautier P, Costa C, Lavergne JM, Derlon AB. (2007). Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *Thrombosis and Haemostasis*, 5, 1469–1476.

140. Adoración Venceslá, María Angeles Corral-Rodríguez, Manel Baena, Mónica Cornet, Montserrat Domènech, Montserrat Baiget, Pablo Fuentes-Prior, Eduardo F, Tizzano. (2008). Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 sai nghĩa mutations suggests new intermolecular binding sites. *Blood*, 111(7), 3468-3478.
141. Rossetti LC, Szurkalo I, Radic CP. (2013). Factor VIII genotype characterization of haemophilia A affected patients with transient and permanent inhibitors: a comprehensive Argentine study of inhibitor risks. *Haematologica*, 19, 115-118.



BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

LƯU VŨ DŨNG

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘ BIẾN GEN F8  
GÂY BỆNH HEMOPHILIA A**

Chuyên ngành: Hóa sinh

Mã số: 62720112

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

Ng-êi h-íng dến khoa hăc:

1. GS.TS. Tạ Thành Văn

2. TS. Trần Văn Khánh

**HÀ NỘI - 2014**



## **KINH PHÍ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI**

Đề tài được thực hiện trên cơ sở của một đề tài cấp Bộ (Quyết định số 101-QĐBYT): “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện đột biến gen yếu tố VIII gây bệnh Hemophilia A”. Đề tài được tài trợ kinh phí từ ngân sách Sự nghiệp Khoa học cấp Bộ Y tế.

**Chủ nhiệm đề tài: GS.TS. Tạ Thành Văn**

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên cho phép tôi xin bày tỏ lòng tri ân sâu sắc tới GS.TS. Tạ Thành Văn, Phó hiệu trưởng, Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội là người hướng dẫn khoa học, người Thầy đã hết lòng giúp đỡ, dìu dắt tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu, truyền đạt kiến thức và những kinh nghiệm quý báu, cũng như tạo mọi điều kiện thuận lợi để giúp tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Trần Văn Khánh, Phó Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã định hướng, trực tiếp hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập cũng như tạo mọi thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án ngày hôm nay.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Thị Hà, nguyên Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã giúp đỡ và truyền cho tôi những kinh nghiệm quý báu trong học tập và nghiên cứu khoa học.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến:

PGS.TS. Phạm Thiện Ngọc, Trưởng Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội, Trưởng khoa Sinh hóa, Bệnh viện Bạch Mai đã tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Các Nghiên cứu viên tại Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ, tạo điều kiện, chia sẻ những kinh nghiệm quý báu để tôi thực hiện các kỹ thuật nghiên cứu và hoàn thành đề tài này.

Các Thầy, Cô trong Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội đã dạy dỗ và truyền đạt những kiến thức quý báu trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Các Bác sĩ, Y tá Khoa Hemophilia A - Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương; Khoa Huyết học, Lâm sàng - Bệnh Viện Nhi Trung ương đã trực tiếp giúp đỡ tôi trong việc thu thập mẫu nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến:

- Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau Đại học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Ban Giám đốc, các Phòng ban chức năng, các Cán bộ viên chức Khoa Sinh hóa Bệnh viện Phụ sản Hải Phòng đã tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.
- Xin được gửi lời cảm ơn đến các bệnh nhân hemophilia A đã giúp đỡ tôi có được số liệu trong luận án này.
- Xin cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ, động viên tôi rất nhiều trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin ghi nhớ công ơn sinh thành, nuôi dưỡng và tình yêu thương của Cha mẹ tôi, cùng sự ủng hộ, giúp đỡ, động viên của vợ, con trai, những người đã luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

*Hà Nội, ngày 8 tháng 12 năm 2014*

Lưu Vũ Dũng

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Lưu Vũ Dũng, nghiên cứu sinh khóa 29 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Tạ Thành Văn và TS. Trần Văn Khánh.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

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

*Hà Nội, ngày tháng năm 2014*

**Người viết cam đoan**

**LƯU VŨ DŨNG**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

A1,A2,A3,B,C1,C2	Các vùng của yếu tố VIII
bp	Base pair
CDC	The Centers for Disease Control and Prevention (Trung tâm kiểm soát và phòng chống bệnh dịch)
DNA	Deoxyribonucleic acid
FVIII	Yếu tố VIII
HAMSTERS	Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site (Trang quản lý thông tin về bệnh hemophilia A của nước Anh)
Int1	Intron 1
Int22	Intron 22
I-PCR	Inversion PCR
LD-PCR	Long distance PCR
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
PCR	Polymerase Chain Reaction
CSGE	Conformation Sensitive Gel Electrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic acid
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
F8	Gene quy định yếu tố VIII
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
vWF	Yếu tố von Willebrand
PEG	Polyethylene glycol
TBE	Tris; acid boric; EDTA
APTT	Activated Partial Thromboplastin Time Xét nghiệm thời gian Thromboplastin từng phần hoạt hóa
NST	Nhiễm sắc thể

# MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN.....</b>	<b>3</b>
1.1. LỊCH SỬ NGHIÊN CỨU BỆNH HEMOPHILIA A .....	3
1.2. BỆNH HỌC BỆNH HEMOPHILIA A.....	4
1.2.1. Bệnh hemophilia A.....	4
1.2.2. Vị trí, cấu trúc, chức năng của gen F8.....	10
1.2.3. Bệnh học phân tử bệnh hemophilia A .....	14
1.2.4. Mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình.....	16
1.2.5. Yếu tố ức chế FVIII.....	19
1.2.6. Di truyền học và tỷ lệ mắc bệnh hemophilia A.....	21
1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN TRÊN GEN F8.....	22
1.3.1. Phương pháp phát hiện đột biến đảo đoạn nhiễm sắc thể.....	23
1.3.2. Phương pháp phát hiện các dạng đột biến khác .....	26
1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC .....	30
1.4.1. Nghiên cứu trên thế giới .....	30
1.4.2. Nghiên cứu tại Việt Nam.....	32
1.5. NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN TỒN TẠI.....	34
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>36</b>
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	36
2.2. DỤNG CỤ, TRANG THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU....	37
2.2.1. Dụng cụ.....	37
2.2.2. Hoá chất .....	37
2.2.3. Trình tự môi cho các phản ứng PCR.....	39

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	40
2.3.1. Quy trình lấy mẫu .....	41
2.3.2. Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi .....	41
2.3.3. Quy trình phát hiện đảo đoạn intron .....	42
2.3.4. Kỹ thuật PCR khuếch đại các exon .....	48
2.3.5. Kỹ thuật điện di trên gel agarose .....	49
2.3.6. Giải trình tự gen .....	49
2.3.7. Phương pháp phân tích kết quả .....	52
2.4. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU .....	52
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>53</b>
3.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA CÁC ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	53
3.1.1. Đặc điểm về tuổi .....	53
3.1.2. Tỷ lệ bệnh nhân chia theo thể bệnh .....	54
3.2. KẾT QUẢ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN F8 .....	54
3.2.1. Tỷ lệ phát hiện được đột biến .....	54
3.2.2. Kết quả phát hiện các dạng đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A .....	55
3.2.3. Đánh giá nguy cơ phát triển chất ức chế yếu tố VIII .....	70
3.3. LẬP BẢN ĐỒ ĐỘT BIẾN GEN F8 GÂY BỆNH HEMOPHILIA A Ở VIỆT NAM .....	73
3.3.1. Kết quả các vị trí đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A Việt Nam .....	73
3.3.2. Tỷ lệ các dạng đột biến khác nhau trên bệnh nhân hemophilia A ở Việt Nam .....	75
3.3.3. Tỷ lệ các dạng đột biến trên các vùng của gen F8 .....	76
3.3.4. Bản đồ đột biến gen F8 gây bệnh hemophilia A ở Việt Nam .....	76

<b>Chương 4: BÀN LUẬN</b> .....	<b>78</b>
4.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG VỀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	78
4.2. PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN F8 Ở BỆNH NHÂN HEMOPHILIA A CỦA VIỆT NAM .....	82
4.2.1. Tỷ lệ phát hiện đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A .....	82
4.2.2. Các dạng đột biến gây bệnh hemophilia A ở Việt Nam.....	84
4.2.3. Đánh giá nguy cơ hình thành chất ức chế .....	94
4.3. XÂY DỰNG BẢN ĐỒ ĐỘT BIẾN GEN F8 ĐỐI VỚI BỆNH NHÂN HEMOPHILIA A TẠI VIỆT NAM.....	98
4.3.1. Vị trí đột biến gây bệnh hemophilia A .....	98
4.3.2. Tần suất hay gặp ở một số vị trí đột biến .....	104
4.3.3. Tỷ lệ phát hiện đột biến trên từng exon.....	104
<b>KẾT LUẬN</b> .....	<b>107</b>
<b>KIẾN NGHỊ</b> .....	<b>108</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	



## DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1.	Đặc điểm về tuổi của các đối tượng nghiên cứu.....	53
Bảng 3.2.	Phân bố tỷ lệ bệnh nhân có chất ức chế yếu tố VIII theo các dạng đột biến.....	70
Bảng 3.3.	Phân bố tỷ lệ bệnh nhân có chất ức chế yếu tố VIII theo các vùng đột biến trên gen F8 .....	71
Bảng 3.4.	Liên quan giữa các dạng đột biến và yếu tố ức chế.....	72
Bảng 3.5.	Kết quả các vị trí đột biến trên gen F8 gây bệnh hemophilia A...	73
Bảng 4.1.	So sánh các dạng đột biến với các nghiên cứu khác trên thế giới...	106

## **DANH MỤC BIỂU ĐỒ**

Biểu đồ 3.1. Phân bố tỷ lệ bệnh nhân theo thể bệnh.....	54
Biểu đồ 3.2. Phân bố tỷ lệ phát hiện đột biến theo thể bệnh.....	55
Biểu đồ 3.3. Các dạng đột biến phát hiện được trên bệnh nhân hemophilia A.....	75
Biểu đồ 3.4. Phân bố tỷ lệ các dạng đột biến trên các vùng của gen F8.....	76

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Sơ đồ đông máu theo con đường nội và ngoại sinh .....	5
Hình 1.2.	Hình ảnh tổn thương ở những bệnh nhân hemophilia A .....	6
Hình 1.3.	Vị trí của gen tổng hợp FVIII .....	10
Hình 1.4.	Cấu trúc gen và protein FVIII .....	11
Hình 1.5.	Mô hình cấu trúc phân tử 3-D của yếu tố VIII hoàn chỉnh .....	13
Hình 1.6.	Cơ chế hình thành kháng thể kháng FVIII .....	20
Hình 1.7.	Ảnh hưởng của các dạng đột biến gen F8 đến nguy cơ phát triển chất ức chế FVIII .....	21
Hình 1.8.	Cơ chế đột biến đảo đoạn intron 22 .....	24
Hình 1.9.	Cơ chế đột biến đảo đoạn intron 1 .....	26
Hình 2.1.	Quy trình xác định đột biến gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A ..	40
Hình 2.2.	Vị trí của enzym cắt <i>BclI</i> và các môi IU, ID, ED.....	42
Hình 2.3.	Các đoạn DNA đóng vòng sau khi nối bằng T4 ligate.....	43
Hình 2.4.	Hình ảnh vị trí thiết kế môi đoạn intron1h1 và intron1h2.....	46
Hình 3.1.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 22 .	56
Hình 3.2.	Hình ảnh giải trình tự 2 đoạn DNA kích thước 487bp (môi IU-ID) và đoạn 559bp (môi IU-ED).....	57
Hình 3.3.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định đảo đoạn intron 1 .....	57
Hình 3.4.	Kết quả PCR xác định đột biến mất exon ở bệnh nhân HA64.....	58
Hình 3.5.	Kết quả PCR xác định đột biến mất exon ở bệnh nhân HA55....	58
Hình 3.6.	Hình ảnh đột biến mất đoạn 15 nucleotid ở bệnh nhân HA46 .....	59
Hình 3.7.	Hình ảnh đột biến mất 3 nucleotid ở bệnh nhân HA91 .....	60
Hình 3.8.	Hình ảnh đột biến ở bệnh nhân mã số HA90 .....	60
Hình 3.9.	Hình ảnh đột biến của bệnh nhân HA76 .....	61
Hình 3.10.	Hình ảnh đột biến thêm nucleotid C của bệnh nhân HA03.....	62

Hình 3.11. Hình ảnh đột biến thêm nucleotid A của bệnh nhân HA06 .....	63
Hình 3.12. Hình ảnh đột biến mất nucleotid của bệnh nhân HA01 .....	63
Hình 3.13. Hình ảnh đột biến mất nucleotid của bệnh nhân HA39 .....	64
Hình 3.14. Hình ảnh đột biến tạo stop codon của bệnh nhân HA33 .....	65
Hình 3.15. Hình ảnh đột biến tại vị trí nối exon/intron của bệnh nhân HA45 ..	65
Hình 3.16. Hình ảnh Blast bằng phần mềm CLC kiểm tra đột biến ở vị trí nối exon/intron của bệnh nhân HA45 .....	66
Hình 3.17. Hình ảnh đột biến thay thế nucleotid tạo SNP của bệnh nhân HA26 .	67
Hình 3.18. Hình ảnh SNP đã được công bố.....	67
Hình 3.19. Hình ảnh đột biến mới chưa được công bố của bệnh nhân HA96...	68
Hình 3.20. Hình ảnh cấu trúc 3D của protein F8 phân tích ở bệnh nhân HA96...	69
Hình 3.21. Bản đồ vị trí đột biến gen F8 gây bệnh hemophilia A ở Việt Nam...	77
Hình 4.1. Cấu trúc và các vị trí tương tác của protein FVIII đông máu .....	99





