

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Wilson được mô tả lần đầu tiên vào cuối thế kỷ 19 và cho đến nay bệnh đã được phát hiện khá rộng rãi ở hầu hết quốc gia và chủng tộc trên thế giới. Tần suất mắc bệnh vào khoảng  $\sim 1/350$  trẻ sinh ra [1],[2]. Theo tỷ lệ này, ước lượng ở nước ta hiện nay có khoảng 3000 người mắc bệnh Wilson. Đây là một bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể số 13, gây nên bởi đột biến gen ATP7B. Gen này có vai trò quan trọng trong quá trình điều hòa sự hấp thu, phân phối và thải trừ đồng của cơ thể. Do đó khi đột biến gen, sẽ gây rối loạn quá trình chuyển hóa đồng, giảm bài xuất đồng qua đường mật, lượng đồng ứ đọng dần trong các tổ chức như: Gan, não, mắt, da, thận, xương, khớp... và gây ra các triệu chứng đa dạng trên lâm sàng, các triệu chứng này tiến triển nặng dần cùng với quá trình lắng đọng đồng theo thời gian [3]. Ở điều kiện sinh lý bình thường, lượng đồng được đưa vào cơ thể từ 2mg đến 5mg/ngày. Sau khi được hấp thu tại ruột non, đồng được đưa vào huyết tương và gắn với Albumin dưới dạng  $\text{Cu}^{2+}$  trước khi kết hợp với các protein khác của gan để tổng hợp thành ceruloplasmin hoặc đào thải qua mật [4],[5]. Quá trình tạo thành ceruloplasmin hoặc bài tiết đồng qua đường mật bị suy giảm trong bệnh Wilson. Ban đầu đồng sẽ tích lũy tại gan gây tổn thương tế bào gan (do 80% lượng đồng được dự trữ trong gan). Sau đó lượng đồng dư thừa sẽ được vận chuyển theo hệ tuần hoàn đến cơ quan đích: Não, mắt, thận, da, xương, khớp... và tích tụ, gây tổn thương nghiêm trọng chức năng các cơ quan này. Bệnh nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời sẽ tiến triển nhanh

sang giai đoạn toàn phát với nhiều biến chứng về thần kinh, tiêu hóa, tâm thần, rối loạn sắc tố và các rối loạn khác [6],[7],[8].

Ở Việt Nam, lần đầu tiên vào năm 1969, Bùi Quốc Hương và cộng sự đã báo cáo 8 trường hợp bệnh Wilson tại hội nghị Thần kinh học quốc tế lần thứ IX tại Mỹ [9]. Sau đó vào những năm 2002-2005 Thái Duy Thành và cộng sự đã có công trình nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của 29 trường hợp bệnh nhân Wilson ở khoa Thần kinh - bệnh viện Bạch Mai [1]. Tiếp theo Quách Nguyễn Thu Thủy và cộng sự công bố nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng bệnh Wilson ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương giai đoạn 2001 - 2006 [2]. Tuy nhiên, cho đến nay ở Việt Nam gần như chưa có một công trình nghiên cứu toàn diện nào về phát hiện đột biến gen gây bệnh Wilson. Việc xác định chính xác các đột biến trên gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson sẽ giúp xác định nguyên nhân gây bệnh, đồng thời tạo tiền đề quan trọng cho việc phát hiện người lành mang gen bệnh trong dòng họ có cùng quan hệ huyết thống với bệnh nhân và tư vấn trước hôn nhân, giúp ngăn ngừa và giảm tỷ lệ mắc bệnh. Từ thực tế trên, đề tài "***Nghiên cứu phát hiện đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson***" được thực hiện với mục tiêu:

***1. Phát hiện đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson.***

***2. Thiết lập bản đồ đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson trên bệnh nhân Wilson Việt Nam.***

## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh Wilson

Bệnh Wilson đã được biết đến từ thế kỷ 19 và đầu thế kỷ 20, sự hiểu biết về bệnh còn hạn chế, các triệu chứng được phát hiện mang tính chất đơn lẻ. Bệnh được mô tả đầu tiên bởi Wesphal vào năm 1883 và Stryxmpell năm 1889 với tên gọi là bệnh “xơ cứng giả hiệu” (Pseudosclerosis), biểu hiện triệu chứng chủ yếu là run rẩy [10].

Năm 1902, Kayser và Fleischer phát hiện vòng màu xanh ở rìa giác mạc trên những bệnh nhân được chẩn đoán bệnh “xơ cứng giả hiệu”, gọi là vòng Kayser - Fleischer.

Năm 1912, lần đầu tiên Wilson mô tả bệnh thoái hóa gan - nhân đậu là bệnh thần kinh có tính chất gia đình và tiến triển, thoái hóa các nhân ở đáy não kết hợp với xơ gan, tiếp theo Strpell nhận thấy sự tích lũy sớm của đồng trong não và gan của các bệnh nhân này [10].

Năm 1948, Martins tìm thấy lượng đồng trong nước tiểu của bệnh nhân Wilson tăng rất cao so với người bình thường [11].

Scheinberg và Gitlin phát hiện được enzym trong huyết thanh gắn với đồng, được gọi là ceruloplasmin. Hoạt tính của enzym này giảm trong huyết tương ở các bệnh nhân Wilson [12],[13],[14].

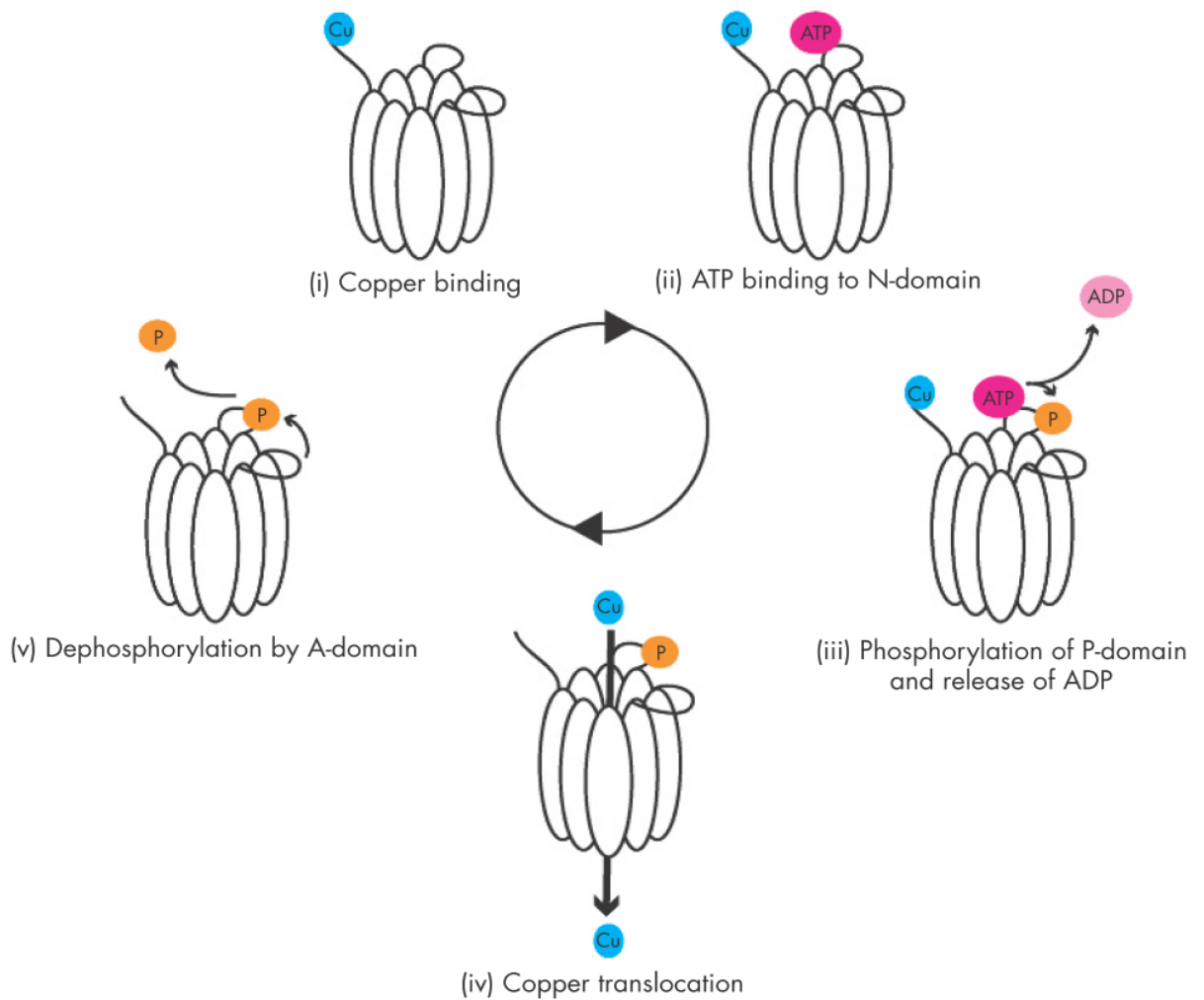
## 1.2. Sinh lý bệnh Wilson

Hàng ngày lượng đồng đưa vào cơ thể từ 2 đến 5 mg. Trong đó 1/10 lượng này được hấp thu tại ruột non nhờ methallothionin là một protein có trọng lượng phân tử thấp. Sau đó đồng được vào huyết tương gắn với albumin dưới dạng  $\text{Cu}^{2+}$ . Trong hai giờ tiếp theo đồng được gắn với protein của gan (hepatocuprein), rồi được tổng hợp thành ceruloplasmin [4], [7],[8].

\* Một phần đồng gắn với protein, được bài tiết vào dịch mật đào thải ra ngoài qua phân.

\* Một phần đi vào huyết tương dưới dạng cation, thải ra ngoài qua nước tiểu, đồng ở dạng cation tự do trong huyết tương rất ít.

\* Phần lớn đồng gắn với protein của gan (hepatocuprein), rồi được tổng hợp thành ceruloplasmin, bản chất là alpha globulin có trọng lượng phân tử 120 Da, gắn với 8 nguyên tử đồng.



**Hình 1.1. Cơ chế vận chuyển đồng trong cơ thể [15].**

Khoảng 95% đồng trong máu dưới dạng ceruloplasmin, gần 5% đồng gắn lỏng lẻo với albumin để vận chuyển, ngoài ra còn một lượng nhỏ đồng hấp thu qua da, thải trừ qua nước tiểu và mồ hôi [17].

Quá trình tạo thành ceruloplasmin hoặc quá trình bài tiết đồng qua đường mật bị tụt giảm trong bệnh Wilson. Lượng đồng bị ứ lại trong cơ thể không đào thải ra ngoài được, nó là một chất oxy hóa kích thích hình thành các gốc tự do và quá trình peroxy hóa lipid. Sự tích lũy của đồng trong tế bào

gan do đó gan là cơ quan đầu tiên bị tổn thương. Lượng đồng càng tăng sẽ theo máu di chuyển đến các cơ quan khác: Não, mắt, thận, da, xương khớp. [16]. Đồng ứ đọng ở các cơ quan và gây ra những tổn thương cho các cơ quan này. Lượng đồng bình thường trong cơ thể khoảng 80mg/dl trong nước tiểu <100mg/24h, trong 1gram gan khô có khoảng 15-55 mg đồng. Khi mắc bệnh Wilson lượng đồng này có sự thay đổi theo chiều hướng <80mg/dl trong huyết tương, đồng thời đồng trong nước tiểu tăng >100mg/24h, và trong 1 gram gan khô có khoảng 250mg đồng. Lượng đồng tăng cao ứ đọng tại thận gây tổn thương thận, tổn thương màng lọc cầu thận, có thể dẫn đến tăng protein niệu, tế bào trụ niệu, nếu kéo dài sẽ dẫn đến suy thận. Ứ đọng đồng trong gan gây tổn thương gan ở nhiều mức độ, trên lâm sàng hay gặp viêm gan cấp và mạn tính, xơ gan, teo gan [7],[18].

Nồng độ ceruloplasmin trong huyết tương có giá trị bình thường trong khoảng 20-40mg/dl. Tuy nhiên có thể gặp tăng ceruloplasmin huyết tương ở phụ nữ có thai, cường giáp, nhiễm khuẩn cấp và mạn tính, người có nồng độ estrogen trong máu tăng cao. Ngược lại đối với trẻ em sơ sinh, suy dinh dưỡng, thiếu máu, hội chứng thận hư hàm lượng ceruloplasmin trong máu bị giảm nhưng giảm không dưới 15mg/dl.

Ở bệnh nhân Wilson nồng độ ceruloplasmin huyết tương giảm quá nửa trị số bình thường <20mg/dl, có thể giảm chỉ còn ở dạng vết hoặc bằng 0mg/dl, tuy nhiên có khoảng 5% bệnh nhân Wilson có nồng độ ceruloplasmin huyết tương trong giới hạn bình thường [2].

### **1.3. Triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh Wilson**

Bệnh được biểu hiện rất đa dạng trên lâm sàng với tuổi khởi phát khác nhau và tổn thương nhiều cơ quan trong cơ thể. Bởi vậy, chẩn đoán bệnh trở nên khó khăn, bệnh nhân được nhập viện và điều trị ở nhiều chuyên khoa như: Thần kinh, tiêu hóa, mắt, da liễu, thận, xương khớp...

Bệnh nhân Wilson có cuộc sống kéo dài từ năm đến năm mươi năm tính từ khi có biểu hiện triệu chứng lâm sàng. Các triệu chứng tiêu hóa thường xuất hiện sớm nhất, biểu hiện hay gặp nhất là tổn thương gan vì gan dự trữ khoảng 80% lượng đồng được đưa vào cơ thể. Khoảng 40% đến 70% bệnh nhi Wilson có triệu chứng ở gan với biểu hiện chủ yếu là viêm gan mạn tính tiến triển thành xơ gan hoặc viêm gan cấp. Biểu hiện triệu chứng thần kinh hoặc tâm thần thường gặp ở lứa tuổi lớn hơn, hiếm gặp trước 12 tuổi và sau 40 tuổi [7],[19],[20],[21] Biểu hiện hay gặp nhất là run ngón chi, loạn vận ngôn, loạn trương lực cơ, rối loạn sự điều phối, rối loạn giấc ngủ và hành vi. Do đó tất cả các bệnh nhân có hội chứng ngoại tháp xuất hiện trước 40 tuổi đều cần làm các xét nghiệm để loại trừ bệnh Wilson.

#### **1.3.1. Triệu chứng lâm sàng ở giai đoạn đầu**

Triệu chứng ở giai đoạn này rất đa dạng nhưng hay bị bỏ qua. Thường gặp nhất là chán ăn, mệt mỏi, ăn uống khó, vận động cơ thể và tứ chi chậm chạp. Ở trẻ em biểu hiện sớm là kém tập trung chú ý, viết chữ xấu, hay bị vấp ngã. Các triệu chứng tiến triển nặng dần. Gia đình thường phát hiện trẻ mắc bệnh khi trẻ có biểu hiện nói khó, nuốt khó, run ngón chi, chảy nhiều dãi, đi đứng khó khăn, đôi khi trẻ có kèm theo đau bụng, chảy máu chân răng, viêm gan cấp...[2].

### 1.3.2. Triệu chứng lâm sàng ở giai đoạn toàn phát

#### - Triệu chứng thần kinh:

Các triệu chứng thần kinh thường xuất hiện muộn hơn triệu chứng tiêu hóa và hiếm khi xuất hiện trước tuổi dậy thì [22]. Các triệu chứng nổi bật ở giai đoạn này là rối loạn trương lực cơ do hành tủy chi phối cho nên gây khó vận động cơ vùng cổ, thắt lưng, môi, miệng và lưỡi. Tăng trương lực cơ kiểu ngoại tháp, đặc biệt là khi tập trung chú ý, vận động gắng sức và sự tăng trương lực cơ giảm bớt khi ngủ. “Bộ mặt Wilson” là triệu chứng điển hình với biểu hiện bất động mặt - miệng - hầu. Bệnh nhân thường có loạn vận ngôn: Nói khó, nói chậm, âm thanh đơn điệu, loạn âm kèm theo vẻ mặt kém biểu cảm, kém linh hoạt. Các động tác bất thường hay gặp: Run ngón chi, múa vờn, múa giật, co vận hoặc các động tác tự động ở miệng. Rối loạn cơ tròn ở giai đoạn muộn (bí tiểu, táo bón). Giai đoạn cuối của bệnh, các triệu chứng lâm sàng rất nặng với biểu hiện tăng trương lực cơ toàn thân, bệnh nhân nằm liệt giường trong tư thế co quắp chân tay, miệng há, có khi không nói, không nuốt được kèm theo các cơn co giật [23]. Các triệu chứng biểu hiện nặng hơn nếu bệnh nhân có đột biến cả hai gen ATP7B và PRNP [24],[25],[26].



**Hình 1.2. Vòng Kayser - Fleisher và bộ mặt Wilson điển hình**

([www.http://Wilson\\_disease.com](http://Wilson_disease.com))



*- Triệu chứng tiêu hóa:*

Các triệu chứng tiêu hóa của bệnh Wilson xuất hiện rất sớm và biểu hiện hay gặp nhất là tổn thương gan. Khoảng 50% bệnh nhân có biểu hiện của viêm gan mạn tính, suy giảm chức năng gan và xơ gan. Các triệu chứng tiêu hóa thoáng qua như tiêu chảy, sốt, nôn, chán ăn, đau bụng, chảy máu chân răng, vàng da... thường xuất hiện trước các triệu chứng thần kinh [7],[27].

Xơ gan trong bệnh Wilson không có sự khác biệt so với xơ gan trong các bệnh cảnh khác. Xơ gan tiến triển với gan to rồi teo gan, tăng áp lực tĩnh mạch cửa, tuần hoàn bàng hệ, lách to, phù cổ trướng và hôn mê gan ở giai đoạn cuối. Ở nhóm bệnh nhân dưới 35 tuổi, tỷ lệ viêm gan mạn tính là 35% [2].

*- Triệu chứng tâm thần:*

Những biểu hiện về tâm thần thường khó chẩn đoán, trong đó có biểu hiện hành vi bất thường, thay đổi tính tình và tác phong. Những biểu hiện phức tạp hơn bao gồm rối loạn cảm xúc và khí sắc, cảm xúc bất thường và không ổn định, khóc cười vô cớ, không tự kiềm chế được bản thân. Nhiều trường hợp suy yếu trí tuệ có khuynh hướng tiến tới sa sút, giảm hiệu suất học tập và công tác. Đôi khi, có thể gặp cơn loạn thần mà các thuốc an thần kinh không có tác dụng trên bệnh nhân Wilson [1], [6]. Những bệnh nhân có đột biến ATP7B kết hợp với đột biến PRNP thường kèm theo triệu chứng suy giảm trí nhớ nặng [28].

*- Rối loạn sắc tố:*

Rối loạn sắc tố thường thấy rõ ở mắt và da. Ở mắt, có vòng Kayser – Fleischer với kích thước 1,2mm màu xanh nâu, được tạo nên do đồng lắng đọng ở vị trí mặt sau màng Descemet, quanh giác mạc. Ban đầu, vòng Kayser – Fleischer được hình thành ở đỉnh giác mạc sau đó lan xuống phía dưới và cuối cùng bao quanh phần còn lại của rìa giác mạc. Một số ít trường hợp khi lượng đồng xâm phạm vào củng mạc mắt và thủy tinh thể gây nên đục nhân hình hoa hướng dương của Siebmerling và Oloff.

Tình trạng lắng đọng đồng ở da thường xảy ra chậm, da có màu nâu nhạt hoặc xám nhạt như màu băng đá [1].

*- Các rối loạn khác*

+ Biến đổi xương khớp: Thường gặp mất chất vôi kiểu nhuyễn xương, rối xương làm cho xương dễ gãy, lắng đọng vôi tại các khớp và dây chằng, đầu sụn có thể bị mòn.

+ Biến đổi về nội tiết: Có thể gặp thiếu năng sinh dục, vô kinh, kèm theo rối loạn thực vật vùng gian não như ngủ nhiều, hạ thân nhiệt hoặc tăng thân nhiệt, cũng có thể gặp tiểu đường.

+ Số ít trường hợp có biểu hiện thiếu máu tan máu, giảm bạch cầu, giảm tiểu cầu dẫn đến cường lách. Về tim mạch, có thể tổn thương dẫn đến loạn nhịp tim. Khi lượng đồng đào thải qua thận tăng sẽ dẫn đến tổn thương màng lọc cầu thận và xét nghiệm nước tiểu có thể có protein, tế bào, trụ niệu. Tuy nhiên nồng độ urê và creatinin trong máu vẫn trong giới hạn bình thường [7].

### 1.3.3. Các thể lâm sàng

#### - Các thể lâm sàng theo triệu chứng

Thể lâm sàng được phân chia theo triệu chứng chiếm ưu thế, bao gồm:

- Thể thần kinh đơn thuần
- Thể gan - thần kinh
- Thể thận - thần kinh
- Thể gan - tâm thần
- Thể huyết học

#### - Các thể lâm sàng theo giai đoạn tiến triển của bệnh

- Thể không rõ triệu chứng: Ở giai đoạn trước khi có biểu hiện lâm sàng, chỉ phát hiện nồng độ ceruloplasmin huyết tương bị giảm và lượng đồng trong nước tiểu tăng.

- Thể trước khi có biểu hiện thần kinh: Bệnh nhân vốn bị rối loạn tiêu hóa từ nhỏ, có nhiều đợt sốt, trẻ chậm lớn, dễ gãy xương, vàng da tan huyết, gan lách to và xơ gan.

- Thể thần kinh với hai bệnh cảnh Wilson và Westphal– Stryxmpell.

### 1.3.4. Các chỉ số cận lâm sàng

- Nồng độ đồng huyết tương thường hạ thấp dưới 80mg/dl [29].

- Lượng đồng trong nước tiểu có thể tăng gấp 30 lần so với mức bình thường (tăng trên 100mg/ 24giờ hoặc trên 1mmol/24 giờ) [11].

- Lượng đồng trong 100 gram gan khô thường tăng trên 250mg [30].
- Định lượng nồng độ ceruloplasmin huyết tương luôn luôn giảm dưới 20mg/dl, có thể tới mức 0mg/dl hoặc chỉ còn dạng vết [1]. Tuy nhiên có khoảng 5% số bệnh nhân bị bệnh Wilson có nồng độ ceruloplasmin huyết tương trong giới hạn bình thường (từ 20mg/dl đến 40 mg/dl). Có khoảng 10% đến 20% trường hợp có nồng độ ceruloplasmin huyết tương giảm đơn độc mà không phải bệnh Wilson. Vì vậy, không nên chỉ dựa vào xét nghiệm này để chẩn đoán và điều trị bệnh.
- Xét nghiệm hóa sinh máu: Tăng ALT và AST khi có tổn thương tế bào gan.
- Protein nước tiểu có thể tăng khi lượng đồng nước tiểu tăng cao vì có tổn thương màng lọc cầu thận.
- Các xét nghiệm công thức máu, định lượng huyết sắc tố, số lượng tiểu cầu có thể trong giới hạn bình thường hoặc giảm, đôi khi kèm theo rối loạn đông máu.
- Xét nghiệm vi thể về gan góp phần quan trọng trong chẩn đoán. Có thể thấy các biến đổi tế bào gan ở nhiều mức độ khác nhau: Viêm gan cấp, viêm gan mạn, xơ gan, hoại tử gan từng đám [31].
- Chụp cắt lớp vi tính sọ não: Phần lớn các bệnh nhân khi đã có các triệu chứng về tâm thần và thần kinh, chụp cắt lớp vi tính sọ não có thể thấy các tổn thương vùng đồi thị, nhân bèo, teo vỏ não, giãn não thất [32].

- Chụp cộng hưởng từ sọ não: Bệnh nhân Wilson trên có thể có tổn thương giảm tín hiệu trên thì T1W, tăng tín hiệu trên thì T2W và Flair ở các vùng đồi thị, nhân bèo, các nhân ở cầu não, hình ảnh giãn não thất, teo vỏ não [33].

## **1.4. Chẩn đoán bệnh**

### **1.4.1. Chẩn đoán xác định**

Dựa theo các tiêu chuẩn của Sternlieb (1978) [23]. Bao gồm: Các triệu chứng thần kinh, nồng độ ceruloplasmin huyết tương < 20mg/dl, xuất hiện vòng Kayser - Fleischer, tiền sử gia đình và dấu hiệu tổn thương gan: Hình ảnh vi thể gan khi nhuộm bằng phương pháp Mallory có sự lắng đọng đồng bắt màu nâu, bào tương bắt màu xanh. Ngoài ra, chụp cắt lớp vi tính sọ não cho thấy giảm tỷ trọng vùng nhân xám trung ương, teo vỏ não, giãn não thất [32] và chụp cộng hưởng từ sọ não thấy hình ảnh tăng tín hiệu trên thì T2W, giảm tín hiệu trên thì T1W ở vùng đồi thị, nhân bèo và các nhân ở cầu não, teo vỏ não, giãn não thất [33].

Đột biến gen chưa đưa vào tiêu chuẩn chẩn đoán thường quy. Tuy nhiên, ngày nay trên thế giới đã phát hiện đột biến gen ở hầu hết các phòng thí nghiệm nghiên cứu bệnh Wilson. Trong tương lai, đột biến gen sẽ được đưa vào tiêu chuẩn chẩn đoán ở nước ta.

### **1.4.2. Chẩn đoán phân biệt**

- Các bệnh di truyền có triệu chứng ngoại tháp.
- Các bệnh tâm thần đã và đang được điều trị bằng các thuốc có thể gây hội chứng ngoại tháp.

- Các bệnh viêm gan do virus hoặc các bệnh lý thoái hóa gan - não mắc phải khác.

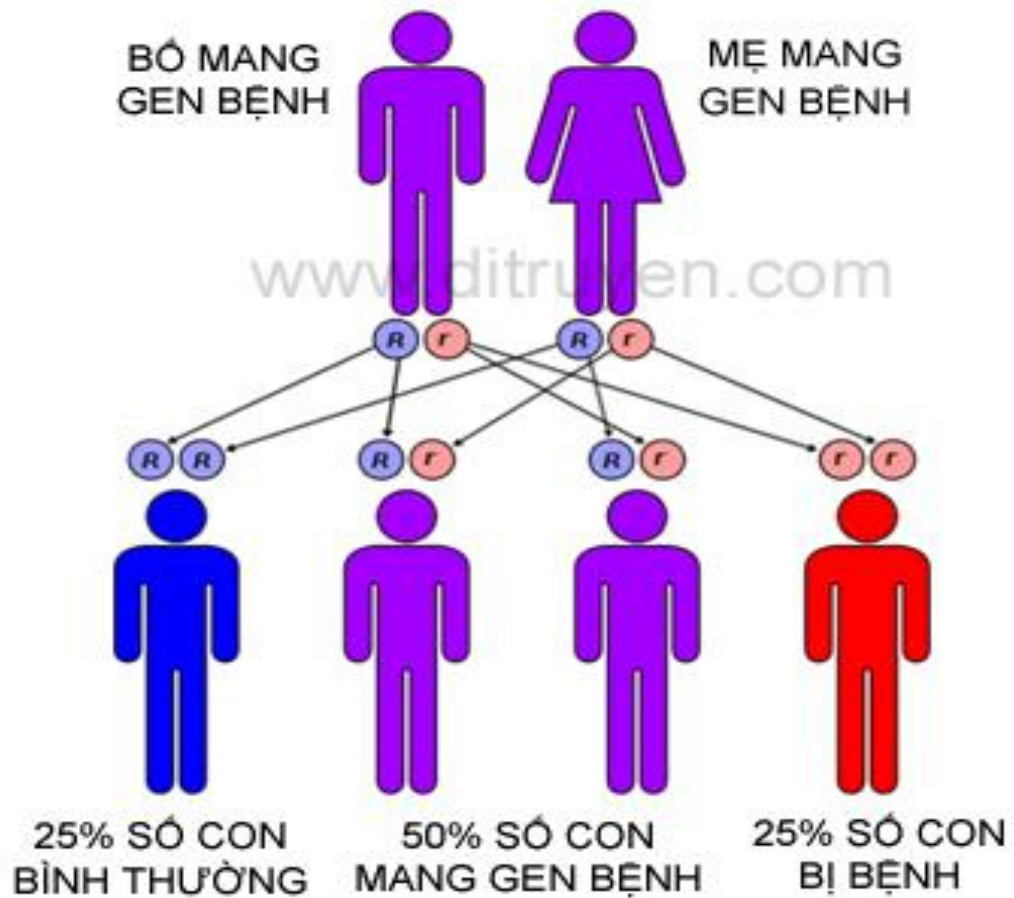
### **1.5. Di truyền học bệnh Wilson**

Bệnh Wilson là di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường. Nghĩa là để có thể biểu hiện ra bệnh, phải được thừa hưởng hai gen *ATP7B* bất thường, một gen từ bố và một gen từ mẹ. Nếu chỉ mang duy nhất một gen bất thường được gọi là người mang gen bệnh. Người mang gen bệnh không phải là người mắc bệnh di truyền vì họ còn có một gen bình thường để kiểm soát hoạt động chức năng của đồng trong cơ thể. Nhưng người mang gen bệnh có thể truyền lại gen bất thường này cho con cháu. Khi hai người cùng mang một gen bất thường, các trường hợp mà con họ sinh ra có thể gặp là:

\* 25% trẻ bị bệnh Wilson vì nhận cả hai gen bất thường từ bố và mẹ

\* 50% trẻ không bị bệnh Wilson nhưng sẽ là người mang gen bệnh vì nhận một gen bất thường từ bố hoặc mẹ và một gen bình thường từ người còn lại.

\* 25% trẻ không bị bệnh Wilson và sẽ không phải là người mang gen bệnh vì nhận cả hai gen bình thường từ bố và mẹ.



*Hình 1.3. Kiểu gen của bố mẹ và tỷ lệ bị bệnh ở thế hệ con*

*(<http://ditruyen.com>)*

### 1.6. Điều trị bệnh Wilson

Đây là bệnh di truyền bẩm sinh, đã xác định được do nhiều dạng đột biến gen gây nên. Tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có biện pháp can thiệp vào gen đột biến mà chủ yếu là điều trị nhằm lập lại cân bằng lượng đồng trong các mô của cơ thể, bao gồm biện pháp làm giảm lượng đồng hấp thu ở ruột và tăng bài tiết đồng qua nước tiểu cùng với một số biện pháp hỗ trợ khác như ghép gan, lọc huyết tương...

### 1.6.1. Chế độ ăn uống

- Hạn chế tối đa lượng đồng đưa vào cơ thể. Không nên ăn một số loại thức ăn có hàm lượng đồng cao như đồ hải sản có vỏ, các loại hạt, gan, sôcôla, sản phẩm từ đậu nành, gelatin, quả khô và nấm.

- Nước uống cần được xét nghiệm phân tích lượng đồng, nếu lượng đồng trong nước cao thì nên dùng nước tinh khiết thay thế [34].

- Không nên uống bia, rượu và các chất kích thích khác vì có thể gây tăng các triệu chứng thần kinh cũng như ảnh hưởng tới chức năng gan.

### 1.6.2. Thuốc điều trị bệnh Wilson

- Có nhiều loại thuốc được sử dụng trong điều trị bệnh Wilson như D-penicillamine, dicaptol, trientine.

- Kẽm acetat hoặc kẽm sulphat, tetrathiomolybdate, thuốc chống oxy hóa,...

- Có thể lựa chọn các loại thuốc sau đây [35],[36],[37],[38].

+ *D-penicillamine (Trolovol) 600-3000mg ngày chia uống nhiều lần trong và ngoài bữa ăn.do thuốc dung nạp kém nên hiện nay trên thế giới đã cho sử dụng một số thuốc khác.*

+ *Amonium tetrathiomolybdat. 60-300mg/ ngày chia uống sáu lần*

+ *Triethylen tetramin dihydrochlorid (Trientine) 25mg x 4 viên/ ngày uống 1h trước ăn hoặc 2h sau ăn.*

+ *Acetat kẽm (hoặc sulphat kẽm) 50mg x 3 lần/ ngày. Có thể kết hợp kẽm với D-penicillamin liều thấp. Điều trị duy trì có thể sử dụng Acetat kẽm là một lựa chọn tối ưu.*



- Ghép gan: Ghép gan có thể làm giảm nồng độ đồng trong huyết tương, dẫn tới sự ổn định nồng độ ceruloplasmin trong máu và làm tăng lượng đồng được đào thải qua nước tiểu. Phương pháp này được thực hiện trong những trường hợp điều trị nội khoa thất bại và xơ gan giai đoạn cuối. Tuy nhiên, việc ghép gan rất khó khăn vì phải có người cho gan phù hợp, tai biến chảy máu trong phẫu thuật do chức năng gan giảm kèm theo rối loạn đông máu và phải điều trị chống thải ghép sau phẫu thuật [4]. Ở Việt Nam, ghép gan đã được thực hiện ở một số bệnh viện trên toàn quốc nhưng ghép gan cho bệnh nhân Wilson vẫn còn trong giai đoạn nghiên cứu.

### **1.7. Phòng bệnh và tiên lượng bệnh Wilson**

- Phát hiện sớm và dự phòng các trường hợp có nguy cơ cao trong gia đình của bệnh nhân Wilson và cả ở những bệnh nhân có tiền sử viêm gan. Ngoài ra các bệnh nhân ở vào giai đoạn sớm rất cần được điều trị dự phòng [13].

- Nếu phát hiện sớm ở giai đoạn chưa biểu hiện hoặc mới xuất hiện triệu chứng lâm sàng, điều trị tích cực, kiên trì, đúng phương pháp có thể ngăn chặn được các biến chứng xảy ra và tiên lượng bệnh sẽ tốt hơn [7].

- Xác định gen đột biến có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong việc chẩn đoán sớm cũng như tư vấn trước hôn nhân. Những người trong dòng họ có quan hệ cùng huyết thống và những người trong gia đình có bệnh nhân bị bệnh Wilson khuyến cáo không nên kết hôn nếu chưa được làm xét nghiệm gen. Các thành viên trong các gia đình nói trên nên được khám sớm, kiểm tra định kỳ, theo dõi và điều trị ngay từ giai đoạn chưa có triệu chứng trên lâm sàng [39].

- Tuổi khởi phát sớm, chẩn đoán muộn, không được điều trị hoặc điều trị khi đã có biến chứng trên lâm sàng tiên lượng thường nặng, điều trị ít hiệu quả.

Bệnh Wilson có tiên lượng rất đáng ngại nếu không được chẩn đoán đúng. Một số trường hợp tuy được điều trị nhưng vẫn có thể tiến triển nặng lên, thậm chí có nguy cơ tử vong [7].

## **1.8. Cơ chế bệnh sinh và các dạng đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson**

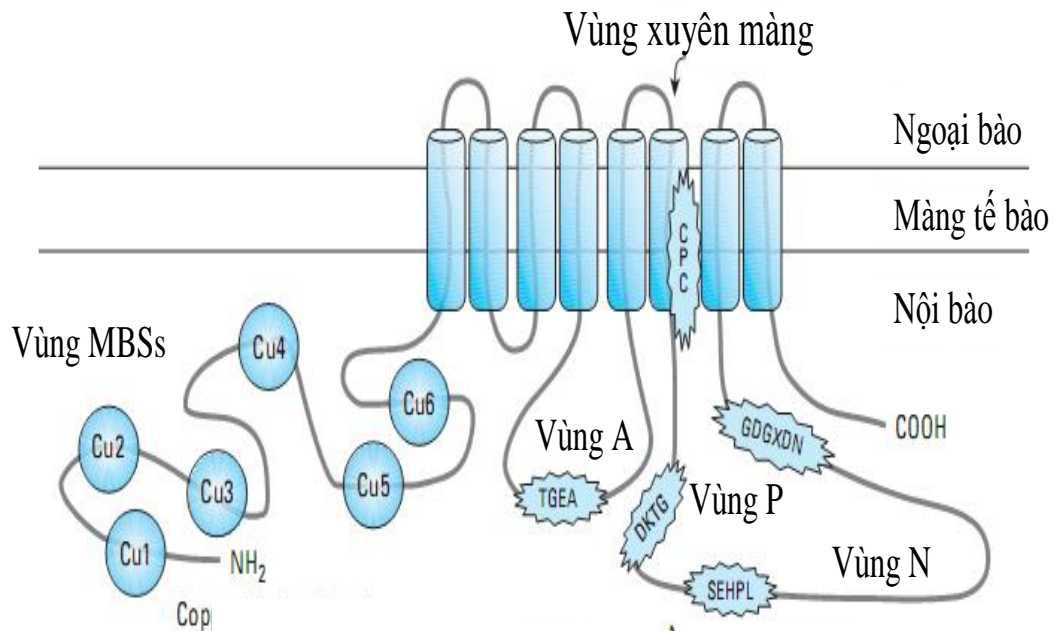
### **1.8.1. Vị trí, cấu trúc của gen ATP7B**

Năm 1985, Frydman và cộng sự đã phát hiện ra gen đột biến của bệnh Wilson nằm trên nhiễm sắc thể 13 [3]. Gen mang bệnh này được khẳng định là ATP7B vào năm 1993 bởi hai nhóm tác giả Bull [40] và Tanzi [29] nghiên cứu độc lập với nhau. Năm 1994, Thomas và cộng sự xác định gen mang bệnh ở vị trí 13q14.3 [41].

Bệnh nhân Wilson có thể mang một gen bệnh của người bố hoặc một gen bệnh của người mẹ hoặc cả hai gen bệnh của người bố và người mẹ. Bố, mẹ của bệnh nhân có thể mang gen đồng hợp lặn hoặc gen dị hợp. Các anh chị em của bệnh nhân có thể mang gen bệnh hoặc không. Những người mang gen bệnh đều có khả năng di truyền cho con cháu [42],[43],[44]. Có một điểm khác biệt so với nhiều bệnh di truyền khác là người mang gen dị hợp cũng biểu hiện bệnh và thường kèm theo dạng đột biến khác.

Cho đến nay cấu trúc gen, cơ chế bệnh học phân tử đã được nghiên cứu đầy đủ và rõ ràng. Gen ATP7B gồm 21 exon, mã hóa 1465 acid amin cấu thành một protein có chức năng vận chuyển đồng trong tế bào và sử

dụng ATP làm năng lượng [45]. Protein ATP7B mang đầy đủ các đặc điểm đặc trưng cho một protein thuộc họ protein P - typ APTase với các vùng chức năng như sau: Vùng xuyên màng, vùng N- đóng vai trò là vị trí bám nucleotid, vùng P- có chức năng phosphoryl hóa, vùng A - có chức năng khử phosphoryl hóa, vùng MBSs với chức năng là vị trí bám cho các nguyên tử đồng - đặc điểm đặc thù của protein thuộc nhóm vận chuyển kim loại trong tế bào [46], [47].



**Hình 1.4. Cấu trúc protein ATP7B [46]**

*Protein ATP7B gồm 4 vùng chính: Vùng xuyên màng có chức năng vận chuyển đồng ra vào tế bào; vùng MBSs có chức năng làm vị trí bám cho 6 nguyên tử đồng; vùng P đóng vai trò phosphoryl hóa các phức hợp protein tham gia việc vận chuyển đồng; vùng N đóng vai trò là vị trí bám cho ATP; vùng A có chức năng khử phosphoryl hóa vùng P.*

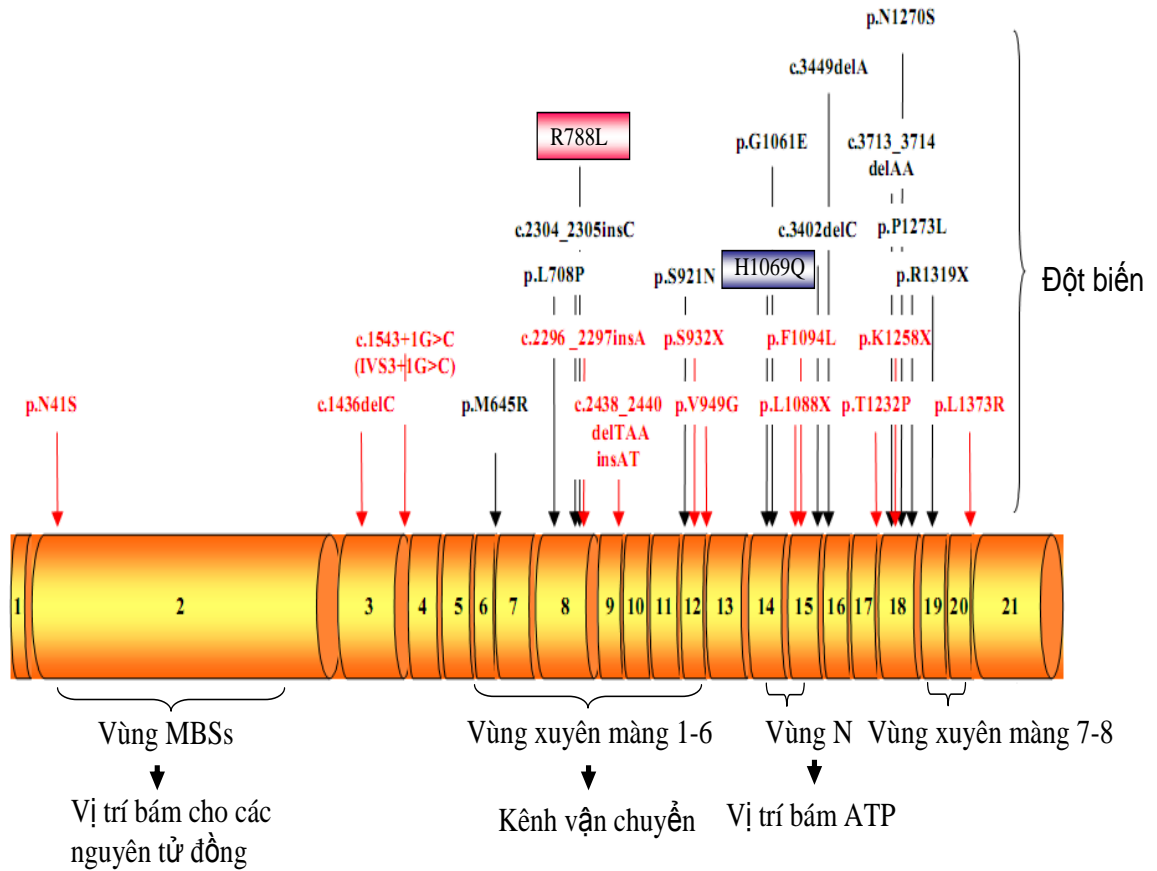
### 1.8.2. Một số đột biến gen ATP7B hay gặp gây bệnh Wilson

Thống kê từ các nghiên cứu của Trung Quốc, Hàn Quốc, Brazil, Tây Ban Nha, Ý trên thế giới cho thấy có ít nhất 300 loại đột biến gây nên bệnh Wilson, bao gồm các đột biến vô nghĩa, sai nghĩa, thêm hoặc bớt nucleotid gây lệch khung dịch mã protein [26],[48],[49],[50],[51]. Trong đó, đột biến thay thế nucleotid chiếm phần lớn các dạng đột biến gây bệnh (>60%) và được phân bố tập trung ở 2 vùng, vùng N và vùng xuyên màng [52]. Một số giả thuyết cho rằng các đột biến nằm trong vùng N làm bất hoạt khả năng bám của protein với ATP thông qua việc giảm ái lực đột ngột với các nucleotid như các đột biến E1064A, H1069Q [53] [54]. Nghiên cứu khác lại chỉ ra rằng đột biến tại vùng N không làm giảm nhiều ái lực với ATP mà thông qua sự thay đổi quá trình cuộn gấp cấu trúc bậc IV của protein ATP7 [55]. Đột biến R1151H, C1104F hoặc thậm chí không làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của vùng N - đột biến C1104A. Điều này cho thấy cơ chế tác động của các đột biến thuộc vùng N lên chức năng của protein ATP7B là rất đa dạng [56]. Các đột biến tại vùng xuyên màng gây ảnh hưởng đến quá trình hoàn thiện cấu trúc không gian protein, làm mất đi khả năng vận chuyển đồng qua màng tế bào như các đột biến M645R, T974M, Q1004P, A1328T [15], [57],[58]. Dạng đột biến phổ biến nhất ở nhóm bệnh nhân Wilson khu vực châu Âu là đột biến H1069Q (C3270A) gây ra sự thay thế Histidin thành Glutamin thuộc vùng N của protein ATP7B [51],[53],[59]. Dạng đột biến hay gặp ở nhóm bệnh nhân khu vực châu Á là đột biến R788L trên exon 8, acid amin Arginin chuyển thành Leucin (CGG → CTG) [60],[61],[62],[63].

Nhiều nghiên cứu của Ấn Độ cho thấy đột biến gen ATP7B trên người Ấn ở khu vực, tây bắc Ấn và miền nam Ấn, nghiên cứu thực hiện trên gia đình bệnh nhân mắc bệnh, và trên bệnh nhân Wilson cho thấy đột biến tìm được nhiều nhất thuộc exon 8, ngoài ra cũng tìm thấy một số các đột biến khác [44],[64],[65],[66],[67].

Trong những năm thập kỷ đầu tiên của thế kỷ 21 nhiều nghiên cứu về đột biến gen gây bệnh Wilson được công bố tại Mỹ, Ý, Pháp, Anh, tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình của bệnh nhân, các đột biến mới được tìm thấy [68],[69],[70],[71]. Số lượng đột biến tìm thấy trên chủng tộc thuộc các quốc gia khác nhau, trong đó có nhiều đột biến mới được tìm thấy, một số đột biến được phát hiện ở trên exon 2 và vùng 5'UTR của gen c.314C>A, C778insC, c.1285+2T>A [19],[72],[73]. Những nghiên cứu của Trung Quốc và Hàn Quốc cho thấy tiếp tục có những đột biến trên bệnh nhân của các nước này công bố của Fan Y cho biết có ba trường hợp đột biến thêm nucleotid và mất nucleotid Q1351stop, L1305P [74].

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, chuẩn mực trong việc chẩn đoán phát hiện các đột biến gen ATP7B.



**Hình 1.5. Cấu trúc gen ATP7B và một số dạng đột biến hay gặp[46]**

Bằng việc sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen ATP7B, các nhóm nghiên cứu của Tanzi, Caca, Ferenci đã phát hiện ra dạng đột biến **H1069Q** (exon 14) phổ biến nhất trên bệnh nhân Wilson ở các nước Trung, bắc và Đông Âu. Khoảng 50-80% bệnh nhân Wilson ở các nước này có ít nhất một alen mang đột biến H1069Q. Một số các đột biến khác như 2299insC, G710S (exon 8); 3400 delC (exon 15) và R969Q (exon 13) chiếm tỷ lệ khoảng 10% [41]. Nghiên cứu của Loudianos và cộng sự [59],[75] cho thấy đột biến mất 15 bp (-441/-427 del) nằm trong vùng promoter gen ATP7B là dạng đột biến đặc trưng cho nhóm bệnh nhân Wilson ở quốc đảo Sardinia thuộc vùng Địa Trung Hải. Một nghiên cứu khác của Oru S và cộng sự cho thấy đột biến mất 24 bp

và Ala1278Val trong gia đình bệnh nhân Wilson cũng là một đột biến của quốc đảo này [76].

Bằng việc sử dụng kỹ thuật PCR kết hợp với dHPLC trước khi giải trình tự gen, Curtist và cộng sự năm 1999 đã cho thấy các đột biến ở exon 8, 14 và 18 chiếm đến 60% tỷ lệ các alen đột biến ở bệnh nhân Wilson nước Anh [51]. Ở các quốc gia có sự đa dạng sắc tộc như Hoa Kỳ, Canada (khu vực Bắc Mỹ) việc thiết lập các dữ liệu về đột biến gen đặc trưng gặp nhiều khó khăn, Shah và cộng sự năm 1997 đã tiến hành nghiên cứu trên nhóm 118 bệnh nhân Wilson Hoa Kỳ có gốc là người Cáp-ca (Bắc Âu) cũng cho thấy đột biến phổ biến nhất là đột biến H1069Q, tỷ lệ alen mang đột biến là 35,2% [28], [31]. Tại Brazil và Chi Lê đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất là đột biến 3400delC [50]. Cho đến nay dữ liệu về tỷ lệ đột biến gen ATP7B ở các nước châu Á hầu hết mới chỉ có ở 3 quốc gia là Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc [77],[78],[79],[80]. Năm 1995, Kim và cộng sự tìm thấy 3 dạng đột biến gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson người Hàn Quốc, trong đó đột biến hay gặp nhất là R778L trên exon 8, acid amin Arginine chuyển thành Leucin (CGG → CTG), ở vị trí codon 2333 [81]. Đột biến này chiếm tỷ lệ cao nhất ở Nhật Bản (35%) và Đài Loan (43,1%) [82]. Trong số 29 bệnh nhân Đài Loan được Lee Wan và cộng sự nghiên cứu bằng phương pháp PCR, sau đó xử lý sản phẩm PCR với enzym cắt giới hạn, giải trình tự gen đã phát hiện thấy 21 bệnh nhân mang đột biến R778L dạng dị hợp và 2 bệnh nhân mang đột biến dạng đồng hợp. Khi nghiên cứu 75 bệnh nhân Wilson người Trung Quốc, Liu và cộng sự đã phát hiện 49 trường hợp đột biến R778L, trong đó có 16 đồng hợp lặn và 33 trường hợp dị hợp [42],[48].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu phát hiện đột biến gen trên một số bệnh lý di truyền cũng đã bắt đầu được triển khai và thu được một số kết quả khá tốt như bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, thoái hóa cơ tủy [83],[84],[85]. Tuy nhiên các nghiên cứu về gen gây bệnh và phát hiện đột biến gen gây bệnh Wilson vẫn chưa có nghiên cứu nào toàn diện, những nghiên cứu trước đây tập trung chủ yếu về đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng [6], [7],[9],[18]. Năm 2011 Tạ Thành Văn và cộng sự đã xây dựng thành công qui trình phát hiện đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson ở Việt Nam [86]

### **1.8.3. Cơ chế bệnh sinh bệnh Wilson.**

Về mặt bệnh học phân tử, nguyên nhân gây bệnh Wilson là do thiếu hụt enzyme ATPase typ P (P-ATPase), được mã hóa bởi gen ATP7B trên NST 13q14.3. Enzym P-ATPase đóng vai trò vận chuyển đồng qua màng tế bào. Sự thiếu hụt hoặc giảm chức năng của enzym dẫn đến giảm sự bài tiết đồng từ tế bào gan vào mật và gây ứ đọng đồng tại gan. Khi lượng đồng trong gan tăng quá mức, đồng sẽ theo hệ thống tuần hoàn tới các cơ quan như: Não, mắt, thận...và gây ra các tổn thương cho các cơ quan này [3],[29],[40],[41].

## **1.9. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen ATP7B**

### **1.9.1. Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)**

#### *Nguyên tắc chung*

Dựa vào hoạt tính của các DNA polymerase xúc tác sự tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch DNA khuôn, với nguyên liệu là bốn loại nucleotid. Phản ứng này đòi hỏi sự có mặt của những mồi xuôi và mồi ngược có trình tự bổ sung với hai đầu của trình tự DNA khuôn.



Phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba bước: Biến tính, bắt cặp, kéo dài chuỗi.

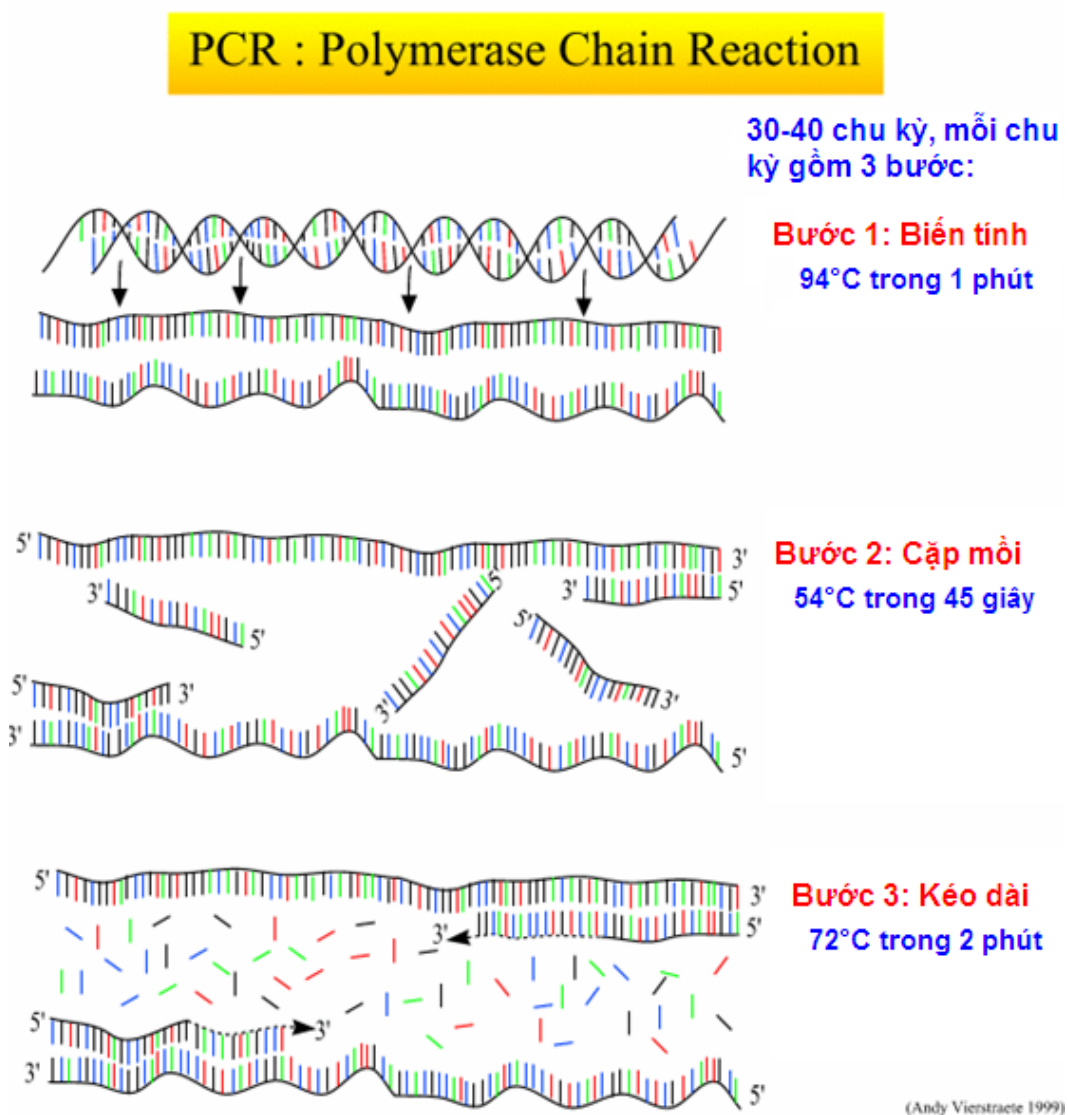
- *Bước 1*: Là giai đoạn biến tính (denaturation). Trong một dung dịch phản ứng bao gồm các thành phần cần thiết cho sự sao chép, phân tử DNA được biến tính ở nhiệt độ cao hơn  $T_m$  (nhiệt độ nóng chảy) của phân tử, thường là  $94^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$  trong vòng 30 giây - 1 phút.

- *Bước 2*: Là giai đoạn bắt cặp (annealing). Nhiệt độ được hạ thấp cho phép các mồi bắt cặp với khuôn, dao động trong khoảng  $40^{\circ}\text{C} - 70^{\circ}\text{C}$ , tùy thuộc  $T_m$  của các mồi sử dụng và kéo dài từ 30 giây - 1 phút.

- *Bước 3*: Là giai đoạn tổng hợp hay kéo dài (extension). Nhiệt độ được tăng lên  $72^{\circ}\text{C}$  để cho DNA polymerase là các polymerase chịu nhiệt (*Taq* polymerase, *Tth* polymerase, *Pfu* polymerase,...) hoạt động tổng hợp tốt nhất. Thời gian phụ thuộc vào độ dài của trình tự DNA cần khuếch đại, thường kéo dài từ 30 giây đến nhiều phút.

Sau mỗi chu kỳ các chuỗi đôi DNA mới tạo thành sẽ tiếp tục được dùng để làm các DNA nền để tổng hợp các DNA mới trong chu kỳ tiếp theo. Sản phẩm cuối của phản ứng PCR là những đoạn DNA chuỗi đôi có chiều dài là khoảng cách giữa hai đoạn gen mồi, và hai đầu tận cùng của sản phẩm được xác định bởi đầu tận cùng 5' của hai đoạn gen mồi.

Số lượng chu kỳ trong PCR thường không vượt quá 40. Sau mỗi chu kỳ, số sợi DNA tăng gấp đôi. Như vậy, sau  $n$  chu kỳ số lượng sợi DNA là  $2^n$ . Nhờ vậy, số lượng DNA sẽ có đủ để có thể tách ra khi điện di và phát hiện được sau khi nhuộm, có thể tách dòng hoặc giải trình tự gen.



**Hình 1.6. Các bước cơ bản của kỹ thuật PCR**

(nguồn: Andy Vierstraete, 1999)

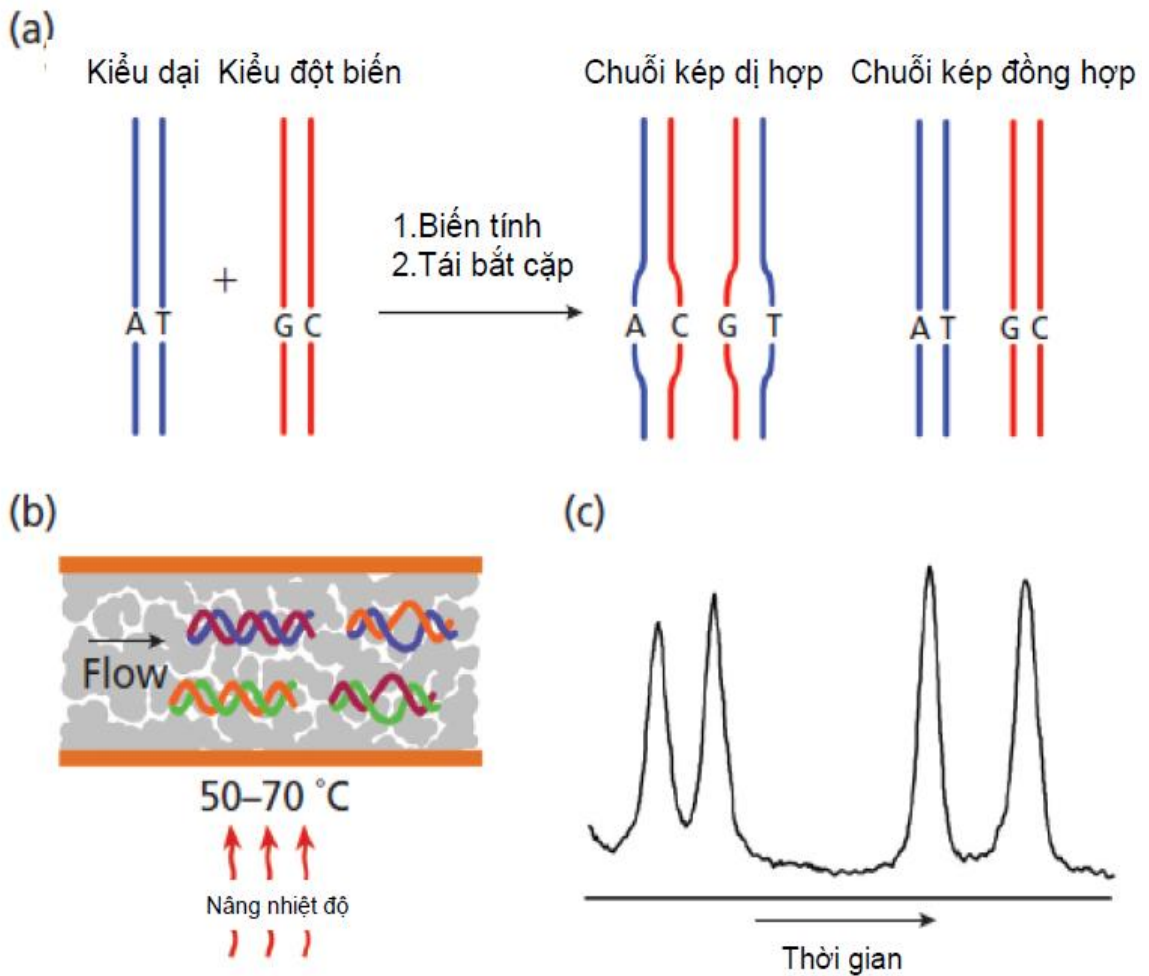
### 1.9.2. Kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp biến tính

Sắc ký lỏng cao áp biến tính một phần (partially denaturing high-performance liquid chromatography - pDHPLC). Sắc ký lỏng cao áp biến tính một phần (pDHPLC) được xem là một phương pháp tối ưu để phát hiện các biến thể đa dạng của bộ gen. Kỹ thuật này phân biệt được alen kiểu dại và

alen đột biến nhờ vào đặc tính sắc ký tại nhiệt độ gây biến tính một phần và pH của chúng. Các nghiên cứu so sánh trước đây cho thấy pDHPLC là một trong những kỹ thuật tầm soát trên DNA nhạy nhất, có thể phát hiện ra những alen đột biến trong hỗn hợp với alen kiểu dại ở tỷ lệ 1:100. Nếu thực hiện trên một số lượng mẫu lớn, pDHPLC giúp tiết kiệm chi phí và thời gian hơn nhiều so với kỹ thuật giải trình tự. Không những vậy, các thiết bị pDHPLC hiện tại còn giúp điều chỉnh chính xác quá trình kiểm soát nhiệt độ, bơm mẫu, tiến hành sắc ký và phân tích kết quả tự động.

Nguyên lý phát hiện đột biến gen của kỹ thuật pDHPLC như sau:

(a) Trước khi tiến hành sắc ký, đoạn gen đích (200-1000 bp) sẽ được khuếch đại nhờ PCR. Sau đó, sản phẩm khuếch đại sẽ được cho biến tính ở 95°C trong 3 phút, rồi chúng sẽ tái bắt cặp khi nhiệt độ được hạ dần, từ 95°C xuống 60°C trong vòng 30 phút. Nếu mẫu bệnh phẩm chứa một số tế bào mang đột biến gen, DNA bộ gen ban đầu sẽ chứa 2 cặp alen khác nhau ở vị trí đột biến. Do đó, khi tái bắt cặp, ngoài hai loại chuỗi kép đồng hợp ban đầu sẽ xuất hiện thêm hai loại chuỗi kép dị hợp do sự tái tổ hợp của các alen khác nhau.



**Hình 1.7. Nguyên tắc kỹ thuật pDHPLC**

(b) Phụ thuộc vào nồng độ GC trong đoạn DNA sợi đôi đích ban đầu mà một chương trình phù hợp sẽ được cài đặt để nâng nhiệt độ lên từ từ (thường từ 50-70°C) để làm tăng hiệu suất biến tính một phần. Những chuỗi kép dị hợp mới hình thành kém bền với nhiệt sẽ biến tính với tỷ lệ tăng dần (nhưng vẫn chỉ biến tính một phần), sau đó sẽ giảm thời gian lưu giữ trong pha tĩnh (của chất nền phân ly sắc ký). (c) Phụ thuộc vào một vài yếu tố như kích thước của đoạn gen đích ban đầu, cột nhiệt độ cài đặt, ảnh hưởng của các base lân cận đến những cặp base bắt cặp đúng hoặc bắt cặp sai mà cả bốn alen khác nhau sẽ tách ra hoàn toàn hoặc một phần. Từ đó, sẽ xuất hiện những đỉnh tín hiệu khác nhau tương ứng trên sắc ký đồ.

Nhờ khả năng của pDHPLC giúp phát hiện một khoảng rộng các trình tự đột biến với độ nhạy cao và ngưỡng phát hiện alen đột biến thấp trong một quy trình đã chuẩn hóa và ít tốn kém, các nhà nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật này để tầm soát các đột biến gen.

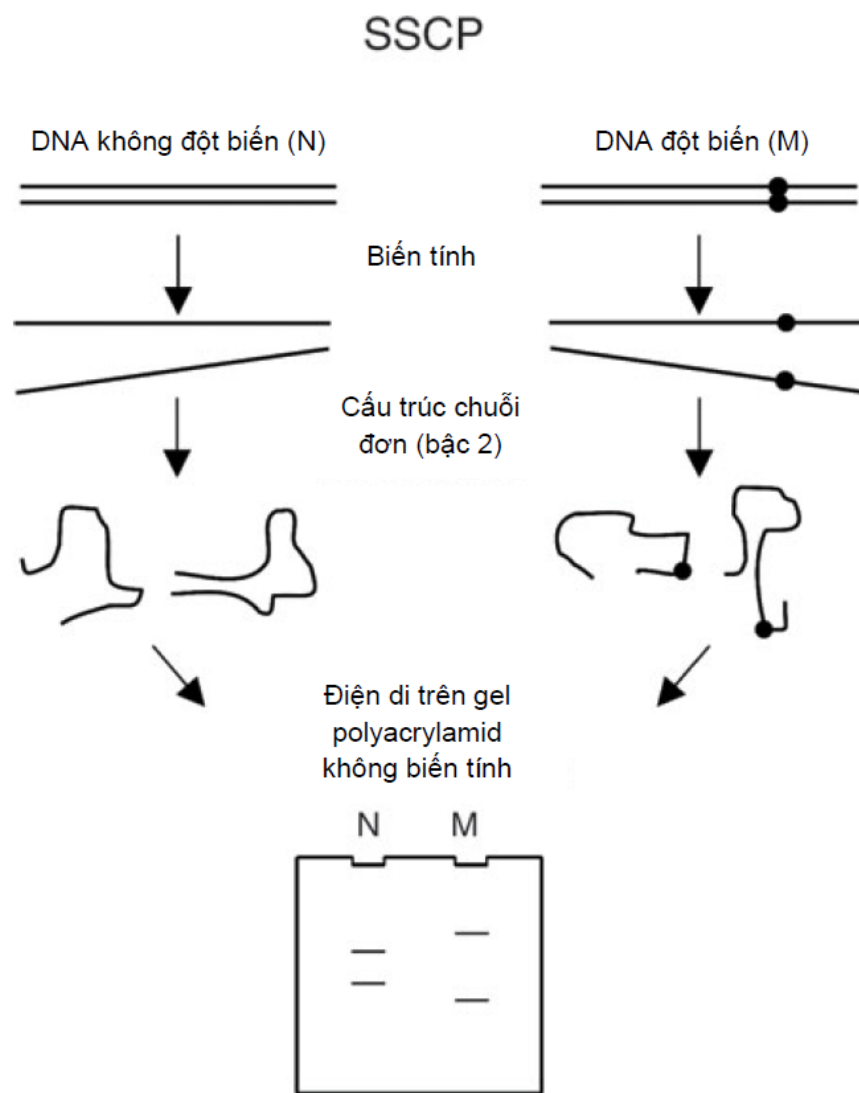
Kỹ thuật này áp dụng phát hiện các đột biến trên các exon của gen. Sau khi được điện di trên gel agarose để khẳng định chính xác kích thước đoạn DNA mong muốn, sản phẩm PCR mỗi exon sẽ được cho biến tính ở 95°C trong 4 phút rồi làm lạnh xuống 25°C với tốc độ 1,2°C/phút để tạo thành các chuỗi kép dị hợp. Sau đó, các sản phẩm này sẽ lần lượt được đưa vào máy sắc ký để thực hiện phân tích pDHPLC. Các mẫu đột biến được trình bày cùng với alen kiểu dại và mẫu nước (chứng âm) để đối chứng.

### **1.9.3. Phân tích cấu trúc đa hình thái chuỗi đơn: (Single - Strand Conformation Polymorphism analysis - SSCP)**

*\* Nguyên tắc chung: Kỹ thuật SSCP gồm 2 giai đoạn*

- Giai đoạn 1: Đoạn DNA đích được khuếch đại nhờ phản ứng PCR
- Giai đoạn 2: Sản phẩm PCR được biến tính và phân đoạn nhờ điện di trên gel Polyacrylamid ở điều kiện không biến tính. Sau khi bị biến tính bởi nhiệt độ khả năng di chuyển của các phân đoạn DNA khi điện di trên gel polyacrylamid phụ thuộc vào cấu trúc bậc 2 nội phân tử của chuỗi đơn (tạo ra do sự cặp đôi của các base). Như vậy, so với sợi đôi DNA đối chứng khi điện di trên gel polyacrylamid, sẽ có hai vạch tương ứng với mỗi sợi đơn của phân tử DNA ban đầu. Nếu các sợi DNA đích chỉ khác với DNA đối chứng 1 đôi base thì các sợi đơn DNA này sẽ có cấu trúc khác nên có thể phân biệt nhờ gel polyacrylamid ở trạng thái không biến tính. Sự khác biệt này được xác định trên cơ sở khác biệt về tốc độ di chuyển giữa sợi DNA đích (có đột biến điểm) với sợi DNA đối chứng. Thông thường người ta kết hợp sử dụng

nucleotide được gắn  $\alpha^{32}\text{P}$  trong phản ứng PCR ở giai đoạn đầu để đánh dấu các đoạn gen đích đã được khuếch đại này. Gel polyacrylamid sau đó được chụp hình phóng xạ hoặc máy xạ hình phosphor. Phương pháp kết hợp này được gọi là PCR-SSCP. Ưu điểm của phương pháp này là chỉ cần một lượng nhỏ DNA khuôn (5-10ng) so với kỹ thuật SSCP truyền thống (5-10  $\mu\text{g}$ ). Một phương pháp khác sử dụng các chất nhuộm như SYBR green II. Thuốc nhuộm này có độ nhạy cao hơn ethidium bromide, được sử dụng phổ biến trong kỹ thuật phân tích SSCP không sử dụng chất phóng xạ.



**Hình 1.8. Quy trình kỹ thuật SSCP.**

Sản phẩm PCR sau khi biến tính sẽ ở dạng chuỗi đơn, được điện di trên gel polyacrylamid trong điều kiện không biến tính. Kết quả sẽ có 2 vạch tương ứng với mỗi sợi đơn của phân tử DNA ban đầu.

Tác giả Marchetti và các cộng sự đã thiết kế một kỹ thuật SSCP. Trong đó các exon 18, 19 và 21 của gen EGFR được khuếch đại nhờ PCR. Sản phẩm PCR của mỗi exon sẽ được pha loãng 1:5 trong dung dịch đệm (95% formamid, 2 mmol/L EDTA, pH 8.3). Sau đó, các mẫu này sẽ được cho biến tính trong 5 phút ở 90°C, ngay lập tức làm lạnh trên đá và chuyển vào hệ thống gel polyarylamid không biến tính. Nồng độ acrylamid là 10% khi sử dụng để phát hiện đột biến trên exon 19 và 12% cho exon 18 và 21. Trên gel, các mẫu DNA mô ung thư được đặt cạnh bên mẫu DNA mô phổi lành của cùng bệnh nhân. Điện di ở 20°C, cường độ dòng điện 3W trong 14 giờ. Khi kết thúc điện di, gel sẽ được đem nhuộm bạc (silver staining) để phát hiện các vạch sản phẩm [85]. Trong nghiên cứu trên, Các tác giả đã kết luận kỹ thuật SSCP thiết kế có độ nhạy tốt hơn kỹ thuật giải trình tự DNA trực tiếp: SSCP phát hiện được 39 trường hợp đột biến trong khi kỹ thuật giải trình tự chỉ phát hiện 31. Kỹ thuật PCR - SSCP Có khả năng phát hiện ra đột biến trong mẫu bệnh phẩm chỉ có 10% DNA đột biến, trong khi kỹ thuật giải trình tự cần đến khoảng 30% DNA đột biến trong mẫu bệnh phẩm thì mới phát hiện ra đột biến. Mặt khác không có kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả nào khi thực hiện bằng SSCP (các tác giả đã xác định bằng cách mỗi mẫu đều làm SSCP 2 lần và giải trình tự để đối chứng). Những ưu điểm trên cùng với thuận lợi có thể tiến hành bằng mẫu mô cố định trong formalin, mô đúc paraffin hoặc mô sinh thiết khối lượng ít (< 1µg DNA), đã giúp các tác giả tự tin khẳng định kỹ thuật PCR-SSCP là một kỹ thuật tin cậy và cho kết quả nhanh chóng, giúp tầm soát các đột biến gen.

#### **1.9.4. Sử dụng enzym cắt giới hạn**

Phân tích sản phẩm PCR bằng cách sử dụng enzym cắt giới hạn là kỹ thuật không phổ biến. Tuy nhiên, kỹ thuật này có thể đem lại ưu điểm như: Hiệu quả cao, cho kết quả rõ ràng, nhanh và đơn giản. Quy trình kỹ thuật bao gồm: Dung dịch sản phẩm PCR, dung dịch đệm cho enzym giới hạn 10x; enzym cắt giới hạn, thiết bị ủ và dụng cụ kèm hóa chất để điện di và chụp ảnh. Song điều quan trọng là phải có vị trí cắt của enzym trong đoạn DNA đích.

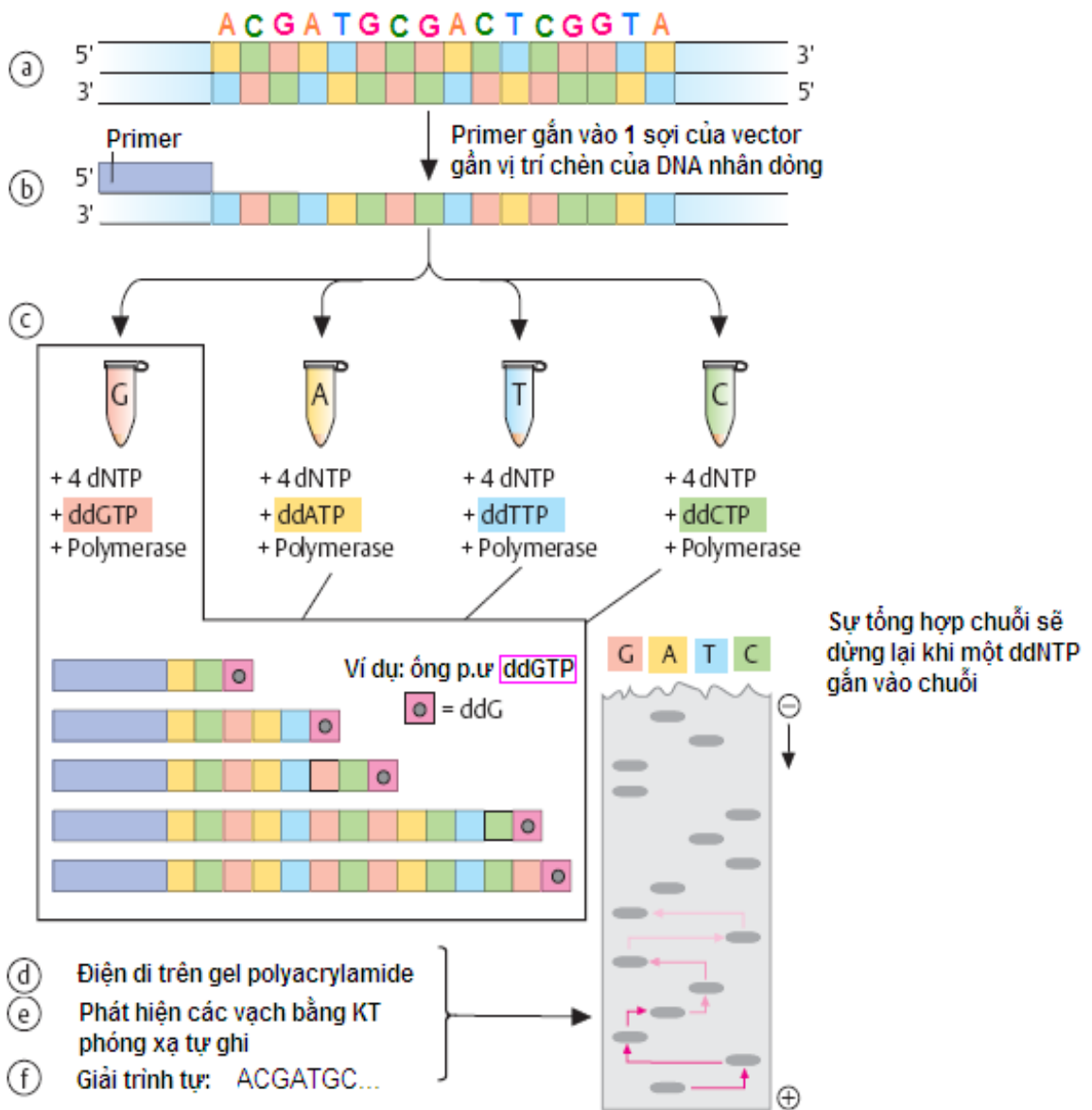
Một điều nữa là không phải tất cả các enzym giới hạn đều hoạt động tốt ở điều kiện của sản phẩm PCR với nhiều thành phần khác nhau như: Đệm, ion, nucleotid, môi, DNA khuôn... Do vậy thường phải có bước tinh sạch sản phẩm trước khi tiến hành phản ứng enzym cắt. Kỹ thuật phân tích bằng enzym cắt là công cụ hữu hiệu trong trường hợp cần xác định sự có mặt của đột biến tạo ra trong phản ứng PCR, mà đột biến này cấu thành vị trí cắt của enzym là sợi DNA khuôn ban đầu không có. Kỹ thuật này có thể được phối hợp với các kỹ thuật khác như lai Southern blot hay PCR lồng.

#### **1.9.5. Kỹ thuật giải trình tự gen (DNA sequencing)**

Giải trình tự gen là phương pháp xác định vị trí sắp xếp của các nucleotid trong phân tử 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 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 dideoxynucleotid được đánh dấu bằng các chất phát huỳnh quang đặc hiệu khác nhau.



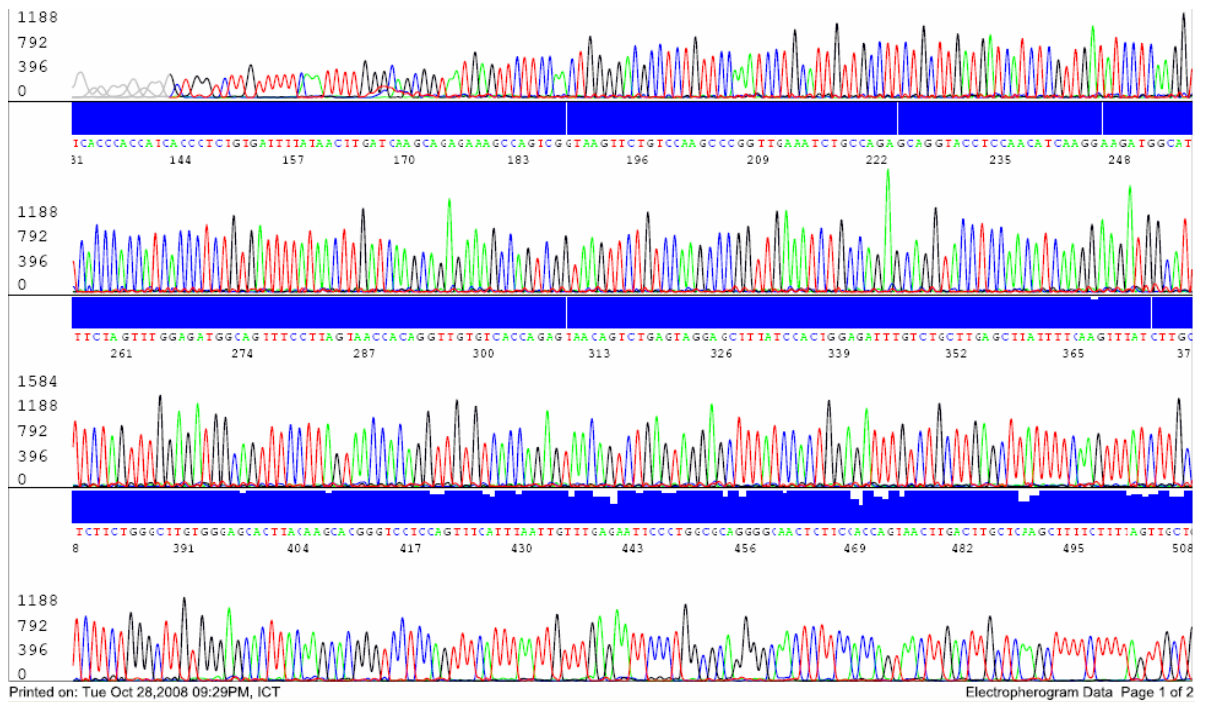
**Hình 1.9: Quy trình giải trình tự gen theo phương pháp ddNTP [51].**

Kết quả là hỗn hợp các sợi DNA tổng hợp từ sợi khuôn được phân tách bằng điện di trên thạch 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.

Máy giải trình tự gen tự động hoàn toàn dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP, hệ thống điện di thường là điện di mao quản. Mỗi khi có một vạch điện di đi qua, phân tử ddNTP cuối cùng ở đầu 3' của đoạn DNA sẽ phát ra một màu huỳnh quang tương ứng, máy sẽ ghi nhận màu sắc này và chuyển về máy tính phân tích. Dựa vào màu huỳnh quang mà máy nhận biết được từng loại nucleotid và trình tự của DNA đích.

Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự gen trên Genbank (National Center for Biotechnology Information - NCBI).

Kỹ thuật giải trình tự của DNA đích đã được ứng dụng trong nhiều nghiên cứu để xác định các đột biến mất nucleotid, thay thế nucleotid, thêm nucleotid trên gen. Do phần lớn các đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson là đột biến điểm nên phương pháp giải trình tự gen ATP7B vẫn được coi là một tiêu chuẩn vàng để phát hiện các đột biến của gen gây bệnh.



**Hình 1.10: Hình ảnh giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động**

(Nguồn Trung tâm Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội).

## Chương 2

# ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lựa chọn 61 bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc bệnh Wilson tại Bệnh viện Bạch Mai và Bệnh viện Nhi Trung ương.

- Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân Wilson: Dựa theo tiêu chuẩn của Sternlieb (1978), bao gồm:

- + Có các dấu hiệu của tổn thương gan
- + Có các triệu chứng thần kinh
- + Định lượng ceruloplasmin huyết thanh giảm dưới 20mg/dl
- + Có vòng Kayser - Fleischer
- + Tiền sử gia đình

- Tiêu chuẩn loại trừ:

+ Bệnh nhân không tự nguyện tham gia, bệnh nhân mắc các bệnh di truyền khác.

### 2.2. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất nghiên cứu

#### 2.2.1. Hóa 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

**2.2.2. Trang thiết bị máy móc**

- Pipet và đầu côn các loại 1000 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 10 $\mu$ l
- Ống Eppendoff
- Ống nghiệm pha hóa chất
- Cốc thủy tinh
- Ống đong, bình nón
- khay đổ gel
- Cân điện tử
- Tủ sấy
- Lò vi sóng
- Máy Voltex
- Máy ly tâm lạnh, máy ly tâm thường
- Máy lắc nhiệt

- Máy điện di
- Máy chụp ảnh gel
- Máy đọc huỳnh quang
- Máy đo OD
- Máy PCR
- Máy giải trình tự gen tự động

### **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.3.1. Kỹ thuật tách chiết DNA từ máu ngoại vi**

Các mẫu DNA được tách chiết từ máu ngoại vi theo phương pháp Phenol/chloroform

Nguyên tắc cơ bản bao gồm các bước: Loại hồng cầu và phá vỡ màng tế bào → Phá vỡ màng nhân → Loại protein → Tủa DNA → Rửa tủa → Hòa tan DNA

Quy trình cụ thể:

- 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 µL SDS 10%; 10 µL 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 µL 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.

### *Phương pháp quang phổ*

- *Nguyên lý đo mật độ quang học*

- Acid nucleic có phổ hấp phụ cực đại ở bước sóng 260 nm là do sự có mặt của base purin và base pyrimidin. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm ( $OD_{260nm}$ ) của các mẫu cho phép xác định nồng độ acid nucleic có trong mẫu nghiên cứu.



- Protein hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 280nm do sự hấp thụ của các acid amin nhân thơm và dị vòng, bao gồm: tyrosin, tryptophan và phenylalanin.

- Dựa vào tỷ lệ  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  để kiểm tra độ tinh sạch của DNA. Nếu  $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1,8 \div 2$  thì DNA được coi là tinh sạch.

### 2.3.2. Kỹ thuật PCR khuếch đại 21 exon của gen ATP7B

Sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại toàn bộ 21 exon của gen ATP7B. Các cặp mồi được trình bày ở bảng 2.1

**Bảng 2.1. Các trình tự mồi dùng để khuếch đại 21 exon của gen ATP7B**

STT	Trình tự mồi		Exon	Kích thước SP PCR (bp)
1	F	CCC AAC TTT GAA TCA TCC GT	Exon 1	240
	R	R. AAC GCG GGG ACG AAA ATC CT		
2	F	AGA ACC TCG GAT GTT GTA GAA	Exon 2	385
	R	AAT GGA GCT GAC ACA GGA CTG		
3	F	GCC CTG AA CCT CCT GTT CTG	Exon 3	258
	R	CTA CTG ATA AAC ACA GTT GCT		
4	F	CTT TGT TCG GTT ATA TTG ACT G	Exon 4	164
	R	CCG TAA CGC ACC CAC AGT A		
5	F	AGA CTC CCT GGA CTG GCT TT	Exon 5	400
	R	TTC CAT GGG AAA AGT TGA AGA		
6	F	GCT TTC TGC CAA TGC ATA TTTT	Exon 6	178
	R	AGA GTT GGG CCC AGG TAG AG		
7	F	AGG GGA GTG GCT TGT AAT CC	Exon 7	176
	R	CTT AGC GGG CAG AAT ATC TGA		
8	F	CGC TCA TTC AAC TCT CCT CC	Exon 8	520
	R	AAC ATG GTG TTC AGA GGA AGT		

9	F	CAG CTG TCT CTA ACA CCA CGC	Exon 9	193
	R	ATA CAA CAT GGG CAT CTG AT		
10	F	CTA TTG TAA CAG CTG GCC TAG	Exon 10	229
	R	CTG TCA CTT GCT CAG CCCC		
11	F	GCT GTC AGG TCA CAT GAG TGC	Exon 11	156
	R	CTG ATT TCC CAG AAC TCT TCA		
12	F	TTC TTC ATA GGT TGT AAT TTCC	Exon 12	236
	R	GGA TCA ATG TCA GTA GAT TAT		
13	F	CCC TGA AAT GTC CTT ATG TGA	Exon 13	196
	R	CTC TCA GGC TTT TCT CTC AAT		
14	F	CAG CTA GGA GAG AAG GAC ATG	Exon 14	184
	R	AGT TCT GCC TCA GGA GTG TGA		
15	F	TCT TGG CTT ACA GTT TCC TCTT	Exon 15	170
	R	TCT GTG GTT TGA CCC ACC TC		
16	F	GAC TCT TTT GCC TGA TAT CTG	Exon 16	245
	R	TGC TGT TAA AAG GAT TGC ATG		
17	F	CAT TGC AAG TGT GGT ATC TTG	Exon 17	244
	R	TAC AGC TCA GTG CTG GGCC		
18	F	CAA GGG TAA CTT GAG GTT TCT	Exon 18	205
	R	TCA TTC TGA TGG AGA GGA GCA		
19	F	TGG GCA GAC CCC TTC CTC AC	Exon 19	219
	R	AAG CCT TTC TGG GCG CAG CT		
20	F	CTA GGT GTG AGT GCG AGTT	Exon 20	204
	R	CAG CAT TTG TCC CAG GT		
21	F	AAT GGC TCA GAT GCT GTT	Exon 21	221
	R	GCT TGT GGT GAG		

*Thành phần phản ứng PCR*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (<math>\mu</math>l)</b>
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/ $\mu$ l)	0,1
DNA	3,0
<b>Tổng</b>	<b>20,0</b>

*Chu trình nhiệt phản ứng PCR như sau*

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	94°C - 5 phút		
2 – 34	94°C - 30 giây	55°C - 30 giây	72°C - 30 giây
35			72°C - 5 phút
Bảo quản ở 10°C			

Kiểm tra đột biến trên gel agarose 1,5%. Khuếch đại lại đoạn DNA đó với PCR ống chứng âm để loại trừ khả năng nhiễm và chứng dương để so sánh.

### **2.3.3. Giải trình tự gen**

Sản phẩm PCR sẽ được tinh sạch và giải trình tự gen trực tiếp để xác định đột biến trên gen ATP7B.

#### **2.3.3.1. 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 µl 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.

#### **2.3.3.2. 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 PCR

- Chuẩn bị effendorf 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 PCR	13,0
Mồi 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 mồi xuôi và mồi ngược

### + Giai đoạn 2: 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			

- 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)

#### 2.3.4. Phương pháp phân tích kết quả

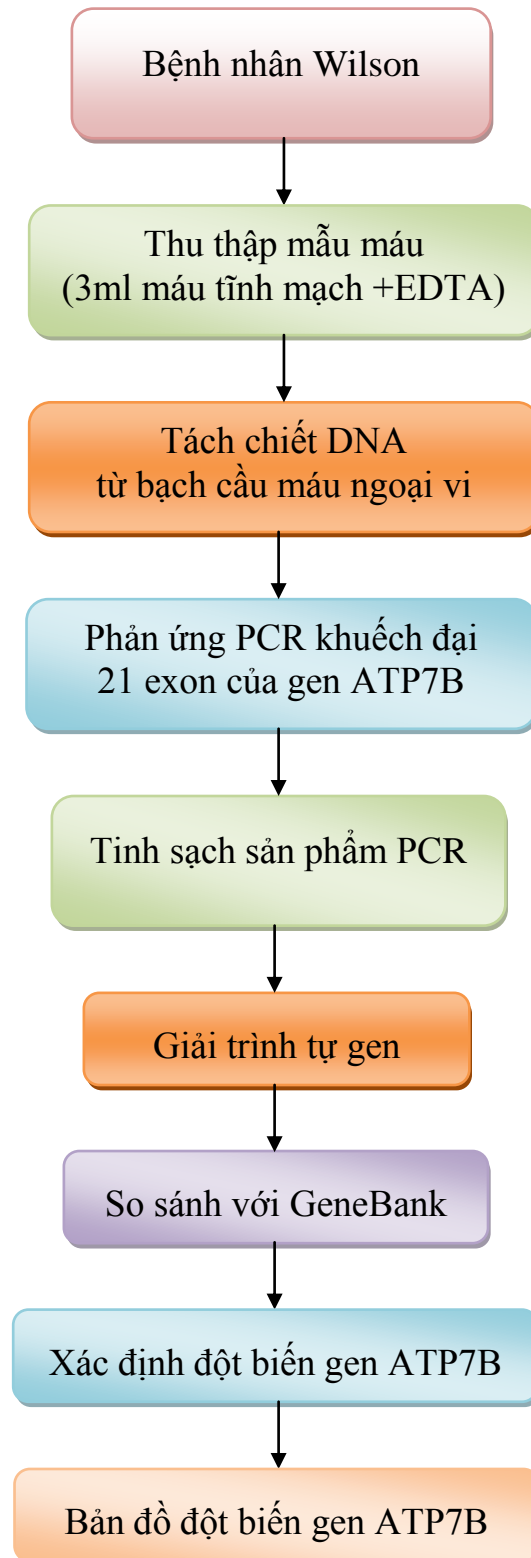
So sánh kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân với trình tự GeneBank của gen ATP7B (National Center for Biotechnology Information, NCBI) NG\_011403 bằng phần mềm CLC.

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.

#### **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.

## 2.5. Quy trình nghiên cứu



**Quy trình xác định đột biến gen ATP7B**



### Chương 3

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Phát hiện đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson

#### 3.1.1. Kết quả tách chiết DNA

DNA của bệnh nhân được tách chiết theo quy trình phenol/chloroform. Sau khi tách chiết, các mẫu DNA được kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nanodrop.

**Bảng 3.1. Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA**

MS	DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )	MS	DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )	MS	DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )
W1	139	1,7	W17	146	1,7	W33	148	2,0
W2	131	1,8	W18	122	1,9	W34	127	1,9
W3	169	1,7	W19	127	1,9	W35	116	2,0
W4	158	1,7	W20	197	1,9	W36	115	1,9
W5	159	1,7	W21	1113	1,8	W37	119	2,0
W6	325	1,7	W22	1511	1,8	W38	113	2,0
W7	412	1,9	W23	134	1,8	W39	115	1,9
W8	812	1,9	W24	139	1,8	W40	110	1,9
W9	146	1,9	W25	132	1,8	W41	82	2,0
W10	153	1,8	W26	174	1,7	W42	383	2,0
W11	173	1,8	W27	131	1,7	W43	127	1,9
W12	142	1,8	W28	182	1,7	W44	133	2,0
W13	144	1,9	W29	138	1,8	W45	125	1,9
W14	132	1,9	W30	194	1,7	W46	124	2,0
W15	148	1,8	W30	196	1,8	W47	134	2,0
W16	193	1,7	W32	164	1,7	W48	121	2,0
W49	78	1,8	W50	29	1,7	W51	58	1,7
W52	59	1,7	W53	130	1,7	W54	97	1,8
W55	190	1,8	W56	172	1,8	W57	104	1,8
W58	157	1,9	W59	160	1,9	W60	98	2,0
W61	125	1,9						

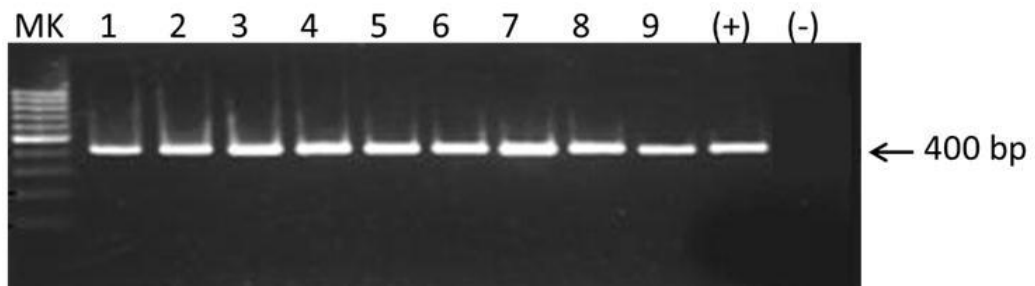
**Nhận xét:**

Tất cả mẫu DNA được tách chiết có nồng độ và độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280nm nằm trong khoảng 1,7÷2,0.

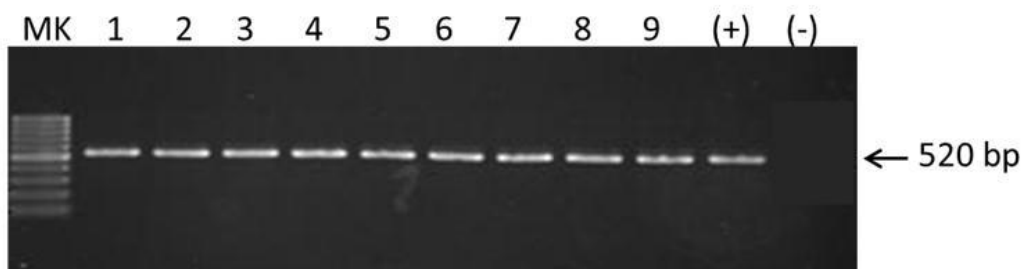
**3.1.2. Kết quả chạy PCR khuếch đại các exon của gen ATP7B**

Sử dụng 21 cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại toàn bộ 21 exon của gen ATP7B. Kích thước của các sản phẩm PCR trong khoảng 164÷520 bp. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5%. Hình 3.1 là hình ảnh Minh họa kết quả PCR khuếch đại exon 5 và exon 8 của gen ATP7B.

A)



B)



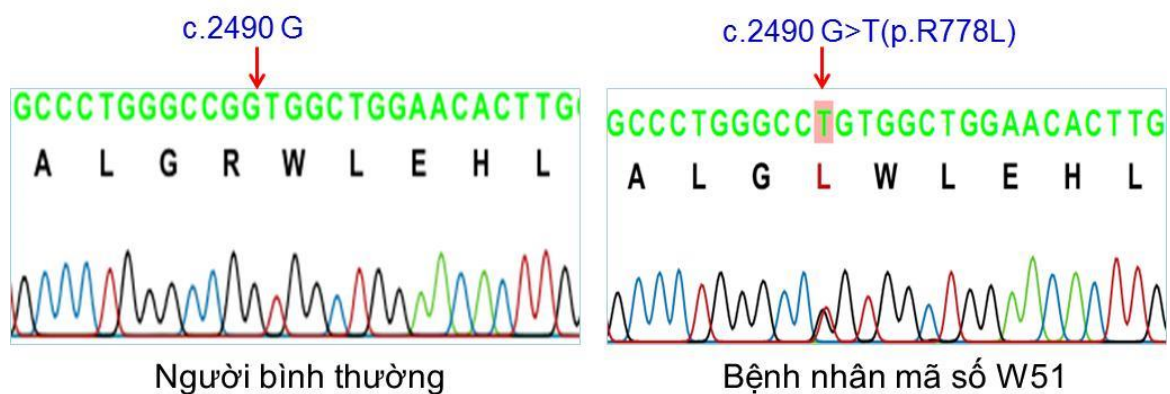
**Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 3 (A) và exon 8 (B) của gen ATP7B.** (+) mẫu đối chứng dương; (-) mẫu chứng âm; (1-9) mẫu bệnh nhân; (MK) Marker  $\Phi$ 174.

**Nhận xét:**

Sản phẩm PCR thu được chỉ có 1 băng đặc hiệu, rõ nét, không có sản phẩm phụ. Sản phẩm khuếch đại PCR đảm bảo cho phản ứng giải trình tự tiếp theo để phát hiện đột biến điểm.

**3.1.3. Kết quả xác định đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự gen**

Sản phẩm PCR tiếp tục được giải trình tự gen để phát hiện đột biến. Kết quả cho thấy có nhiều kiểu gen khác nhau được phát hiện trên bệnh nhân Wilson bao gồm: đột biến sai nghĩa, đột biến vùng 5'UTR, đột biến thêm nucleotid, đột biến tạo mã kết thúc và đột biến ở vùng intron. Bệnh nhân có thể có kiểu gen đột biến dị hợp tử, kiểu gen đột biến đồng hợp tử tại 1 vị trí trên gen và các kiểu gen khác do sự kết hợp của 2 dạng đột biến dị hợp tử, đồng hợp tử hoặc kết hợp với các SNP (bảng 3.2).

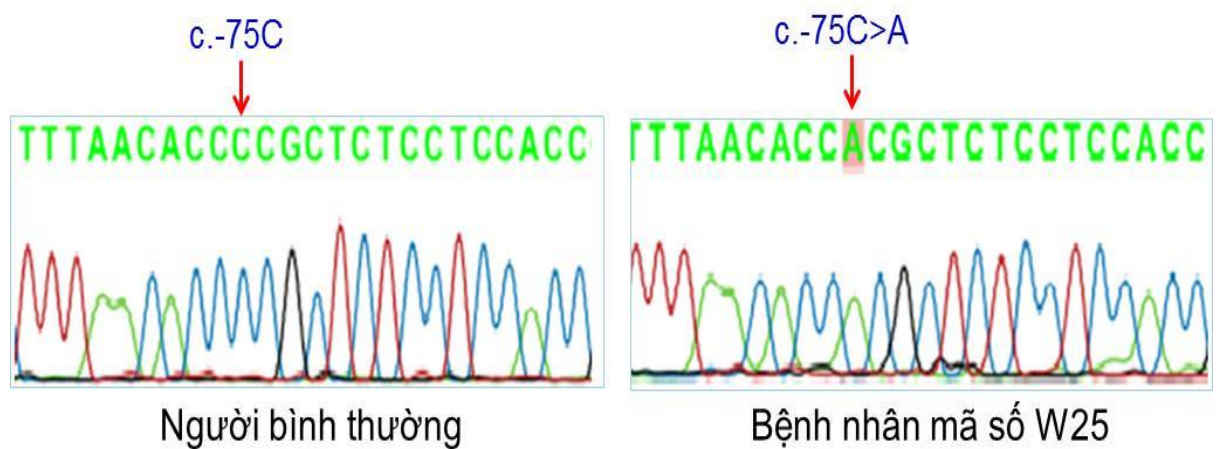
**3.1.3.1. Bệnh nhân Wilson với các dạng đột biến khác nhau trên gen *ATP7B*****Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa (missense mutation)**

**Hình 3.2. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W51**

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

***Nhận xét:***

Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W51 có đột biến sai nghĩa dị hợp tử, thay thế nucleotid 2490G>T dẫn đến bộ ba thứ 778 CGG mã hóa Arginine chuyển thành CTG mã hóa Leucine (R778L).

**Bệnh nhân có đột biến ở vùng 5' UTR**

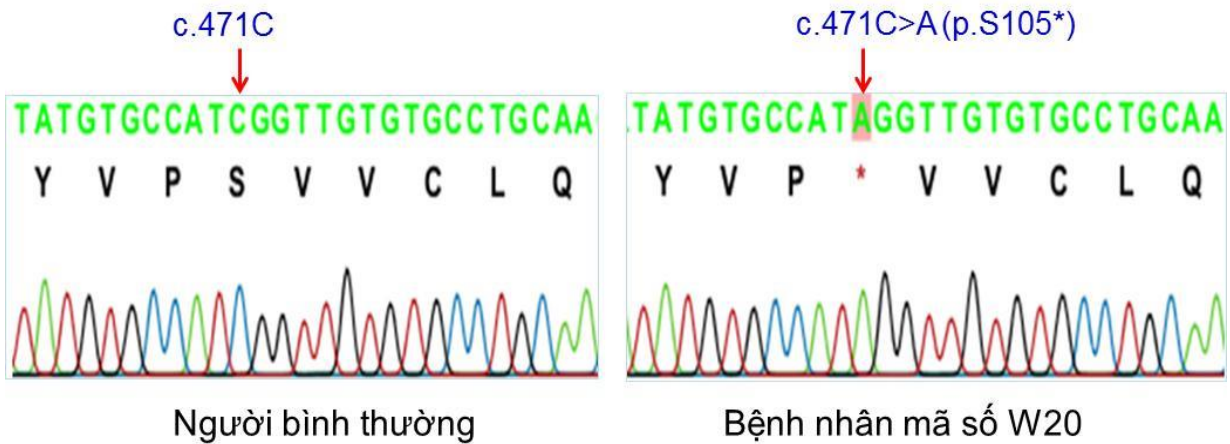
**Hình 3.3. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W25**

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

***Nhận xét:***

Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W25 có đột biến đồng hợp tử C thay thế thành A ở vùng 5'UTR cách vị trí mã khởi đầu 75 bp.

### Bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm (stop codon)



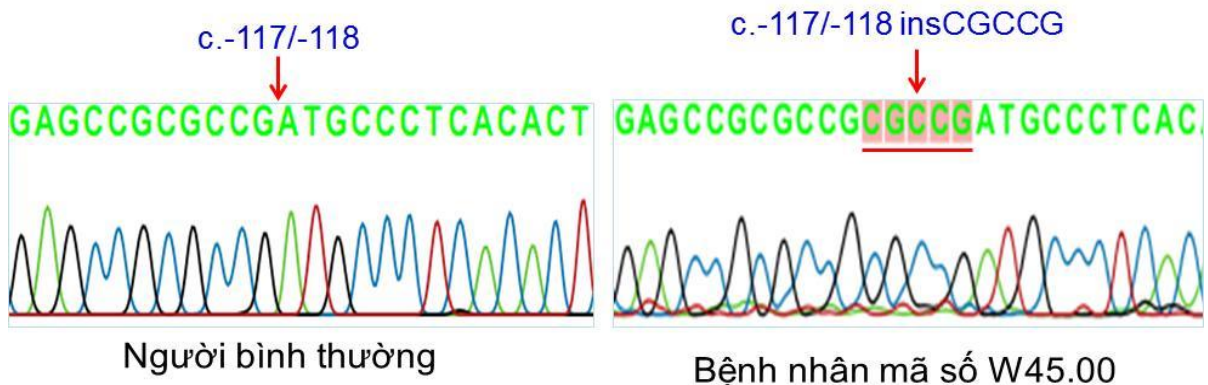
**Hình 3.4. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W20**

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

#### Nhận xét:

Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W20 có đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid 471C>A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG (S105\*).

### Bệnh nhân có đột biến thêm nucleotid (insertion mutation)



**Hình 3.5. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W45**

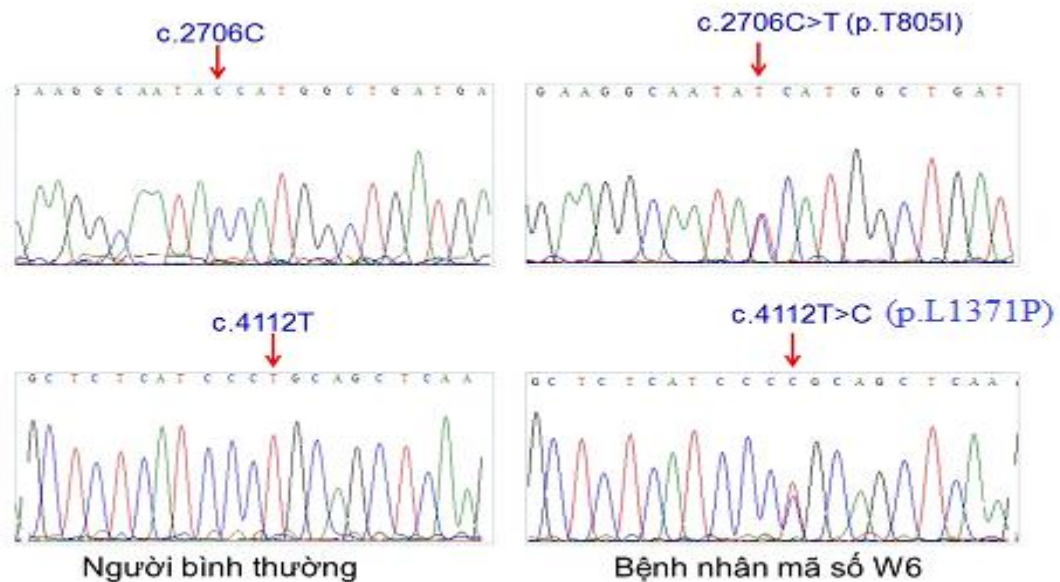
Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí thêm nucleotid.

**Nhận xét:**

Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W45 có đột biến đồng hợp tử thêm 5 nucleotid CGCCG ở vị trí giữa -117/-118 trên vùng 5'UTR (cách vị trí mã khởi đầu 117 bp).

**3.1.3.2. Bệnh nhân với những đột biến kết hợp trên gen ATP7B**

**Bệnh nhân có 2 đột biến dị hợp tử**



**Hình 3.6. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W6**

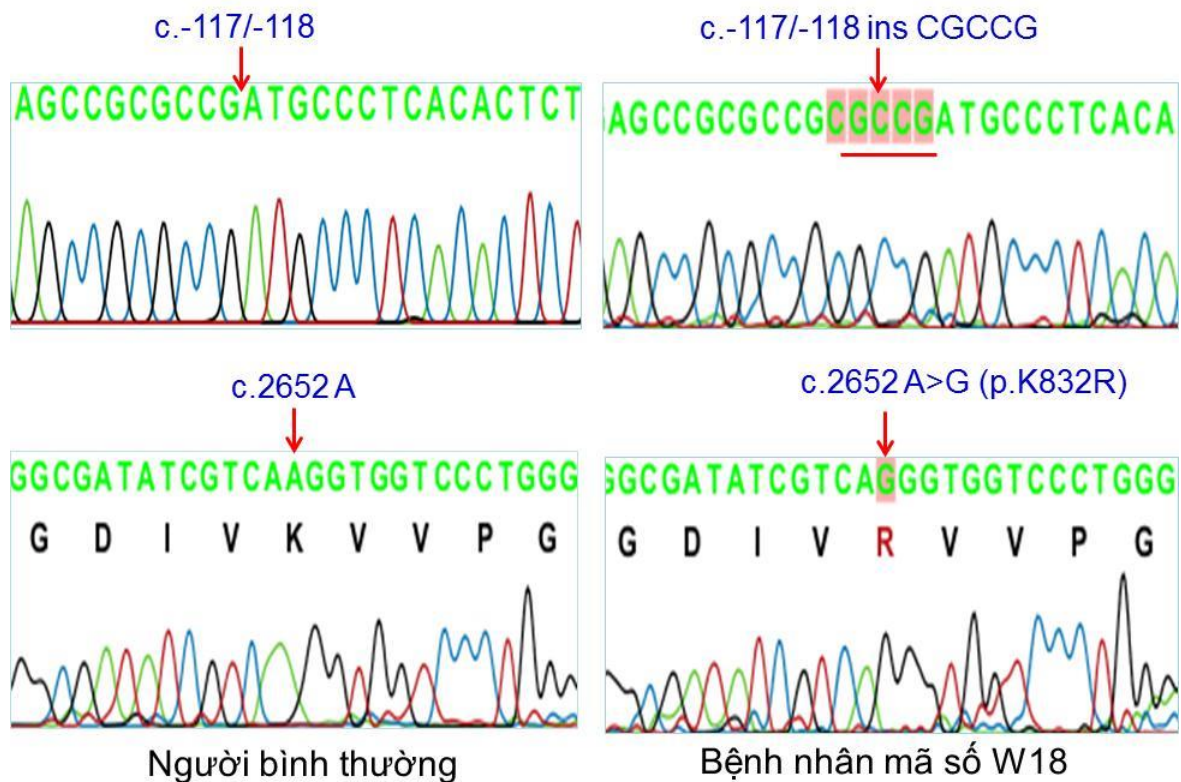
Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi.

**Nhận xét:**

Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W6 có đột biến dị hợp tử tại 2 vị trí: (1) thay thế nucleotid 2706C>T dẫn đến bộ ba thứ 805 mã hóa ACC Theonine chuyển thành ATC mã hóa Isoleusin (T805I); (2) thay thế

nucleotid 4112T>C dẫn đến bộ ba thứ 1371 CTG mã hóa Leucine chuyển thành CCG mã hóa Proline (L1371P).

**Bệnh nhân có 2 đột biến đồng hợp tử**



**Hình 3.7. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W18**

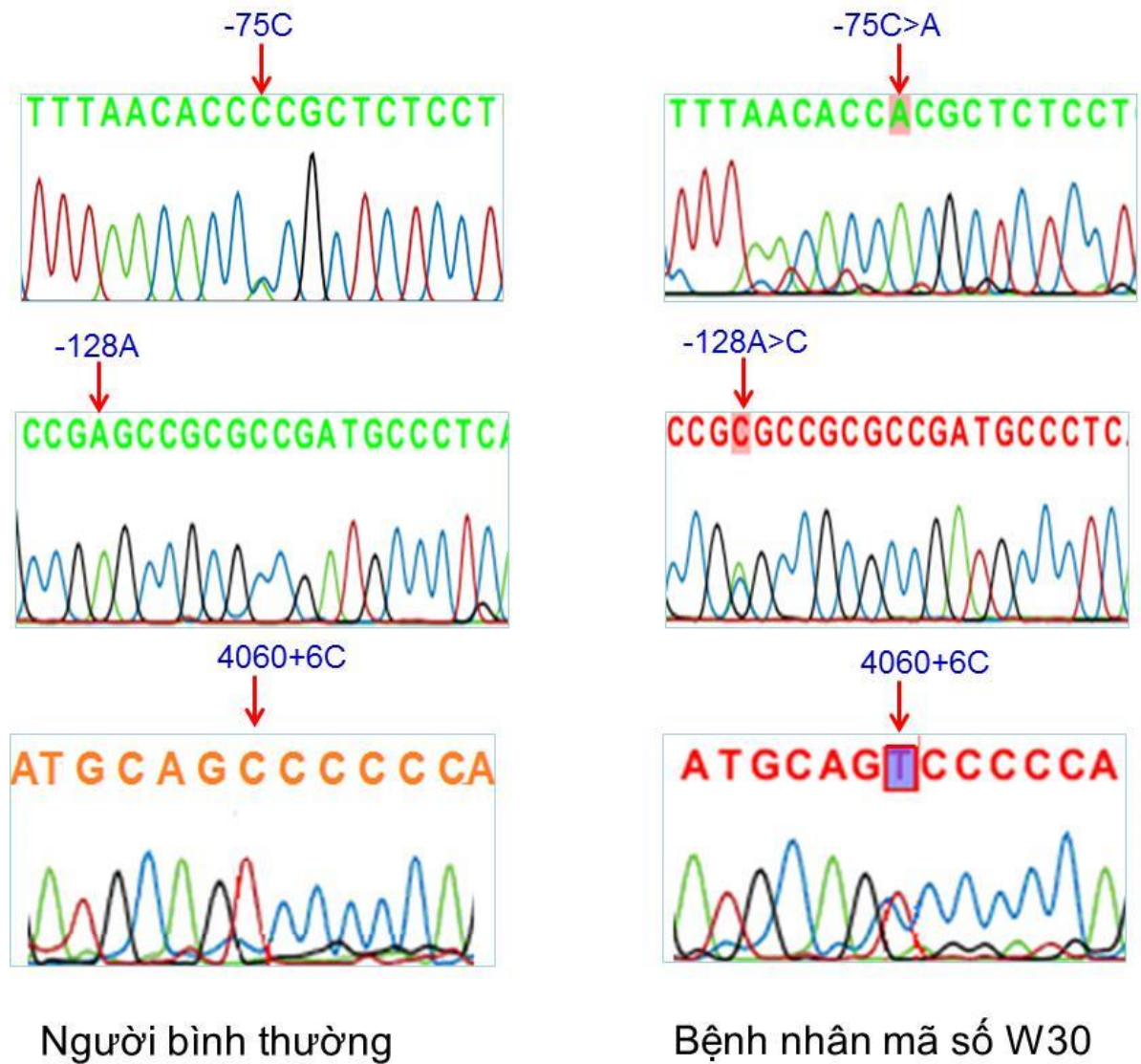
Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi.

**Nhận xét:**

Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W18 có 2 đột biến đồng hợp tử: (1) thêm 5 nucleotid CGCCG ở vị trí giữa -117/-118 trên vùng 5'UTR (cách vị trí mã khởi đầu 117 bp), (2) thay thế nucleotid

2652A>G dẫn đến bộ ba thứ 832 AAG mã hóa Lysine chuyển thành AGG mã hóa Arginine (K832R).

**Bệnh nhân có nhiều đột biến kết hợp**



**Hình 3.8. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W30**

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



**Nhận xét:**

Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W30 có 3 đột biến: (1) đột biến đồng hợp tử C thay thế thành A ở vùng 5'UTR cách vị trí mã khởi đầu 75 bp; (2) đột biến dị hợp tử A thay thế thành C ở vùng 5'UTR cách vị trí mã khởi đầu 128 bp; (3) đột biến dị hợp tử ở vùng intron 18 c.4060+6C>T.

**3.1.3.4. Kết quả phát hiện đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân****Bảng 3.2. Các kiểu đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson**

STT	Mã số	Exon	Đột biến/SNP	Thể đột biến	n	Chú thích	Tài liệu công bố
1	W9	14	pD1027H(c.3079G>C)	Dị hợp	1	DV	Wan L (2006)
2	W10	5	pA604P(c.1810G>C)	Dị hợp	1	DV	GuYH (2003)
3	W28	13	p.C985T (c.2954G>A)	Dị hợp	1	DV	Mak CM (2008)
4	W38, W39	3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp	2	SNP	GuYH (2003)
5	W51, W55	8	p.R778L (c. 2490 G>T)	Dị hợp	2	DV	Nanji MS (1997)
6	W52	11	p.L902P (c.2862T>C)	Dị hợp	1	NEW	
7	W20, W60	2	p.S105Stop (c.471C>A)	Đồng hợp	2	DV	Mak CM (2008)
8	W23	14	p.G943D (c.2982G>A)	Đồng hợp	2	DV	Wan L (2006)
9	W25	5'UTR	c.-75C>A	Đồng hợp	1	DV	Yamaguchi A (1998)
10	W26	5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Đồng hợp	1	DV	GuYH (2003)
11	W6	10	p.T850I (c.2706 C>T)	Dị hợp	1	NEW	
		20	p.L1371P (c.4112T>C)	Dị hợp	1	DV	Gupta A (2005)

12	W7	1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp	1	NEW	
		3	p.V456L (c.1523 G>C)	Dị hợp	1	SNP	GuYH (2003)
13	W11, W13, W21,W22	1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp	4	NEW	
		3	p.V456L (c.1523G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
14	W27	3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp	1	SNP	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
15	W29	8	p.T715A ( c.2147T>G)	Dị hợp	1	DV	Gupta A (2005)
		8	p.R778L (c. 2490 G>T)	Dị hợp		DV	Nanji MS (1997)
16	W32	1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp	1	NEW	
		10	p.T850 I (c.2706 C>T)	Dị hợp		NEW	
17	W35	5'UTR	c.-75C>A	Dị hợp	1	DV	Yamaguchi A (1998)
		IVS18	c.4060 + 6 C > T	Dị hợp		DV	Liu XQ (2004)
18	W43	5'UTR	c.-75C>A	Đồng hợp	1	DV	Yamaguchi A (1998)
		5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Dị hợp		DV	GuYH (2003)
19	W54	8	p.R778L (c. 2490 G>T)	Dị hợp	1	DV	Nanji MS (1997)
		16	p.I1148L (c.3600T>C)	Dị hợp		SNP	Todorov T (2005)
20	W56	5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Dị hợp	1	DV	GuYH (2003)
		3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
21	W18	5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Đồng hợp	1	DV	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Đồng hợp		DV	Okada T (2000)

22	W44, W45	5'UTR	c.-75C>A	Đồng hợp	2	DV	Yamaguchi A (1998)
		5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Dị hợp		DV	GuYH (2003)
23	W1	2	p.S105Stop (c.471C>A)	Đồng hợp	1	DV	Mak CM (2008)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		SNP	Okada T (2000)
24	W61	5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Dị hợp	1	DV	GuYH (2003)
		2	p.S105Stop (c.471C>A)	Đồng hợp		DV	Mak CM (2008)
25	W31	1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp	1	NEW	
		2	p.S105Stop (c.471C>A)	Đồng hợp		DV	Mak CM (2008)
		3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
26	W58	2	p.S105Stop (c.471C>A)	Đồng hợp	1	DV	Mak CM (2008)
		8	p.R778L (c. 2490 G>T)	Dị hợp		DV	Nanji MS (1997)
		16	p.V1140A (c.3577T>C)	Dị hợp		NEW	
27	W5, W34	1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp	2	NEW	
		3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
		10	p.T850I (c.2706 C>T)	Dị hợp		NEW	
28	W8	1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp	1	NEW	
		3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
		16	p.V1140A (c.3577T>C)	Dị hợp		NEW	
29	W33	5'UTR	c.-75C>A	Dị hợp	1	DV	Yamaguchi A (1998)
		3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		SNP	Okada T (2000)

		5'UTR	c.-75C>A	Dị hợp		DV	Yamaguchi A (1998)
30	W36	5'UTR	c.-128A>C	Đồng hợp	1	NEW	
		IVS18	c.4060+6 C>T	Dị hợp		DV	Liu XQ (2004)
		5'UTR	c.-75C>A	Dị hợp		DV	Yamaguchi A (1998)
31	W40	5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Dị hợp	1	DV	GuYH (2003)
		3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
		5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Dị hợp		DV	GuYH (2003)
32	W59	3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp	1	SNP	GuYH (2003)
		5	pA604P(c.1810G>C)	Dị hợp		DV	GuYH (2003)
		5'UTR	c.-118/117ins CGCCG	Dị hợp		DV	GuYH (2003)
33	W4	3	p.V456L (c.1523 G>C)	Dị hợp	1	SNP	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		SNP	Okada T (2000)
		16	p.V1140A (c.3577T >C)	Dị hợp		NEW	
		5'UTR	c.-75C>A	Đồng hợp		DV	Yamaguchi A (1998)
34	W17	5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Đồng hợp	1	DV	GuYH (2003)
		3	p.V456L (c.1523G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		DV	Okada T, (2000)
		2	p.S105Stop (c.471C>A)	Đồng hợp		DV	Mak CM (2008)
35	W57	3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp	1	SNP	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		SNP	Okada T (2000)
		16	p.V1140A (c.3577T>C)	Dị hợp		NEW	

		5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Dị hợp		DV	GuYH (2003)
		1	ins 47/48 CGGCG	Đồng hợp		NEW	
36	W16	3	p.V456L (c.1523G>C)	Dị hợp	1	SNP	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		SNP	Okada T (2000)
		12	p.R952K (c.3012G>A)	Đồng hợp		NEW	
		5'UTR	c.-75C>A	Đồng hợp		DV	Yamaguchi A (1998)
		1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp		NEW	
37	W24	3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp	1	SNP	GuYH (2003)
		18	p.F1240I (c.3966C>A)	Dị hợp		NEW	
		18	p.N1270I (c.3976A>T)	Dị hợp		NEW	
		5'UTR	c.-75C>A	Dị hợp		DV	Yamaguchi A (1998)
		2	p.G50S (c.305G>A)	Dị hợp		NEW	
38	W53	2	p.S105Stop (c.471C>A)	Đồng hợp	1	DV	Mak CM (2008)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		SNP	Okada T (2000)
		16	p.V1140A (c.3577T>C)	Đồng hợp		NEW	
		5'UTR	c.-75C>A	Đồng hợp		DV	Yamaguchi A (1998)
		5'UTR	c.-118/117 ins CGCCG	Dị hợp		DV	GuYH (2003)
		1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp		NEW	
39	W30	2	p.S105Stop (c.471C>A)	Đồng hợp	1	DV	Mak CM (2008)
		3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp		SNP	GuYH (2003)

		1	ins 47/48 CGGCG	Dị hợp	NEW	
		3	p.V456L (c. 1523 G>C)	Dị hợp	SNP	GuYH (2003)
		10	p.K832R (c.2652A>G)	Dị hợp	SNP	GuYH (2003)
		12	p.W939C (c.2974G>C)	Dị hợp	DV	Folhffer A (2007)
40	W19		p.C980S (c.3106G>C; c.3106-3107 GC>CA)	Dị hợp	1	NEW
		13	p.C980Stop (c.3107C>A)	Dị hợp		NEW
		16	p.F1144I (c.3587T>A)	Dị hợp		NEW
<b>Tổng</b>		<b>13 exon</b>			<b>48</b>	

*New: Đột biến mới; DV: Disease Variant (đột biến gây bệnh); SNP: Single Nucleotide Polymorphism (tính đa hình đơn nucleotid)*

**Nhận xét:**

- 48/61 bệnh nhân được phát hiện có đột biến trên gen ATP7B gồm các đột biến dị hợp tử, đột biến đồng hợp tử tại 1 vị trí trên gen; các dạng đột biến khác do sự kết hợp của 2 đến 5 dạng đột biến dị hợp tử, đồng hợp tử hoặc kết hợp với các SNP.
- 3/61 bệnh nhân phát hiện có sự thay thế nucleotid (SNP) trên gen ATP7B.
- 10/61 bệnh nhân không phát hiện thấy đột biến trên gen ATP7B.
- Các kiểu gen phát hiện trên bệnh nhân là những đột biến công bố gây bệnh Wilson, hoặc các SNP kết hợp với đột biến gây bệnh, một số đột biến mới chưa được công bố là gây bệnh Wilson.

### 3.2. Thiết lập bản đồ đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson ở Việt nam

**Bảng 3.3. Các loại đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson**

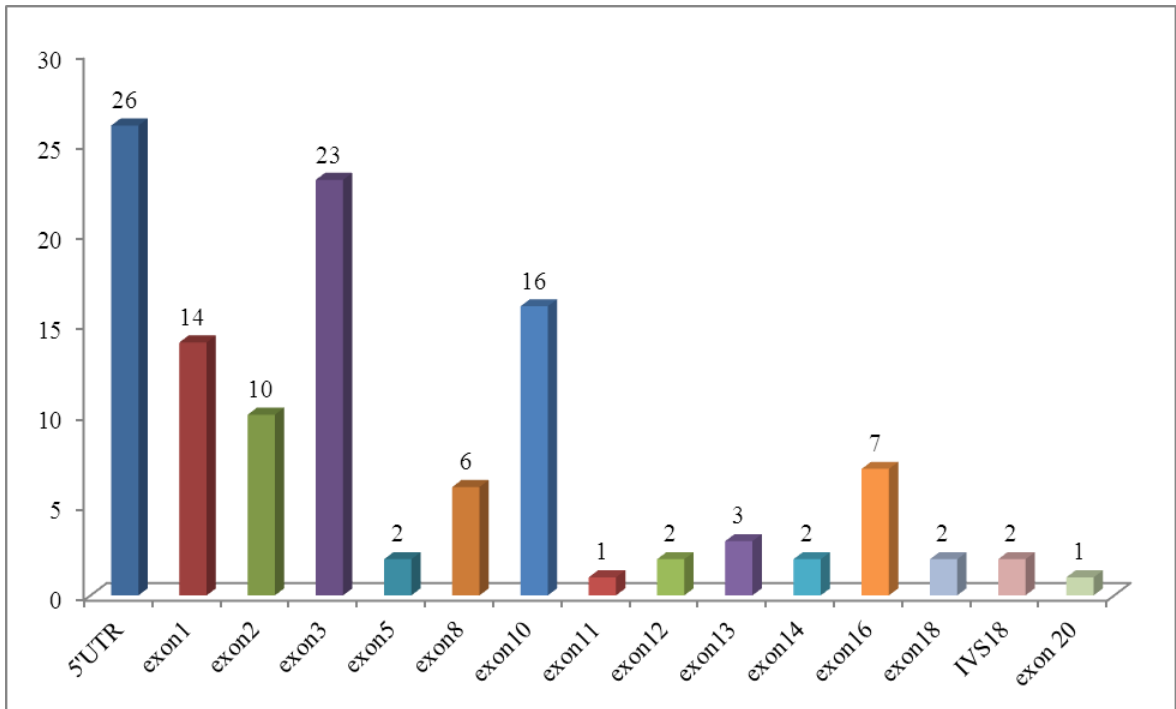
STT	Đột biến		Vùng /exon	Số lượng
	Thay đổi nucleotid	Thay đổi acid amin		
1.	c.-75C>A		5'UTR	12
	c.-117/118CGCCG			13
	c.-128A>C			1
2.	Ins 47/48 CGGCG		Exon 1	14
3.	c.471C>A	p.S105*	Exon 2	9
	c.305G>A	p.G50S		1
4.	c.1523G>C	p.V456L	Exon 3	23
5.	c.1810G>C	p.A604P	Exon 5	2
6.	c.2490G>T	p.R778L	Exon 8	5
	c.2147T>G	p.T715A		1
7.	c.2652 A>G	p.K832R	Exon 10	13
	c.2706C>T	p.T850I		3
8.	c.2862T>C	p.L902P	Exon 11	1
9.	c.2974G>C	p.W939C	Exon 12	1

	c.2982 G>A	p.G943D		1
	c.3012G>A	p.R952K		1
10.	c.3106 G>C	p.C980S	Exon 13	1
	c.3107C>A	p.C980S		1
	c.2954G>A	p.C985T		1
11.	c.2892G>A	p.G943D	Exon 14	1
	c.3079G>C	p.D1027H		1
12.	c.3577T>C	p.V1140A	Exon 16	5
	c.3587T>A	p.F1144I		1
	c.3600T>C	p.P1148L		1
13.	c.3966C>A	p.F1240I	Exon 18	1
	c.3976A>T	p.N1270I		1
14.	c.4060+6C>T		IVS18	2
15.	c.4112T>C	p.L1371P	Exon 20	1
<b>Tổng</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>15</b>	<b>118</b>

**Nhận xét:**

28 loại đột biến và SNP khác nhau đã được phát hiện trên 13 exon, 1 vùng intron và vùng 5'UTR của gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson Việt Nam.

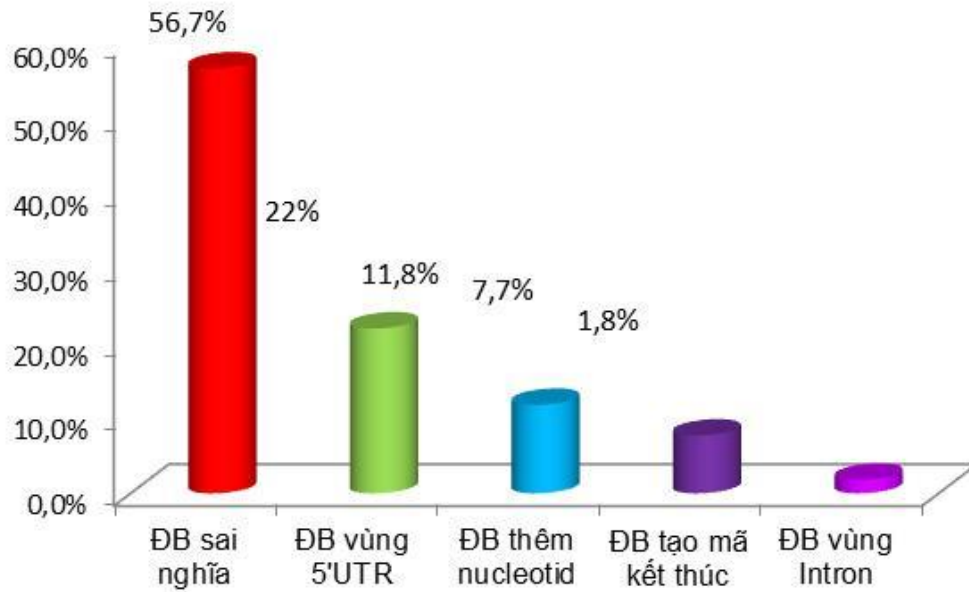




***Biểu đồ 3.1. Phân bố đột biến trên các exon của gen ATP7B***

***Nhận xét:***

Đột biến ở vùng 5'UTR chiếm tỉ lệ cao nhất, đột biến ở vùng exon 3, exon 10 chiếm tỉ lệ cao thứ 2, tiếp theo là ở vùng exon 1, exon 2, exon 16 và exon 8, đột biến chiếm tỉ lệ thấp nhất nằm ở các exon còn lại (biểu đồ 3.1).

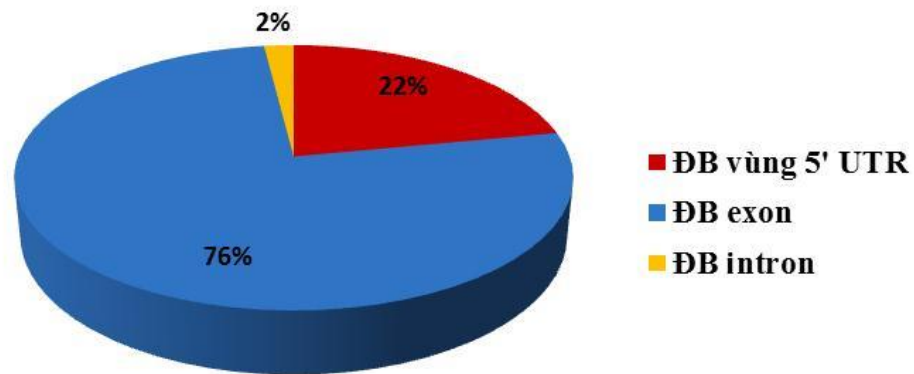


***Biểu đồ 3.2. Các dạng đột biến phát hiện được trên bệnh nhân Wilson***

*(ĐB: đột biến)*

***Nhận xét:***

Trong 5 dạng đột biến đã được phát hiện trên gen ATP7B ở 48 bệnh nhân Wilson Việt Nam, đột biến sai nghĩa (missense mutation) chiếm tỉ lệ cao nhất với 56,7%, tiếp theo là đột biến ở vùng 5'UTR chiếm tỉ lệ 22%, đột biến thêm nucleotid chiếm tỉ lệ 11,8%, đột biến tạo mã kết thúc sớm và đột biến ở vùng intron chiếm tỉ lệ thấp với 7,7% và 1,8%.

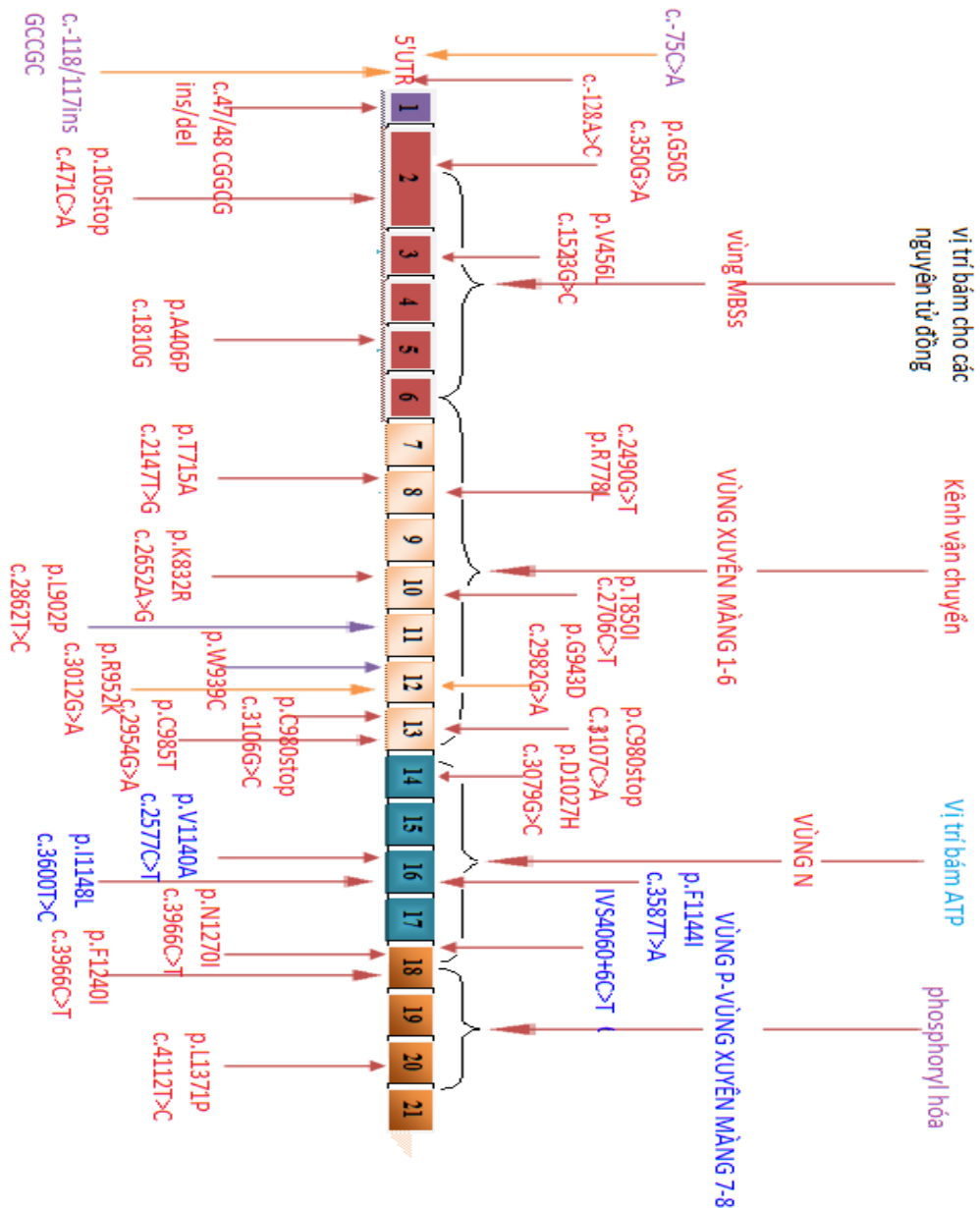


**Biểu đồ 3.3. Phân bố các đột biến gen ATP7B tương ứng với các vùng gen**

(ĐB: đột biến)

**Nhận xét:**

Đột biến ở vùng exon chiếm tỉ lệ cao nhất (76%), tiếp theo là đột biến ở vùng 5'UTR chiếm tỉ lệ cao thứ 2 (22%), đột biến ở vùng intron chiếm tỉ lệ thấp nhất (2%)



**Hình 3.9. Bản đồ đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson Việt Nam**

\* Nhận xét: Đột biến xảy ra trên tất cả các vùng chức năng của gen, trên 1 exon xuất hiện nhiều đột biến. Vùng 5'UTR có 3 dạng đột biến, trong đó có 1 dạng là đột biến mới phát hiện (c.-128A>C). Vùng exon 1

có 1 dạng đột biến, trong đó có 1 đột biến mới, hai vùng này có tổng số đột biến lớn nhất tìm thấy trong nghiên cứu.

Vùng MBSs kéo dài từ exon 2 đến một phần của exon 6, (vùng bám cho các nguyên tử đồng) có 4 dạng đột biến nằm trên các exon 2, exon 3, và exon 5, trong đó tại exon 2 có hai đột biến tạo thành mã kết thúc, một trong số đó là đột biến mới.

Vùng xuyên màng 1-6 (Vùng A-kênh vận chuyển) kéo dài từ một phần của exon 6 đến exon 13 có 11 dạng đột biến nằm trên các exon 8, 10, 11, 12, 13, trong đó có 5 là đột biến mới. Vùng N (vị trí bám cho ATP) kéo dài từ exon 14 đến một phần của exon 18 vùng này có 7 đột biến nằm trên exon 14, 16, 18 trong đó có 3 là đột biến mới, một đột biến missense nằm ở vùng cắt nối exon (vùng intron) trước exon 18 IVS18 c.4060+6 C>T.

Vùng P-vùng xuyên màng 7-8 (vùng phosphoryl hóa), chiếm một phần của exon 18, kéo dài đến exon 21 có 1 đột biến trên exon 20. Trên các exon 4, 6, 7, 9, 15, 17, 19, 21 của gen ATP7B không phát hiện thấy đột biến trên bệnh nhân Wilson Việt Nam.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

Bệnh Wilson và những bệnh lý di truyền trên gen lặn khác có biểu hiện lâm sàng phức tạp, bệnh cảnh đa dạng, phong phú, chẩn đoán trên lâm sàng có nhiều khó khăn như bệnh Wilson. Chẩn đoán bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử, giúp cho chẩn đoán sớm và chính xác bệnh. Bệnh Wilson là một bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường. Giai đoạn đầu đồng sẽ tích lũy trong gan (khoảng 80% lượng đồng được dự trữ trong gan) gây xơ gan, viêm gan cấp tính... Khi nồng độ đồng tăng cao sẽ qua tĩnh mạch cửa theo hệ thống tuần hoàn đến các cơ quan đích như não, mắt, xương... gây ra các biến chứng về mắt, thần kinh, tâm thần, rối loạn sắc tố và các rối loạn khác. Bệnh được biểu hiện rất đa dạng trên lâm sàng với tuổi khởi phát khác nhau và tổn thương nhiều cơ quan trong cơ thể. Bởi vậy, chẩn đoán bệnh trở nên khó khăn, đặc biệt trong các trường hợp không có các triệu chứng lâm sàng điển hình. Các nghiên cứu về các dạng đột biến gen ATP7B của các quốc gia khác nhau trên thế giới cũng đã và đang được triển khai rộng rãi. Xác định vị trí các đột biến gen dATP7B ở bệnh nhân Wilson cung cấp nhiều lợi ích cho khoa học cơ bản và ứng dụng lâm sàng. Đối với những bệnh nhân bị bệnh Wilson, xác định được vị trí đột biến là một tiêu chuẩn vàng để khẳng định chính xác chẩn đoán bệnh, ngoài ra nó cũng hỗ trợ trong việc tiên lượng mức độ nghiêm trọng của bệnh và diễn biến lâm sàng để từ đó có phương pháp điều trị thích hợp phòng tránh các biến chứng. Hơn nữa, xác định được vị trí

đột biến của bệnh nhân sẽ giúp phát hiện người lành mang gen bệnh, tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho những bà mẹ có nguy cơ cao giúp ngăn ngừa và làm giảm tỉ lệ mắc bệnh.

### **KẾT QUẢ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN ATP7B**

Để tiến hành xác định đột biến trên gen ATP7B, tách chiết DNA là bước đầu tiên quan trọng của quy trình thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử. DNA tách chiết được phải đảm bảo không bị đứt gãy, không nhiễm tạp chất để đảm bảo độ chính xác cho kết quả PCR và giải trình tự gen. Trong nghiên cứu này, tất cả mẫu DNA của bệnh nhân sau tách chiết được đo trên máy quang phổ kế Nano-drop ở bước sóng 260/280nm đều có nồng độ cao và độ tinh sạch nằm trong khoảng 1,8÷2.0.

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR và giải trình tự gen trực tiếp đã được áp dụng để xác định đột biến. Kết quả cho thấy đã phát hiện được 48/61 (78,6%) bệnh nhân được phát hiện có đột biến trên gen ATP7B gồm các đột biến sai nghĩa, đột biến thêm nucleotid, đột biến ở vùng 5' tận và đột biến ở vùng intron. Đột biến xảy ra ở hầu hết các vùng trên gen ATP7B, tuy nhiên một số vùng như exon 4, exon 6, exon 7, exon 9, exon 15, exon 17, exon 19, exon 21 chưa phát hiện được đột biến. Kết quả phát hiện đột biến sẽ giúp cho chúng tôi bước đầu hoàn thiện bản đồ đột biến gen trên bệnh nhân Wilson. 21,4% bệnh nhân không phát hiện thấy đột biến, theo các nghiên cứu trước của thế giới, tỷ lệ bệnh nhân Wilson không phát hiện được đột biến trên gen ATP7B cũng chiếm khoảng trên 20%, các

tác giả đã đưa ra lý giải là có thể có một số đột biến gen nằm trên vùng intron chưa được phát hiện và cơ chế cụ thể chưa được rõ ràng [26-30].

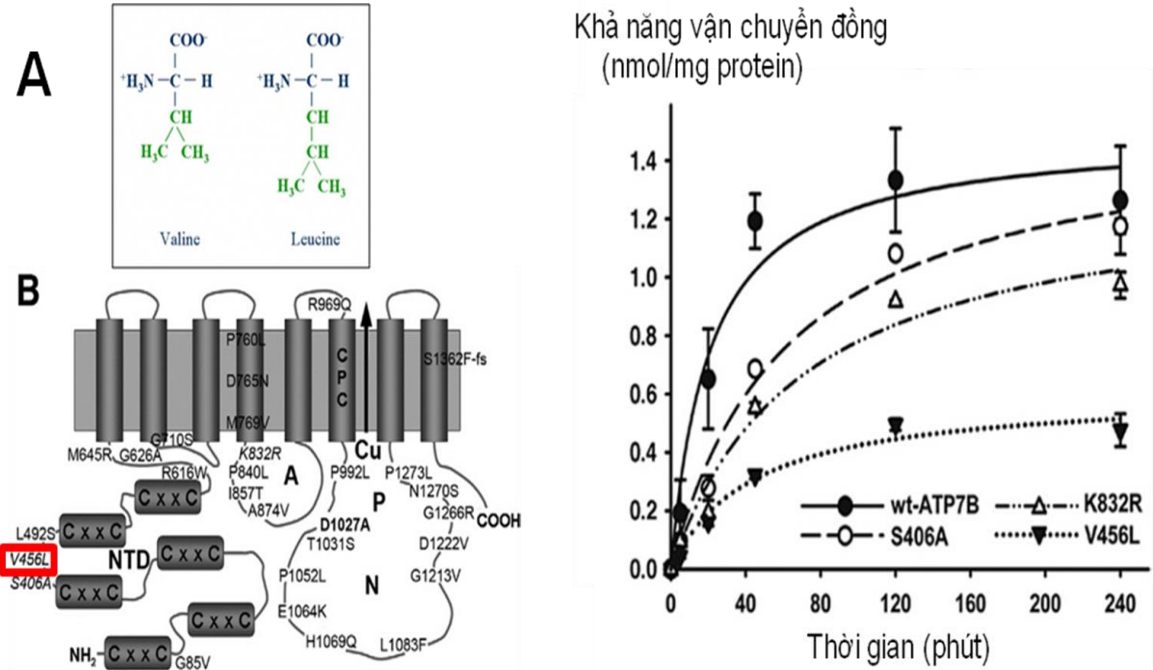
Năm 1993 Petrukhin K, Tanzi RE và cộng sự xây dựng bản đồ gen và các vùng gen có đột biến gây bệnh Wilson [87]. Đột biến trên các vùng chức năng của gen *ATP7B* trong nghiên cứu cho thấy có sự khác nhau, có vùng chức năng phát hiện thấy nhiều đột biến trên nhiều exon, đột biến có thể xảy ra trên bất kỳ exon nào, tuy nhiên một số exon không tìm thấy đột biến. Một bệnh nhân có thể xuất hiện nhiều đột biến khác nhau.

Protein enzym *ATP7B* với các vùng chức năng đặc thù mang đầy đủ đặc điểm của một protein vận chuyển kim loại thuộc họ protein typP-ATPase, đóng vai trò quan trọng trong việc đào thải đồng ra khỏi cơ thể. Sự bất thường của enzym *ATP7B* là nguyên nhân trực tiếp gây bệnh Wilson.

Theo thống kê tại ngân hàng dữ liệu về bệnh Wilson ([Wilsondiseas.med.ualberta.ca](http://Wilsondiseas.med.ualberta.ca)) cho đến thời điểm hiện nay, có 8 dạng đột biến trên gen *ATP7B*: Đột biến xóa đoạn, đột biến chuyển đoạn, đột biến đảo đoạn, đột biến thay thế, đột biến thêm nucleotid, đột biến tạo mã kết thúc sớm, đột biến sai nghĩa, đột biến tại vùng intron. Trong nghiên cứu này, 61 bệnh nhân Wilson đã được tiến hành xác định đột biến gen *ATP7B*, và 5 dạng đột biến được phát hiện là: Đột biến sai nghĩa, Đột biến tạo mã kết thúc sớm, đột biến thêm nucleotid, đột biến ở vùng 5'UTR, đột biến tại vùng intron.



Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự thay thế nucleotid dị hợp tử SNP được công bố không gây bệnh, nhưng có thể có đột biến trên vùng intron kết hợp, mà nhóm nghiên cứu chưa phát hiện được, nên bệnh nhân vẫn biểu hiện các triệu chứng bệnh lý trên lâm sàng, có 2 bệnh nhân (W38, W39) chỉ mang duy nhất 1 SNP dạng dị hợp tử SNP. Sự thay thế nucleotid tại vị trí c.1523 G>C (p.V456L) dẫn đến thay thế acid amin Valine thành Leucine. Acid amin Valine có kích thước nhỏ, kỵ nước, có 4 bộ ba nucleotid cùng mã hóa. Leucine là acid amin có kích thước lớn, cũng kỵ nước và có tới 6 bộ ba nucleotid cùng mã hóa. SNP này nhiều lần được công bố không gây bệnh Wilson tại Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Đài Loan, và một số nước châu Âu, nhưng sự kết hợp của SNP này với các đột biến khác có thể gây bệnh Wilson. Theo nghiên cứu của Nakayama (Nhật Bản) cho thấy p.V456L và p.K832R thuộc dạng SNP, những SNP này giảm đáng kể khả năng vận chuyển đồng khi thực nghiệm *in vitro* trên các tế bào gan của chuột. Tài liệu tham khảo cho thấy nhiều đột biến dị hợp tử trên các exon khác nhau được công bố gây bệnh trên Genebank [89]. Đột biến đồng hợp tử được công bố gây bệnh trong nhiều tài liệu [17],[94], điều này cho thấy đột biến đồng hợp tử gây bệnh, tuân theo đúng qui luật di truyền của Menden, bệnh Wilson di truyền gen lặn trên nhiễm sắc thể thường.



Hình 4.1: Đột biến giảm p.V456L và p.K832R đáng kể khả năng vận chuyển đồng khi thực nghiệm *in vitro* trên các tế bào gan của chuột.

([www.http://Wilson\\_disease.com](http://Wilson_disease.com))

(Theo nghiên cứu của Kenji nakayama và cộng sự năm 2012. Trên tế bào gan *in vitro* cho thấy đột biến p.V456L và p.K832R đều làm giảm đáng kể khả năng vận chuyển và đào thải đồng ra khỏi tế bào).

Trong số 48 bệnh nhân phát hiện có đột biến gen ATP7B, 36 bệnh nhân mang từ 2 đột biến trở lên, sự kết hợp giữa nhiều loại đột biến trên một bệnh nhân bao gồm đột biến, đồng hợp tử kết hợp đột biến dị hợp tử, đột biến dị hợp tử, với đột biến dị hợp tử, hoặc đột biến đồng hợp tử kết hợp với đột biến đồng hợp tử, đã khẳng định chính xác những loại đột biến này là nguyên nhân gây bệnh Wilson.

## **Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa (missense mutation)**

### *Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa dị hợp tử*

Đột biến sai nghĩa dị hợp tử trên exon 8 thay thế nucleotid tại vị trí 2490 G>T, làm cho bộ ba mã hóa arginine chuyển thành leucine. Đây là đột biến được công bố gây bệnh. Hai kiểu đột biến trên exon 8, p.T715A và p.R788L được tìm thấy trên 6 bệnh nhân. Đột biến p.T715A, là một đột biến mới. Tại cùng vị trí này, đã có một nghiên cứu của Hungary công bố đột biến p.T715H gây bệnh Wilson [100] và một nghiên cứu của Ấn độ công bố đột biến tạo mã kết thúc p.T715Stop [65], [66], [67]. Ở bệnh nhân mang đột biến p.T715A xuất hiện thêm một đột biến dị hợp tử trên cùng exon 8, đó là đột biến p.N765G (c.2295C>G). Đột biến này cũng đã được công bố gây bệnh trong một nghiên cứu của Trung Quốc [93]. Đột biến c.2490G >T (p.R778L) xuất hiện trên 3 bệnh nhân. Đây là đột biến đã được công bố gây bệnh Wilson 25 lần trong các nghiên cứu của Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản, Hàn Quốc. Ngoài ra, ở cùng một vị trí 778 có thể xuất hiện đột biến p. R778Q, hoặc p.R778W cũng gây bệnh Wilson. 2 đột biến này được công bố tại Đài Loan, Trung Quốc, Hàn Quốc và cả Italia [71], [76] [80], [82]. Một đột biến cùng vị trí nhưng chỉ xuất hiện ở Châu Âu, đó là p.R778G. Đột biến này được công bố gây bệnh Wilson ở Đan Mạch, Tây Ban Nha, Bungary và Anh [26],[54], [68],[99]. Có thể thấy đột biến tại vị trí 778 là một đột biến quan trọng ảnh hưởng đến sự vận chuyển đồng qua màng tế bào. Arginin (R) là một acid amin phân cực mang tính kiềm giữ vai trò quan trọng cho quá trình cân bằng điện tích của màng tế bào, cho nên sự thay đổi tính chất acid amin tại vị trí này có thể ảnh

hưởng lớn đến quá trình chuyển hoá cation và anion, trong đó  $\text{Cu}^{2+}$  là một thành phần quan trọng. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã tìm thấy 3 bệnh nhân W54, W55, W51 mang đột biến c.2490G>T (p.R778L).

### ***Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa đồng hợp tử***

\* Đột biến c.-75C>A là đột biến sai nghĩa do thay thế nucleotid C thành A tại vị trí nằm cách mã khởi đầu 75 bp: 12 bệnh nhân mang đột biến kiểu này, bao gồm 7 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử và 5 bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử. Tất cả bệnh nhân này đều có thêm những đột biến khác, trên các exon thuộc các vùng khác nhau của gen. Tuy nhiên nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng đột biến thay thế nucleotid, cho dù là đột biến đồng hợp tử hay đột biến dị hợp tử thì sự kết hợp các loại đột biến kép, ở vị trí này đã tạo nên nhiều đột biến đa dạng. Đột biến đồng hợp tử kết hợp với các đột biến dị hợp tử hoặc giữa đột biến đồng hợp tử với đột biến đồng hợp tử khác, làm cho cấu trúc và chức năng của protein ATP7B thay đổi, dẫn đến giảm một phần khả năng vận chuyển đồng hoặc mất hoàn toàn khả năng vận chuyển đồng của protein ATP7B.

### **Bệnh nhân có đột biến ở vùng 5' UTR**

Một số bệnh nhân có đột biến ở vùng 5'UTR như sau: Đột biến thêm 5 nucleotid CGCCG ở vị trí giữa - 117/-118 trên vùng 5'UTR (cách vị trí mã khởi đầu 117 bp). Đột biến -117/-118 ins CGCCG, đột biến có thể là dị hợp tử hoặc đồng hợp tử. Đột biến c.-75C>A là đột biến thay thế nucleotid C thành A tại vị trí nằm cách mã khởi đầu 75 bp: 12 bệnh nhân mang đột biến kiểu này, bao gồm 7 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử và 5 bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử. Những bệnh nhân này đều mang thêm những đột biến khác, trên các exon thuộc các vùng khác nhau của gen. Đột biến dị hợp tử A thay thế thành C ở vùng 5'UTR cách vị trí mã khởi đầu 128 bp. Đột biến c.-128A>C, chỉ phát hiện được 1 bệnh nhân duy nhất mang đột biến này và là đột biến đồng hợp tử c.-128A>C bệnh nhân mã số (W53). Đột biến này, khi đối chiếu và so sánh trên Genebank, nhóm nghiên cứu chưa thấy có tài liệu nào công bố, do đó có thể đây cũng là một đột biến mới xuất hiện trên bệnh nhân Wilson Việt Nam

Đột biến tại vùng 5' UTR của gen thường tạo nên mã kết thúc sớm. Tuy nhiên nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng kiểu đột biến thay thế nucleotid, cho dù là đột biến đồng hợp tử hay đột biến dị hợp tử thì sự kết hợp của các loại đột biến này tạo nên những đột biến kép, do đó hình thành nên nhiều đột biến đa dạng. Đột biến đồng hợp tử kết hợp với các đột biến dị hợp tử hoặc giữa đột biến đồng hợp tử với đột biến đồng hợp tử khác, làm cho cấu trúc và chức năng của protein ATP7B thay đổi, dẫn đến giảm một phần khả

năng vận chuyển đồng hoặc mất hoàn toàn khả năng vận chuyển đồng của protein ATP7B.

Các đột biến ở vùng 5'UTR cũng đã được chứng minh là gây nên bệnh Wilson [88, 89].

### **Bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm (nonsense mutation)**

Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid 471C>A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG (S105\*). Đột biến này phát hiện trên exon 2. Đây là vị trí bám cho các nguyên tử đồng gồm 6 MBSs, mỗi một MBSs gồm các trình tự MxCxxC, 1 MBSs sẽ gắn với một nguyên tử đồng. Việc phân tích cấu trúc riêng biệt của MBSs trong *ATP7B* đã cho thấy một cấu trúc nếp gấp  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  được bảo tồn. Trình tự và cấu trúc của các MBSs này được bảo tồn cao trong quá tiến hóa, ngay cả trong các protein khác như ATOX1 liên kết đồng (Cu-chaperon ATOX1). Các MBSs trong *ATP7B* có các chức năng quan trọng như: Chuyển vị đồng, hợp nhất đồng trong phức hợp enzym, hoạt hóa ATPase, tương tác giữa protein với protein. Tuy nhiên, *ATP7B* tương đồng trên vi khuẩn và nấm men cho thấy chỉ chứa một hoặc hai MBSs. Như vậy không phải tất cả 6 MBSs đều quan trọng [88],[89]

\* Đột biến trên exon 2 có hai kiểu p.G50S và p.S105stop phát hiện ở 10 bệnh nhân, hai kiểu đột biến này đều thuộc dạng thay thế nucleotid A được thay thế G hoặc C. Đột biến tạo nên mã kết thúc sớm, sự tạo thành mã kết thúc sớm làm mất hoàn toàn chức năng và cấu trúc của protein ATP7B,

đột biến p.105Stop được công bố 3 lần, là đột biến gây bệnh ở các nước Đức, Trung Quốc [42], [63].

+ Đột biến p.G50S nằm trên exon 2, được tìm thấy 1 lần trong nghiên cứu. Đối chiếu và so sánh trên Genbank chúng tôi không tìm thấy dữ liệu nào công bố liên quan đến đột biến này, chúng tôi cho rằng đây là đột biến mới trên bệnh nhân Wilson Việt Nam. Glycin (G) là một acid amin không phân cực và trung tính, trong khi đó Serin (S) là acid amin phân cực, trung tính. Vì thế đột biến này làm thay đổi hoàn toàn tính chất hoá lý tại vị trí codon 50, có thể làm ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển đồng của vùng xuyên màng.

### **Bệnh nhân có đột biến thêm nucleotid (insertion mutation)**

Đột biến thêm 5 nucleotid CGCCG ở vị trí giữa - 117/-118 trên vùng 5'UTR (cách vị trí mã khởi đầu 117 bp). 8 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử. Trong đó 7 bệnh nhân đều mang đột biến và kết hợp với các dạng đột biến khác. Chỉ có 1 bệnh nhân (W26) mang 1 đột biến đồng hợp c.-118/117 ins CGCCG mà không có sự kết hợp với các đột biến nào khác.

- 5 Bệnh nhân có đột biến dị hợp tử, không có bệnh nhân nào mang một đột biến dị hợp tử duy nhất, mà tất cả đều mang thêm các đột biến khác.

- Đột biến thêm 5 nucleotid CGCCG đã làm thay đổi trình tự các acid amin phía sau của gen, do đó làm thay đổi chức năng của vùng này, hoặc

tạo nên mã kết thúc sớm, hoặc kết hợp với các đột biến khác của gen là nguyên nhân gây bệnh Wilson, đã được công bố trong nhiều nghiên cứu của Trung Quốc, Nhật Bản, Tây Ban Nha, Ý [26], [42], [98].

### **Bệnh nhân với những đột biến kết hợp trên gen ATP7B**

#### ***Bệnh nhân có 2 đột biến dị hợp tử***

(1\*) Thay thế nucleotid 2706C>T dẫn đến bộ ba thứ 850 mã hóa ACC Theonine chuyển thành ATC mã hóa Isoleusin (T850I).

+ Đột biến p.T850I (c.2706C>T) thuộc exon 10 xuất hiện ở 4 bệnh nhân. Đây là đột biến mới, chưa có tài liệu nào công bố chính thức trên thế giới. Threonin (T) là một acid amin phân cực và trung tính, trong khi đó Isoleucin (I) là acid amin không phân cực. Vì thế đột biến này làm thay đổi hoàn toàn tính chất hoá lý tại vị trí codon 850, điều này có thể ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển đồng của vùng xuyên màng. Trong 4 bệnh nhân kể trên chỉ có 1 bệnh nhân (W6) mang đột biến dị hợp tử p.T850I (c.2706C>T) kết hợp với đột biến dị hợp c.4113T>C (p.L1371P) trên exon 20 của vùng xuyên màng 7-8. 3 bệnh nhân còn lại (W5, W32, W34) đều mang đột biến kép gồm 3 đột biến với sự có mặt của đột biến c.ins 47/48 CGGCG của exon 1.

(2\*) Thay thế nucleotid 4112T>C dẫn đến bộ ba thứ 1371 CTG mã hóa Leucine chuyển thành CCG mã hóa Proline (L1371P). Đột biến này thuộc vùng P. Vùng P là vùng chức năng quan trọng nhất, liên quan đến vùng xuyên màng 7-8 có chức năng phosphoryl hóa. Việc phân tích mô hình thực nghiệm



phân tử cho thấy rằng ATP gắn vào vùng N của protein *ATP7B* tạo ra thay đổi về mặt hình thái, làm cho vị trí gắn ATP trong vùng N gần với vùng P hơn. Điều này có thể thúc đẩy việc gắn ATP và phosphoryl hóa của vùng P. Việc gắn ATP trong vùng P của *ATP7B* xảy ra trong vùng lân cận của acid amin aspartic tại vị trí 1027. Tại vị trí này có 3 vùng bảo tồn cao được kí hiệu: **DKTG** (*D: acid aspartic, K: Lysin, T: Threonin, G: Glycine*); **GDGXD**N (*G: glycine, D: aspartic acid, X: any codon NNN, N: asparagine*); **TGEA** (*T: threonine, G: glycine, E: glutamic acid, A: alanine*) ở typ P- ATPase, và là vị trí phospho hóa bằng  $\gamma$ -phosphat của ATP [97].

Trong vùng này nhóm nghiên cứu tìm được duy nhất 1 đột biến dị hợp tử trên exon 20 là p. L1371P (c. 4112 T>C) ở bệnh nhân (W6). Đây là đột biến đã được công bố là gây bệnh Wilson trên bệnh nhân Trung Quốc. Leucine (L) và Proline (P) đều là hai acid amin không phân cực và trung tính. Tuy nhiên Leucine là một kỵ nước trong khi đó Proline lại đặc biệt ưa nước. Đặc điểm đặc biệt của Proline và Hydroproline, có khả năng dễ dàng tạo liên kết Hydro nhờ cấu trúc vòng 5 cạnh. Vì thế đột biến trên cũng có thể làm thay đổi hoàn toàn tính chất hoá lý tại vị trí codon 1371, có thể ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển đồng của vùng xuyên màng. Bệnh nhân W6 còn mang thêm một đột biến dị hợp tử khác đó là p.T850I (c2706C>T) là đột biến mới.

### ***Bệnh nhân có đột biến dị hợp tử kết hợp với đồng hợp tử***

\* Đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 471C>A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG (S105\*). Bệnh nhân

mã số W1 có hai kiểu đột biến p.K832R và p.S105stop, hai kiểu đột biến này đều thuộc dạng thay thế nucleotid. Đột biến tạo nên mã kết thúc sớm, làm mất hoàn toàn chức năng và cấu trúc của protein ATP7B, đột biến p.105Stop được công bố 3 lần, là đột biến gây bệnh ở các nước Đức, Trung Quốc [42], [63].

\* Đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid 2652A>G dẫn đến bộ ba thứ 832 AAG mã hóa Lysine chuyển thành AGG mã hóa Arginine (K832R).

+ Đột biến p.K832R (c.2652A>G) thuộc exon 10 xuất hiện ở 12 bệnh nhân trong đó có 4 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử và 6 bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử. Đột biến này cũng có tính chất giống đột biến c.1523G>C (p.V456L) [94], là đột biến không xuất hiện một mình mà thường đi kèm với các đột biến khác. Đã có 28 tài liệu nghiên cứu về bệnh Wilson công bố về sự xuất hiện của đột biến p.K832R (c.2652A>G) ở các bệnh nhân châu Á, châu Phi và châu Âu. Những nghiên cứu này đều cho thấy mối liên quan không trực tiếp của đột biến p.K832R (c.2652A>G) với sự suy yếu vận chuyển đồng. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu nhận thấy, đột biến p.K832R (c.2652A>G) thường đi kèm với các đột biến của vùng 5'UTR và exon 1 (8/10 bệnh nhân), chỉ có 2 bệnh nhân mang đồng thời đột biến dị hợp p.K832R (c.2652A>G) và đột biến đồng hợp c.417C>A (p.S105Stop) ở exon 2 (vùng MBSs). Kết quả nghiên cứu cho thấy, bệnh nhân mang đột biến p.K832R (c.2652A>G) thường đi kèm với các đột biến của vùng 5'UTR c.-75 C>A; c.-117/118 CGCCG; c.-128 A>C và exon 1 c.ins 47/48CGGCG

### ***Bệnh nhân có 2 đột biến đồng hợp tử***

Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử thứ nhất: Thêm 5 nucleotid CGCCG ở vị trí giữa -117/-118 trên vùng 5'UTR (cách vị trí mã khởi đầu 117 bp). 8 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử, trong đó 7 bệnh nhân đều mang đột biến đồng hợp tử kết hợp với các đột biến khác. Chỉ có 1 bệnh nhân (W26) mang 1 đột biến đồng hợp c.-118/117 ins CGCCG mà không có sự kết hợp với các đột biến nào khác. Đột biến thêm 5 nucleotid CGCCG đã làm thay đổi trình tự các acid amin phía sau của gen, do đó làm thay đổi chức năng của vùng này, hoặc tạo nên mã kết thúc sớm, hoặc kết hợp với các đột biến khác của gen là nguyên nhân gây bệnh Wilson, đã được công bố trong nhiều nghiên cứu của nước ngoài.

Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử thứ hai: thay thế nucleotid 2652 A>G dẫn đến bộ ba thứ 832 AAG mã hóa Lysine chuyển thành AGG mã hóa Arginine (K832R). Đột biến p.K832R (c.2652A>G). Kết quả nghiên cứu cho thấy sự kết hợp của 2 đột biến đồng hợp tử, thêm 5 nucleotid và thay thế nucleotid là nguyên nhân gây bệnh Wilson.

### ***Bệnh nhân có kết hợp nhiều đột biến trên gen ATP7B***

i) Bệnh nhân có 4 đột biến kết hợp

(1) Đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 471C>A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG (S105\*). p.S105stop phát hiện ở 10 bệnh nhân, kiểu đột biến này đều thuộc dạng thay thế nucleotid

A thay thế C. Đột biến tạo nên mã kết thúc sớm, sự tạo thành mã kết thúc sớm làm mất hoàn toàn chức năng và cấu trúc của protein ATP7B, đột biến p.105Stop được công bố 3 lần, là đột biến gây bệnh ở các nước Đức, Trung Quốc [42], [63]..

(2) Đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 1523G>C dẫn đến bộ ba thứ 456 GTG mã hóa Valine chuyển thành CTG mã hóa Leucine (V456L).

\* Đột biến c.1523G>C (p.V456L) trên exon số 3. Đột biến này được công bố 29 lần trên các tài liệu quốc tế, nằm rải rác trên cả 5 châu lục. Không phải là đột biến trực tiếp gây nên bất thường cho protein ATP7B nhưng nó xuất hiện thường xuyên với các đột biến thêm hoặc thay thế nucleotid. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng, 17/23 bệnh nhân có đột biến c.1523G>C (p.V456L) là dạng dị hợp tử, chỉ có 4 bệnh nhân mang đột biến c.1523G>C (p.V456L) đồng hợp tử.

+ Điều đặc biệt, đột biến này hầu như chỉ xuất hiện trong trường hợp có đột biến ở vùng 5'UTR và exon 1 (17/23 trường hợp), 1 trường hợp đột biến dị hợp tử c.1523G>C (p.V456L) xuất hiện cùng 1 đột biến đồng hợp c.417C>A (p.S105Stop) và 1 trường hợp đột biến dị hợp tử c.1523G>C (p.V456L) xuất hiện cùng 1 đột biến dị hợp c.2652A>G (p.K832R).

+ Chỉ có 2 trường hợp, bệnh nhân mang duy nhất 1 đột biến đồng hợp c.1523G>C (p.V456L) (W38,W39). Như vậy, có thể thấy rằng, đột biến p.Val456Leu xuất hiện cùng với các đột biến khác, tuy không có ý nghĩa gây

bệnh nhưng có thể là yếu tố làm tăng thêm mức độ nặng của bệnh Wilson do ảnh hưởng cộng hưởng. Axit amin khi bị thay thế có thể ảnh hưởng đến tương tác cũng như sự định hướng của các axit amin bên cạnh dẫn đến sự thay đổi cấu trúc không gian và chức năng của protein. Đột biến này chỉ xuất hiện ở bệnh nhân Wilson chứ không có ở người thường. Nghiên cứu của Kenji cho thấy, các thử nghiệm invitro đột biến p.V456L trên tế bào gan đều cho thấy giảm đáng kể khả năng vận chuyển và đào thải đồng ra khỏi tế bào.

(3) Đột biến đồng hợp tử nucleotid 2652A>G dẫn đến bộ ba thứ 832 AAG mã hóa Lysine chuyển thành AGG mã hóa Arginine (K832R). Đột biến p.K832R (c.2652A>G) thuộc exon 10 xuất hiện ở 12 bệnh nhân trong đó có 4 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử, đột biến này cũng có tính chất giống đột biến trên exon 3 c.1523G>C (p.V456L) [94], là đột biến không xuất hiện một mình mà thường đi kèm với các đột biến khác. Như vậy ở trường hợp này đột biến xuất hiện cùng với 3 kiểu đột biến khác, mặc dù có nhiều tài liệu công bố những đột biến này không phải là nguyên nhân gây bệnh, nhưng luôn luôn xuất hiện trên những bệnh nhân có nhiều đột biến. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu nhận thấy, đột biến p.K832R (c.2652A>G) thường đi kèm với các đột biến của vùng 5'UTR và exon 1 (8/10 bệnh nhân), chỉ có 2 bệnh nhân mang đồng thời đột biến dị hợp p.K832R và đột biến đồng hợp (p.S105Stop) ở exon 2 (vùng MBSs). Kết quả nghiên cứu cho thấy, bệnh nhân mang đột biến p.K832R thường đi kèm với các đột biến của vùng 5'UTR và exon 1, điều này cho thấy đột biến có ái lực với kiểu thay thế 5 nucleotid và thay thế nucleotid của vùng ngoài gen.

(4) Đột biến đồng hợp tử nucleotid 3577T>C dẫn đến bộ ba thứ 1140 GTC mã hóa Valine chuyển thành GCC mã hóa Alanine (V1140A). Đột biến p.V1140A (c.3577C>T) dị hợp tử thuộc exon 16 xuất hiện ở 3 bệnh nhân (2 dị hợp W4 và W8,1 đồng hợp W53). Đã có 36 công bố chính thức về sự xuất hiện của đột biến này trên bệnh nhân Wilson ở châu Á, châu Âu và châu Phi. Tuy nhiên, cũng như trường hợp đột biến p.K952R (c.3012 A>C) và c.1523G>C (p.V456L), đây là đột biến không trực tiếp gây bệnh, nhưng vẫn có thể xuất hiện cùng một số đột biến quan trọng khác trên gen ATP7B để làm giảm rõ rệt hơn chức năng của protein ATP7B. Điều này cũng phù hợp với kết quả tìm được trên bệnh nhân mà nhóm nghiên cứu đang phân tích.

## ii) Bệnh nhân có 5 đột biến kết hợp

(1) Đột biến đồng hợp tử C thay thế thành A ở vùng 5'UTR cách vị trí mã khởi đầu 75 bp. Trong 48 bệnh nhân phát hiện đột biến gen ATP7B, có 26/48 bệnh nhân có đột biến tại vùng 5'UTR. 12 bệnh nhân có đột biến tại c.-75 C>A, có 7 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử, 5 bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử tại vị trí này. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đột biến c.-75 C>A không xuất hiện đơn độc, mà đột biến này luôn luôn kết hợp với nhiều kiểu đột biến khác, sự kết hợp các đột biến của vùng 5' UTR và các đột biến khác rất đa dạng, tất cả các bệnh nhân này đều mang thêm những đột biến khác trên các exon thuộc các vùng khác nhau của gen.

Tuy nhiên nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng đột biến thay thế nucleotid, tại vùng 5' UTR, cho dù là đột biến đồng hợp tử hay đột biến dị hợp tử thì sự kết hợp các loại đột biến kép, ở vị trí này đã tạo nên nhiều đột biến đa dạng. Đột biến đồng hợp tử kết hợp với các đột biến dị hợp tử hoặc giữa đồng hợp tử với đồng hợp tử khác, đã làm cho cấu trúc và chức năng của protein ATP7B thay đổi, làm giảm một phần khả năng vận chuyển đồng hoặc làm mất hoàn toàn khả năng vận chuyển đồng của protein ATP7B

(2) Đột biến dị hợp tử A thay thế thành C ở vùng 5'UTR cách vị trí mã khởi đầu 128 bp. Đột biến c.-128A>C, nhóm nghiên cứu chỉ phát hiện được 1 bệnh nhân duy nhất mang đột biến này và là đột biến đồng hợp tử c.-128A>C bệnh nhân mã số (W53). Bệnh nhân này cũng mang đột biến kép. Đột biến này, khi đối chiếu và so sánh trên Genebank, nhóm nghiên cứu chưa thấy có tài liệu nào công bố, do đó có thể đây cũng là một đột biến mới xuất hiện trên bệnh nhân Wilson Việt Nam.

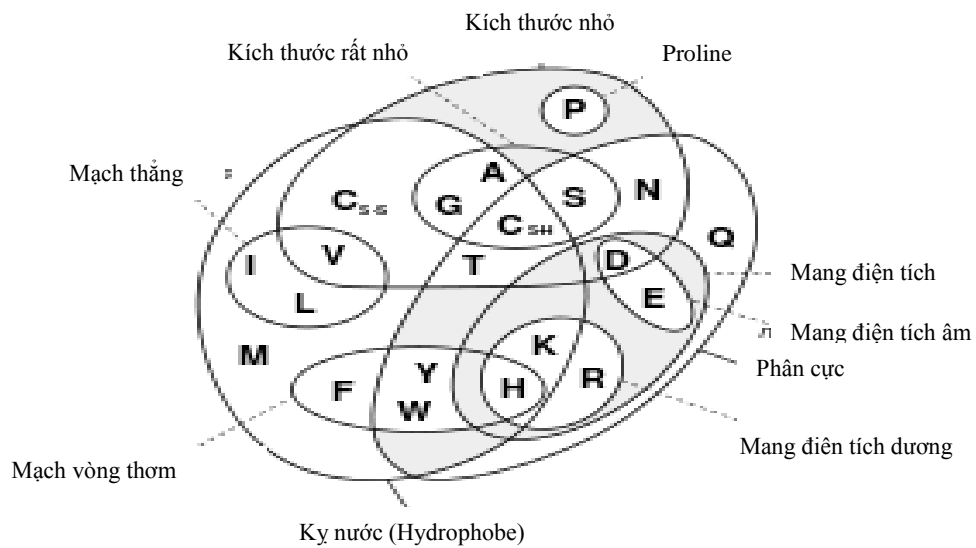
(3) Đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid 471C>A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG (S105\*). Đột biến trên exon 2, p.S105stop phát hiện ở 10 bệnh nhân, kiểu đột biến này đều thuộc dạng thay thế nucleotid A thay thế C. Đột biến tạo nên mã kết thúc sớm, sự tạo thành mã kết thúc sớm làm mất hoàn toàn chức năng và cấu trúc của protein ATP7B, đột biến p.105Stop được công bố 3 lần, là đột biến gây bệnh ở các nước Đức, Trung Quốc.

(4) Đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid 2652A>G dẫn đến bộ ba thứ 832 AAG mã hóa Lysine chuyển thành AGG mã hóa Arginine (K832R). Đột biến p.K832R (c.2652A>G). Có 4 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử. Tuy nhiên đột biến này cũng có tính chất giống đột biến c.1523G>C (p.V456L) [94], là đột biến không xuất hiện một mình mà thường đi kèm với các đột biến khác. Đã có 28 tài liệu nghiên cứu về bệnh Wilson công bố về sự xuất hiện của đột biến p.K832R (c.2652A>G) ở các bệnh nhân châu Á, châu Phi và châu Âu. Những nghiên cứu này đều cho thấy mối liên quan không trực tiếp của đột biến p.K832R (c.2652A>G) với sự suy yếu vận chuyển đồng. K là kí hiệu của acid amin lysine, có kích thước lớn, kỵ nước, và mang điện tích dương, còn R là kí hiệu của acid amin arginine cũng mang điện tích dương, nhưng thuộc loại acid amin không kỵ nước. Sự thay đổi về tính chất lý hóa tại vị trí 832 và làm khả năng vận chuyển đồng. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu nhận thấy, đột biến p.K832R (c.2652A>G) thường đi kèm với các đột biến của vùng 5'UTR và exon 1 (8/10 bệnh nhân), chỉ có 2 bệnh nhân mang đồng thời đột biến dị hợp p.K832R và đột biến đồng hợp p.S105Stop, ở exon 2 (vùng MBSs). Kết quả nghiên cứu cho thấy, bệnh nhân mang đột biến p.K832R luôn luôn đi kèm với các đột biến của vùng 5'UTR và exon 1 c.ins 47/48CGGCG.

(5) Đột biến đồng hợp tử nucleotid 3577 T>C dẫn đến bộ ba thứ 1140 GTC mã hóa Valine chuyển thành GCC mã hóa Alanine (V1140A). Valine là acid amin có kích thước nhỏ, mạch thẳng, kỵ nước. Trong khi đó Alanine là acid amin có kích thước rất nhỏ, ưa nước. Sự thay đổi về cấu trúc của acid



amin và tính chất lý hóa và kết hợp nhiều đột biến khác, là nguyên nhân gây bệnh Wilson. Đột biến p.V1140A thuộc exon 16 xuất hiện ở 3 bệnh nhân (2 dị hợp tử W4 và W8, 1 bệnh nhân đồng hợp tử W53). Có 36 công bố chính thức về sự xuất hiện của đột biến này trên bệnh nhân Wilson ở châu Á, châu Âu và châu Phi. Tuy nhiên, cũng như trường hợp đột biến p. K952R p.V456L, đây là đột biến không trực tiếp gây bệnh, nhưng vẫn thường xuất hiện cùng một số đột biến quan trọng khác trên gen ATP7B để làm giảm rõ rệt chức năng của protein ATP7B. Điều này cũng phù hợp với kết quả tìm được trên bệnh nhân mà nhóm nghiên cứu đang phân tích.



Hình 4.2: Sơ đồ Venn về tính chất acid amin

([www.http://Wilson\\_disease.com](http://Wilson_disease.com))

## KẾT QUẢ THIẾT LẬP BẢN ĐỒ GEN GÂY BỆNH WILSON

Năm 1993 Petrukhin K, Tanzi RE và cộng sự xây dựng bản đồ gen gây bệnh Wilson dựa trên các đột biến xuất hiện trong nghiên cứu, các đột biến được công bố gây bệnh trực tiếp, hoặc các đột biến có tác động cộng hưởng gây bệnh. Đột biến xuất hiện trên toàn bộ exon và các vùng chức năng của gen ATP7B. Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, 28 kiểu đột biến được tìm thấy trên 48 bệnh nhân nghiên cứu, đột biến phát hiện được ở vùng 5' UTR, ở 13 exon của gen và vùng intron 18. Có những đột biến của bệnh nhân Wilson Việt Nam, khi đối chiếu trên ngân hàng Genbank được công bố là nguyên nhân gây bệnh Wilson, hoặc có những đột biến dạng SNP không gây bệnh, nay cũng tìm thấy. Như vậy có thể cho rằng đột biến gen gây bệnh rất đa dạng và phong phú. Mặc dù chúng tôi chỉ phát hiện được 5 dạng đột biến trên tổng số 8 dạng đột biến đã được công bố tìm thấy là: Đột biến thêm nucleotid, đột biến sai nghĩa, đột biến ở vùng 5' tận, đột biến tạo thành mã kết thúc sớm và đột biến ở vùng intron.

Trong nghiên cứu này, đột biến sai nghĩa (missense mutation) ở vùng exon chiếm tỉ lệ cao nhất (56,7%), tiếp theo là đột biến ở vùng 5'UTR (22%), đột biến thêm nucleotid và đột biến tạo mã kết thúc sớm chiếm tỉ lệ 11,8% và 7,8%, đột biến ở vùng intron chiếm tỉ lệ thấp nhất (2%). Trong số các đột biến xảy ra ở vùng exon, đột biến ở vùng exon 3, exon 10 chiếm tỉ lệ cao nhất, tiếp theo là ở vùng exon 1, exon 2, exon 16 và exon 8, chiếm tỉ lệ thấp nhất nằm ở các exon còn lại. Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu trước đây [42, 83, 88, 89].

Đột biến xảy ra trên tất cả các vùng chức năng của gen, điều này cho thấy vai trò quan trọng của từng vùng đối với quá trình điều hòa sự hấp thu, phân phối và thải trừ đồng của cơ thể.

Trong nghiên cứu này, một số exon 4, exon 6, exon 7, exon 9, exon 15, exon 17, exon 19, exon 21 của gen ATP7B không phát hiện thấy đột biến trên bệnh nhân Wilson Việt Nam, tuy nhiên với 28 kiểu đột biến được phát hiện cũng phần nào cho thấy đột biến gây bệnh Wilson ở quần thể người Việt Nam đa dạng về kiểu gen. Có thể còn một số những kiểu đột biến khác mà trong giới hạn của nghiên cứu chưa tìm thấy, cần có một nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn và trên nhiều vùng địa lý khác nhau mới có thể trả lời câu hỏi này. Kết quả cũng chỉ ra rằng 12 đột biến tìm thấy trên các bệnh nhân Wilson ở nhóm nghiên cứu khi đối chiếu với Genbank và các công bố trước đây thì chưa tìm thấy có công bố nào chính thức phát hiện ra các đột biến này. Các đột biến này đều ở những bệnh nhân có các đặc điểm lâm sàng của bệnh Wilson rất điển hình. Để kết luận chắc chắn liệu đây có phải thực sự là đột biến gây bệnh cho bệnh nhân Wilson chúng tôi cần so sánh với nhóm chúng ở một cỡ mẫu đủ lớn và nghiên cứu ở mức độ *in vitro* để đánh giá khả năng ảnh hưởng của các đột biến này với quá trình phiên mã gen. Tuy nhiên do thời gian và kinh phí nghiên cứu hạn hẹp nên nhóm nghiên cứu chưa triển khai được. Để kết luận chính xác liệu đây có phải thực sự là đột biến mới trên bệnh nhân Wilson Việt Nam chúng tôi cần có những nghiên cứu tiếp theo.

## KẾT LUẬN

### **1. Xác định đột biến gen trên bệnh nhân Wilson**

48/61 (78,6%) bệnh nhân Wilson được phát hiện có đột biến gen ATP7B và 13/61 (21,4%) bệnh nhân không phát hiện thấy đột biến gen ATP7B.

Đột biến sai nghĩa chiếm tỉ lệ cao nhất (56,7%), tiếp theo là đột biến ở vùng 5'UTR chiếm tỉ lệ 22%, đột biến thêm nucleotid và đột biến tạo mã kết thúc sớm chiếm tỉ lệ thấp hơn với 11,8% và 7%, đột biến ở vùng intron chiếm tỉ lệ thấp nhất (2%).

### **2. Đã thiết lập thành công bản đồ đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson Việt Nam**

Bước đầu đã thiết lập thành công bản đồ đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson Việt Nam với 28 dạng đột biến gen phân bố trên 13 exon của gen ATP7B, trong đó đột biến ở vùng exon 3, exon 10 chiếm tỉ lệ cao nhất, tiếp theo là ở vùng exon 1, exon 2, exon 16 và exon 8 chiếm tỉ lệ thấp hơn.

## KIẾN NGHỊ

Bệnh Wilson thường được phát hiện muộn. Rất nhiều triệu chứng của bệnh gây nên những chẩn đoán khác nhau. Chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây bệnh, góp phần vào chẩn đoán sớm điều trị sớm, giảm kinh phí cho gia đình người bệnh cũng như gánh nặng của xã hội. Do đó chúng tôi xin có một số kiến nghị như sau:

1. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về đột biến gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson.
2. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về người mang gen bệnh Wilson.
3. Tư vấn di truyền trước hôn nhân và chẩn đoán trước sinh cho những bà mẹ có nguy cơ sinh con bị bệnh trong quá trình mang thai.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Phan Tôn Hoàng, Trần Huy Thịnh, Tạ Thành Văn, Lê Văn Hưng, Nguyễn Ngọc Hùng, Nguyễn Đức Hình, Trần Văn Khánh, (2014). Phát hiện đột biến gen ATP7B trên gia đình bệnh nhân Wilson. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, **5 (91)**, 30-34.
2. Phan Tôn Hoàng, Trần Huy Thịnh, Phạm Lê Anh Tuấn, Nguyễn Ngọc Hùng, Nguyễn Đức Hình, Tạ Thành Văn, Trần Văn Khánh (2014). Bước đầu nghiên cứu phát hiện đột biến gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson. *Tạp chí Y học Việt Nam*, **1 (10)**, 102 - 104.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thái Duy Thành (2005). *Nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh Wilson tại khoa thần kinh Bệnh viện Bạch Mai từ 2002-2005*. Luận văn Bác sĩ nội trú bệnh viện.
2. Nguyễn Quách Thu Thủy (2006). *Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng bệnh Wilson ở trẻ em tại Viện Nhi Quốc gia*. Luận văn Bác sĩ chuyên khoa cấp II.
3. Frydman M., Bonn - Tarmir B., Frarrer LA., Conneally PM., MagazanikA., Ashbel S., Goldwitch Z (1985). Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus. *Proc. Nat.Acad.sci.* **82**,1819-1821.
4. Diaz J., Acosta F., Canizares FA., et al (1995). Does orthotopic liver transplantation normalize copper metabolism in patients with Wilson's disease. *Transplant Proc:* **27** (4), 2306.
5. Kiss JE., Berman D., Van Thiel (1998). Defective removal of copper by plasma exchange in fulminant Wilson's disease. *Transfusion*, **38**(4), 327-321.
6. Lê Đức Hình (1989 - 1990). Một số đặc điểm bệnh Wilson ở Việt Nam. *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học.* **3**, 316-334.
7. Lê Đức Hình (2006). Đặc điểm lâm sàng của bệnh Wilson ở Việt Nam.
8. Negah Fatemi and Bibudhendra Sarkar (2002). Molecular Mechansm of Copper Transport in Wilson Disease. *Environ Health Perspect.* **110**, 695-698.
9. Bùi Quốc Hương, Nguyễn Nhật Thông, Nguyễn Ngọc Quang (1970). 8 trường hợp bệnh thoái hóa gan – nhân đậu ở Việt Nam. **25**, 1147.

10. Jonh H. Menkes (1980). Text book of Child Neurology. *Second edition*, 80-86.
11. Martins DC., Baldwin D., Portmann B., Lolin Y. (1992). Value of urinary copper excretion after penicillamin challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology*. **15**(4), 609-615.
12. J.D Gitlin (2003). Wilson disease. *Gastroenterology*. **125**, 1868-1877.
13. Scheinberg IH Jaffe ME., Sternlieb I. (1987). The use of trientine in preventing the effects of interrupting penicillamine therapy in Wilson's disease. *N Engl J Med*. **317**, 209-213.
14. Sternlieb I., Scheinberg IH. (1968). Prevention of Wilson's disease in asymptomatic patients. *N Engl J Med*. **278**, 352-359.
15. Hsi G, Cullen LM, Macintyre G, et al (2008). Sequence variation in the ATP-binding domain of the Wilson disease transporter, ATP7B, affects copper transport in a yeast model system. *Human mutation*. **29**, 491-501.
16. Hsi G, Cullen LM, Moira Glerum D, et al (2004). Functional assessment of the carboxy-terminus of the Wilson disease copper-transporting ATPase, ATP7B. *Genomics*. **83**, 473-481.
17. Owada M, Suzuki K, Fukushi M, et al (2002). Mass screening for Wilson's disease by measuring urinary holoceruloplasmin. *The Journal of pediatrics*. **140**, 614-616.
18. Chu Văn Tường, Lê Văn Thiêng, Nguyễn Thị Hiền, Lê Thu Phương, Nguyễn Thị Vân (1975 – 1979). Bệnh Wilson ở trẻ em (qua hai trường hợp). *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học*, Viện bảo vệ sức khỏe trẻ em.
19. Lisa Prat Davies, Georgina Macintyre, DianeW.Cox. (2006). New Mutations in the Wilson Disease Gene, ATP7B. Implications for Molecular Testing. *Genetic testing*. **12** (1).



20. Thomas GR, Bull PC., Roberts EA., Walshe JM., Cox DW. (1994). Halotype studies in Wilson's disease. *Am. J. Hum Genet.* **54**,71-78.
21. Ray K, Gupta A. (2008). Gene symbol: ATP7B. Disease: Wilson disease. *Human genetics.* **124**, 297.
22. Thomas GR, Jensson O, Gudmundsson G, et al (1995). Wilson disease in Iceland: a clinical and genetic study. *American journal of human genetics.* **56**, 1140-1146.
23. Sternlieb I.(1978). Diagnosis of Wilson's disease. *Gastroenterology.* 774-787.
24. Yang J, Chan P.(2005). Gene symbol: ATP7B. Disease: Wilson's disease. *Human genetics.* 118, 539.
25. Balakrishnan P, Kabra M, Arora NK, et al (2007). Gene symbol: ATP7B. *Human genetics.* **120**, 917.
26. Brage A, Tome S, Garcia A, et al (2007). Clinical and molecular characterization of Wilson disease in Spanish patients. *Hepatol Res.* **37**, 18-26.
27. Ohya K, Abo W, Tamaki H, et al (2002). Presymptomatic diagnosis of Wilson disease associated with a novel mutation of the ATP7B gene. *European journal of pediatrics.* **161**,124-126.
28. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, et al (1997). Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *American journal of human genetics.* **61**, 317-328.
29. Tanzi RE., Petrukhin K., Chernov I., et al (1993). The Wilson's disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes' disease gene. *Nat Genet.* **5**, 344-348.

30. Eapen CE, Santhosh S, Shaji RV, et al (2004). Gene symbol: ATP7B. Disease: Wilson's disease. *Human genetics*. **114**, 606.
31. Kucinskas L, Jeroch J, Vitkauskiene A, et al (2008). High frequency of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation in ATP7B gene of Lithuanian patients with hepatic presentation of Wilson's disease. *World J Gastroenterol*. **14**, 5876-5879.
32. Mochizuki H., Kamakura K., Masaki T., et al (1997). Atypical MRI features of Wilson's disease: high signal in globus pallidum on T1-Weighted images. *Neuroradiology*. **39**(3), 171-174.
33. Hitoshi S., Iwata M., Yoshikawa K. (1991). Mid- brain pathology of Wilson's disease: MRI analysis of three cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **54**, 624-626.
34. Brewer GJ., Yusbasiyan - Gurkan V., et al (1993). Does a vegetarian diet control Wilson's disease. *J Am Coll Neurol*. **12**, 527-530.
35. Anderson LA., Hakojarvi SL., Boudreaux SK (1998). Zinc acetate treatment in Wilson's disease *Ann Pharmacother*. **32**, 78-80.
36. Brewer GJ., Terry CA., Aisen AM., Hill GM (1987). Worsening of neurological syndrome in patients with Wilson's disease with initial penicillamin therapy. *Arch Neurol*. **44**, 490-493.
37. Brewer GJ., Yusbasiyan – Gurkan V., Tankanow R., Young AB., Kluin KJ (1991). Initial therapy of patients with Wilson's disease with tetrathiomolybdate. *Arch Neurol*. **48**, 42-47.
38. Brewer GJ., Dick RD., Jonhson VD., Fink JK., Kluin KJ., Daniel S. (2001). Treatment of Wilson's disease with Zinc: treatment during the pediatric years. *Jlab Clin Med*. **1973**, 191-198.
39. Sundaresan S, Eapen CE, Shaji RV, et al (2007). Screening for mutations in ATP7B gene using conformation-sensitive gel electrophoresis in a family with Wilson's disease. *Med Sci Monit*. **13**, 38-40.

40. Bull PC., Thomas GR., Romens JM., Forbes JR., Cox DW (1993). The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet.* **5**, 327-337.
41. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW (1995). The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Gene.* **9**, 210-217.
42. Xiao - Qing Liu, Ya - Fen Zhang, Tze - Tze Liu, Kwang - Jen Hsiao, Jian - Ming Zang, Xue - Fan Gu, Ke - Rong Bao, Li - Hua Yu, Mei - Xian Wang (2004). Corelation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World J Gastroenterol.* **10**(4), 590-593.
43. Shah AB, Chernov I. Zjang HT, Ross B, Das K etal (1997). Identification and analysis of mutations in the Wilson diseasegene (ATP7B): population frequencies. Genotype-pheno-type correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet.* **61**, 317-328.
44. Gupta A, Aikath D, Neogi R, et al (2005). Molecular pathogenesis of Wilson disease: haplotype analysis, detection of prevalent mutations and genotype-phenotype correlation in Indian patients. *Human genetics.* **118**, 49-57.
45. Rahil Shah MD. (2007). Structure and Funtion of ATPase with Wilson's disease. [www.emedicine.com/med/topic 2413.htm](http://www.emedicine.com/med/topic 2413.htm).
46. Forbes JR, Cox DW (2000). Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Human molecular genetics*, 9:1927-1935.
47. Ray K, Gupta A (2005). Gene symbol: ATP7B. Disease: Wilson's disease. *Human genetics.* **118**, 541.
48. Lei Wan, Chang - Hai Tsai, Yuhsin Tsai, Chin - Moo Hsu, Cheng - Chun Lee (2006). Mutation analysis of Taiwanese Wilson disease patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **345**, 734-738.

49. Kim EK., Yoo OJ., Song KY., Yoo HW., Choi SY., Cho SW., Hahn SH (1998). Identification of three novel mutations and a high frequency of the Arg778-to-Leu mutation in Korean patients with Wilson's disease. *Hum. Mutat.* **11**, 275-278.
50. Deguti MM, Genschel J, Cancado EL, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, Prota G, Lochs H, Carrilho FJ, Schmidt HH (2004). Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat.* **398**, 1-8.
51. Curtis D, Durkie M. A study of Wilson disease mutations in Britain (1999). *Hum Mutat.* **14**, 04-11.
52. Peter Ferenci (2006). Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet.* **120**, 151-159.
53. T. Maier Dobersberger MD., Peter Ferenci MD., Claudia Polli, Pauline Balac PhD, Hans Peter Dienes MD. (1997). Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction. *Pubmed ID.127*(1), 21-26.
54. Cox DW, Prat L, Walshe JM, et al (2005). Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly European ancestry. *Human mutation.* **26**, 280.
55. Morgan CT, Tsivkovskii R, Kosinsky YA, et al (2004). The distinct functional properties of the nucleotide-binding domain of ATP7B, the human copper-transporting ATPase: analysis of the Wilson disease mutations E1064A, H1069Q, R1151H, and C1104F. *The Journal of biological chemistry.* **279**, 36363-36371.

56. Mak CM, Lam CW, Tam S, et al (2008). Mutational analysis of 65 Wilson disease patients in Hong Kong Chinese: identification of 17 novel mutations and its genetic heterogeneity. *Journal of human genetics*. **53**, 55-63.
57. Karunas AS, Mersiianova IV, Poliakov AV, et al (2000). Analysis of mutations and haplotypes of polymorphic markers in patients with Wilson-Konovalov disease from Bashkir. *Genetika*. **36**, 972-979.
58. Kok KF, Hoevenaars B, Waanders E, et al (2008). Value of molecular analysis of Wilson's disease in the absence of tissue copper deposits: a novel ATP7B mutation in an adult patient. *The Netherlands journal of medicine*. **66**, 348-350.
59. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Figus A, Lilliu F, De Virgiliis S, Nurchi AM, Deplano A, Moi P, Pirastu M, Cao A (1999). Molecular characterization of Wilson disease in the Sardinian population - evidence of an founder effect. *Hum Mutat*. **14**, 294-303.
60. Chuang LM, Wu HP, Jang MH, et al (1996). High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease. *Journal of medical genetics*. **33**, 521-523.
61. Tsai CH, Tsai FJ, Wu JY, et al (1998). Mutation analysis of Wilson disease in Taiwan and description of six new mutations. *Human mutation*. **12**, 370 - 376.
62. Wu ZY, Wang N, Lin MT, et al (2001). Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in chinese patients with Wilson disease. *Archives of neurology*. **58**, 971-976.

63. Xu P, Liang X, Jankovic J, et al (2001). Identification of a high frequency of mutation at exon 8 of the ATP7B gene in a Chinese population with Wilson disease by fluorescent PCR. *Archives of neurology*. **58**, 1879-1882.
64. Kumar S, Thapa BR, Kaur G, et al (2005). Identification and molecular characterization of 18 novel mutations in the ATP7B gene from Indian Wilson disease patients: genotype. *Clinical genetics*. **67**, 443-445.
65. Kumar S, Thapa BR, Kaur G, et al (2006). Familial gene analysis for Wilson disease from north-west Indian patients. *Annals of human biology*. **33**, 177-186.
66. Santhosh S, Shaji RV, Eapen CE, et al (2006). ATP7B mutations in families in a predominantly Southern Indian cohort of Wilson's disease patients. *Indian J Gastroenterol*. **25**, 277-282
67. Santhosh S, Shaji RV, Eapen CE, et al (2008). Genotype phenotype correlation in Wilson's disease within families-a report on four south Indian families. *World J Gastroenterol*. **14**, 4672-4676.
68. Prella M, Baccala R, Horisberger JD, et al (2001). Haemolytic onset of Wilson disease in a patient with homozygous truncation of ATP7B at Arg1319. *British journal of haematology*. **114**, 230-232.
69. Chappuis P, Callebert J, Quignon V, et al (2007). Late neurological presentations of Wilson disease patients in French population and identification of 8 novel mutations in the ATP7B gene. *J Trace Elem Med Biol*. **21**, 37-42.
70. Panagiotakaki E, Tzetis M, Manolaki N, et al (2004). Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *American journal of medical genetics*. **131**, 168-173.

71. Lepori MB, Lovicu M, Dessi V, et al (2007). Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly Italian origin. *Genetic testing*. **11**, 328-332.
72. Genschel J, Sommer G, Haas R, et al (2000). Three novel mutations, c314C>A, C778insC, and c1285+2T>A, in exon 2 of the Wilson disease gene. *Human mutation*. **16**, 278.
73. Cullen LM, Prat L, Cox DW (2003). Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson disease. *Clinical genetics*. **64**, 429-432.
74. Fan Y, Yu L, Han Y, et al (2004). Identification of three novel insertion/deletion mutations in Wilson disease's gene. *Biochemical genetics*. **42**, 377-384.
75. Loudianos G, Lovicu M, Solinas P, et al (2000). Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and the identification of six novel mutations. *Genetic testing*. **4**, 399-402.
76. Orru S, Thomas G, Loizedda A, et al (1997). 24 bp deletion and Ala1278 to Val mutation of the ATP7B gene in a Sardinian family with Wilson disease. *Human mutation*. **10**, 84-85.
77. Shimizu N, Kawase C, Nakazono H, et al (1995). A novel RNA splicing mutation in Japanese patients with Wilson disease. *Biochemical and biophysical research communications*. **217**, 16-20.
78. Kusuda Y, Hamaguchi K, Mori T, et al (2000). Novel mutations of the ATP7B gene in Japanese patients with Wilson disease. *Journal of human genetics*. **45**, 86-91.
79. Yoo HW (2002). Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human ATP7B gene of Korean patients with Wilson disease. *Genet Med*. **4**, 43-48.

80. Park S, Park JY, Kim GH, et al (2007). Identification of novel ATP7B gene mutations and their functional roles in Korean patients with Wilson disease. *Human mutation*. **28**, 1108-1113.
81. Choi JS, Lee JH, Ki CS (2006). A Korean family with Wilson disease occurred in two consecutive generations. *The Korean journal of laboratory medicine*. **26**, 449-453.
82. Lee CC, Wu JY, Tsai FJ, et al (2000). Molecular analysis of Wilson disease in Taiwan: identification of one novel mutation and evidence of haplotype-mutation association. *Journal of human genetics*. **45**, 275-279.
83. Đỗ Ngọc Hải, Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn và CS (2009). Nghiên cứu đột biến mất đoạn gen Dystrophin ở mức độ mRNA trên bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. **61**(2), 18-23.
84. Nguyễn Thị Băng Sương, Trần Văn Khánh, Nguyễn Thị Hà, Tạ Thành Văn (2008). Phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng phương pháp PCR định lượng. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. **59**, 1-10.
85. Sundaresan S, Eapen CE, Shaji RV, Chandy M, et al (2007). Screening for mutations in ATP7B gene using conformation-sensitive gel electrophoresis in a family with Wilson's disease. *Med Sci Monit*. **13**(3), 38-40
86. Tạ Thành Văn, Hồ Cẩm Tú, Tạ Minh Hiếu, Trần Văn Khánh (2011). Xây dựng quy trình phát hiện đột biến Gen ATP7B gây bệnh Wilson. *Tạp chí nghiên cứu y học* **3**.
87. Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M et al (1993). Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* **5**, 338-343.



88. Yamaguchi A, Okada T, Shiono Y, Hayashi H, et al (2000). Mutational analysis of ATP7B and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Human mutation*. **15**, 454-462.
89. Gu YH, Kodama H, Du SL, et al (2003). Mutation spectrum and polymorphisms in ATP7B identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease. *Clinical genetics*. **64**, 479-484.
90. Davies LP, Macintyre G, Cox DW (2008). New mutations in the Wilson disease gene, ATP7B: implications for molecular testing. *Genetic testing*. **12**, 139-145.
91. Cater MA, La Fontaine S, Shield K, et al (2006). ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion. *Gastroenterology*. **130**, 493-506.
92. Hayashi H, Wakusawa S, Yano M, et al (2007). Genetic background of Japanese patients with adult-onset storage diseases in the liver. *Hepatol Res*. **37**, 777-783.
93. Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, et al (2005). Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Molecular genetics and metabolism*. **86**, 277-285.
94. Gupta A, Maulik M, Nasipuri P, et al (2007). Molecular diagnosis of Wilson disease using prevalent mutations and informative single-nucleotide polymorphism markers. *Clinical chemistry*. **53**, 1601-1608.
95. Margarit E, Bach V, Gomez D, et al (2005). Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population - identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clinical genetics*. **68**, 61-68.

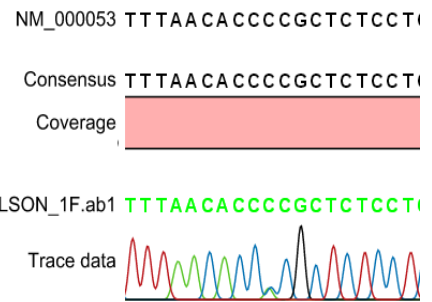
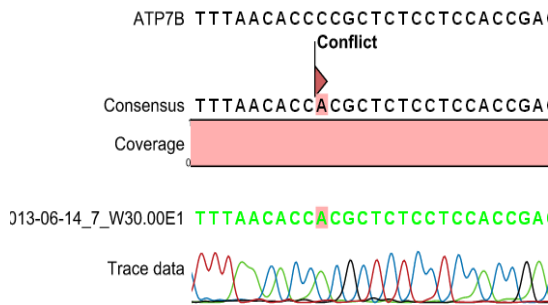
96. Caprai S, Loudianos G, Massei F, et al (2006). Direct diagnosis of Wilson disease by molecular genetics. *The Journal of pediatrics*. **148**, 138-140.
97. Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elsobky E, et al (2008). Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *Journal of human genetics*.
98. Nanji MS, Nguyen VT, Kawasoe JH, et al (1997). Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease. *American journal of human genetics*. **60**, 1423-1429.
99. Todorov T, Savov A, Jelev H, et al (2005). Spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B) in the Bulgarian population. *Clinical genetics*. **68**, 474-476.
100. Folhoffer A, Ferenci P, Csak T, et al (2007). Novel mutations of the ATP7B gene among 109 Hungarian patients with Wilson's disease. *European journal of gastroenterology & hepatology*. **19**, 105-111.
101. Yamaguchi A, Okada T, Shiono Y, Hayashi H, et al (2000). Mutational analysis of ATP7B and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Human mutation*. **15**, 454-462.

# PHỤ LỤC

## Hình ảnh giải trình gen ATP7B của bệnh nhân Wilson so sánh trên Genebank và người bình thường

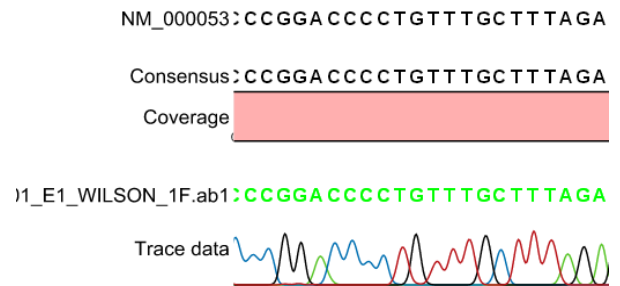
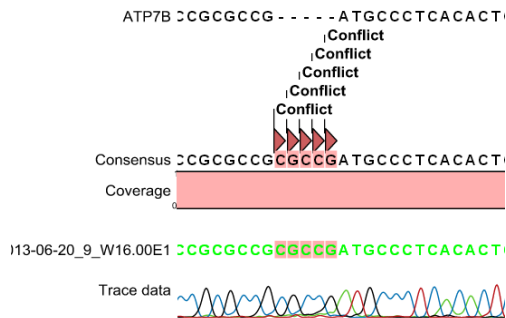
5 UTR 75C>A

người bình thường



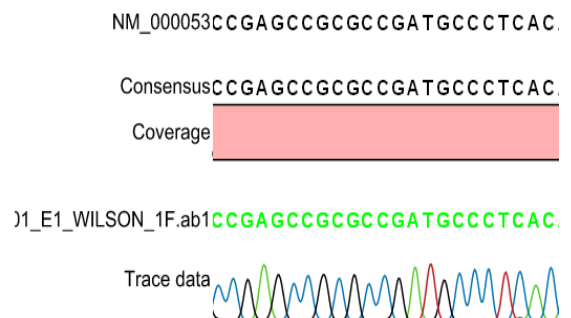
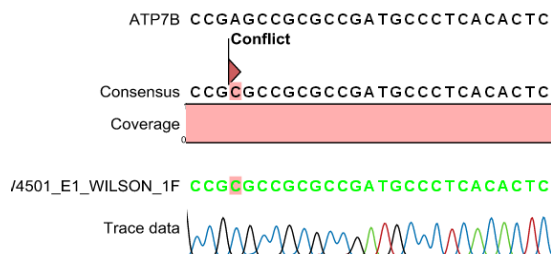
5 UTR 118 117 ins

Người bình thường

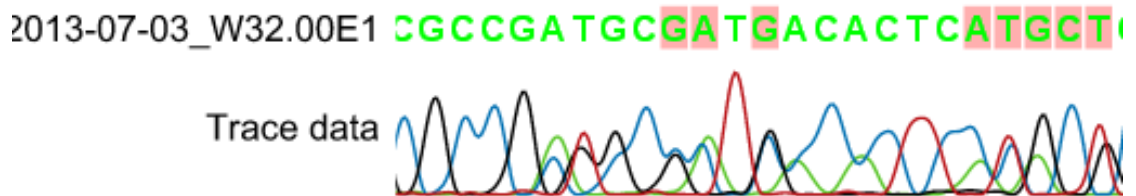
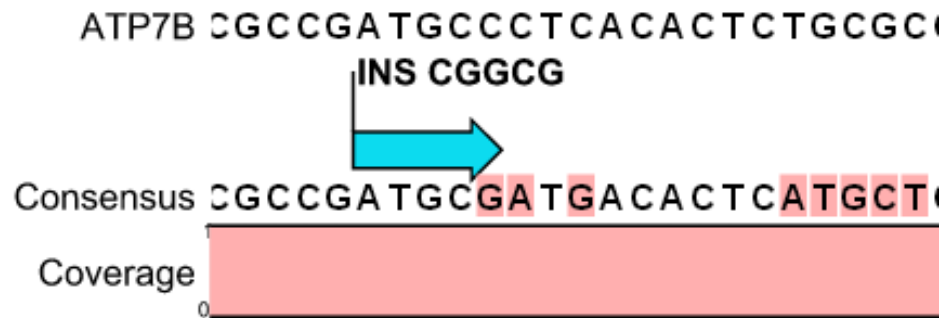


5UTR 128 A>C

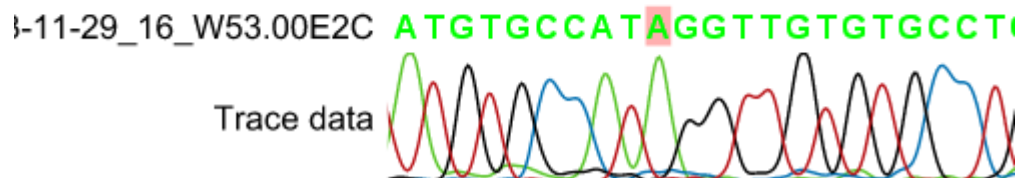
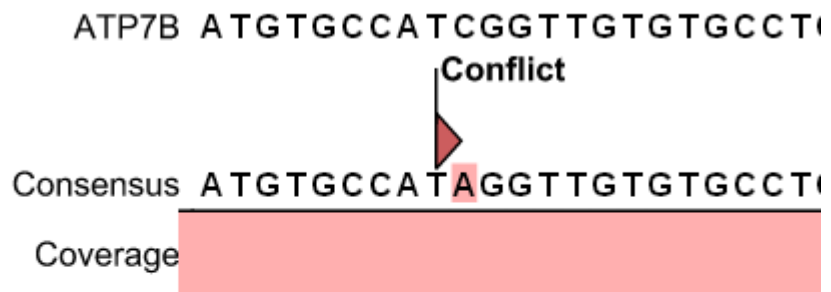
người bình thường



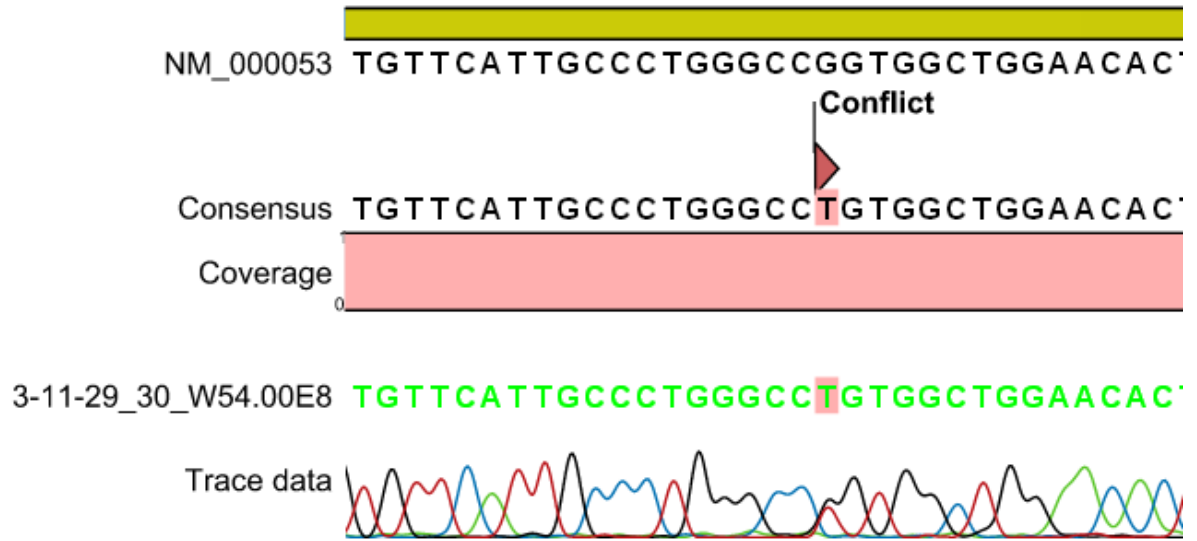
E1 47 48 INS CGGCG



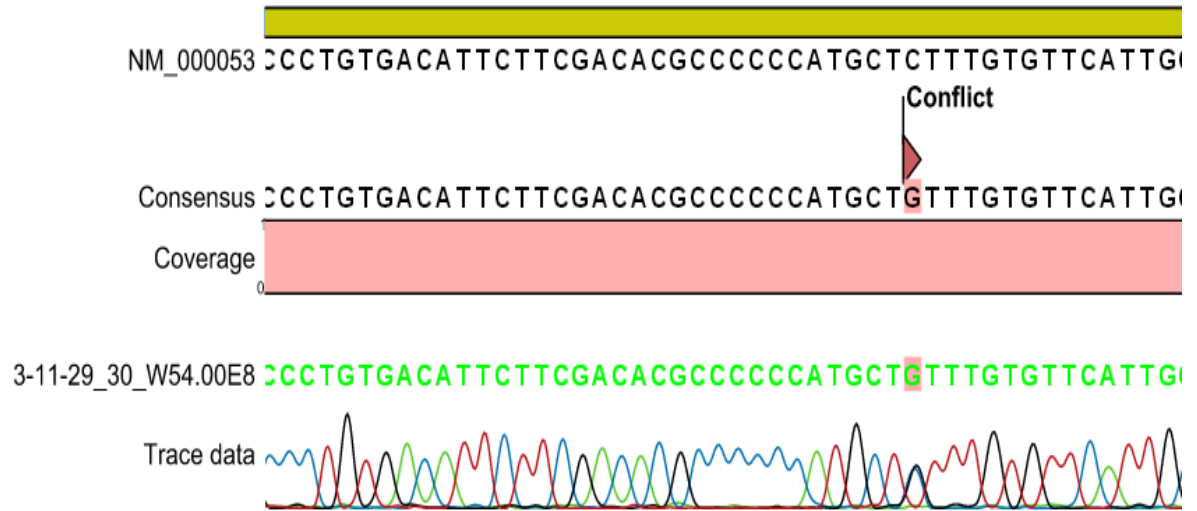
E2 STOP CODON 471 C > A



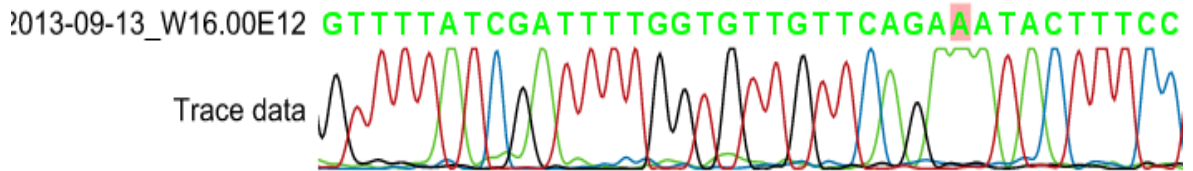
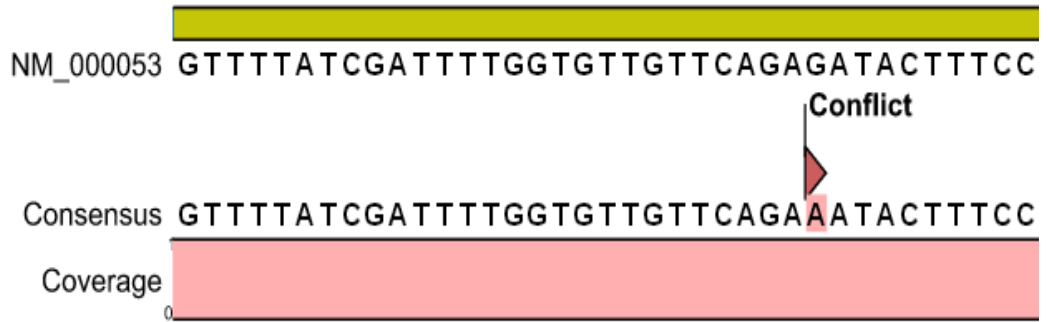
E8 778 G> T



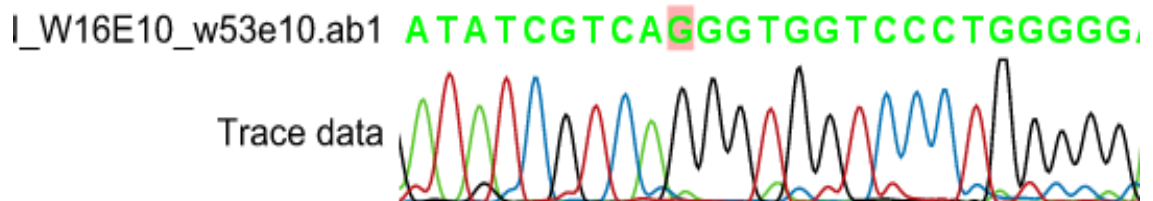
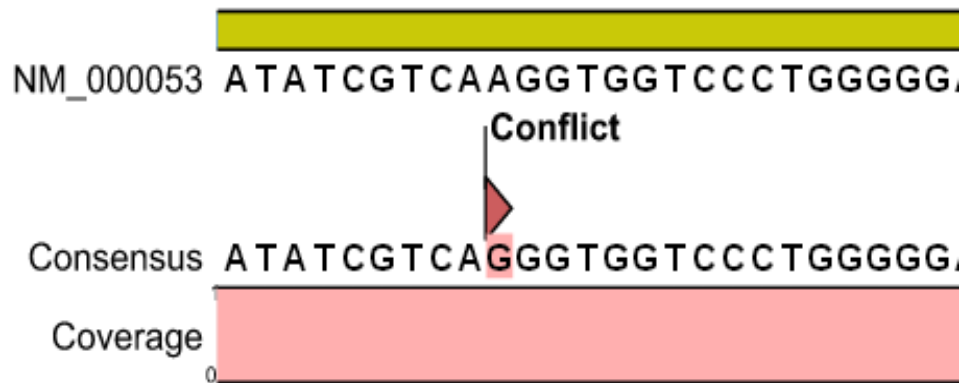
E8 R778L C> G



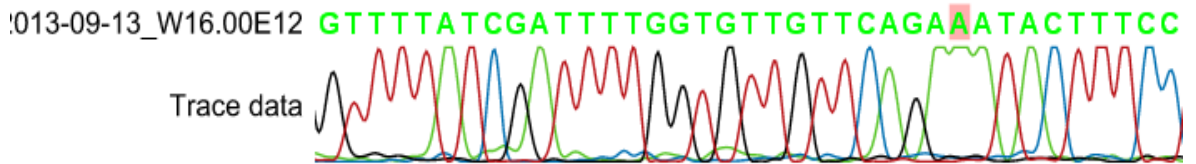
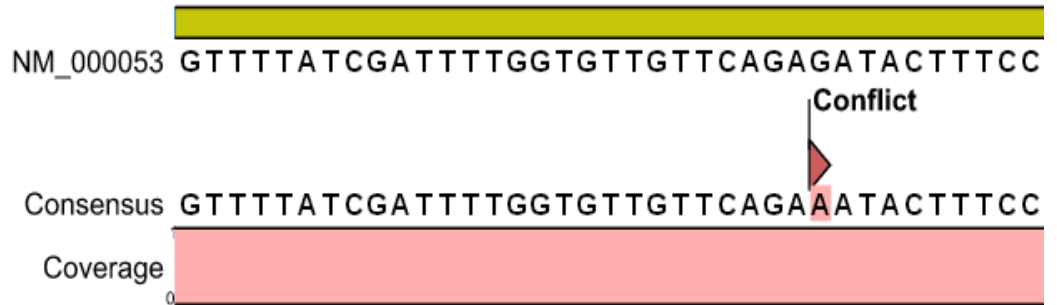
E12 R952K G> A



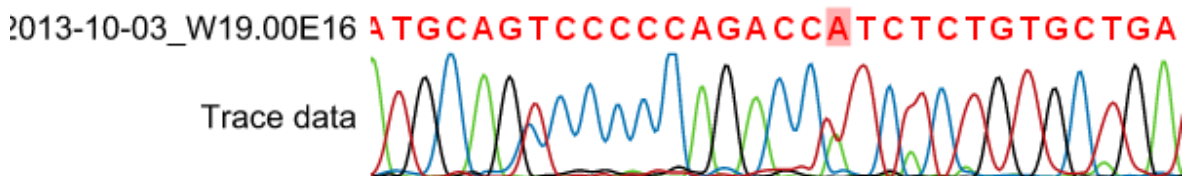
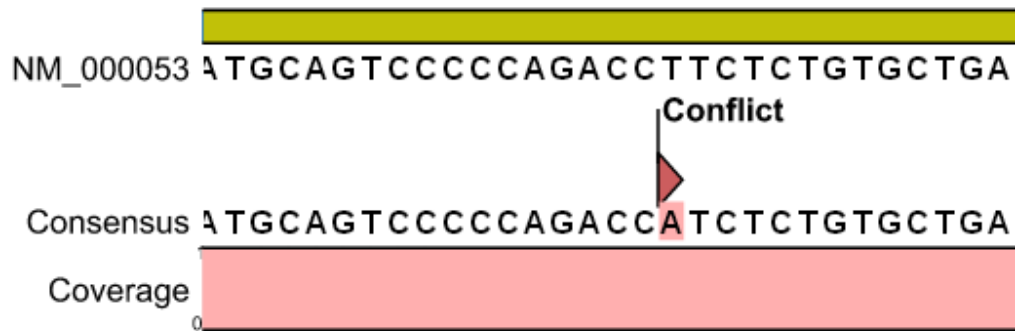
E10 K832R A >G



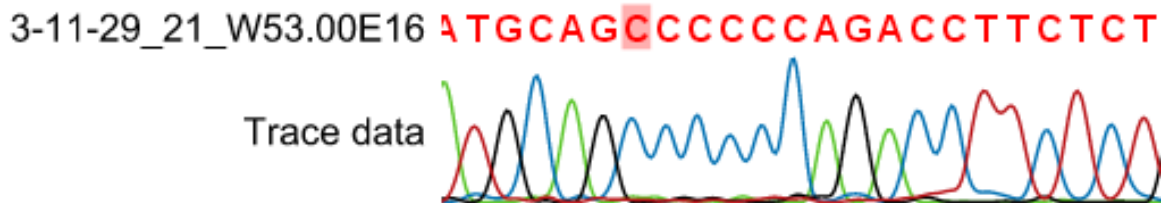
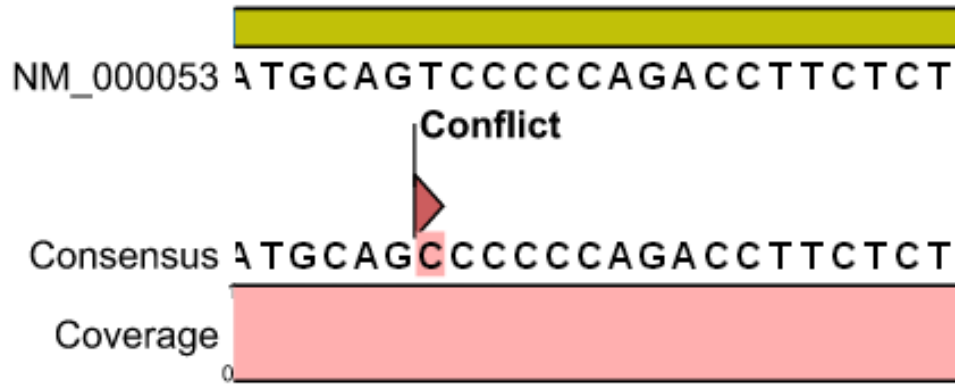
E12 R952K G> A



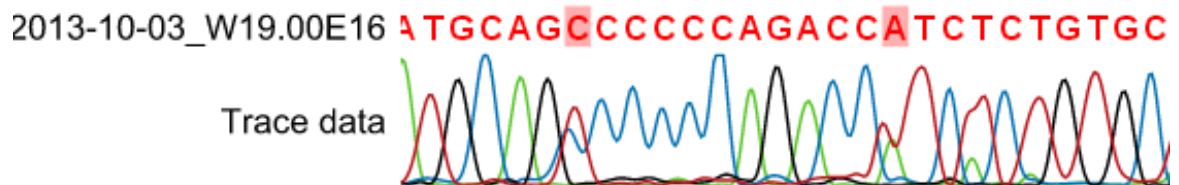
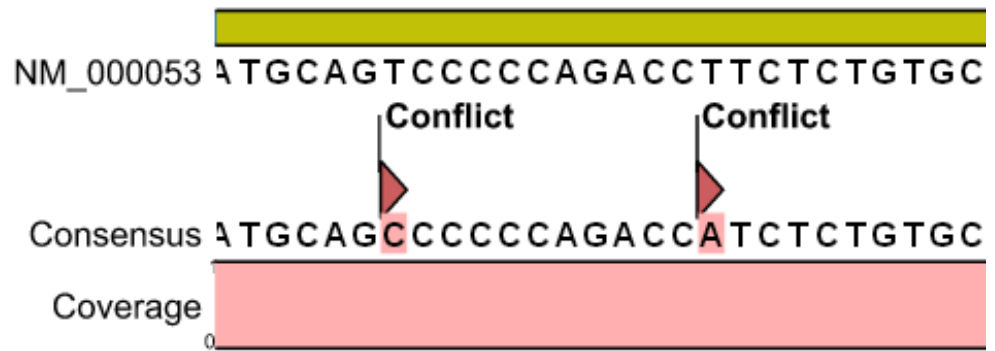
E16 F1144I T> A



E16 I1148L T> C

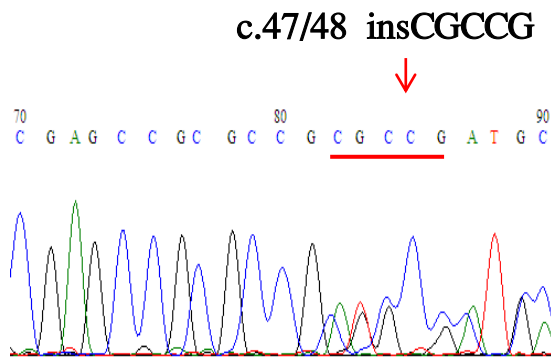
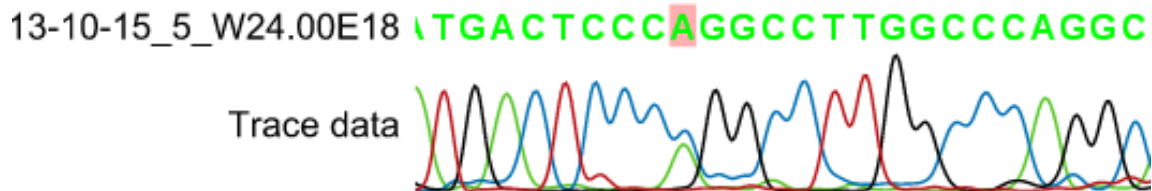
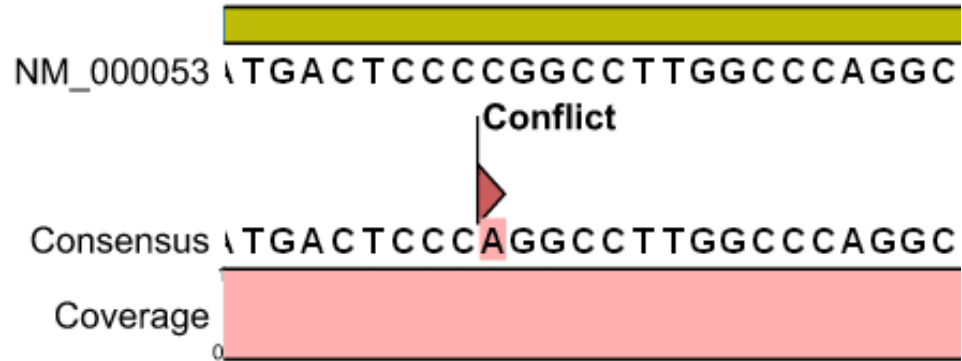


E16 V1140A T> C

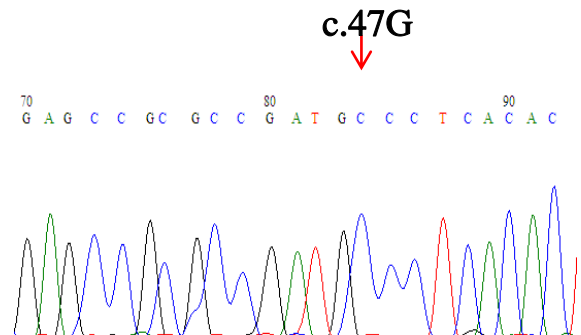




E18 F1240I C> A



*Bệnh nhân mã số W7.00*

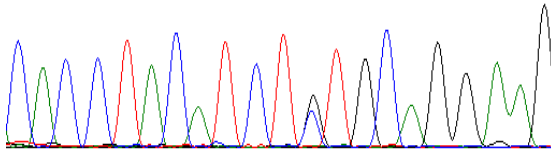


*Người bình thường*

**c. 1523G >C**  
**p.Val456Leu**



C A C C T A C A T C T C T G C A G G A A G

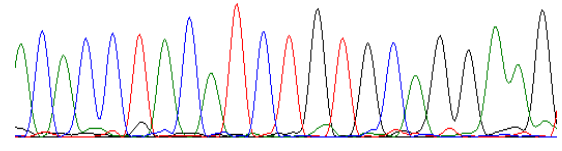


*Bệnh nhân mã số W7.00*

**c.1523G**  
**p.Val456**



A C A C C T A C A T C T G T G C A G G A A G

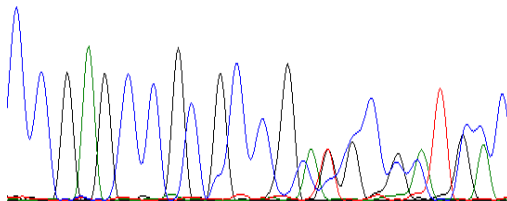


*Người bình thường*

**c.47/48 insCGCCG**



70 C C G A G C C G C G C C G C G C C G A T G C C 90

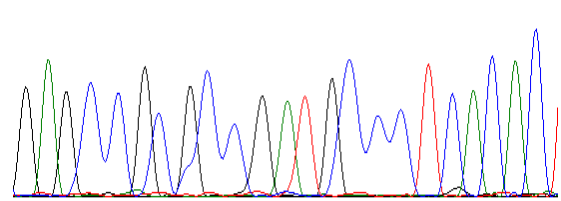


*Bệnh nhân mã số w.500*

**c.47G**



70 G A G C C G C G C C G A T G C C C T C A C A C 90

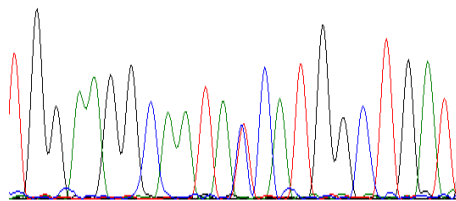


*Người bình thường*

**c. 2706C >T**  
**p.T850I**



150 T G G A A G G C A A T A T C A T G G C T G A T 160

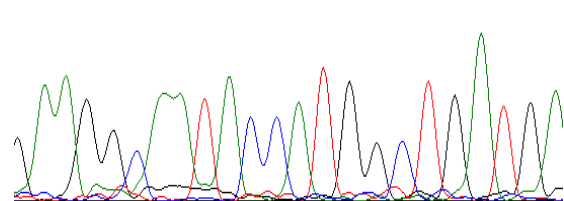


*Bệnh nhân mã số W5.00*

**c. 2706C**  
**p.T850I**



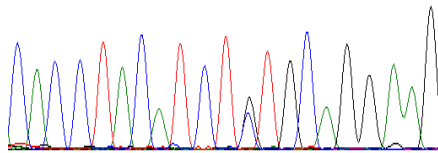
G A A G G C A A T A C C A T G G C T G A T G A 170



*Người bình thường*

**c. 1523G >C**  
**p.V456L**

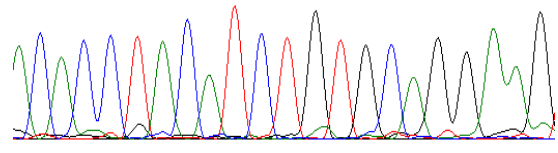
C A C C T A C A T C T C T G C A G G A A G



*Bệnh nhân mã số W5.00*

**c. 1523G**  
**p.V456L**

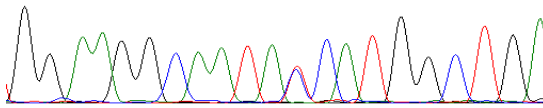
A C A C C T A C A T C T G T G C A G G A A G



*Người bình thường*

**c. 2627C >T**  
**p.T850I**

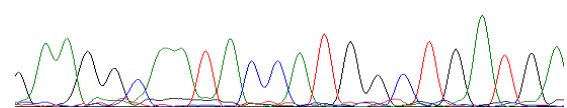
G G A A G G C A A T A T C A T G G C T G A



*Bệnh nhân mã số W6.00*

**c. 2627C**  
**p.T850I**

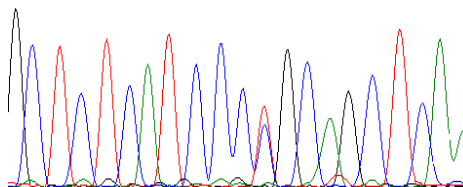
G A A G G C A A T A C C A T G G C T G A T G A



*Người bình thường*

**c. 4112T >C**  
**p.L1371P**

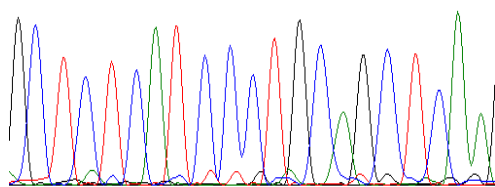
G C T C T C A T C C C C G C A G C T C A A



*Bệnh nhân mã số W6.00*

**c. 4112T**  
**p.L1371P**

G C T C T C A T C C C T G C A G C T C A A



*Người bình thường*

## DANH SÁCH BỆNH NHÂN WILSON

STT	Mã số	Họ và tên	Giới	Tuổi	Ngày đến
1	W1	Trần Quốc V.	Nam	12	5/2011
2	W2	Trần Quốc H.	Nam	2	5/2011
3	W3	Ngô Tiến C.	Nam	14	25/6/2011
4	W4	Đỗ Văn Y.	Nam	14	6/7/2011
5	W5	Vũ Sơn H.	Nam	28	17/8/2011
6	W6	Nguyễn Văn L.	Nam	22	17/9/2011
7	W7	Nguyễn Thị H.	Nữ	47	9/10/2011
8	W8	Tổng Thị Hiền N.	Nữ	10	9/12/2012
9	W9	Nguyễn Thành T.	Nam	8	20/12/2012
10	W10	Trịnh Huy H.	Nam	8	17/02/2012
11	W11	Đặng Văn Đ.	Nam	11	11/4/2012
12	W12	Nguyễn Thị T.	Nữ	16	12/4/2012
13	W13	Nguyễn Đăng T.	Nam	13	23/4/2012
14	W14	Lê Khánh H.	Nam	27	23/4/2012
15	W15	Nguyễn Thị T. T.	Nữ	15	3/7/2012
16	W16	Lương Thị Tr.	Nữ	15	04/09/2012
17	W17	Nguyễn Tuấn Đ.	Nam	9	26/10/2012
18	W18	Nguyễn Thị Hồng N.	Nữ	16	9/11/2012
19	W19	Hà Văn M.	Nam	21	1/3/2013
20	W20	Phùng Thị. Tr.	Nam	12	5/2013
21	W21	Đỗ Anh T.	Nam	8	5/2013
22	W22	Hà Minh T.	Nam	10	5/2013
23	W23	Nguyễn Hồng H.	Nữ	14	5/2013
24	W24	Đặng Nam K.	Nam	12	5/2013
25	W25	Dương Đình L.	Nam	11	5/2013
26	W26	Nguyễn Hồng Q.	Nam	14	5/2013

27	W27	Vũ Văn Đ.	Nam	12	5/2013
28	W28	Hoàng Tuấn H.	Nam	11	5/2013
29	W29	Phạm Lê Mai L.	Nữ	14	7/2013
30	W30	Trần Hoài N.	Nam	13	28/3/2013
31	W31	Nguyễn Văn Q.	Nam	12	15/5/2013
32	W32	Trần Thị Kim T.	Nữ	9	17/5/2013
33	W33	Lê Thị Ngọc T.	Nữ	12	23/6/2013
34	W34	Tiền T.	Nam	12	16/7/2013
35	W35	Vanh K.	Nữ	14	8/9/2013
36	W36	Nguyễn Thế V.	Nam	14	12/9/2013
37	W37	Nguyễn Minh S.	Nam	12	6/2013
38	W38	Vũ Thanh Th.	Nam	11	6/2013
39	W39	Nguyễn Thị Th.	Nữ	12	6/2013
40	W40	Trần Văn Ngh.	Nam	16	6/2013
41	W41	Cán Hồng K.	Nữ	18	6/2013
42	W42	Nguyễn Thuỳ L.	Nữ	19	6/2013
43	W43	Nguyễn Văn Th.	Nam	21	6/2013
44	W44	Nguyễn Văn Th.	Nam	4	6/2013
45	W45	Nghiêm Mạnh T.	Nam	16	6/2013
46	W46	Nguyễn Đăng T.	Nam	16	6/2013
47	W47	Đỗ Thị Th.	Nữ	16	6/2013
48	W48	Nguyễn Thị Tr.	Nam	14	6/2013
49	W49	Đỗ Tuấn N.	Nam	15	6/2013
50	W50	Phạm Thị Ng.	Nữ	17	6/2013
51	W51	Trần Việt Đ.	Nam	16	6/2013
52	W52	Nguyễn Huy P.	Nam	17	6/2013

53	W53	Nghiêm Mạnh T.	Nam	24	1/11/2013
54	W54	Trần Quang B.	Nam	42	21/11/2013
55	W55	Chu Ngọc M.	Nam	7	1/2014
56	W56	Phạm Thị H.	Nữ	15	1/2014
57	W57	Nghiêm Đăng Quốc A.	Nam	10	4/2014
58	W58	Hoàng Phương Ph.	Nam	12	4/2014
59	W59	Ngô Duy Th.	Nam	26	4/2014
60	W60	Vũ Thị TH.	Nữ	15	5/2014
61	W61	Phùng Việt A.	Nam	12	5/2014

**Xác nhận của phòng  
NCKH**

**Xác nhận của Trung tâm  
Nghiên cứu Gen-Protein**

**Xác nhận của Giáo viên  
hướng dẫn**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**



**PHAN TÔN HOÀNG**

Nghi<sup>a</sup>n cứu ph<sub>1</sub>t hiện ®ét biõn gen  
ATP7B  
tr<sup>a</sup>n bõnh nh©n Wilson

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

HÀ NỘI - 2013

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

**PHAN TÔN HOÀNG**

Nghiên cứu phát hiện đột biến gen  
ATP7B  
trên bệnh nhân Wilson

Chuyên ngành : Hóa sinh y học

Mã số : 62720112

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Nguyễn Ngọc Hùng



## HÀ NỘI - 2015

### LỜI CẢM ƠN

Trước hết tôi xin bày tỏ lòng kính trọng, biết ơn sâu sắc đến PGS.TS Nguyễn Ngọc Hùng là người Thầy hướng dẫn khoa học, đã tận tình giúp đỡ và truyền đạt những kinh nghiệm quý báu và kiến thức để tôi có thể hoàn thành được luận án ngày hôm nay.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng, biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Tạ Thành Văn, Phó Hiệu trưởng, Trưởng Bộ môn Hóa sinh, Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội là người Thầy đã động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Trần Văn Khánh, Phó trưởng Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trưởng Bộ môn Bệnh học phân tử, Khoa Kỹ thuật Y học, Trường Đại học Y Hà Nội là người đã tận tình giúp đỡ, trực tiếp hướng dẫn thực hiện nghiên cứu, góp ý và sửa chữa để hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến:

PGS. TS. Nguyễn Thị Hà, nguyên Phó Hiệu trưởng, Trường Đại học Y Hà Nội  
PGS.TS. Phạm Thiện Ngọc, nguyên Trưởng Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong học tập và công tác.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến:

- Ban Giám Hiệu, Phòng đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Y Hà Nội
- Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội.

- Các nghiên cứu viên tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein.
- Ban Giám Đốc Bệnh viện Bạch Mai- Hà Nội.
- Ban Giám Đốc Bệnh Viện Thống Nhất- Thành phố Hồ Chí Minh.
- Cán bộ viên chức khoa Hóa sinh Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh Viện Thống Nhất.

Tôi Cũng bày tỏ lòng cảm ơn đến bệnh nhân và gia đình của các em đã giúp tôi có được những số liệu trong luận án này.

Xin cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp đã động viên giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình công tác và học tập.

Cuối cùng, tôi xin biết ơn công sinh thành, giáo dục và tình thương yêu của bố mẹ, con gái và các em trong gia đình, những người luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

*Hà Nội, ngày 10 tháng 9 năm 2015*

**Phan Tôn Hoàng**



## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Phan Tôn Hoàng, nghiên cứu sinh khóa 30 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Nguyễn Ngọc Hùng cùng với nhóm nghiên cứu của Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội và số liệu trong luận án là một phần trong đề tài cấp Bộ Y tế được thực hiện tại Trung tâm.
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 10 tháng 09 năm 2015*

**Người viết cam đoan**

**Phan Tôn Hoàng**

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ATP7B	: P-type ATPase
CS	: Cộng sự
dATP	: Deoxy adenosine triphosphate
dCTP	: Deoxy cytidine triphosphat
dGTP	: Deoxy guanosine triphosphat
dNTP	: Deoxy nucleotide triphosphat
dTTP	: Deoxy thymidine triphosphat
DNA	: Deoxyribo nucleic acid
ddNTP	: Dideoxy nucleotide triphosphat
DKTG D	: acid aspartic, K: Lysin, T: Threonin, G: Glycine
GDGXD N	G: glycine, D:aspartic acid, X: any codon NNN, N: asparagine
TGEA T	: threonine, G:glycine, E: glutamic acid, A: alanine
Kb	: Kilobase
kD	: Kilo daltol
MBSs	: Metal binding sites
pDHPLC	: Partially Denaturing High-Performance liquid chromatography
PRNP	: Prion protein
SNP	: Single nucleotid polymorphisms
5'UTR	: Untranslation Region (Vùng không dịch mã)
SSCP	: Single -Strand Conformation Polymorphism analysis ( <i>Phân tích cấu trúc đa hình thái chuỗi đơn</i> )
F	: Forward (mũi xuôi)
R	: Reverse (mũi ngược)
EDTA	: Ethylen diamine tetraacetic acid

# MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh Wilson .....	3
1.2. Sinh lý bệnh Wilson .....	4
1.3. Triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh Wilson .....	7
1.3.1. Triệu chứng lâm sàng ở giai đoạn đầu .....	7
1.3.2. Triệu chứng lâm sàng ở giai đoạn toàn phát .....	8
1.3.3. Các thể lâm sàng .....	11
1.3.4. Các chỉ số cận lâm sàng .....	11
1.4. Chẩn đoán bệnh .....	13
1.4.1. Chẩn đoán xác định .....	13
1.4.2. Chẩn đoán phân biệt .....	13
1.5. Di truyền học bệnh Wilson .....	14
1.6. Điều trị bệnh Wilson .....	15
1.6.1. Chế độ ăn uống .....	16
1.6.2. Thuốc điều trị bệnh Wilson .....	16
1.7. Phòng bệnh và tiên lượng bệnh Wilson .....	17
1.8. Cơ chế bệnh sinh và các dạng đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson ...	18
1.8.1. Vị trí, cấu trúc của gen ATP7B .....	18
1.8.2. Một số đột biến gen ATP7B hay gặp gây bệnh Wilson .....	20
1.8.3. Cơ chế bệnh sinh bệnh Wilson .....	24
1.9. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen ATP7B .....	24
1.9.1. Kỹ thuật PCR .....	24
1.9.2. Kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp biến tính .....	26
1.9.3. Phân tích cấu trúc đa hình thái chuỗi đơn .....	29
1.9.4. Sử dụng enzym cắt giới hạn .....	32
1.9.5. Kỹ thuật giải trình tự gen .....	32

<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 .....	36
2.2.1. Hóa chất .....	36
2.2.2. Trang thiết bị máy móc .....	38
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	39
2.3.1. Kỹ thuật tách chiết DNA từ máu ngoại vi .....	39
2.3.2. Kỹ thuật PCR khuếch đại 21 exon của gen ATP7B .....	41
2.3.3. Giải trình tự gen .....	44
2.3.4. Phương pháp phân tích kết quả.....	46
2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu .....	47
2.5. Quy trình nghiên cứu .....	48
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>49</b>
3.1. Phát hiện đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson .....	49
3.1.1. Kết quả tách chiết DNA .....	49
3.1.2. Kết quả chạy PCR khuếch đại các exon của gen ATP7B.....	50
3.1.3. Kết quả xác định đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự gen... 51	
3.2. Thiết lập bản đồ đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson ở Việt Nam ... 63	
<b>Chương 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>70</b>
<b>KẾT QUẢ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN ATP7B .....</b>	<b>71</b>
Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa .....	75
Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa dị hợp tử.....	75
Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa đồng hợp tử.....	76
Bệnh nhân có đột biến ở vùng 5' UTR .....	77
Bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm .....	78

Bệnh nhân có đột biến thêm nucleotid.....	79
Bệnh nhân với những đột biến kết hợp trên gen ATP7B.....	80
Bệnh nhân có 2 đột biến dị hợp tử .....	80
Bệnh nhân có đột biến dị hợp tử kết hợp với đồng hợp tử .....	81
Bệnh nhân có 2 đột biến đồng hợp tử .....	83
Bệnh nhân có kết hợp nhiều đột biến trên gen ATP7B .....	83
KẾT QUẢ THIẾT LẬP BẢN ĐỒ GEN GÂY BỆNH WILSON .....	90
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>92</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>93</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TÀI LIỆU THAM KHẢO PHỤ LỤC</b>	



## **DANH MỤC BẢNG**

Bảng 2.1. Các trình tự môi dùm để khuếch đại 21 exon của gen ATP7B .....	41
Bảng 3.1. Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA .....	49
Bảng 3.2. Các kiểu đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson.....	57
Bảng 3.3. Các loại đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson .....	63

## **DANH MỤC BIỂU ĐỒ**

Biểu đồ 3.1. Phân bố đột biến trên các exon của gen ATP7B .....	65
Biểu đồ 3.2. Các dạng đột biến phát hiện được trên bệnh nhân Wilson .....	66
Biểu đồ 3.3. Phân bố các đột biến gen ATP7B tương ứng với các vùng gen.....	67

## DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Cơ chế vận chuyển đồng trong cơ thể .....	5
Hình 1.2. Vòng Kayser - Fleisher và bộ mặt Wilson điển hình.....	8
Hình 1.3. Kiểu gen của bố mẹ và tỷ lệ bị bệnh ở thế hệ con .....	15
Hình 1.4. Cấu trúc protein ATP7B .....	19
Hình 1.5. Cấu trúc gen ATP7B và một số dạng đột biến hay gặp.....	22
Hình 1.6. Các bước cơ bản của kỹ thuật PCR.....	26
Hình 1.7. Nguyên tắc kỹ thuật pDHPLC .....	28
Hình 1.8. Quy trình kỹ thuật SSCP.....	30
Hình 1.9: Quy trình giải trình tự gen theo phương pháp ddNTP.....	33
Hình 1.10: Hình ảnh giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động.....	35
Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 3 (A) và exon 8 (B) của gen ATP7B. (+) mẫu đối chứng dương; (-) mẫu chứng âm; (1-9) mẫu bệnh nhân; (MK) Marker $\Phi$ 174.....	50
Hình 3.2. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W51 .....	51
Hình 3.3. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W25 .....	52
Hình 3.4. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W20 .....	53
Hình 3.5. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W45 .....	53
Hình 3.6. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W6.....	54
Hình 3.7. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W18 .....	55
Hình 3.8. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W30 .....	56
Hình 3.9. Bản đồ đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson Việt Nam.....	68
Hình 4.1: Đột biến giảm p.V456L và p.K832R đáng kể khả năng vận chuyển đồng khi thực nghiệm in vitro trên các tế bào gan của chuột.....	74
Hình 4.2: Sơ đồ Venn về tính chất acid amin .....	89

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung Tâm Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội, với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “*Nghiên cứu phát hiện đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson*” Trích từ ngân sách sự nghiệp khoa học cấp Bộ Y Tế.

**Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. TRẦN VĂN KHÁNH**

5,8,15,19,22,26,28,33,35,48,50-56,65-68,74,107-115

1-4,6-7,9-14,16-18,20-21,23-25,27,29-32,34,36,37-47,49,57-64,69-73,75-  
106,120-131

màu 31 tr