

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



BÙI THỊ THU HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH NGƯỜI LÀNH MANG
gen VÀ ỨNG DỤNG CHẨN ĐOÁN TRƯỚC
sinh bõnh hemophil ia a**

Chuyên ngành : Hóa sinh

Mã số : 62720112

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2014

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Trần Văn Khánh
2. PGS.TS. Nguyễn Thị Hà**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sỹ cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2014

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội
- Thư viện Thông tin Y học Trung ương

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh máu khó đông hemophilia A là bệnh di truyền alen lặn liên quan đến giới tính, gen bệnh nằm trên nhiễm sắc thể X không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể Y, do vậy người mẹ mang gen bệnh có thể truyền bệnh cho 50% con trai và truyền gen bệnh cho 50% con gái. Bệnh có thể di truyền qua nhiều thế hệ và có nhiều người mắc bệnh trong cùng một gia đình. Bệnh ảnh hưởng đến tâm sinh lý, thể chất trẻ nhỏ và là gánh nặng cho gia đình và xã hội. Tại Việt Nam, ước tính có khoảng 6000 người bị bệnh hemophilia và khoảng 30.000 người mang gen bệnh hemophilia. Mặc dù trong thời gian qua, công tác chăm sóc bệnh nhân hemophilia A tại Việt Nam đã có nhiều tiến bộ, số lượng bệnh nhân được chẩn đoán và quản lý đã tăng lên đáng kể, tuy nhiên mới chỉ chiếm chưa tới 30% tổng số người bị bệnh và đa số người mang gen bệnh chưa được chẩn đoán và quản lý. Việc phát hiện người lành mang gen bệnh đóng vai trò quan trọng trong công tác tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh để có thể giúp ngăn ngừa sinh con bị bệnh và giảm tỷ lệ mắc bệnh.

2. Mục tiêu của đề tài:

1. Phát hiện người lành mang gen bệnh ở các thành viên gia đình bệnh nhân hemophilia A đã xác định được đột biến gen F8.
2. Ứng dụng kỹ thuật I-PCR và giải trình tự gen chẩn đoán trước sinh cho những thai phụ có nguy cơ cao sinh con bị bệnh hemophilia A.

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

Phát hiện người phụ nữ mang gen bệnh bằng các xét nghiệm thông thường như xác định hoạt tính yếu tố VIII trong máu còn gặp khó khăn vì hoạt tính yếu tố VIII của họ không giảm hoặc giảm ít, có thể dao động từ 50 – 150%, chỉ có khoảng 10% tổng số những phụ nữ này có hoạt tính yếu tố VIII huyết tương <10% và có biểu hiện chảy máu.

Ở Việt Nam, một số công trình nghiên cứu về bệnh hemophilia A đã được công bố, chủ yếu là các nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng, tần suất mắc bệnh và đánh giá hiệu quả điều trị bệnh bằng các chế phẩm thay thế; nghiên cứu về tính chất gia đình của

bệnh hemophilia A, nghiên cứu phát hiện người lành mang gen bệnh bằng phân tích một số yếu tố đông máu; nghiên cứu phát hiện người lành mang gen bệnh sử dụng kỹ thuật enzym cắt giới hạn (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphisms) chỉ phát hiện được 4/9 người mẹ mang gen bệnh (44,4%)...Tuy nhiên các nghiên cứu này dựa trên cỡ mẫu nhỏ, phương pháp phát hiện gián tiếp, tỷ lệ người lành mang gen phát hiện được thấp và như vậy vẫn chưa có một nghiên cứu đầy đủ và toàn diện về tình trạng mang gen bệnh của các thành viên nữ có nguy cơ cao trong gia đình bệnh nhân hemophilia A.

Sử dụng phương pháp phát hiện trực tiếp (bằng kỹ thuật I-PCR và giải trình tự gen), đề tài đã xác định chính xác tình trạng mang gen bệnh của các thành viên nữ trong gia đình bệnh nhân hemophilia A (đã phát hiện được đột biến gen F8) tạo cơ sở khoa học cho công tác tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh, có thể ngăn ngừa việc sinh ra những đứa trẻ bị bệnh hemophilia A. Đây là nghiên cứu xác định người lành mang gen F8 đột biến đầu tiên được thực hiện ở Việt Nam, có ý nghĩa khoa học và nhân văn sâu sắc.

4. Cấu trúc luận án:

- Luận án được trình bày trong 126 trang (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án được chia làm 7 phần:

- + Đặt vấn đề: 2 trang
- + Chương 1: Tổng quan tài liệu 34 trang
- + Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 16 trang
- + Chương 3: Kết quả nghiên cứu 41 trang
- + Chương 4: Bàn luận 31 trang
- + Kết luận: 1 trang
- + Kiến nghị: 1 trang

Luận án gồm 10 bảng, 2 biểu đồ và 53 hình. Sử dụng 113 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt, tiếng Anh và một số trang Web. Phần phụ lục gồm bệnh án nghiên cứu, danh sách 166 thành viên nữ trong các gia đình bệnh nhân hemophilia A, kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh, sơ đồ phả hệ của 6 gia đình chẩn đoán trước sinh và hình ảnh minh họa.

Chương 1: TỔNG QUAN

1. Đặc điểm bệnh hemophilia A

Bệnh máu khó đông (hemophilia A) là một bệnh di truyền hay gặp nhất do thiếu hụt hoặc bất thường chức năng của các yếu tố đông máu (yếu tố VIII) trong huyết tương.

Theo thống kê của tổ chức Hemophilia thế giới (WFH), hiện nay có khoảng 250.000 bệnh nhân mắc bệnh hemophilia và chỉ có khoảng 50.000 được điều trị đặc hiệu [19]. Tỷ lệ mắc bệnh hemophilia A gần giống nhau ở các vùng địa lý, các nước, các chủng tộc, tần suất mắc bệnh chung khoảng 30-100/1.000.000 dân. Tần suất mắc bệnh hemophilia A là $1/4000 \div 1/5.000$ trẻ trai.

Tại Việt Nam, hiện tại có khoảng 6000 bệnh nhân hemophilia và có khoảng 2.200 (chiếm gần 40%) bệnh nhân được phát hiện và chăm sóc thường xuyên. Như vậy, tỷ lệ bệnh nhân chưa được chẩn đoán và điều trị vẫn còn ở mức cao.

Chẩn đoán xác định bệnh Hemophilia A dựa vào 3 đặc điểm: (1) Triệu chứng lâm sàng: có vết bầm tím, tụ máu, chảy máu; (2) Dựa vào tiền sử gia đình; (3) Xét nghiệm máu trong đó quan trọng nhất là hoạt tính yếu tố VIII huyết tương giảm dưới 40%.

Cơ chế phân tử bệnh hemophilia A: Gen quy định tổng hợp yếu tố VIII nằm ở vị trí Xq28 trên NST giới tính X, là một trong những gen lớn nhất của người, có kích thước 186 Kb gồm 26 exon, trong đó 24 exon có kích thước từ 62 bp đến 262 bp và 2 exon lớn nhất là exon 14 (3106 bp) và exon 26 (1958 bp), mã hóa 9 Kb mRNA. Đột biến gen F8 gây thiếu hụt hoặc bất thường chức năng protein yếu tố VIII, làm ngừng trệ dòng thác đông máu theo con đường nội sinh, dẫn đến tình trạng chảy máu kéo dài, không cầm ở bệnh nhân hemophilia A

Có nhiều dạng đột biến gen F8 gây bệnh hemophilia A: dạng đột biến điểm (thay thế nucleotid gây đột biến sai nghĩa hoặc vô nghĩa) chiếm tỷ lệ cao nhất (47,5%) tiếp đến là dạng đột biến đảo đoạn gồm đảo đoạn intron 1 và intron 22 (36,7%), còn lại là đột biến xóa đoạn gen chiếm khoảng 10 – 15%. Tùy thuộc vào kiểu và vị trí đột biến trên gen F8 mà gây ra các thể bệnh nặng nhẹ khác nhau.

2. Người lành mang gen bệnh hemophilia A

Người lành mang gen bệnh hemophilia A là người mang một nhiễm sắc thể X bị đột biến gen F8 và một nhiễm sắc thể X bình thường, chính vì vậy mà đa số họ không biểu hiện bệnh.

Con gái của một bệnh nhân hemophilia A, người mẹ của hai con trai bị bệnh; người mẹ của một con trai bị bệnh hoặc một con gái mang gen bệnh và có một người nam cùng huyết thống trong phả hệ gia đình bị bệnh; là những người chắc chắn mang gen F8 bị đột biến theo quy luật di truyền, được gọi là người lành mang gen bệnh bắt buộc (obligate carrier). Bà ngoại của một cháu trai bị bệnh hemophilia A, con gái của một người mẹ mang gen bệnh hemophilia A, dì và em gái của một bệnh nhân hemophilia A là những người có nguy cơ cao mang gen bệnh (possible carrier).

Người phụ nữ có biểu hiện bệnh máu khó đông tương tự như một trường hợp hemophilia A thể nhẹ thì khi đó gọi là người lành mang gen bệnh có triệu chứng (symptomatic carriers). Khoảng 10% người mang gen có hoạt tính yếu tố VIII huyết tương thấp hơn so với bình thường, thậm chí một số ít trường hợp người mang gen bệnh có hoạt tính yếu tố VIII huyết thanh rất thấp dưới 4% gây chảy máu tương tự thể bệnh nặng, với nồng độ yếu tố VIII từ 5% đến 40% có thể bị chảy máu tương tự như bệnh nhân thể nhẹ. Khoảng 20% người lành mang gen bệnh biểu hiện triệu chứng chảy máu với các mức độ

khác nhau, bao gồm cả những người có hoạt tính yếu tố VIII huyết tương trong giới hạn bình thường (40 đến 60%).

Với những thành viên nữ mang gen bệnh, việc xác định chính xác tình trạng mang gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử giúp các nhà tư vấn sớm đưa ra lời khuyên di truyền trước khi kết hôn để họ tăng cường nhận thức về bệnh, làm giảm tỷ lệ mang thai và tỷ lệ trẻ sinh ra bị mắc bệnh hemophilia A.

Xác định tình trạng mang gen để giúp người phụ nữ có các biện pháp tăng hiệu quả trong việc phòng ngừa bệnh tật, đồng thời nâng cao chất lượng chăm sóc sức khỏe cho cộng đồng và xã hội.

3. Các phương pháp phát hiện người lành mang gen bệnh hemophilia A

- Các xét nghiệm đông máu

Xét nghiệm định lượng hoạt tính yếu tố VIII huyết thanh thường thấp hơn giá trị bình thường (50-150%). Tuy nhiên cũng chỉ phát hiện được khoảng 10-20% người lành mang gen có biểu hiện bệnh thể nhẹ và có hoạt tính yếu tố VIII huyết thanh < 35%, số người còn lại có hoạt tính yếu tố VIII huyết thanh dao động trong khoảng 40 – 60% và không có triệu chứng bệnh. Do vậy xét nghiệm này không phát hiện được rất nhiều các trường hợp người lành mang gen bệnh.

- Phát hiện người lành mang gen bệnh dựa vào phân tích phả hệ

Đối với những trường hợp bệnh nhân có tiền sử gia đình rõ ràng, dựa vào kết quả phân tích phả hệ có thể xác định chắc chắn tình trạng mang gen của các thành viên nữ trong gia đình bệnh nhân. Tuy nhiên phương pháp này cũng chỉ phát hiện được số lượng hạn chế người mang gen bệnh và các thông tin được thu thập để xây dựng phả hệ đòi hỏi phải thật chính xác và bị ảnh hưởng bởi yếu tố chủng tộc. Kỹ thuật này cũng không áp dụng được cho những trường hợp bệnh đơn lẻ trong gia đình.

- Phát hiện người lành mang gen bệnh bằng các kỹ thuật sinh học phân tử

+ *Phương pháp phát hiện đột biến trực tiếp:* Là phương pháp phát hiện tình trạng mang gen của người mẹ và các thành viên nữ trong gia đình dựa trên đột biến chỉ điểm đã xác định được trên bệnh nhân hemophilia A. Phương pháp này phát hiện được 99-100% các trường hợp người lành mang gen bệnh. Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật I-PCR phát hiện đột biến đảo đoạn intron 22, kỹ thuật giải trình tự toàn bộ 26 exon để phát hiện đột biến điểm và xóa đoạn, đây là những phương pháp hiện đại, chính xác, xác định tình trạng mang gen bệnh của các thành viên nữ có nguy cơ cao trong các gia đình bệnh nhân hemophilia A.

+ *Phương pháp phát hiện gián tiếp:* Phân tích liên kết được sử dụng trong nhiều năm gần đây, sử dụng enzym cắt giới hạn *Bcl I*, *Hind III* và intron7 G > A (c.1010 – 27G > A) cộng với đa hình STR trong intron 13 và 22. Phương pháp phân tích liên kết thực hiện nhanh, tương đối rẻ tiền, đáng tin cậy để phát hiện các trường hợp bị bệnh hemophilia A trong phả hệ gia đình có nhiều người bị bệnh. Tuy nhiên, phương pháp phân tích liên kết không thể phát hiện được người lành mang gen trong các gia đình có đột biến mới phát sinh trong quá trình hình thành giao tử.

4. Chẩn đoán trước sinh bệnh hemophilia A

Kết quả phân tích gen cho biết thai phụ có mang gen bệnh hay không là yếu tố sàng lọc quan trọng nhất. Sau quá trình phân tích sàng lọc, những thai phụ có nguy cơ cao sinh con bị bệnh hemophilia A được tiến hành lấy mẫu tế bào thai nhi để phân tích và xác định đột biến.

5. Các nghiên cứu về người lành mang gen bệnh ở Việt Nam

Các nghiên cứu về căn bệnh này ở nước ta mới chỉ tập trung chủ

yếu vào tỉ lệ mắc bệnh, đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, điều trị và những tác động tâm lý của bệnh đối với bệnh nhân và thành viên gia đình. Như vậy còn để ngỏ việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong việc phân tích, phát hiện đột biến gen F8, người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 50 gia đình bệnh nhân hemophilia A đã được xác định đột biến gen F8 (tại Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội) bao gồm:

- 50 người mẹ bệnh nhân.
- 116 thành viên nữ (bà ngoại, bà họ, bác gái, dì, chị, em gái....) có cùng huyết thống với bệnh nhân.
- 12 thai phụ/166 thành viên gia đình bệnh nhân trong đó 6/12 thai phụ là người lành mang gen bệnh, đang mang thai ở tuần thai thứ 12-18.
- 20 người (10 nam, 10 nữ) khỏe mạnh, tiền sử gia đình không có người mắc bệnh di truyền dùng để chuẩn hóa kỹ thuật và làm mẫu đối chứng cùng với mẫu nghiên cứu khi thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử để phân tích gen.

Các đối tượng nghiên cứu được lấy mẫu nghiên cứu: Máu tĩnh mạch có chống đông EDTA, dịch chọc ối (thai phụ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Sử dụng phương pháp nghiên cứu tiến cứu và mô tả cắt ngang

2.3. Địa điểm nghiên cứu

- + Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein, trường Đại học Y Hà Nội.
- + Thời gian từ 1/2012 – 6/2014.



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

- Phân tích phả hệ gia đình các bệnh nhân.
- Tách chiết DNA tổng số từ mẫu nghiên cứu.
- Phản ứng PCR khuếch đại 26 exon gen F8.
- Kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện đột biến điểm và mất đoạn nhỏ.
- Kỹ thuật I-PCR (Inversion-PCR) xác định đột biến đảo đoạn intron 22.
- Nuôi cấy tế bào ối.

2.5. Đề tài tuân thủ chế độ đức nghiên cứu trong Y học.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm của các đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.1. Phân bố đối tượng nghiên cứu theo quan hệ với bệnh nhân

Quan hệ với bệnh nhân	n	Tỷ lệ %
Mẹ bệnh nhân	50	30,1
Các thành viên nữ (bà, bác, dì và chị em gái)	116	69,9
Tổng	166	100

Nhận xét: Trong 166 thành viên nữ của 50 gia đình bệnh nhân hemophilia A có 50 người mẹ, chiếm tỷ lệ 30,1% và 116 người bao gồm bà, bác, dì và chị em gái của bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 69,9%.

3.2. Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh hemophilia A

3.2.1. Tỷ lệ phát hiện người lành mang gen bệnh qua phân tích phả hệ

Bảng 3.2. Tỷ lệ người lành mang gen bệnh phát hiện được dựa vào phả hệ

Tình trạng mang gen	Mang gen bệnh bắt buộc (n,%)	Có nguy cơ mang gen bệnh (n,%)	Tổng (n,%)
Thành viên gia đình			
Mẹ bệnh nhân	20 (40%)	30 (60%)	50
Thành viên nữ khác	23 (20%)	93 (80%)	116
Tổng	43 (26%)	123 (74%)	166

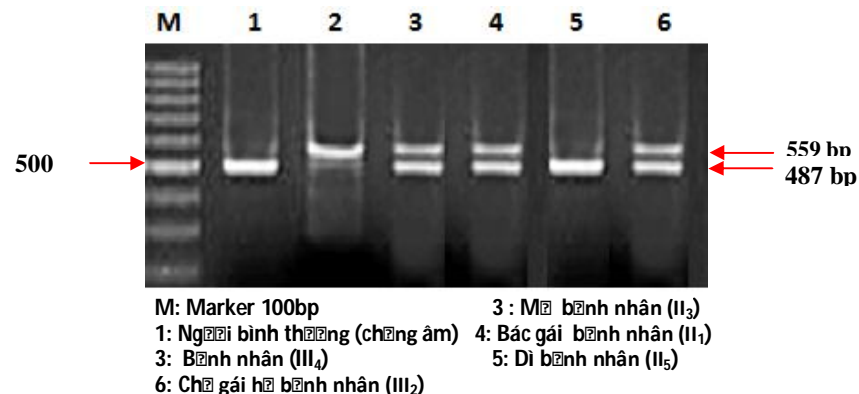
Nhận xét: Phân tích phả hệ cho thấy 20/50 người mẹ (chiếm tỷ lệ 40%) và 23/116 thành viên nữ (chiếm tỷ lệ 20%) mang gen bệnh bắt buộc; 30/50 người mẹ (chiếm tỷ lệ 60%) và 93/116 thành viên nữ người có nguy cơ cao mang gen bệnh (chiếm tỷ lệ 80%); 43/166 người chắc chắn mang gen bệnh (chiếm tỷ lệ 26%) và 123/166 người có nguy cơ mang gen bệnh (chiếm tỷ lệ 74%);

3.2.2. Kết quả tách chiết DNA

DNA tổng số từ máu toàn phần được tách theo phương pháp phenol/chloroform. Nồng độ DNA tổng số tách được có giá trị từ 150 – 1200 ng/μl và độ tinh sạch của các mẫu đạt yêu cầu với tỷ lệ mật độ quang đo được ở bước sóng 260/280 nm luôn nằm trong khoảng 1,8-2,0.

3.2.3. Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh bằng các phương pháp phân tích gen

3.2.3.1. Kết quả phát hiện người lành mang gen F8 đột biến đảo đoạn intron22



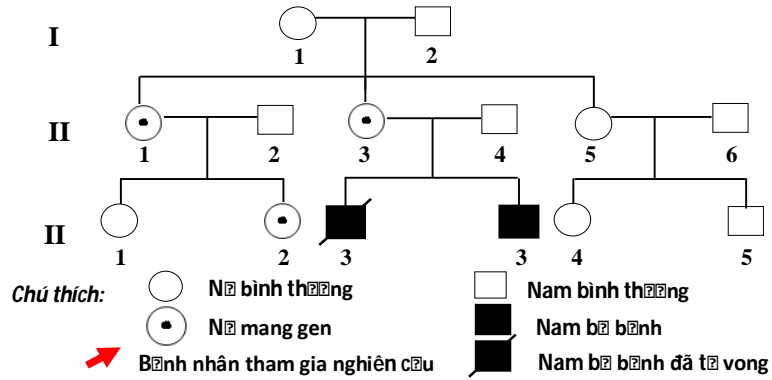
Hình 3.4. Hình ảnh multiplex PCR xác định đột biến intron 22 của gia đình bệnh nhân HA02

Nhận xét: DNA của người bình thường ở vị trí giếng số 1 có 1 băng kích thước tương ứng 487 bp. DNA của bệnh nhân HA02 bị đột biến đảo đoạn intron 22 ở giếng số 2 có 1 băng kích thước tương ứng 559 bp.

DNA của người mẹ, bác gái và chị gái họ của bệnh nhân ở giếng số 3, 4 và 6 có 2 vạch kích thước tương ứng là 487 và 559 bp, như vậy người mẹ bệnh nhân (II₃), bác gái (II₁) và chị gái họ của bệnh nhân (III₂) là người lành mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp tử.

DNA của người dì ở giếng số 5 có 1 băng kích thước tương ứng 487 bp giống người bình thường, như vậy dì của bệnh nhân (II₅) không mang gen bệnh, do đó con gái của dì (em họ bệnh nhân-III₅) cũng không mang gen bệnh.

- Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số HA02 (sau khi phân tích gen)



Hình 3.5. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân mã số HA02 (sau khi phân tích gen)

Nhận xét:

Có 2/5 thành viên nữ (II₁, III₂) trong gia đình bệnh nhân HA02 có nguy cơ cao mang gen bệnh, được xác định có mang gen F8 đột biến đảo đoạn intron 22 ở trạng thái dị hợp tử.

3.2.3.2. Kết quả phát hiện người lành mang gen F8 đột biến điểm

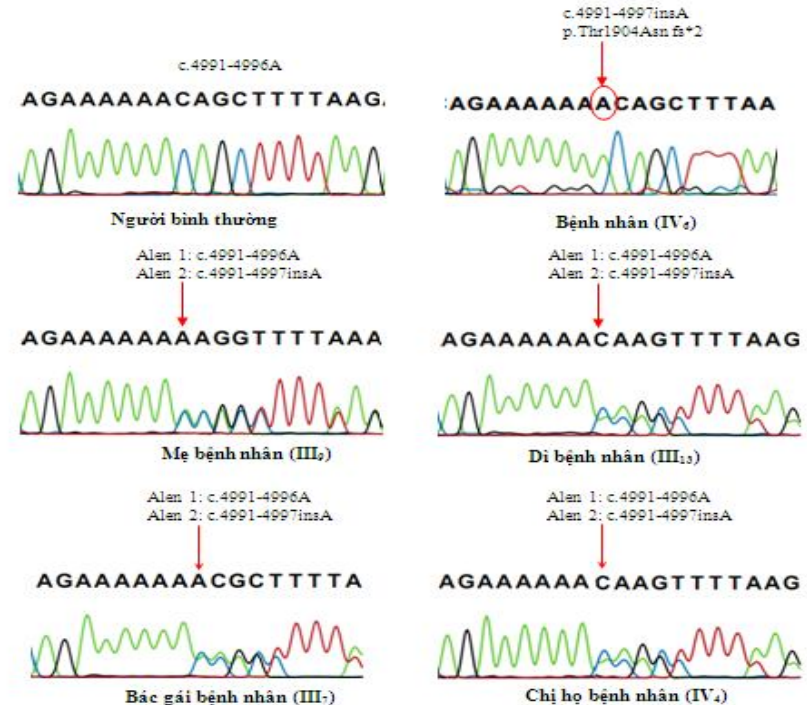
* Kết quả phân tích gen gia đình bệnh nhân mã số HA16

Bệnh nhân HA16 có đột biến thêm 1 nucleotid A trên exon 14 tại vị trí c. 4997insA gây lệch khung dịch mã (Thr1904Asn fs*2).

- Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số HA16 (trước khi phân tích gen)

Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số HA16 có một con trai bị bệnh hemophilia A (bệnh nhân mã số HA16 – IV₆), có tiền sử gia đình nhưng không rõ ràng, vì vậy bà ngoại (II₆), bà họ (II₁), mẹ (III₉), bác gái (III₃, III₅, III₇), dì (III₁₁, III₁₃) và các chị họ bệnh nhân (IV₁, IV₂, IV₄, IV₅) có thể là người lành mang gen bệnh.

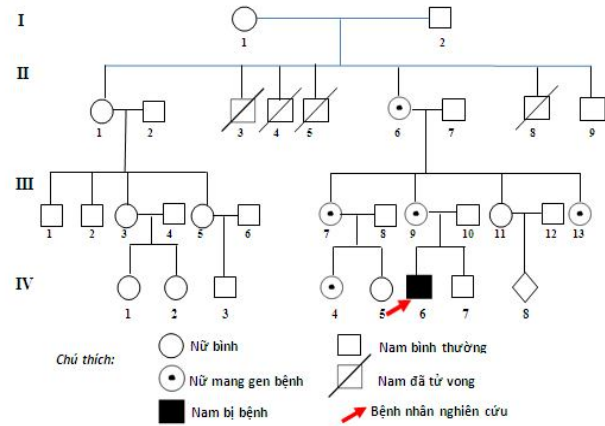
- Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh



Hình 3.7. Hình ảnh giải trình tự gen của gia đình mã số HA16

Nhận xét: Hình ảnh giải trình tự exon 14 gen F8 của người mẹ, bác và chị họ của bệnh nhân HA16 xuất hiện các đỉnh chồng lên nhau sau điểm đột biến c.4997insA, chứng tỏ mẹ, bác và chị họ bệnh nhân mang gen F8 đột biến ở trạng thái dị hợp tử.

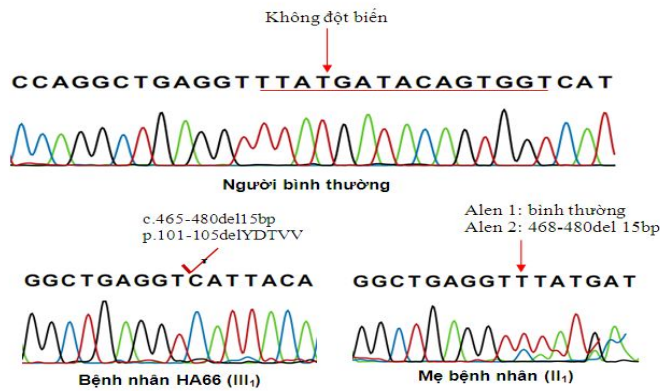
- Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số HA16 (sau khi phân tích gen)



Hình 3.8. Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số HA16

3.2.3.4. Kết quả phát hiện người lành mang gen F8 đột biến xóa đoạn nhỏ

- Kết quả phân tích gen gia đình bệnh nhân mã số HA66

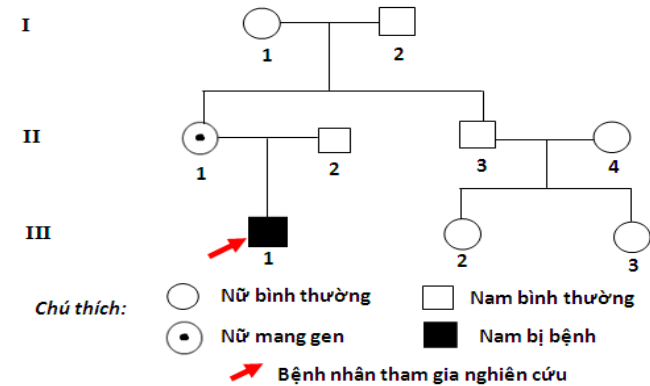


Hình 3.16. Hình ảnh giải trình tự gen của gia đình mã số HA66

Nhận xét: Hình ảnh giải trình tự exon 3 gen F8 của người mẹ (II₁) bệnh nhân HA66 xuất hiện các đỉnh chồng lên bắt đầu từ vị trí đột

biến đã phát hiện được ở bệnh nhân (c. 468 – 480del15bp), chứng tỏ người mẹ bệnh nhân mang gen F8 đột biến ở trạng thái dị hợp tử.

- Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số HA66 sau khi phân tích gen



Hình 3.17. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số HA66 (sau khi phân tích gen)

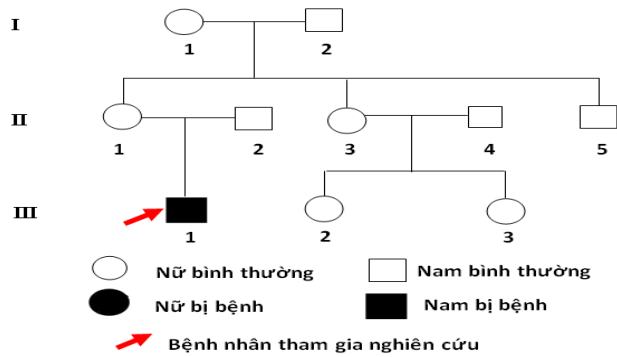
Nhận xét:

Trong 2 thành viên nữ (I₁, II₁) của gia đình bệnh nhân HA66 có nguy cơ cao mang gen bệnh đã xác định được: 1 thành viên nữ có mang gen F8 đột biến ở trạng thái dị hợp tử (II₁), 1 thành viên nữ (I₁ – bà ngoại bệnh nhân) không mang gen F8 đột biến ở trạng thái dị hợp tử.

* Kết quả phân tích gen gia đình bệnh nhân mã số HA92

Bệnh nhân HA92 có đột biến thêm 1 nucleotid A trên exon 14 (c. 3864-70 insA) gây thay thế acid amin Glycin thành Arginin vị trí codon 1271 và lệch khung dịch mã toàn bộ các acid amin còn lại. (P. Gly1271Argfs*7).

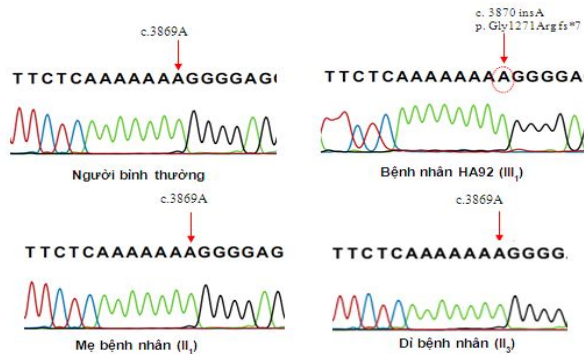
- Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số HA92



Hình 3.18. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số HA92

Nhận xét: Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số HA92 có một con trai bị bệnh hemophilia A (bệnh nhân mã số HA92), tiền sử gia đình trước đây không có ai bị bệnh giống như bệnh nhân, vì vậy bà ngoại (I₁), mẹ (II₁), dì (II₃) và các chị họ bệnh nhân (III₂, III₃) có thể là người lành mang gen bệnh.

- Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh



Hình 3.19. Hình ảnh giải trình tự gen của gia đình mã số HA92

Nhận xét: Hình ảnh giải trình tự exon 14 gen F8 của người mẹ (II₁) và dì (II₃) của bệnh nhân HA92 giống như trình tự gen của người bình thường, chứng tỏ mẹ và dì bệnh nhân không mang gen F8 đột

biến ở trạng thái dị hợp tử. Từ kết quả này không cần phân tích gen của các chị họ bệnh nhân (III₂, III₃) vì đột biến ở bệnh nhân không phải là đột biến do di truyền.

3.2.3. Tỷ lệ phát hiện người lành mang gen bệnh

Bảng 3.3. Tỷ lệ phát hiện người lành mang gen bệnh

Thành viên gia đình	Mang gen bệnh			Không mang gen bệnh (n,%)	Tổng
	Phân tích phả hệ	Phân tích gen	Tổng (n,%)		
Mẹ bệnh nhân	20	14	34 (68)	16 (32)	50
Thành viên nữ khác	23	32	55 (47,4)	61 (52,6)	116
Tổng	43	46	89 (54)	77 (46)	166

Nhận xét:

34/50 (68%) người mẹ mang gen F8 đột biến ở trạng thái dị hợp tử và 16/50 người mẹ (32%) không mang gen F8 đột biến.

55/116 (47,4%) thành viên nữ khác (bao gồm: bà, bác gái, dì, chị em gái của bệnh nhân) mang gen F8 đột biến ở trạng thái dị hợp tử; 61/116 (52,6%) thành viên nữ khác không mang gen F8 đột biến.

89/166 thành viên nữ là người lành mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 54%; 77/166 thành viên nữ không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 46%.

3.3. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh Hemophilia A

3.3.1. Đặc điểm chung của các thai phụ tham gia nghiên cứu

Bảng 3.7. Một số đặc điểm chung của các thai phụ tham gia nghiên cứu

Đặc điểm		n
Tổng số thai phụ tham gia nghiên cứu		12
Tuổi thai	<12 tuần	3
	12-15 tuần	6
	>15 tuần	3
Số thai phụ không mang gen F8 đột biến		6
Số thai phụ mang gen F8 đột biến		6

Nhận xét: Có 12 thai phụ tham gia vào nghiên cứu, trong đó có 6 thai phụ được xác định là người lành mang gen bệnh đang mang thai tuần 12 – 18. Chẩn đoán qua siêu âm 5 cho thấy thai nhi giới tính nam và 1 thai nhi giới tính nữ. Những thai phụ này sau khi được tư vấn có nguyện vọng làm chẩn đoán trước sinh.

3.3.2. Xác định độ tinh sạch DNA tách chiết từ tế bào ối

6/12 thai phụ thực hiện chẩn đoán trước sinh được tiến hành chọc ối ở tuần thứ 15 của thai kỳ tại Bệnh viện phụ sản Trung ương dưới sự hướng dẫn của siêu âm. DNA được tách chiết từ tế bào ối và được tiến hành kiểm tra độ tinh sạch trên máy Nano drop. Mẫu DNA thu được có độ tinh sạch khá cao, dao động 1,8 – 1,9 và nồng độ khoảng 200 – 540 ng/ μ l.

3.3.3. Kết quả chẩn đoán trước sinh

* Kết quả chẩn đoán trước sinh của gia đình bệnh nhân HA04

Bệnh nhân HA04 có đột biến thêm 1 nucleotid A trên exon 14 (c.4550insA) làm lệch khung dịch mã toàn bộ các acid amin từ vị trí codon 755 trên protein yếu tố VIII.

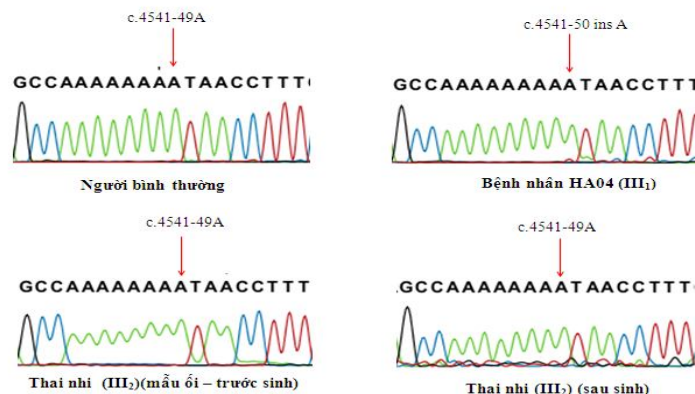
- *Phả hệ gia đình bệnh nhân HA04:* Gia đình bệnh nhân HA04 có một con trai bị bệnh hemophilia A (bệnh nhân mã số HA04 – III₁), trong phả hệ gia đình đã có một người cậu (II₃) bị bệnh, vì vậy thai phụ - người mẹ bệnh nhân (II₁) là người lành mang gen bệnh bắt buộc, thai phụ cũng đã được phân tích gen cho kết quả mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp tử. Việc chẩn đoán trước sinh cho thai phụ này là cần thiết nếu thai nhi có giới tính là nam.

- *Kết quả xác định giới tính của thai nhi (III₂)*

Kỹ thuật PCR được tiến hành với cặp mồi cho phép khuếch đại vùng gen xác định giới tính *SRY* (có kích thước 254 bp) đặc hiệu trên NST Y. Kết quả cho thấy thai nhi (III₂) có giới tính nam.

- *Kết quả xác định đột biến của thai nhi (III₂)*

Dựa vào vị trí đột biến chỉ điểm trên mẫu DNA bệnh nhân HA04, mẫu DNA tách chiết từ tế bào ối của thai phụ II₁ (thai nhi III₂) được phân tích để xác định đột biến và đưa trẻ sau sinh đã được kiểm tra kết quả chẩn đoán trước sinh bằng phân tích gen.



Hình 3.25. Hình ảnh giải trình tự exon 14 gen F8 của DNA thai nhi (III₂) trước và sau sinh

Nhận xét: Hình ảnh giải trình tự exon 14 gen F8 của DNA thai nhi III₂ trước khi sinh không có đột biến giống như đột biến đã phát hiện được trên bệnh nhân và kết quả kiểm tra sau khi sinh cho phép khẳng định người em trai bệnh nhân HA04 (III₂) không bị đột biến exon14 gen F8.

Bảng 3.9+10. Kết quả phát hiện đột biến trên mẫu ối trước sinh và chẩn đoán sau sinh

		Kết quả	n	Giới tính
Chẩn đoán trước sinh (n=6)	Thai nhi bị bệnh		2	Nam
	Thai nhi không bị bệnh		3	Nam
	Thai nhi không mang gen bệnh		1	Nữ
Chẩn đoán sau sinh (n=4)	Có đột biến gen F8		0	
	Không đột biến gen F8		2	Nam
	Chưa thực hiện chẩn đoán sau sinh		2	1 nam, 1 nữ

Nhận xét: Có 2/6 mẫu DNA tách chiết từ tế bào ối mang gen F8 đột

biến được tư vấn đình chỉ thai nghén; 4/6 mẫu DNA không mang gen F8 đột biến trong đó: 2 mẫu được thực hiện chẩn đoán sau sinh đều cho kết quả phù hợp với chẩn đoán trước sinh (không có đột biến gen F8); 2 mẫu chưa thực hiện chẩn đoán sau sinh do chưa sinh.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Về đặc điểm của các đối tượng nghiên cứu

166 thành viên nữ của 50 gia đình bệnh nhân hemophilia A tham gia nghiên cứu bao gồm 50 người mẹ, chiếm tỷ lệ 30,1% và 116 người bao gồm bà, bác, dì và chị em gái của bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 69,9%, nhiều người trong số đó là những người trong độ tuổi sinh đẻ và dưới 18 tuổi. Việc xác định sớm tình trạng mang gen với trẻ nhỏ sẽ giúp các bà mẹ quan tâm đến con mình sớm hơn ngay từ chu kỳ kinh nguyệt đầu tiên xem có kéo dài không, có rong kinh không, có đau bụng không ... và giúp những người con khi trưởng thành có kiến thức, kế hoạch cho tương lai của mình, chủ động phòng tránh các yếu tố nguy cơ gây chảy máu và là cơ sở khoa học giúp chẩn đoán trước sinh và tư vấn di truyền, tránh sinh con bị bệnh hemophilia A.

4.2. Về kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh hemophilia A

4.2.1. Về tỷ lệ phát hiện người lành mang gen dựa vào phân tích phả hệ

Đối với những trường hợp bệnh nhân có tiền sử gia đình rõ ràng, dựa vào kết quả phân tích phả hệ có thể xác định chắc chắn tình trạng mang gen của các thành viên nữ trong gia đình bệnh nhân. Dựa vào kết quả phân tích phả hệ nghiên cứu đã phát hiện được 20/50 người mẹ mang gen bệnh (chiếm tỷ lệ 40%); 30/50 người mẹ là người có nguy cơ cao mang gen bệnh (chiếm tỷ lệ 60%); 23/116 thành viên nữ mang gen bệnh (chiếm tỷ lệ 20%); 93/116 thành viên nữ là người có nguy cơ cao mang gen bệnh (chiếm tỷ lệ 80%). Kết quả nghiên cứu cho thấy 43/166 người chắc chắn mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 26%. Như vậy tỷ lệ phát hiện người mang gen bệnh dựa vào phân tích phả hệ còn thấp và không áp dụng được cho những trường hợp bệnh đơn lẻ trong gia đình.

4.2.2. Về quy trình kỹ thuật tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA là bước đầu tiên quan trọng của quy trình áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử. Nếu tách chiết DNA tốt, đảm bảo độ tinh sạch, các phân tử DNA không bị đứt gãy, không bị tạp nhiễm thì các phản ứng tiếp theo sẽ thu được kết quả có độ chính xác cao. Với sản phẩm DNA không tinh sạch, phản ứng PCR sẽ bị ức chế do tạp nhiễm hoặc tạo ra các sản phẩm không đặc hiệu.

Các mẫu DNA trong nghiên cứu đều có nồng độ cao và độ tinh sạch nằm trong khoảng cho phép từ 1,8-2,0 (bảng 3.1). Đó là một điều kiện tiên quyết đảm bảo kết quả của những kỹ thuật tiếp theo trong quy trình nghiên cứu.

4.2.3. Về kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh bằng các phương pháp phân tích gen

4.2.3.1. Phát hiện người lành mang gen F8 đột biến đảo đoạn intron22

Đột biến đảo đoạn intron 22 xảy ra do sự tái tổ hợp giữa bản sao của vùng int 22h (vùng lặp lại gồm 9,5 kb) thuộc intron 22 và một trong hai bản sao của vùng đồng nhất nằm ở telomere, vị trí 400 kb ở đầu 5' của gen F8. Hiện tượng đảo đoạn dẫn đến đứt gãy gen F8 và hậu quả gây thể bệnh nặng cho bệnh nhân. Đột biến này chiếm 45-50% bệnh nhân Hemophilia A thể nặng.

Việc xác định đột biến đảo đoạn intron 22 của bệnh nhân hemophilia A đã cung cấp cho chúng tôi cơ sở để tiến hành phân tích phát hiện người lành mang gen bằng kỹ thuật I-PCR.

Kết quả hình 3.4 cho thấy người mẹ, bác gái và chị họ bệnh nhân là người lành mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp tử. Dì của bệnh nhân không mang gen bệnh. Mặc dù người mẹ đã được xác định là mang gen bệnh bắt buộc nhưng chúng tôi vẫn tiến hành phân tích mẫu DNA của người mẹ, coi đó là mẫu chứng dương cho tình trạng mang gen ở trạng thái dị hợp tử cho các thành viên nữ khác trong gia đình. Điều đó chứng tỏ không có sự khác biệt về điều kiện thực hiện

các bước của quy trình phát hiện đột biến đảo đoạn và kết quả phân tích gen là đáng tin cậy. Kết quả nghiên cứu đã cung cấp thông tin cho bác sỹ lâm sàng tư vấn cho người mẹ, bác, chị gái bệnh nhân cần làm chẩn đoán trước sinh cho những lần mang thai sau.

4.2.3.2. Phát hiện người lành mang gen F8 đột biến điểm

Đột biến điểm gen F8 ở các bệnh nhân hemophilia A là đột biến chỉ điểm để phát hiện tình trạng mang gen của các thành viên nữ trong gia đình bệnh nhân. Chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để phân tích toàn bộ 26 exon gen F8 nhằm xác định chính xác tình trạng mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp tử. Đây là một trong những kỹ thuật hiện đại và chính xác nhất hiện nay.

4.2.3.3. Phát hiện người lành mang gen F8 đột biến mất đoạn gen

Đối với trường hợp bệnh nhân có đột biến thêm hoặc xóa đoạn nhỏ dưới 50bp, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen F8 để phát hiện người lành mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp tử nhằm tiết kiệm chi phí.

Hình ảnh giải trình tự exon 3 gen F8 của người mẹ (II₁) của bệnh nhân HA66 xuất hiện các đỉnh chồng lên bắt đầu từ vị trí đột biến đã phát hiện được ở bệnh nhân, chứng tỏ mẫu DNA của người mẹ có 1 alen bình thường và 1 alen đột biến mất 15 nucleotid tại vị trí c. 468 – 480del15bp và như vậy người mẹ này mang gen F8 đột biến ở trạng thái dị hợp tử.

4.2.3.4. Trường hợp bệnh nhân hemophilia A có người mẹ không mang gen bệnh

Hình ảnh giải trình tự exon 14 gen F8 của người mẹ (II₁) và di (II₃) của bệnh nhân HA92 giống như trình tự gen của người bình thường, chứng tỏ mẹ và di bệnh nhân không mang gen F8 đột biến ở trạng thái dị hợp tử. Từ kết quả này không cần phân tích gen của các chị họ bệnh nhân (III₂, III₃) vì đột biến ở bệnh nhân không phải là đột biến do di truyền.

Như vậy người mẹ mang gen F8 hoàn toàn bình thường, đột biến exon 14 gen F8 ở bệnh nhân HA92 là đột biến mới phát sinh.

4.2.4. Về tỷ lệ người lành mang gen bệnh hemophilia A

Nghiên cứu được thực hiện với 50 gia đình bệnh nhân hemophilia A đã xác định được đột biến chỉ điểm cho thấy có 34/50 người mẹ mang gen F8 đột biến ở dạng dị hợp tử chiếm tỷ lệ 68 % và 16/50 người (chiếm tỷ lệ 32 %) không mang gen F8 đột biến, kết quả này dựa trên cỡ mẫu nhỏ nên chưa thể có kết luận, tuy nhiên bước đầu cho thấy sự phù hợp với quy luật di truyền căn bệnh này (2/3 các trường hợp đột biến do di truyền, 1/3 là đột biến mới phát sinh). Kết quả xác định tình trạng mang gen của người mẹ rất quan trọng: nếu mẹ mang gen bệnh thì như vậy là bệnh có tính chất di truyền, con trai nhận gen bệnh từ mẹ, gen bệnh này người mẹ có thể nhận từ thế hệ trước. Kết quả nghiên cứu chứng tỏ tỷ lệ đột biến mới phát sinh ở các bệnh nhân hemophilia A Việt Nam là 32%. Điều này có thể được giải thích là do các yếu tố bên ngoài tác động lên quá trình phát sinh giao tử ở cơ thể người bố hoặc người mẹ như điều kiện môi trường sống, do tập quán ăn uống, do chiến tranh đã để lại nhiều chất độc hại trong môi trường...

Kết quả xét nghiệm gen cho thấy có 55/116 thành viên nữ ở dạng dị hợp tử (chiếm tỷ lệ 47,4 %); 61/116 thành viên nữ không mang gen đột biến (chiếm tỷ lệ 52,6%). Nghiên cứu của Shetty S (2001) trên 102 gia đình bệnh nhân hemophilia A (Ấn Độ) thấy một tỷ lệ người lành mang gen bệnh cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi (64,5%), có thể do tỷ lệ gia đình có tiền sử bệnh của 2 nghiên cứu khác nhau, mà các thành viên nữ trong gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng thì có nguy cơ mang gen bệnh cao hơn.

Chúng tôi phát hiện được 89/166 thành viên nữ (bao gồm bà ngoại, mẹ, bác, di, chị em gái bệnh nhân...) là người lành mang gen bệnh hemophilia A. Kết quả phát hiện này rất quan trọng vì với 89 người nữ này không còn là nghi ngờ mà đã chắc chắn mang gen, do vậy họ cần làm thêm xét nghiệm định lượng hoạt tính yếu tố VIII huyết thanh để xác định nguy cơ chảy máu. Kết quả này cho thấy những người nữ này cần thiết có kế hoạch dự phòng để đảm bảo sức

khỏe nói chung và sức khỏe sinh sản nói riêng nhằm nâng cao chất lượng cuộc sống. Nghiên cứu cũng đã khẳng định 77/166 người chắc chắn không mang gen bệnh.

4.3. Về kết quả chẩn đoán trước sinh

Trước đây, những thai phụ mang gen bệnh thường được tư vấn chỉ nên sinh con gái, nếu thai nhi là con trai thì được khuyến cáo nên đình chỉ thai nghén để tránh sinh con có thể bị bệnh Hemophilia A. Ngày nay, những tiến bộ về sinh học phân tử đã cho phép phát hiện chính xác những người lành mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp tử để thực hiện tư vấn hôn nhân và di truyền khi gia đình có nguyện vọng. Các thai phụ có nguy cơ cao sinh con bị bệnh hemophilia A (người lành mang gen bệnh) được khuyến khích thực hiện chẩn đoán trước sinh và có cơ hội sinh con trai khỏe mạnh.

Kết quả chẩn đoán trước sinh thực hiện trong nghiên cứu này: Có 2/6 mẫu DNA tách chiết từ tế bào ối mang gen F8 đột biến; 4/6 mẫu không mang gen F8 đột biến; 2/4 mẫu không đột biến thực hiện chẩn đoán sau sinh đều cho kết quả phù hợp với chẩn đoán trước sinh (không có đột biến gen F8).

Trong trường hợp thai phụ là người lành mang gen bệnh mang thai giới tính nam nhưng quyết tâm sinh con cho dù con có bị bệnh hay không thì vấn đề chẩn đoán trước sinh có đặt ra hay không? Chúng tôi cho rằng vẫn nên làm chẩn đoán trước sinh bởi nếu biết trước thai nhi bị bệnh thì thai phụ này khi sinh con không được can thiệp thủ thuật để lấy thai vì như vậy dễ gây chảy máu cho thai nhi. Biết trước thai nhi bị bệnh máu khó đông giúp bác sỹ sản khoa có quyết định đúng đắn khi thai phụ chuyển dạ.

Việc phát hiện người lành mang gen bệnh để quản lý, điều trị cũng như áp dụng các phương pháp sàng lọc, chẩn đoán trước sinh là điều vô cùng cần thiết, nhằm cải thiện chất lượng cuộc sống cho những người phụ nữ mang gen bệnh và quan trọng nhất là làm giảm số trẻ sinh ra bị bệnh hemophilia A do di truyền.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu có thể đưa ra một số kết luận sau:

1. Phát hiện người lành mang gen F8 bị đột biến

Trong 50 gia đình có con bị bệnh hemophilia A đã xác định được đột biến:

- 34/50 người mẹ mang gen F8 đột biến ở dạng dị hợp tử, chiếm tỷ lệ 68% và 16/50 người mẹ (chiếm tỷ lệ 32%) không mang gen F8 đột biến

- 55/116 thành viên nữ (gồm bà ngoại, bác, dì, chị, em gái ...) mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp tử, chiếm tỷ lệ 47,4 %; 61/116 thành viên nữ không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 52,6%.

2. Chẩn đoán trước sinh bệnh hemophilia A

6/12 thai phụ là người lành mang gen bệnh được thực hiện chẩn đoán trước sinh: 4/6 mẫu ối (thai nhi) không bị đột biến gen F8 nên 4 thai phụ này được tư vấn di truyền giữ thai và 2/4 trường hợp chẩn đoán sau sinh cho kết quả không đột biến gen F8 phù hợp với chẩn đoán trước sinh; 2/6 mẫu ối (thai nhi) mang gen yếu tố VIII đột biến nên 2 thai phụ này được tư vấn đình chỉ thai nghén.

KHUYẾN NGHỊ

1. Cần sớm phát hiện người lành mang gen bệnh trong các gia đình bệnh nhân hemophilia A để có kế hoạch quản lý, theo dõi và tư vấn di truyền.

2. Cần thực hiện chẩn đoán trước sinh đối với tất cả trường hợp mẹ là người lành mang gen bệnh mang thai giới tính nam để xác định thai nhi có bị bệnh hay không để từ đó có quyết định đình chỉ thai nghén càng sớm càng tốt hoặc nếu không cần có kế hoạch dự phòng chảy máu cho thai phụ và thai nhi lúc sinh.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC

ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Bùi Thị Thu Hương, Trần Văn Khánh, Nguyễn Việt Tiến, Nguyễn Thị Hà, Tạ Thành Văn (2013). Nghiên cứu phát hiện người lành mang gen bệnh Hemophilia A, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, Tập 83, số 3, 1-8.
2. Bùi Thị Thu Hương, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Thị Hà, Nguyễn Đức Hình, Tạ Thành Văn, Trần Văn Khánh (2014). Phát hiện người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh Hemophilia A, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, Tập 88, số 3, 1-9 .
3. Bùi Thị Thu Hương, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Thị Hà, Nguyễn Đức Hình, Tạ Thành Văn, Trần Thị Oanh, Trần Văn Khánh (2014). Phát hiện đột biến gen F8 và xác định người lành mang gen bệnh trên phả hệ gia đình một bệnh nhân Hemophilia A, *Tạp chí Nghiên cứu Y học* , Tập 89, số 4, 1-9.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



BUI THI THU HUONG

**CARRIER DETECTION AND PRENATAL DIAGNOSIS
HEMOPHILIA A**

Major : Biochemistry

Code : 62720112

MEDICAL DOCTOR DISSERTATION SUMMARY

Ha Noi - 2014

**THE DISSERTATION IS COMPLETED AT
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

BACKGROUND

Scientific guidance: **1. PhD. Tran Van Khanh**
 2. Prof.PhD. Nguyen Thi Ha

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The dissertation will be presented to the Board of Ph.D dissertation at University level at Hanoi Medical University.

At date month year 2014

The dissertation can be found at:

- National Library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University
- Library of Vietnam Medical Information.

1. Urgency of topics

Hemophilia hemophilia A is a recessive genetic disease related to gender, disease gene located on the X chromosome has no corresponding allele on the Y chromosome, so the mother can pass the disease gene to 50% of patients son and gene transfer treatment for 50% of girls. The disease can be inherited through many generations and many people get sick of the same family. The disease affects the physiological, physical, and young children are a burden to family and society. In Vietnam, an estimated 6,000 people with hemophilia and about 30,000 carriers. Although in recent years, the care of patients with hemophilia A in Vietnam has made progress, the number of patients diagnosed and managed has increased significantly, but only accounted for less than 30% of the total some people are sick and most of the gene carriers have not been diagnosed and managed. The detection of the genetic carriers of the disease plays an important role in genetic counseling and prenatal diagnosis can help prevent disease and reduce the birth incidence.

2. Objectives of the research:

1/ To detect the F8 gene mutation carrier status in family members of patients hemophilia A.

2/ Initial prenatal diagnosis for women with high-risk babies with hemophilia A.

3. The meaning of scientific and practical subjects:

The woman discovered gene carriers by conventional tests such as determining the activity of factor VIII in the blood also had difficulty because of the factor VIII activity they do not reduce or reduce less, can range from 50 - 150%, only about 10% of the women with factor VIII activity plasma <10% and bleeding manifestations. Can confirm the woman carries the gene, if he or she has published more than 2 or son hemophilia A. The woman at high risk gene carriers if he has one sick son hemophilia A or the daughter of a mother with the disease gene; the aunt or sister with the disease hemophilia A.

In Vietnam, a number of studies on hemophilia A have been published, mainly to study the clinical characteristics and subclinical,

disease incidence and evaluate the effectiveness of treatment with preparations substitutes; Researchers found the gene carrier status using restriction enzyme techniques (RFLP - Restriction Fragment Length polymorphisms) detected 44.44% of mothers gene carriers; research on the nature of hemophilia A family... But there is no adequate studies and comprehensive disease gene status of female members at high risk in patients with hemophilia A. Family Use direct detection method (by I-PCR technique and sequenced), we determine the exact status of the gene carriers female family members hemophilia A patients (suddenly discovered F8 gene mutation) to have genetic counseling centers and prenatal diagnosis.

This study determined the F8 gene mutation carriers was first performed in Vietnam using the techniques of modern molecular biology identify the disease gene status of the members of high-risk women in the household patients with hemophilia A. family Research plays a very important role because most of the female members of gene carriers are still in child-bearing age, the findings are accurate status F8 gene mutations in subjects this is essential for screening and prenatal diagnosis, prevention continues to give birth to children with hemophilia A

4. Thesis structure

- The thesis is presented in the 126 pages (not including references and appendices). The thesis is divided into 7 sections:

- + Introduction: 2 pages
- + Chapter 1: Overview document 34 pages
- + Chapter 2: Objects and methodology 16 pages
- + Chapter 3: Research Results 41 pages
- + Chapter 4: Discussion 31 pages
- + Conclusion: 1 page
- + Propose: 1 page

The thesis consists of 10 tables, 53 charts and figure 2. Using 113 references, including Vietnamese, English and some Web pages. The appendix includes medical studies, lists 166 female members of the family hemophilia A patients, findings healthy people carry the disease gene, genealogical charts of 6 family truocsinh diagnosis and illustrations.

Chapter 1: OVERVIEW

1. Hemophilia A disease

Hemophilia (hemophilia A) is the most common genetic disease due to deficiency or abnormal function of the coagulation factors (factor VIII) in plasma.

According to world organizations Hemophilia (WFH), there are currently about 250,000 patients with hemophilia and only about 50,000 are specific treatment [19]. The incidence of hemophilia A in similar geographic regions, countries, races, overall disease frequency range 30-100 / $\square 20 \square$ 1,000,000 people. The incidence of hemophilia A is $\square 1/4000$ $1/5000$ males, [11], [21].

In Vietnam, there are currently about 6,000 hemophilia patients and about 2,200 (accounting for nearly 40%) patients were detected and regular care. Thus, the proportion of patients are not diagnosed and treated remain at a high level [7].

Confirmed diagnosis of the disease Hemophilia A: Based on clinical: There bruises, hematoma, bleeding; Based on family history; Based on blood tests, is the most important factor VIII activity plasma dropped below 40%.

Molecular mechanisms hemophilia A: Gene regulation of factor VIII synthesis is located at Xq28 on the X chromosome, is one of the largest genes, size 186 Kb of 26 exons, of which 24 exons in size from 62 bp to 262 bp and exon 2 exon 14 largest (3106 bp) and exon 26 (1958 bp), 9 Kb mRNA encoding. F8 gene mutation causing deficiency or abnormal function halt factor VIII clotting cascade endogenous way, resulting in prolonged bleeding, do not hold in patients with hemophilia A

There are many types of F8 gene mutations causing hemophilia A: point mutations (nucleotide replacement mutation causing missense or nonsense) accounted for the highest percentage (47.5%) followed by mutations, including the island of inversion paragraph intron 1 and intron 22 (36.7%), the rest are deleted gene mutations account for about 10-15%. Depending on the type and location F8 gene mutations that can cause disease severity.

2. Hemophilia A carriers

Healthy carriers of hemophilia A gene is X-chromosome bearing a mutated F8 gene and a normal chromosome X, so that most of them do not manifest the disease.

The daughter of a hemophilia A patient, the mother of two sons is sick; the mother of a son or a daughter is sick gene carriers and a man with blood in the family tree is sick; who certainly F8 gene is mutated according to the genetic rules, known as the healthy gene carriers is mandatory (obligate carriers). Grandmother of one grandson is hemophilia A, a daughter of a mother with hemophilia A gene, aunt and sister of a patient with hemophilia A who have high-risk gene carriers (carrier thê).

People with hemophilia expression similar to a mild case of hemophilia A, then known as the healthy gene carriers with symptoms (symptomatic carriers). Approximately 10% of the gene carriers of factor VIII activity in plasma is lower than normal, and even a few cases of the gene carriers of factor VIII activity plasma is 4% lower than similar bleeding severe disease with factor VIII concentrations from 5% to 40% may be bleeding similar to mild patients. Approximately 20% of healthy people carry the disease gene bleeding symptoms with different levels, including those with active plasma factor VIII in the normal range (40 to 60%).

With the female member gene carriers, to accurately determine gene status by molecular biology techniques help the consultant early genetic advice before their marriage to raise awareness about the disease, reduced pregnancy rate and percentage of children born with the disease hemophilia A.

Identifying gene status to help women increase the efficiency measures in preventing disease, and improving the quality of health care for the community and society.

3. Methods to detect the carriers of hemophilia A

- The clotting tests

Quantitative assay of factor VIII activity in serum is usually lower than normal values (50-150%). However, only about 10-20% to detect carriers of the gene expression of mild disease activity and serum factor VIII <35%, the rest of the factor VIII activity plasma oscillations in approximately 40-60% and no symptoms. Therefore, this test does not detect a lot of cases the disease gene carriers.

- Detection of the disease gene carriers based on pedigree analysis

For those cases where the patient has a family history clear, based on the results of phylogenetic analysis can ascertain gene status of women in family members of patients. However, this method also detected only limited amounts of the gene carriers and the information collected to construct phylogenetic requires accurate and influenced by racial factors. This technique is not applicable to cases of single family [51], [52], [53].

- Detection of the disease gene carriers with molecular biology techniques

+ **Directly method:** A method of detecting gene status of the mother and the female members of the family based on point mutations have been identified only in patients with Hemophilia A. This method found achieve 99-100% of cases the disease gene carriers. In this study we used the I-PCR technique to detect mutated intron 22 inversion technique sequenced all 26 exons to detect point mutations and deletion stages are modern methods and accuracy, identification disease gene status of the members of high-risk women in the family Hemophilia A patients (detected mutations).

+ **Indirect method:** link analysis is used in more recent years, use of restriction enzymes Bcl I, Hind III and intron7 G> A (c.1010 - 27g> A) plus polymorphism STR in intron 13 and 22 linkage analysis method implemented fast, relatively inexpensive, reliable way to detect cases of hemophilia A in the family tree has many sick people. However, linkage analysis methods can not detect carrier status in families with genetic mutations arise in the process of forming gametes.

4. Prenatal Diagnosis of hemophilia A

Results genetic analysis that pregnant women with the disease gene screening factor is most important. After the screening process

analysis, women with high-risk babies with hemophilia A will be conducted sampling fetal cells to analyze and identify mutations.

5. Studies of healthy people carry the disease gene in Vietnam

The study of this disease in our country has been concentrated mainly on the incidence, clinical features, pre-clinical, treatment, and the psychological impact of the disease on patients and family members. So are open for application in molecular biology techniques to analyze and detect the F8 gene mutation, genetic disease carrier status and prenatal diagnosis.

Chapter 2: SUBJECTS AND METHODS

2.1. Research Subjects

Of 50 patients with hemophilia A families were identified F8 gene mutation (Gen Research Center - Protein Hanoi Medical University) includes:

- Mother of 50 patients.
- 116 female members (grandmother, their grandmother, her aunt, aunt, sister, sister....) have the same blood with the patient.
- 12 pregnant women/166 family members of patients in which 6/12 healthy women who carry genetic diseases, are pregnant at 12-18 weeks of gestation.
- 20 people (10 male, 10 female) healthy, with no family history of the disease genetic engineering used to standardize and control samples and samples from carrying out research in molecular biology techniques for genetic analysis.

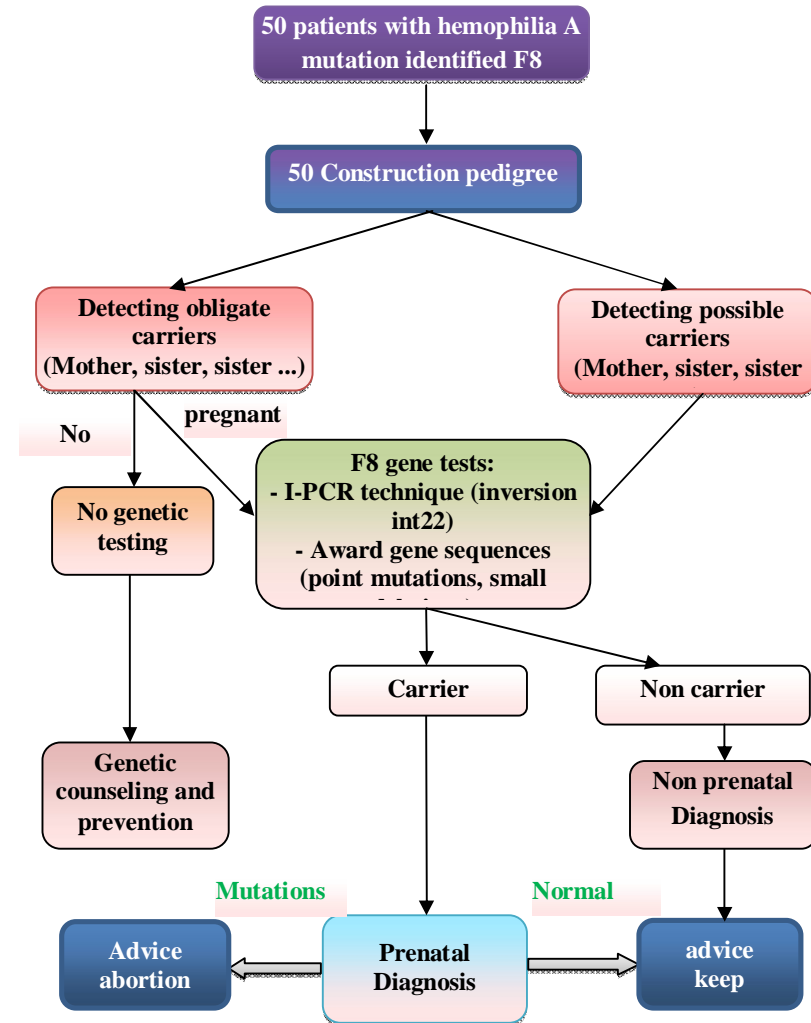
2.2. Research Methodology:

Using a prospective study and cross-sectional descriptive

2.3. Study sites

- + Center for Gene Research - Protein, Hanoi Medical University.
- + Time from 1/2012 - 6/2014.

Diagram of the study design:



2.4. The process and techniques used in the study

- PCR amplification F8 gene exon 26
- Technical sequenced

- I-PCR technique (Inversion-PCR) to identify the intron 22 inversion mutation.

- Analysis of family genealogy patients.
- Prenatal Diagnosis of Hemophilia A patients

2.5. Thread adhere research ethics in medicine.

Chapter 3: RESULTS

3.1. Characteristics of the study subjects

Table 3.2. Distribution of study subjects according to sex with patient

Relationship to patient	n	Ratio
The mothers	50	30,1
The female members (grandmother, uncle, aunt and sister)	116	69,9
Total	166	100

Comment:

In the women's 166 members of 50 families with 50 patients with hemophilia A mother, accounting for 30.1% and 116 people, including her uncle, aunt and sisters of patients, accounting for 69.9% rate.

3.2. Detection rate for genetic disease carrier status through pedigree analysis

Table 3.2. The proportion of carriers of the disease gene discovery is based on pedigree

Status gene	Obligate carriers (n,%)	Possible carriers (n,%)	Total (n,%)
Family members			
Mother of patient	20 (40%)	30 (60%)	50
Other female members	23 (20%)	93 (80%)	116
Total	43 (26%)	123 (74%)	166

Comment: Based on the results of phylogenetic analysis detected 20/50 maternal gene carriers (accounting for 40%); 30/50 mothers who have high-risk gene carriers (accounting for 60%); 23/116 female members of gene carriers (accounting for 20%); 93/116 female members who are at high risk gene carriers (accounting for 80%); 43/166 patients who definitely gene (accounting for 26%); 123/166 people with high-risk gene carriers (accounting for 74%)

3.3. Findings the F8 gene mutation carriers

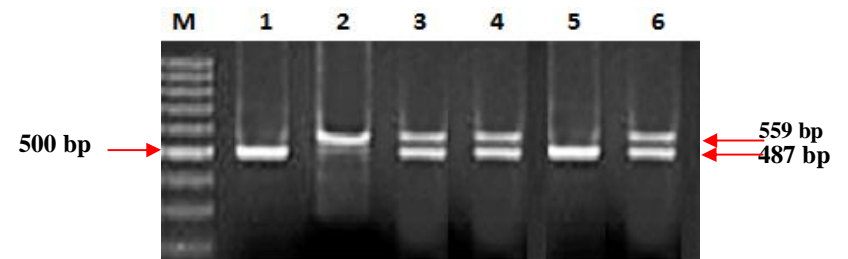
3.3.1. DNA extraction results

Total DNA from whole blood is separated by the method of phenol/chloroform. The concentration of total DNA extracted value from 150 - 1200 ng/ml and purity of the samples with satisfactory optical density ratio measured at 260/280 nm wavelengths are in the range of 1.8 -2.0.

3.3.2. Findings healthy people carry the disease gene by gene analysis methods.

3.3.2.1. Findings the F8 gene mutation carriers intron22 inversions

- The results of the detection of carriers of the disease gene in the patient's family HA02



M: Marker 100bp
 1: The normal (negative control)
 (II1)3: Patients (III4)
 3 : Patient's mother (II3)
 4: Uncle younger patients
 5: Aunt patients (II5)

Figure 3.4. Picture multiplex PCR identified mutations intron 22 of the patient's family HA02

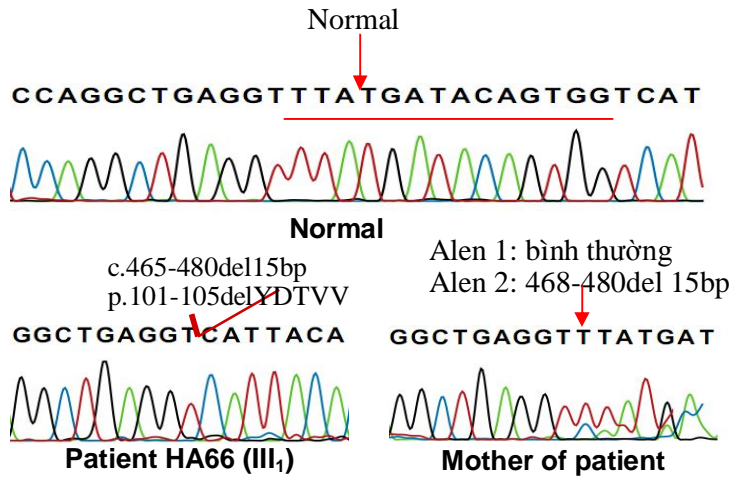


Figure 3:16. Sequenced pictures of the family code HA66

Comment: Picture sequenced exon 3 of the F8 gene mother (III) of patients HA66 peaks appear superimposed starting position mutations were detected in patients (c. 468 - 480del15bp), demonstrated the parent patients F8 gene mutations in heterozygous state.

- Genealogy of the family code HA66 patients after gene analysis

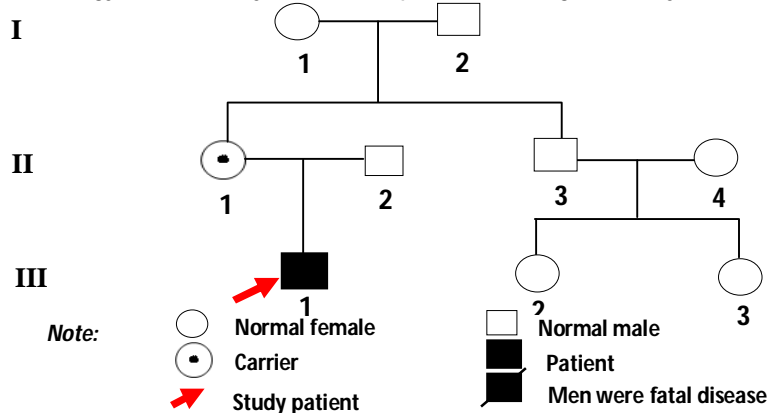


Figure 3:17. Patient's family pedigree code HA66 (after genetic analysis)

Comment: In 2 female members (II, III) family HA66 patients at high risk of carrying disease genes have been identified: one female member F8 gene mutation in the heterozygous state (III1, II3, III2), 1 female (II - grandmother patients) did not carry mutations in the F8 heterozygous state.

3.3.2.4. The genetic analysis of case mothers family hemophilia A patients do not carry disease genes* Kết quả phân tích gen gia đình bệnh nhân mã số HA92

Patients HA92 add 1 nucleotide mutation in exon 14 A (c. 3864-70 INSA) causing amino acid replacement Arginin Glysin the codon position bias in 1271 and translated the entire frame of the remaining amino acids. (P. Gly1271Argfs * 7).

- Genealogy of the patient's family code HA92

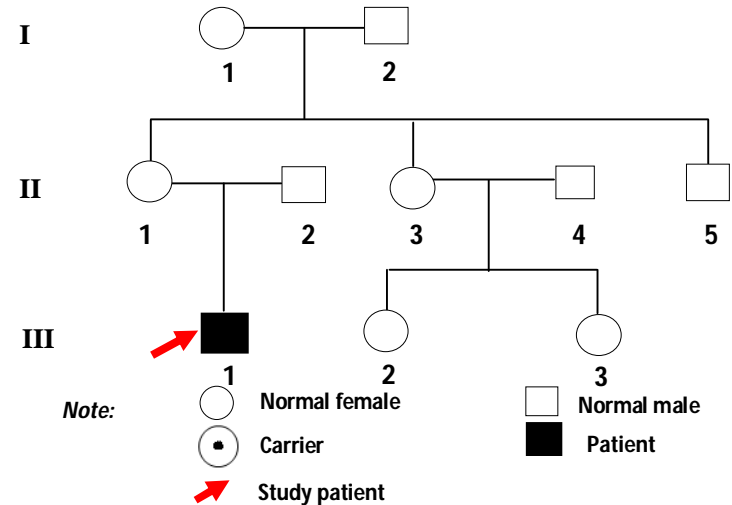


Figure 3:18. Patient's family pedigree code HA92

Comment: The family code HA92 patients had a sick son hemophilia A (code HA92 patients), family history before nobody like ill patients, so her grandmother (II1), mother (III1), aunt (II3) and cousin patient (III2, III3) who may be carriers of the disease gene.

- The results of the detection of carriers of the disease gene

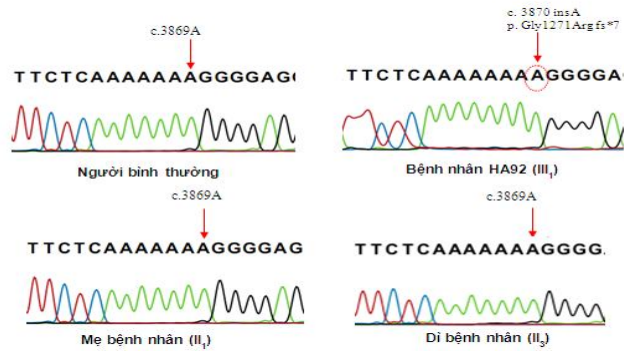


Figure 3:19. Sequenced pictures of the family code HA92

Comment: Picture sequenced exon 14 of the F8 gene mother (II1) and aunt (II3) of patients HA92-like sequence of the normal gene, suggesting that the mother and aunt patients F8 gene mutation in the heterozygous state. From this result without genetic analysis of the patient's cousin (III2, III3) because mutations in patients is not caused by a genetic mutation.

3.4. Detection rate for genetic disease carrier status

Table 3.4. The rate of gene discovery healthy people sick manng

Family members	Carrier			Non carrier (n,%)	Total
	Phylogenetic analysis	Gene tets	Total (n,%)		
Mother of patient	20	14	34 (68)	16 (32)	50
Other female members	23	32	55 (47,4)	61 (52,6)	116
Total	43	46	89 (54)	77 (46)	166

Note: other female members including her uncle, aunt and sisters patients

Comment: Of 50 mothers with 34 F8 gene mutation in the heterozygous state, accounting for 68% and 16 people (32% rate) is not bringing F8 gene mutation.

55/116 female members (including her, her aunt, aunt, sister of the patient) F8 gene mutation in the heterozygous state, accounting for 47.4%; 61/116 members who did not carry the F8 gene mutation, accounting for 52.6% rate.

89/166 female members of the family are carriers of genetic diseases, accounting for 54%; 77/166 female members did not carry the disease, accounting for 46%.

3.5. Prenatal diagnosis disease Hemophilia A

3.5.1. General characteristics of the women participating in the study

Table 3.6. Some common characteristics of the women participating in the study

Characteristic		n
Total number of women in the study		12
Gestational age	<12 weeks	3
	12-15 weeks	6
	>15 weeks	3
Non carier		6
Carrier		6

Comment:

There are 12 women participating in the study, including 6 women who were identified as carriers of genetic diseases are pregnant weeks 12-18, the fetus is diagnosed through ultrasound male 5 cases and 1 case the female sex. These women after consultation with aspirations to do prenatal diagnosis.

3.5.2. Determination of purified DNA extracted from amniotic cells

6/12 women presenting diagnosis was conducted before amniocentesis in the 15th week of pregnancy at the Central Obstetrics Hospital under the guidance of ultrasound. DNA extracted from amniotic cells and examined on Nano purity drop. DNA samples obtained with high purity, ranging from 1.8 to 1.9 and the concentration range 200-540 ng / ml.

3.5.3. Results for prenatal diagnosis

* Results for prenatal diagnosis of the patient's family HA04

Patients HA04 add 1 nucleotide mutation in exon 14 A (c.4550insA) deflects the entire frame translation from the amino acid codon position 755 on the protein factor VIII. (Results are conducted at the Center for Gene-Protein Research, Hanoi Medical University.

- The patient's family pedigree HA04

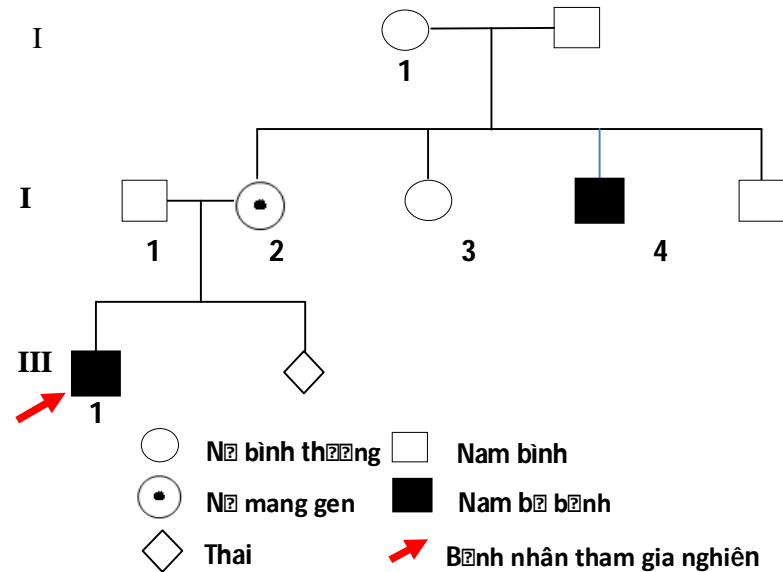


Figure 3:24. Patient's family pedigree HA04

Comment: HA04 patient's family has a sick son hemophilia A (patient numbers HA04 - III1), in the family tree had a boy (II3) is sick, so pregnant women - mothers of patients (III 1) is a genetic disease carrier status compulsory prenatal diagnosis during pregnancy is necessary if the fetus is male gender.

- The results of sex determination of the fetus (III2)

PCR was conducted with primers to amplify genomic regions allows sexing SRY (size 254 bp) on chromosome Y-specific results showed that the fetus (III2) were male.

- The results of determination of fetal mutations (III2)

Based on mutations in DNA marker HA04 patients, DNA samples extracted from amniotic cells of III1 pregnant women (fetal III2) were analyzed to determine the mutation and then 1-year test results by gene sequencing techniques.

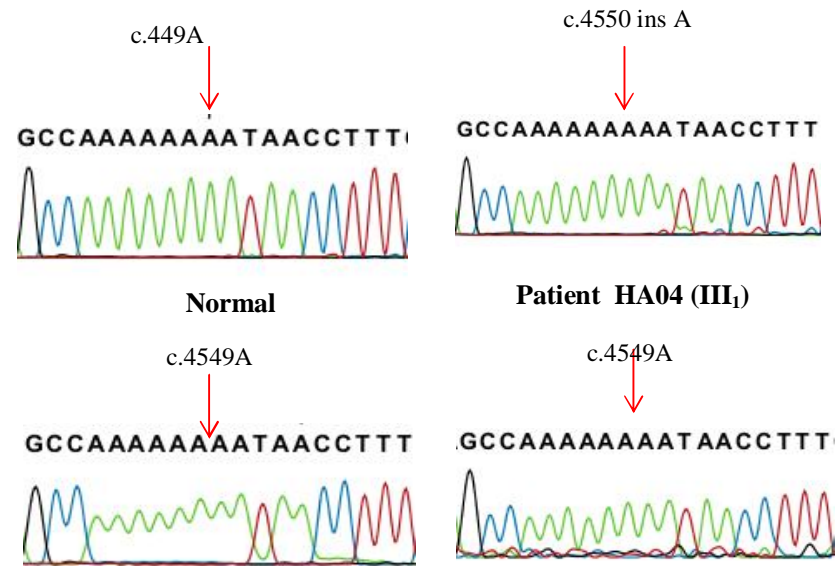


Figure 3:25. Picture sequenced exon 14 of the F8 gene Fetal DNA (III2) before and after childbirth

Comment: Picture sequenced exon 14 of the F8 gene DNA III2 fetus before birth like no mutation was detected mutations in patients and test results after birth to allow his brother confirmed patients HA04 (III2) is not mutated gene exon14 F8.

Table 3.7. Results revealed a mutation in amniotic fluid samples for prenatal and postnatal diagnosis

Result		n	Sex
Fetal disease		2/6	Nam
The fetus does not get sick		3/6	Nam
The fetus did not carry disease		1/6	Nũ
There postnatal diagnosis	F8 gene mutation	0/2	
	Non F8 gene mutation F8	2/2	Nam
Unrealized diagnosed after birth		2/4	1nam, 1nũ

Comment:

There are two sixths DNA extracted from amniotic cells F8 gene mutation; 4/6 sample F8 gene mutations: 2 samples did not perform mutation are diagnosed after birth results in accordance with prenatal diagnosis (no F8 gene mutation); 2 samples unrealized diagnosed after birth because the unborn.

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.1. Characteristics of the study subjects

Of 166 members of 50 female patients with hemophilia A family study participants had 50 mothers, accounting for 30.1% and 116 people, including her uncle, aunt and sisters of patients, accounting for 69.9%, many of which are those of childbearing age and children under 18 years of age. The early identification of gene status of the child will help mothers care about their children early from the first menstrual cycle lasts not see, do not have menorrhagia, abdominal pain... and help the children as adults have the knowledge and plan for their future, actively prevent the risk factors for bleeding

and help the scientific basis for prenatal diagnosis and genetic counseling, childbirth avoid being hemophilia A

4.2. V E ratio to detect the gene carriers based on pedigree analysis

For those cases where the patient has a family history clear, based on the results of phylogenetic analysis can ascertain gene status of women in family members of patients. Based on the results of phylogenetic analysis of our study was to detect 20/50 maternal gene carriers (accounting for 40%); 30/50 mothers who have high-risk gene carriers (accounting for 60%); 23/116 female members of gene carriers (accounting for 20%); 93/116 female members who are at high risk gene carriers (accounting for 80%). The study results also showed that 43/166 people carries the gene certainly, accounting for 26%. %. Thus, the detection rate of the gene carriers of this technique is low and does not apply to individual cases in the family.

4.3. Findings about the F8 gene mutation carriers

4.3.1. On the technical process to extract DNA from peripheral blood and amniotic cells:

DNA extraction is a critical first step in the process of applying the techniques of molecular biology. If possible DNA extraction, ensuring the purity, the DNA molecule, unbroken, no contamination, the next response will get results with high accuracy. With the purified DNA, PCR reactions will be inhibited due to contamination or generate nonspecific products.

The DNA samples in the study have a high concentration and purity in the range from 1.8 to 2.0 allowed (Table 3.1). It is a prerequisite to ensure the technical results of the procedure followed in the study.

4.3.2. Findings on healthy people carry the disease gene by gene analysis method

4.3.2.1. Detecting the F8 gene mutation carriers intron22 inversions

Intron 22 inversion mutation is caused by recombination between copies of the int 22h (repeat region consisting of 9.5 kb) of intron 22 and one of two identical copies of the telomere is located at position 400 kb at the 5' end of the F8 gene. Inversion phenomenon leading to fracture F8 gene and the disease can cause severe consequences for the patient. This mutation accounts for 45-50% of patients with severe Hemophilia A.

For patients who have been identified with the intron 22 inversion mutation, based on just this point mutation analysis we discovered gene carrier status by I-PCR technique.

Figure 3.4 shows the results for the mother, her aunt and cousin healthy patients who carry the disease gene in the heterozygous state. Aunt of patients did not carry the disease. Although the mother has been identified as gene carriers is mandatory, but we are still analyzing DNA samples from the mother, as it is proof positive samples for gene status in the heterozygous state for female members other family members. This proves that there is no difference in terms of implementation of process steps to detect mutations and inversions, such analysis results are reliable. The research results provide information to clinicians advising mother, uncle, sister, patients need to do prenatal diagnosis for future pregnancies.

4.3.2.2. Detecting the F8 gene mutation carriers point

F8 gene point mutations in patients with hemophilia A mutation markers to detect gene status of women in family members of patients. We use gene sequencing techniques to analyze all 26 exons F8 gene in order to determine the exact status of gene carriers in the state zygote. This is one of the modern techniques and the most accurate.

4.3.2.3. Detection of gene carrier status F8 gene deletion mutants

For the case of patients with mutations add or remove small sections below 50bp, in this study we use techniques F8 gene sequencing to detect the disease gene carriers in the heterozygous state in order to save costs charge.

Picture sequenced exon 3 of the F8 gene mother (II1) of patients HA66 peaks appear superimposed starting position mutations were detected in patients, suggesting that the mother's DNA sample with 1 allele normal allele and one mutated nucleotide at position 15 c. 468 - 480del15bp and so this mother F8 gene mutation in the heterozygous state.

4.3.2.4. In case of hemophilia A patient whose mother did not carry disease

Picture sequenced exon 14 of the F8 gene mother (III1) and aunt (II3) of patients HA92-like sequence of the normal gene, suggesting that the mother and aunt patients carrying mutations in the F8 gene status heterozygotes. From this result without genetic analysis of the patient's cousin (III2, III3) because mutations in patients is not caused by a genetic mutation.

Thus maternal gene completely normal F8, F8 gene mutation in exon 14 patients HA92 is a new mutation arises.

4.4. The percentage of healthy people carry the disease gene

The study was conducted with 50 patients with Hemophilia A family has identified point mutations showed only 34/50 mothers F8 gene mutations in heterozygous form accounting for 68% and 16/50 people (accounting for 32%) did not carry F8 mutations, this result is based on a small sample size can not conclude, however tentatively suggest conformity with the law of hereditary diseases (2/3 of cases due to genetic mutation, new mutation third is incurred). The results identify gene status of the mother is very important: if the mother carries the gene diseases such as hereditary nature of the disease,

genetic diseases son received from the mother, the maternal genetic disease can get from one generation before. The study results demonstrate the new mutation rate arising in patients with hemophilia A Vietnam is 32%. This can be explained by external factors impact on the development process in the body gametes father or mother as habitat conditions, due to eating habits, because war has left many toxic substances in the environment,...

Genetic testing results showed 55/116 female members in the heterozygous form (accounting for 47.4%); 61/116 members who did not carry the mutated gene (accounting for 52.6%). S Shetty's research (2001) on 102 patients with hemophilia A families (India) show a healthy proportion of gene carriers is higher than our study (64.5%), possibly due to rate family medical history of two different studies, but the female members of the family there is a clear medical history which may carry a higher genetic diseases.

We detected 89/166 female members (including my grandmother, mother, uncle, aunt, sisters patients...) are carriers of genetic disease hemophilia A. The result of this discovery is important because with 89 this woman is no longer a suspect, but was certainly gene, so they need to do more quantitative assay of factor VIII activity plasma to determine the risk of bleeding. This result suggests that this woman needed a contingency plan to ensure overall health and reproductive health in particular to improve the quality of life. The study also confirmed that the 77/166 certainly does not carry the disease.

4.5. On the results of prenatal diagnosis

In the past, women often carry genetic disease should be counseled daughter, if the fetus is the son shall be advised to avoid pregnancy termination may be ill baby Hemophilia A. Today, advances of molecular biology has allowed the accurate detection of the disease gene carriers in the heterozygous state to perform

marriage counseling and genetic family wishes. Pregnant women are at high risk babies with Hemophilia A patients (healthy people carry the gene) are encouraged to perform prenatal diagnosis and the chance for a son healthy.

Results for prenatal diagnosis performed in this study: There are two sixths DNA extracted from amniotic cells F8 gene mutation; 4/6 sample F8 gene mutation; 2/4 samples did not perform mutation are diagnosed after birth results in accordance with prenatal diagnosis (no F8 gene mutation).

In the case of pregnant women are carriers of genetic diseases of male pregnancy, but determined to bear a child whether or not the patient had been diagnosed before birth problems pose or not? We believe that there should be diagnosed before birth by the anticipation of the fetus is sick, pregnant women giving birth are not intervene because the tricks to get pregnant so easily cause bleeding to the fetus. Know before baby has hemophilia help obstetricians have right decisions when the pregnant woman in labor.

The detection of the genetic carriers of the disease to manage, as well as treatment methods applied screening, prenatal diagnosis is essential, in order to improve the quality of life for women who carry genetic diseases and most importantly, reduce the number of children born with hemophilia A hereditary disease.

CONCLUSION

From the research results can offer some conclusions:

1 To detect carrier status F8 gene mutation

In 50 families with a child with hemophilia A mutations have been identified:

- 34/50 mothers F8 gene mutation in the heterozygous form, accounting for 68% and 16/50 mothers (32% occupancy rate) is not bringing F8 gene mutation

- 55/116 female members (including my grandmother, uncle, aunt, sister, sister...) gene carriers in the heterozygous state, accounting for 47.4%; 61/116 female members did not carry the disease, accounting for 52.6% rate.

2 prenatal diagnosis of hemophilia A

6/12 pregnant women who are carriers of the disease gene was performed prenatal diagnosis: 4/6 samples of amniotic (fetal) F8 gene mutations were not so pregnant women are four genetic counseling pregnant and keep 2/4 cases diagnosed after birth outcomes F8 gene mutation is not suitable for prenatal diagnosis; 2/6 samples of amniotic (fetal) factor VIII gene 2 mutations should be advised pregnant women to abortion.

RECOMMENDATIONS

1 For early detection of the disease gene carriers in patients with hemophilia A families to have management plans, monitoring and genetic counseling.

2 For prenatal diagnosis performed in all cases the mother is healthy gene carriers male pregnancy to determine fetal or illness from which there is no abortion decision as soon possible or if not needed a backup plan bleeding during pregnancy and the fetus at birth.

LIST OF PUBLIC SCIENTIFIC WORKS RELATED TO THE DISSERTATION

1. Bui Thi Thu Huong, Tran Van Khanh, Nguyen Viet Tien, Nguyen Thi Ha, Ta Thanh Van. Researchers found the gene carriers of Hemophilia A patients, Journal of Medical Research, Volume 83, No. 3, 1-8 (2013).
2. Bui Thi Thu Huong, Tran Huy Thinh, Nguyen Thi Ha, Nguyen Duc Hinh, Ta Thanh Van, Tran Van Khanh. Detecting genetic disease carrier status and prenatal diagnosis of diseases Hemophilia A, Journal of Medical Research, Volume 88, No. 3, 1-9 (2014).
3. Bui Thi Thu Huong, Tran Huy Thinh, Nguyen Thi Ha, Nguyen Duc Hinh, Ta Thanh Van, Tran Thi Oanh, Tran Van Khanh. F8 gene mutation detected and identified the disease gene carriers on a family genealogy Hemophilia A patients, Journal of Medical Research, Volume 89, No. 4, 1-9 (2014).