

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

BỘ Y TẾ

**NGUYỄN HOÀNG NAM**

**NGHIÊN CỨU KIỂU HÌNH VÀ KIỂU GEN  
Ở BỆNH NHI BETA-THALASSEMIA**

**Chuyên ngành: Nhi khoa  
Mã số: 62720135**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2019**

**Công trình được hoàn thành tại  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Bùi Văn Viên  
TS. Dương Bá Trục**

**Phản biện 1:** .....

.....

**Phản biện 2:** .....

.....

**Phản biện 3:** .....

**Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường  
Họp tại Trường Đại học Y Hà Nội**

*Vào hồi      giờ, ngày      tháng, năm 2019*

**Có thể tìm hiểu luận án tại:**

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Beta-thalassemia là một bệnh do giảm hay không tổng hợp được mạch globin  $\beta$  trong hemoglobin, vì đột biến gen  $\beta$ -globin (*HBB*). Bệnh di truyền theo quy luật alen lặn, nhiễm sắc thể thường.

Lâm sàng  $\beta$ -thalassemia rất không đồng nhất, từ thể nhẹ không có triệu chứng đến thể nặng. Mức độ nặng của bệnh liên quan tới sự mất cân bằng giữa mạch globin alpha và beta, với đặc điểm đột biến và kiểu gen *HBB*. Nghiên cứu kiểu hình, kiểu gen  $\beta$ -thalassemia là cơ sở khoa học cho chẩn đoán trước sinh. Nghiên cứu về đột biến gen  $\beta$ -thalassemia ở Việt Nam còn chưa đủ, nhất là còn chưa có nghiên cứu về mối liên quan giữa kiểu gen-kiểu hình  $\beta$ -thalassemia. Xuất phát từ đó, chúng tôi nghiên cứu đề tài: *“Nghiên cứu kiểu hình và kiểu gen ở bệnh nhi  $\beta$ -thalassemia”*.

### **Mục tiêu nghiên cứu:**

- 1. Mô tả kiểu hình lâm sàng, huyết học của bệnh nhi mắc beta-thalassemia tại Bệnh viện Nhi trung ương;*
- 2. Xác định đột biến gen  $\beta$ -thalassemia ở trẻ bệnh;*
- 3. Đối chiếu kiểu hình và kiểu gen của trẻ mắc  $\beta$ -thalassemia thể nặng và trung gian.*

## TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

$\beta$ -thalassemia là bệnh di truyền phổ biến ở Việt Nam. Điều trị thalassemia thể nặng và trung gian chủ yếu bằng truyền máu, thải sắt suốt đời, và ghép tủy xương, là gánh nặng cho gia đình và xã hội. Do đó việc dự phòng nhằm hạn chế sinh ra các thể bệnh nặng và trung gian là quan trọng. Để có cơ sở khoa học cho việc dự phòng cần phải biết được đặc

điểm về di truyền bệnh. Vì thế nghiên cứu này là cấp thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

### **NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN**

- Đã phát hiện nhiều dạng đột biến hơn các nghiên cứu đã công bố trước đây ở Việt Nam như -88.

- Nghiên cứu đặc điểm đột biến gen *HBB* thấy xảy ra nhiều ở tiền trình dịch mã RNA hơn hoàn thiện RNA và phiên mã, đa số ở exon hơn intron và vùng khởi động, nên đa số đột biến có kiểu hình  $\beta^0$ . Từ đó đã rút ra được kết luận, ở Việt Nam  $\beta^0$ -thalassemia phổ biến hơn  $\beta^+$ -thalassemia.

- Nghiên cứu đối chiếu kiểu gen với kiểu hình thể bệnh nặng và trung gian thấy các đột biến CD41/42, CD17, CD71/72 và các kiểu gen phối hợp các đột biến này với đột biến khác liên quan nhiều đến thể bệnh nặng, đã đưa ra kiến nghị chỉ định đình chỉ thai cho chẩn đoán trước sinh.

### **BỐ CỤC LUẬN ÁN**

Luận án được trình bày trong 112 trang, bao gồm : Đặt vấn đề 3 trang, tổng quan tài liệu 36 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 12 trang, kết quả nghiên cứu 28 trang, bàn luận 29 trang, kết luận 2 trang, kiến nghị 1 trang. Luận án có 47 bảng, 15 hình, 2 sơ đồ. Tài liệu tham khảo có 143, trong đó có 24 tài liệu tiếng Việt, và 119 tài liệu tiếng Anh.

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Dịch tễ học

#### *Phân bố beta-thalassemia trên thế giới*

Beta-thalassemia là bệnh di truyền liên quan chặt chẽ với nguồn gốc dân tộc, phân bố khắp toàn cầu, song mang tính chất địa dư rõ rệt. Theo Liên đoàn Thalassemia quốc tế (2005) ước tính có 1,5% dân số thế giới, 80-90 triệu người mang gen  $\beta$ -thalassemia, mỗi năm có thêm 60.000 trường hợp mới sinh mang gen bệnh. Riêng khu vực Đông Nam Châu Á, số người mang gen  $\beta$ -thalassemia tới 50% người mang gen toàn cầu, khoảng 40 triệu người.

#### *Beta-thalassemia ở Việt Nam*

Bệnh hemoglobin khá phổ biến là  $\alpha$ -thalassemia,  $\beta$ -thalassemia và HbE. Bệnh có ở tất cả các tỉnh thành, ở nhiều dân tộc khác nhau. Bệnh phổ biến hơn ở dân tộc ít người miền núi và cao nguyên. Beta-thalassemia phổ biến ở người dân tộc ít người miền Bắc hơn. Hemoglobin E phổ biến ở miền Trung và miền Nam hơn. Ở Việt Nam,  $\beta^0$ -thalassemia phổ biến hơn  $\beta^+$ -thalassemia.

### 1.2. Cơ sở di truyền $\beta$ -thalassemia

#### *Hemoglobin bình thường*

Hemoglobin (Hb) gồm hai thành phần là hem và globin. Globin gồm 4 mạch polypeptid, 2 mạch loại  $\alpha$ , 2 mạch loại  $\beta$ . Ở người có 6 loại Hb bình thường. Hb ở thời kỳ phôi thai là Hb Gower 1, Hb Gower 2 và Hb Portland. Hb ở thời kỳ thai nhi đến khi trưởng thành là HbA1, HbA2 và HbF. Cấu trúc globin của HbA1 là  $\alpha_2\beta_2$ . của HbA2 là  $\alpha_2\delta_2$  và của HbF là  $\alpha_2\gamma_1$ .

#### *Các gen mã hóa tổng hợp globin của hemoglobin*

Các gen mã hóa cho sự tổng hợp các globin của Hb người được sắp xếp thành 2 cụm. Các gen loại  $\alpha$  ở nhiễm sắc thể 16, còn gen-loại  $\beta$  thấy ở nhiễm sắc thể 11. Cụm gen globin  $\alpha$  gồm 3 gen chức năng, một trong ba gen đó là gen  $\xi_2$  mã hóa cho mạch  $\xi$ , là thành phần Hb phôi thai Gower 1, hai gen còn lại là gen đôi  $\alpha_1$  và  $\alpha_2$  mã hóa cho mạch globin  $\alpha$ . Cụm gen loại globin  $\beta$  gồm 5 gen chức năng, gen  $\epsilon$  mã hóa cho globin  $\epsilon$  có trong Hb Gower 1 và Hb Gower 2, gen  $\gamma$  mã hóa cho globin  $\gamma$  trong HbF, hai gen còn lại là gen  $\delta$  cho globin  $\delta$  và gen  $\beta$  cho globin  $\beta$ .

### ***Đột biến gen HBB gây beta-thalassemia***

Đột biến gây  $\beta$ -thalassemia là những thay đổi đặc hiệu không đồng nhất ở DNA. Đột biến có thể là những thay đổi ở một base đơn thuần; hoặc mất một hay nhiều nucleotid; hoặc là đảo đoạn hay tái sắp xếp chuỗi DNA. Đột biến gen *HBB* ảnh hưởng tới một trong nhiều giai đoạn biểu hiện gen, như phiên mã, hoàn thiện RNA và dịch mã RNA, ảnh hưởng đến tổng hợp globin, làm thay đổi tỷ lệ tổng hợp các mạch globin, thay đổi thành phần hemoglobin trong các bệnh cảnh lâm sàng khác nhau. Kiểu hình bệnh beta-thalassemia phụ thuộc vào sự thay đổi của đột biến gen.

Hiện nay đã phát hiện trên 200 đột biến  $\beta$ -thalassemia, phân bố các loại đột biến khác nhau tùy khu vực, quốc gia và dân tộc. Trong đó có khoảng 150 là đột biến điểm, còn lại là mất đoạn ngắn và một số loại hiếm gặp khác. Phần lớn các đột biến đã được mô tả, trong đó chỉ có khoảng 20 đột biến hay gặp, chiếm 80% các đột biến gen  $\beta$  Thalassemia trên thế giới. Mỗi vùng có tần suất  $\beta$  Thalassemia cao thường có 4 – 6 đột biến phổ biến. Các đột biến gen beta-thalassemia được phân thành 3 lớp, ở nhiều vị trí khác nhau.

(1) Đột biến phiên mã, ở vùng khởi động và 5'-UTR (5'-không phiên

mã)

(2) Đột biến hoàn thiện RNA ở vị trí nối, nối đồng thuận, intron, exon và 3'-UTR (vùng 3'–không phiên mã)

(3) Đột biến dịch mã RNA , ở vị trí codon khởi đầu, codon vô nghĩa và dịch khung (frameshift)

Ngoài ra còn có đột biến mất đoạn và đột biến trội.

Đột biến phiên mã ảnh hưởng đến trình tự khởi động phiên mã, làm giảm tổng hợp mạch  $\beta$ -globin tạo ra  $\beta^+$ -thalassemia.

Đột biến dịch mã RNA làm chấm dứt chuỗi gián đoạn  $\beta$ -globin RNA, nên không tổng hợp được mạch  $\beta$ -globin, tạo ra  $\beta^0$ -thalassemia.

Những đột biến hoàn thiện RNA ảnh hưởng đến quá trình thông tin mRNA gây biến đổi các nucleotide, dẫn đến  $\beta^+$ -thalassemia hay  $\beta^0$ -thalassemia. Đột biến ở vị trí nối, ở intron hay exon gây  $\beta^0$ -thalassemia, còn ở vị trí 3'-UTR gây ra  $\beta^+$ -thalassemia

### ***Tần số đột biến gen beta-thalassemia ở Việt Nam***

Nghiên cứu đột biến gen beta-globin gây beta-thalassemia ở người Việt Nam còn chưa đầy đủ. Kết quả đã công bố cho thấy có 8 loại đột biến phổ biến gây ra 95% các trường hợp beta-thalassemia, gồm CD17 (AAG-TAG), CD 41/42 (-TCTT), -28 (A>G), CD 71/72 (+A), IVSI-1 (G>T), IVSI-5 (G>C), IVSI2-654 (C>T) và CD 26 (GAG>AAG) gây bệnh HbE.

### **1.3. Liên quan giữa kiểu hình với kiểu gen beta-thalassemia**

Beta-thalassemia được phân thành 4 thể lâm sàng : thể mang gen ỉn, thể nhẹ, thể trung gian và thể nặng. Kiểu hình lâm sàng, huyết học phụ thuộc vào kiểu gen đột biến, vào sự phối hợp giữa đột biến  $\beta^0$  hay  $\beta^+$

## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Đối tượng nghiên cứu

104 bệnh nhi, 55 bệnh nhi  $\beta$ -thalassemia và 49 bệnh nhi  $\beta$ -thalassemia/HbE vào Bệnh viện Nhi trung ương được nghiên cứu, trong đó 50 dưới 1 tuổi, 39 từ 1- <5 tuổi, 12 từ 5- <10 và 3 từ 10–15 tuổi. 59 nam, 49 nữ; 71 là dân tộc Kinh, 33 dân là tộc ít người (trong đó Thái là 12, Tày là 10, còn lại 11 là 5 dân tộc khác gồm Mường, Sán Dìu, Dao, Bó Y), 14 bệnh nhi cư trú ở Hà Nội, còn lại ở rải rác 28 tỉnh, thành phố khác từ Hà Tĩnh trở ra đến biên giới phía bắc.

#### Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu ngang mô tả

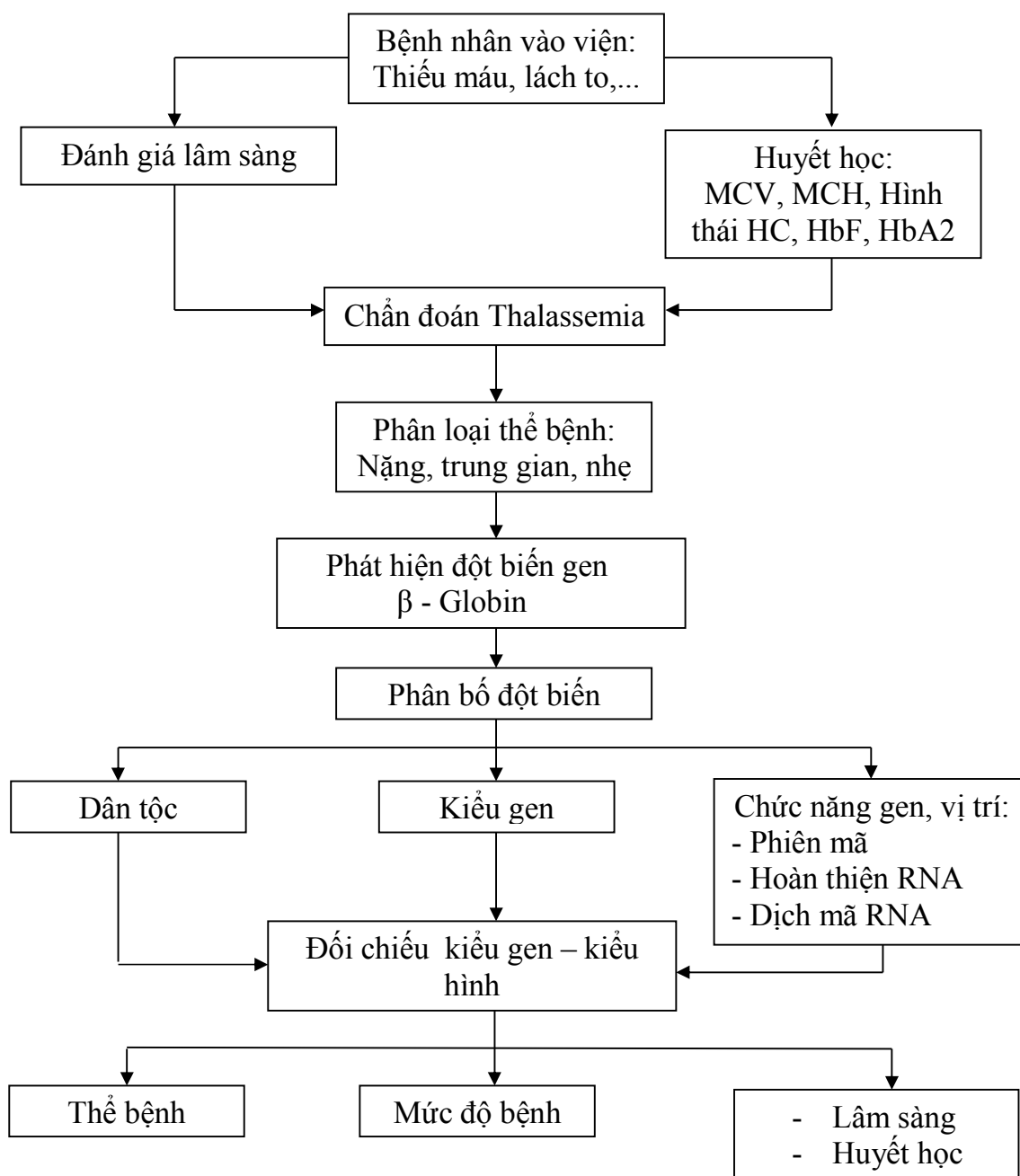
Đánh giá lâm sàng do nghiên cứu sinh cùng bác sĩ chuyên khoa thực hiện. Các xét nghiệm huyết học, hóa sinh và di truyền phân tử thực hiện tại Bệnh viện Nhi trung ương.

Quy trình phát hiện và phân tích đột biến gen beta-globin như sau :

- Tách DNA từ máu ngoại vi với bộ kit thương mại QIA của Đức.
- Phát hiện sàng lọc 9 đột biến điểm thường gặp ở Đông Nam Á, CD41/42, CD17, IVS 1-1, -28, IVS 2-654, CD 71/72, IVS 1-5, CD95 và CD 26 (HbE) bằng kỹ thuật Multiplex ARMS –PCR.
- Giải trình tự gen *HBB* khi không phát hiện được đột biến gen bằng kỹ thuật Multiplex ARMS – PCR
- Tiến hành GAP PCR để phát hiện đột biến xóa đoạn khi cần thiết.



## Thiết kế nghiên cứu



### CHƯƠNG 3

#### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kiểu hình lâm sàng, huyết học $\beta$ - thalassemia

*Bảng 3.1. Biểu hiện lâm sàng khi vào viện*

Triệu chứng lâm sàng	$\beta$ – thalassemia (n = 55)		$\beta$ – thalassemia/HbE (n = 49)		Toàn bộ $\beta$ – thalassemia (n = 104)	
	n	%	n	%	n	%
Tuổi phát bệnh : < 1 tuổi	41	74,6	17	34,7	58	55,7
1 – 3 tuổi	12	21,8	22	44,9	34	32,7
Thiếu máu	55	100	49	100	104	100
+ Đã từng truyền máu từ trước	52		42		94	
+ Tuổi truyền máu - < 1 tuổi	34	65,4	10	23,8	44	46,8
- 1-3 tuổi	13	25,0	20	47,6	33	35,1
+ Truyền máu > 5 lần / năm	40	76,9	21	50,0	61	64,0
Vàng da	7	12,7	14	28,5	21	20,2
Lách to	48	87,3	36	73,5	84	80,8
Gan to	35	63,6	24	49,0	59	56,7
Bộ mặt thalassemia	32	58,2	21	42,9	53	51,0
Da xạm đen	14	25,5	4	8,2	18	17,3
Can nặng - 2SD	13	23,6	12	24,5	25	24,0
Chiều cao – 2SD	12	21,8	12	24,8	24	23,0

Nhận xét:

- Bệnh biểu hiện sớm, 55,7% trước 1 tuổi, 88,4% dưới 3 tuổi.
- Triệu chứng lâm sàng đa dạng: 100% có thiếu máu, 81,9% phải truyền máu trước 3 tuổi, 64% phụ thuộc truyền máu, 20,2% vàng da, 80,8% có lách to, 51 % có bộ mặt thalassemia, 56,7% gan to, 17,3% có da xám xỉn và 24% có chậm tăng trưởng.
- Lâm sàng  $\beta$ -thalassemia và  $\beta$  thalassemia/HbE khá giống nhau chỉ khác nhau về mức độ.

**Bảng 3.2. Phân loại mức độ bệnh  $\beta$ -thalassemia**

Thể bệnh	Thể nặng		Thể trung gian		Thể nhẹ	
	n	%	n	%	n	%
$\beta$ – thalassemia						
$\beta$ – thal. (n = 55)	48	87,3	6	10,9	1	1,8
$\beta$ – thal./HbE (n = 49)	25	51,0	22	44,9	2	4,1
Cộng (n = 104)	73	70,2	28	26,9	3	2,9

Nhận xét: Hầu hết bệnh nhi  $\beta$ -thalassemia là thể nặng và trung gian.

**Bảng 3.3. Phân loại mức độ bệnh  $\beta$ -thalassemia trung gian**

$\beta$ – thalassemia trung gian	Số lượng	(%)
Nhóm I	7	25
Nhóm II	5	17,9
Nhóm III	16	57,1
Cộng	28	100

Nhận xét : 57,1%  $\beta$ -thalassemia trung gian ở nhóm III, có lâm sàng gần giống  $\beta$ -thalassemia nặng.

**Bảng 3.4. Hồng cầu, Hemoglobin, Hematocrit, Các chỉ số hồng cầu**

<b>Tế bào máu ngoại biên</b>	<b><math>\beta</math> – thalassemia (n = 55)</b>	<b><math>\beta</math> – thalassemia/HbE (n = 49)</b>	<b>Toàn bộ <math>\beta</math> – thalassemia (n = 104)</b>
Số lượng hồng cầu (T/l)	2,53 ± 0,73	3,15 ± 0,87	2,85 ± 0,88
Hb (g/l)	60,77 ± 16,6	69,08 ± 20,40	65,50 ± 10,3
Hematocrit (%)	18,23 ± 4,73	21,52 ± 6,26	20,05 ± 5,92
MCV (TTTBHC fl)	77,18 ± 6,42	66,88 ± 8,07	70,77 ± 8,07
MCH (HbTBHC pg)	24,68 ± 3,29	21,23 ± 3,23	23,08 ± 3,64
MCHC (NĐHbHC %)	324,05 ± 30,21	310,65 ± 25,22	318,16 ± 28,17
RDW (DPBHC)	23,11 ± 3,70	24,40 ± 2,85	23,78 ± 3,39

Nhận xét: Số lượng hồng cầu, Hb, hematocrit đều giảm nhiều, MCV giảm dưới 70,77fl, MCH giảm dưới 23,08 pg . MCHC bình thường, RDW lớn.

**Bảng 3.5. Thành phần hemoglobin ở các thể  $\beta$ -thalassemia**

<b>Thành phần Hb (%)</b>	<b><math>\beta</math> – thalassemia (n = 55)</b>	<b><math>\beta</math> – thalassemia/HbE (n = 49)</b>	<b>Toàn bộ <math>\beta</math> – thalassemia (n = 104)</b>
<b>Hb A1</b>			
- Trung bình	36,04 ± 26,2	34,06 ± 28,82	35,03 ± 27,30
- Giới hạn	0 - 78,2	0 - 61,5	0 - 78,2
<b>Hb A2</b>			
- Trung bình	3,88 ± 5,20	3,92 ± 4,80	3,90 ± 4,96

- Giới hạn	1,4 - 9,9	1,8 - 9,2	1,4 - 9,9
<b>Hb F</b>			
- Trung bình	47,83 ± 30,52	37,12 ± 18,50	40,52 ± 20,60
- Giới hạn	14,0 - 95,0	6,8 - 85,2	6,8 - 95,0
<b>Hb E</b>			
- Trung bình	-	40,32 ± 17,30	18,36 ± 10,60
- Giới hạn		12 - 63,1	12 - 63,1

Nhận xét:

- Với  $\beta$ -thalassemia, HbA<sub>1</sub> giảm nhiều, có thể 0%, HbF tăng, cao nhất tới 95%, HbA<sub>2</sub> bình thường hoặc tăng nhẹ, nhiều nhất 7,9%.

- Với  $\beta$ -thalassemia/HbE, HbA<sub>1</sub> giảm, thấp nhất cũng có thể là 0% HbF tăng, cao nhất là 85,2%, có nhiều HbE, nhiều nhất tới 63,1%, HbA<sub>2</sub> bình thường hoặc tăng nhẹ, không quá 9,2%.

### 3.2. Đột biến gen $\beta$ - globin ở bệnh nhân $\beta$ -thalassemia

*Bảng 3.6. Các đột biến gen HBB ở bệnh nhân  $\beta$ -thalassemia*

Đột biến gen $\beta$ – globin ở $\beta$ – thalassemia	Kiểu hình	Số lượng alen đột biến	Tỷ lệ %
CD 41/42 (-TCTT)	$\beta^0$	63	30,3
CD 17 (AA – TAG)	$\beta^0$	62	30
CD 26 (GAG – AAG)	$\beta^+$	49	23,5
CD 71/72 (+ A)	$\beta^0$	10	4,8
IVS 2 -654 (C – T)	$\beta^0/\beta^+$	6	2,9
-28 (A – G)	$\beta^+$	6	2,9
-88 (C – T)	$\beta^{++}$	3	1,4
CD95 (TAC – TAA)	$\beta^0$	2	1

IVS 1 – 1 (G – T)	$\beta^0$	2	1
IVS 1- 5 (G – C)	$\beta^0$	2	1
Các đột biến hiếm gặp	$\beta^+$	3	1,4
-140 (C – T)		1	0,5
c441-c442 ins AC		1	0,5
2.3kb-deletion		1	0,5
Tổng		208	100

Nhận xét: Đã phát hiện 13 loại đột biến, có 4 dạng phổ biến nhất là CD 41/42, CD 17, CD 26,, CD 71/72, 6 dạng ít phổ biến hơn là IVS 2 - 654, - 28 , - 88, CD95 , IVS 1-1, IVS 1- 5,và 3 dạng hiếm gặp là -140, c441-c442 ins AC, 2.3kb deletion. Đa số đột biến có kiểu hình  $\beta^0$ , kiểu hình  $\beta^+$  ít gặp hơn.

### ***Phân bố đột biến gen theo dân tộc***

Chưa thấy sự khác biệt về đột biến ở các dân tộc, trừ CD26 và -28. Đột biến CD26 thấy nhiều ở dân tộc Thái (50%) hơn Kinh (23,2%) và Tày (5%) ( $p < 0,01$ ) . Đột biến -28 thấy nhiều ở dân tộc Tày (5%) hơn Kinh ( $p < 0,05$ )

### ***Phân bố đột biến theo vị trí và chức năng gen $\beta$ -globin***

Nghiên cứu phân bố đột biến gen theo vị trí và chức năng có ý nghĩa quan trọng về kiểu hình beta-thalassemia, được các kết quả sau.

- Đột biến xảy nhiều ở exon 2 (124/208 – 59,6%), exon 162/208 – 30%), ít hơn ở intron 2 (6/208 2,9%), intron 1 (4/208 – 1,9%) và vùng khởi động (9/208 – 4,3%).

**Bảng 3.7. Phân bố đột biến gen HBB theo chức năng gen**

<b>Chức năng gen</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ %</b>
<b>Đột biến phiên mã</b> (Tạo kiểu hình $\beta^+$ và $\beta^{++}$ ) - Yếu tố điều hòa khởi động -28 (A – G) -88 (C – T)	9	4,3
<b>Đột biến hoàn thiện RNA</b> (Tạo kiểu hình $\beta^0$ hay $\beta^+$ ) - Vị trí đầu kết nối (Splice junction) IVS 1 – 1 (G – T) IVS 1 – 5 (G – C) IVS 2 – 654 (C – T)	10	4,8
<b>Đột biến dịch mã RNA</b> (Tạo kiểu hình $\beta^0$ ) - Codon vô nghĩa (Nonsense codon) CD17 (AAG – TAG) CD26 (GAG – AAG) CD95 (TAC – TAA) - Dịch khung (Frameshift) CD 41/42 (- TTCT) CD71/72 (+A)	186	89,4
Đột biến ít gặp khác	3	1,4
<b>Cộng</b>	<b>208</b>	<b>100</b>

Nhận xét: Đột biến xảy ở tiến trình dịch mã RNA nhiều hơn ở tiến trình hoàn thiện RNA và phiên mã.

### ***Phân bố đột biến gen HBB theo kiểu gen***

Có 25 kiểu phối hợp đột biến, với 5 nhóm kiểu gen  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^+\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^E$ ,  $\beta^+\beta^E$ .

- Kiểu gen  $\beta^0\beta^0$  có 40 bệnh nhân (38,46%), 17 đồng hợp tử với 2 kiểu phối hợp CD41/42-CD41/42, CD17-CD17, và 23 dị hợp tử kép với 5 kiểu phối hợp CD41/42-CD17, CD17-CD71/72, CD41/42-CD71/72, CD41/42-CD95, CD41/42-IVS 1-5

- Kiểu gen  $\beta^+\beta^+$  có 1 bệnh nhân (0,96%) với 1 kiểu phối hợp IVS2-654-2.3kb del

- Kiểu gen  $\beta^0\beta^+$  có 14 bệnh nhân (13,46%) với 9 kiểu phối hợp, gồm -28-CD17, -28-CD41/42, -88-CD41/42, CD17-IVS 2-654, CD41/42 - IVS 2-654, CD71/72-IVS2-654, IVS1.1-IVS2-654, -140-CD17, CD71/72-c.441-c442ins AC.

- Kiểu gen  $\beta^0\beta^E$  có 47 bệnh nhân (45,2%) với 6 kiểu gen, gồm CD17-CD26, CD41/42-CD26, CD71/72-CD26, IVS1-1-CD26, IVS1-5-CD26, CD95-CD26.

- Kiểu gen  $\beta^+\beta^E$  có 2 bệnh nhân (1,92%) với 2 kiểu gen là -28-CD26 và -88-CD26.

### **3.3. Đối chiếu kiểu hình-kiểu gen $\beta$ -thalassemia nặng và trung gian**

***Bảng 3.8. Đối chiếu đột biến gen HBB với mức độ nặng về lâm sàng***

Các đột biến	Số lượng	Thể nặng		Thể trung gian		Thể nhẹ	
		n	%	n	%	n	%
CD41/42	63	51	81	12	19		
CD17	62	48	77,4	14	22,6		
CD26	49	25	51	22	44,9	2	4,1
CD71/72	10	9	90	1	10		



IVS 2-654	6	3		2		1	
-28	6	4		1		1	
-88	3	-		2		1	
CD95	2	1		1			
IVS 1-1	2	1		1			
IVS 1-5	2	1		1			
C-140	1	-		1			
C.441-C442ins AC	1	-		1			
2.3 kb del	1	-		-		1	
Cộng	208	143	68,8	59	28,4	6	2,8

**Bảng 3.9. Đối chiếu kiểu gen phối hợp đột biến với mức độ nặng về lâm sàng**

<b>Phối hợp đột biến</b>	<b>Số bệnh nhân</b>	<b>Thế nặng n</b>	<b>Thế trung gian n</b>	<b>Thế nhẹ n</b>
CD17-Cd26	21	10	11	
CD41/42-CD26	20	15	5	
CD41/42-CD17	15	13	2	
CD41/42-CD41/42	9	9		
CD17-CD17	8	8		
CD17-CD71/72	3	3		
CD41/42-CD71/72	3	2	1	
CD71/72-CD26	3	2	1	
-28-CD17	3	3		
-28-CD41/42	2	1	1	
-88-CD41/42	2	1	1	

<b>Phối hợp đột biến</b>	<b>Số bệnh nhân</b>	<b>Thể nặng n</b>	<b>Thể trung gian n</b>	<b>Thể nhẹ n</b>
CD17-IVS2-654	2	1	1	
CD41/42-Cd95	1	1		
CD41/42-IVS1-5	1	1		
IVS2-654-2.3 kb deletion	1			1
nCD41/42-IVS2-654	1	1		
CD71/72-IVS2-654	1	1		
IVS1-1-IVS2-654	1		1	
-140-CD17	1	1		
Cd17-C.441-c442 insAC	1			1
IVS1-1-CD26	1		1	
IVS1-5-CD26	1		1	
CD95-CD26	1		1	
-28-CD26	1		1	
-88-CD26	1			1
<b>Cộng</b>	<b>104</b>	<b>73</b>	<b>28</b>	<b>3</b>

Nhận xét: Các đột biến CD17, CD41/42, CD71/72 và các kiểu phối hợp đột biến này với đột biến khác liên quan với thể nặng và trung gian.

- Đột biến CD26 và các kiểu gen phối hợp đột biến này với đột biến khác có thể liên quan với thể bệnh nặng hoặc trung gian, và ít với thể nhẹ.

**Bảng 3.10. Đối chiếu kiểu hình lâm sàng với kiểu gen**

<b>Kiểu hình lâm sàng</b>	<b><math>\beta^0\beta^0</math></b> <b>(n = 40)</b>	<b><math>\beta^0\beta^+</math></b> <b>(n = 14)</b>	<b><math>\beta^0\beta^E</math></b> <b>(n = 47)</b>
- Tuổi phát hiện bệnh (năm)	0,97 ± 1,22	1,28 ± 0,87	2,77 ± 0,72
Tuổi bắt đầu truyền máu (năm)	1 ± 1,4	1,32 ± 0,76	2,48 ± 2,1
Mức độ thiếu máu (%)			
- Nặng	50	28,6	29,8
- Trung bình	50	35,7	61,7
- Nhẹ	-	35,7	8,5
Lách to (%)	90	78,6	76,6
Gan to (%)	60	71,4	51
Biến dạng xương (%)	32,5	42,8	23,4
Chậm tăng trưởng (%)			
- Cân nặng	57,5	57,1	42,6
- Chiều cao	60	64,3	42,6

Nhận xét: Lâm sàng ở kiểu gen  $\beta^0\beta^0$  biểu hiện bệnh sớm hơn, thiếu máu nặng hơn, truyền máu sớm hơn  $\beta^0\beta^+$  và  $\beta^0\beta^E$ . Lâm sàng ở kiểu gen  $\beta^0\beta^E$  phát bệnh và truyền máu muộn hơn.

**Bảng 3.11. Đối chiếu kiểu gen HBB với một số chỉ số hồng cầu**

<b>Chỉ số về hồng cầu</b>	<b><math>\beta^0\beta^0</math></b> <b>(n = 40)</b>	<b><math>\beta^0\beta^+</math></b> <b>(n = 14)</b>	<b><math>\beta^0\beta^E</math></b> <b>(n = 47)</b>
TTTBHC (MCV fl)	74,26 ± 7,5	73,81 ± 6,8	66,96 ± 5,6
HbTBHC (MCH pg)	24,87 ± 3,6	23,72 ± 3,1	21,24 ± 3,2

Nhận xét: Tất cả các nhóm bệnh có kiểu gen  $\beta^0\beta^0, \beta^0\beta^+, \beta^0\beta^E$  đều có biểu hiện MCV nhỏ hơn 75fl, MCH giảm dưới 25 pg.

**Bảng 3.12. Đối chiếu kiểu gen với thành phần hemoglobin**

<b>Thành phần Hb (%)</b>	<b><math>\beta^0\beta^0</math> (n = 40)</b>	<b><math>\beta^0\beta^+</math> (n = 14)</b>	<b><math>\beta^0\beta^E</math> (n = 47)</b>
HbA1	0	64,8 ± 15,2	0
HbA2	6,04 ± 2,1	3,68 ± 1,9	2,4 ± 1,6
HbF	94,5 ± 3,2	40,02 ± 14,3	51,9 ± 12,8
HbE	-	-	40,2 ± 11,5

Nhận xét: - Với  $\beta^0\beta^0$ , HbA1 không có, chủ yếu là HbF, HbA2 tăng nhẹ.

- Với  $\beta^0\beta^+$ , HbA1 giảm, HbF tăng, HbA2 bình thường hay tăng nhẹ.

- Với  $\beta^0\beta^E$ , HbA1 không có, HbF tăng, có nhiều HbE, HbA2 tăng nhẹ

## **CHƯƠNG 4**

### **BÀN LUẬN**

#### **4.1. Kiểu hình lâm sàng, huyết học $\beta$ -Thalassemia**

##### **4.1.1. Đặc điểm về kiểu hình lâm sàng $\beta$ -thalassemia**

Hầu hết bệnh nhân trong nghiên cứu là  $\beta$ -thalassemia nặng và trung gian. Kết quả nghiên cứu (Bảng 3.1) cho thấy biểu hiện lâm sàng  $\beta$ -thalassemia rất sớm, đa dạng, thể hiện 3 hội chứng chính: thiếu máu tan máu mạn tính, nhiễm sắt và chậm tăng trưởng về thể chất. Thiếu máu thường nặng kéo dài, phụ thuộc vào truyền máu (64,9% trẻ phải truyền máu trên 5 lần/năm). Thiếu máu là do tan máu và sinh hồng cầu không hiệu quả ở tủy xương. Nhiễm sắt là do hậu quả của truyền máu nhiều và tăng hấp thu sắt ở ruột. Chậm tăng trưởng do hậu quả của thiếu máu nặng mạn tính, nhiễm sắt ở các hệ thống, đặc biệt là hệ nội tiết, và thiếu dinh dưỡng.

Biểu hiện lâm sàng của  $\beta$ -thalassemia nặng hơn  $\beta$ -thalassemia/HbE, thể

hiện ở phát bệnh sớm hơn ( $p < 0,001$ ), thiếu máu nặng hơn, phải truyền máu từ  $<1$  tuổi ( $p < 0,01$ ), và truyền máu trên 5 lần/năm nhiều hơn ( $p < 0,05$ ).

Đa số bệnh nhân  $\beta$ -thalassemia vào viện là thể nặng và trung gian. Phân loại theo Shubba Phadke (bảng 3.3.) thấy 57,1%  $\beta$ -thalassemia trung gian ở nhóm III, có biểu hiện lâm sàng giống thể nặng nhiều hơn.

Từ các kết quả nghiên cứu về kiểu hình lâm sàng trên, có thể đưa ra nhận xét, *kiểu hình lâm sàng  $\beta$ -thalassemia ở Việt Nam nặng.*

#### **4.1.2. Đặc điểm về kiểu hình huyết học**

Số lượng hồng cầu, hematocrit, Hb giảm, giảm nhiều ở  $\beta$ -thalassemia đơn hơn  $\beta$ -thalassemia/HbE ( $p < 0,05$ ).

Chỉ số về hồng cầu thay đổi rõ rệt, MCV nhỏ, MCHC còn trong giới hạn bình thường, RDW lớn, chứng tỏ hồng cầu nhỏ, nhược sắc, không đều.

Thành phần hemoglobin thay đổi khá đặc hiệu. HbA1 giảm nhiều, thấp nhất là 0%, HbF tăng, cao nhất tới 95% Hb toàn phần, với  $\beta$ -thalassemia/HbE xuất hiện nhiều HbE, còn HbA2 tăng nhẹ. Cơ chế của sự thay đổi thành phần hemoglobin là do không hay giảm tổng hợp mạch *HBB* vì đột biến gen  $\beta$ -globin. Tùy theo vị trí đột biến tạo ra kiểu hình  $\beta^0$ -thalassemia hay  $\beta^+$ -thalassemia mà thành phần Hb khác nhau.

### **4.2. Đột biến gen *HBB* ở bệnh nhi $\beta$ -thalassemia**

#### **4.2.1. Các đột biến gen *HBB* phát hiện**

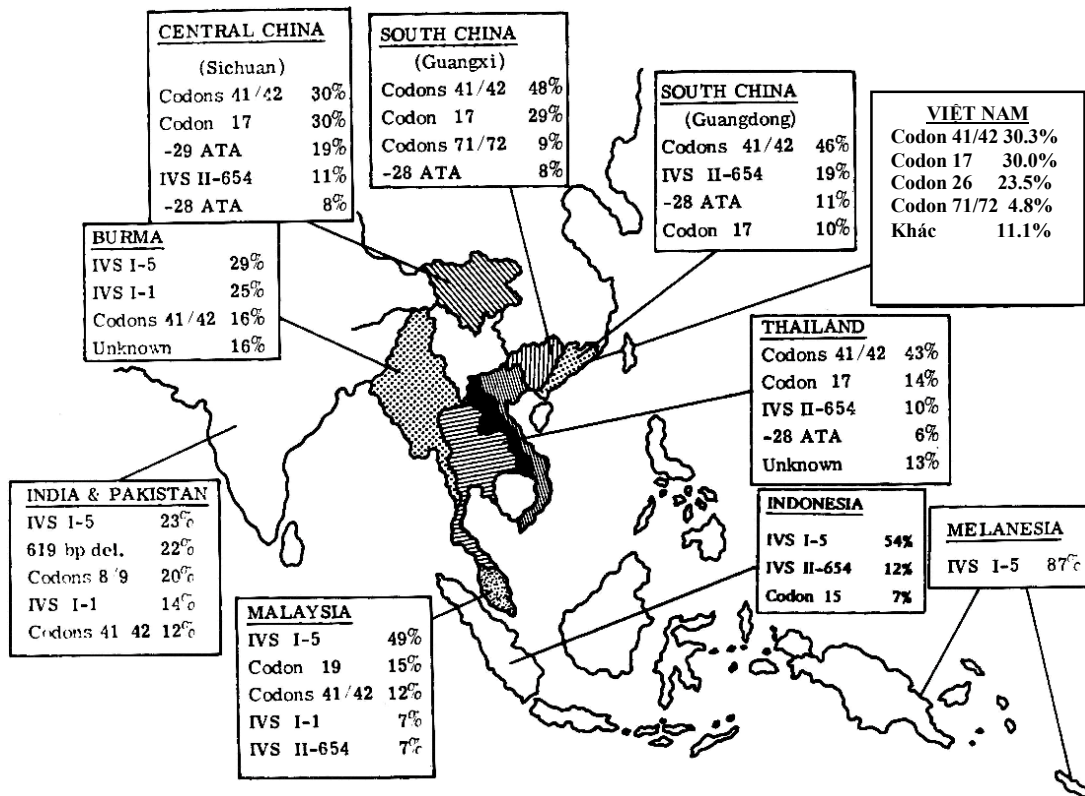
Trong 208 alen ở 104 bệnh nhi  $\beta$ -thalassemia đã phát hiện có 13 dạng đột biến. Tỷ lệ phát hiện đột biến rất cao, vì đối tượng nghiên cứu là các thể bệnh nặng và trung gian. Bốn đột biến phổ biến nhất là CD41/42, CD17, CD26, và CD71/72, sáu dạng ít phổ biến là IVS 2-654, -28, -88, CD95, IVS 1-1, IVS 1-5 và 3 đột biến hiếm là -140, c441-c142 ins AC và 2,3 kb deletion. Nghiên cứu này đã phát hiện thấy nhiều dạng đột biến hơn so với các nghiên cứu trước đây, đó là -88. So với các

ngiên cứu có trước ở trong nước cho thấy, các đột biến phổ biến ở nghiên cứu này cũng tương tự.

**Bảng 4.2. Tần số đột biến gen beta-globin ở bệnh  $\beta$ -thalassemia tại Việt Nam**

<b>Đột biến</b>	<b>Miền Bắc (Nghiên cứu này)</b>	<b>Miền Bắc 2000</b>	<b>Miền Trung 2013</b>	<b>Miền Nam 2002</b>	<b>Miền Nam 1988</b>
CD41/42 (-TCTT)	30,3%	34,5%	+	35,7%	43,5%
CD17 (AAG-TAG)	30%	48,3%	+	25%	13%
CD26 GAG-AAG)	23,5%	-	+	-	-
CD71/72 (+A)	4,8%	3,5%	-	7,3%	8,7%
IVS 2-654 (C-T)	2,9%	13,8%	-	7,3%	13%
-28 (A-G)	2,9%	-	-	7,3%	-
-88 (C-T)	1,4%	-	-	-	-
CD95 (TAC-TAA)	1%	-	-	-	-
IVS 1-1 (G-T)	1%	-	+	6%	4,4%
IVS 1-5 (G-C)	1%	-	-	-	-
c-140 (C-T)	0,5%	-	-	-	-
c.441-c442 ins AC	0,5%	-	-	-	-
2.3 kb deletion	0,5%	-	-	-	-
Khác	-	-	-	11,8%	17,4%

So sánh với các nước khác, các đột biến phổ biến tìm thấy ở Việt Nam khá giống với các đột biến ở một số nước Đông Nam Châu Á; nhưng khác nhiều so với các nước Châu Âu. Ở các nước Châu Âu và Địa Trung Hải, đột biến phổ biến là CD39, IVS1-110, IVS1-6, và IVS2-745.



**Hình 4.1. Phân bố đột biến gen  $\beta$ -thalassemia phổ biến ở Châu Á**

#### 4.2.2. Phân bố đột biến gen $\beta$ -globin theo chức năng và vị trí gen

Vị trí đột biến gen có ý nghĩa lớn với biểu hiện của gen. Kết quả nghiên cứu cho thấy phần lớn đột biến xảy ra ở tiền trình dịch mã RNA, ít hơn ở hoàn thiện RNA và sao mã, nhiều ở exon hơn intron và vùng khởi động. Từ đó có thể rút ra kết luận, ở Việt Nam  $\beta^0$ -thalassemia phổ biến hơn  $\beta^+$ -thalassemia. Nhận xét này phù hợp với các nghiên cứu trước đây ở Việt Nam, và phù hợp với đặc điểm  $\beta$ -thalassemia ở khu vực Đông Nam Châu Á. Kiểu hình lâm sàng,  $\beta$ -thalassemia ở Việt Nam là thể nặng nhiều hơn.

#### 4.2.3. Phân bố đột biến gen theo kiểu gen

Trong 208 alen đột biến đã phát hiện thấy có 25 kiểu gen phối hợp đột biến, 5 kiểu phổ biến nhất là CD17 – CD26, CD41/42 – CD26, CD41/42 – CD17, CD41/42 – CD41/42, CD17 – CD17, được phân loại thành 5 nhóm kiểu gen lớn  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^+\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^E$  và  $\beta^+\beta^E$ . Kiểu gen  $\beta^0\beta^E$  phổ biến nhất, tiếp theo là  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^+\beta^E$  và  $\beta^+\beta^+$ . Kết quả này khá phù hợp với hai nghiên cứu gần đây, năm 2018, tại miền Nam và Bắc Việt

Nam  $\beta$ -thalassemia là một hội chứng bệnh rất không đồng nhất về phân tử và lâm sàng. Biểu hiện lâm sàng, huyết học, cũng như mức độ nặng của bệnh phụ thuộc vào kiểu gen.

### **4.3. Đối chiếu kiểu hình - kiểu gen $\beta$ -thalassemia nặng và trung gian**

#### ***Đối chiếu kiểu hình lâm sàng với kiểu gen $\beta$ -thalassemia***

Kết quả trên cho thấy các đột biến CD41/42, CD 17, CD71/72 và các kiểu gen phối hợp với các đột biến này liên quan nhiều với thể lâm sàng nặng. Điều này có thể giải thích vì các đột biến này là các đột biến thuộc gen  $\beta^0$ -globin, không tổng hợp được mạch  $\beta$ . Đột biến CD26 và các kiểu gen phối hợp với CD26 có thể thấy ở thể nặng, trung gian hay nhẹ.

Biểu hiện lâm sàng thay đổi theo 3 nhóm kiểu gen  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^E$ . Biểu hiện lâm sàng của kiểu gen  $\beta^0\beta^0$  nặng hơn kiểu gen  $\beta^0\beta^+$  và  $\beta^0\beta^E$ , thể hiện ở tuổi phát bệnh, tuổi bắt đầu phải truyền máu sớm hơn, mức độ thiếu máu nặng hơn ( $p < 0,05$ ). Nguyên do là kiểu gen  $\beta^0\beta^0$  không tổng hợp được mạch  $\beta$ -globin, sự mất cân bằng giữa tỷ lệ mạch  $\alpha$ / mạch không  $\alpha$  lớn hơn hai thể bệnh có kiểu gen  $\beta^0\beta^+$  và  $\beta^0\beta^E$ . Biểu hiện lâm sàng giữa thể bệnh có kiểu gen  $\beta^0\beta^+$  và  $\beta^0\beta^E$  không thấy khác nhau nguyên do là còn tổng hợp được một phần mạch  $\beta$ -globin, sự mất cân bằng giữa mạch  $\alpha$ / mạch không  $\alpha$  ít hơn. Từ đó có thể kết luận có sự liên quan rõ ràng giữa kiểu hình lâm sàng với kiểu gen  $\beta$ -thalassemia

#### ***Đối chiếu kiểu hình huyết học với kiểu gen $\beta$ -thalassemia***

Hầu hết MCV, và MCH ở cả 3 kiểu gen  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^0\beta^+$  và  $\beta^0\beta^E$  đều nhỏ hơn 75fl và dưới 28pg. Hồng cầu nhỏ, nhược sắc là một đặc điểm của  $\beta$ -thalassemia, hai chỉ số này thường được sử dụng để sàng lọc thalassemia ở cộng đồng. Cơ chế chính của đặc điểm huyết học này là do kém tổng hợp hemoglobin, sinh hồng cầu không hiệu quả ở tủy xương, vì có đột biến gen  $\beta$ -globin.

Thành phần hemoglobin thay đổi khá đặc hiệu cho từng kiểu gen (bảng 3.12). Với kiểu gen  $\beta^0\beta^0$ , HbA<sub>1</sub> không có, thành phần Hb chủ yếu là HbF và một phần HbA<sub>2</sub>. Với kiểu gen  $\beta^0\beta^+$ , HbA<sub>1</sub> giảm, HbF tăng cao còn HbA<sub>2</sub> bình thường hay tăng nhẹ. Với kiểu gen  $\beta^0\beta^E$ , HbA<sub>1</sub> không có, HbF tăng cao, và có nhiều HbE. Nguyên do cơ bản của sự thay đổi này phụ thuộc vào tính chất đột biến gen  $\beta$ -globin có kiểu hình  $\beta^0$  hay  $\beta^+$ ,



mà không hay giảm tổng hợp mạch  $\beta$ -globin. Với kiểu gen  $\beta^0\beta^0$  và  $\beta^0\beta^E$  do không tổng hợp được mạch  $\beta$ -globin nên không có HbA<sub>1</sub>. Với kiểu gen  $\beta^0\beta^+$ , do còn tổng hợp được một phần mạch  $\beta$ -globin nên HbA<sub>1</sub> giảm. Do không có hay giảm mạch  $\beta$ -globin, lượng mạch  $\alpha$ -globin thừa dư, sẽ kết hợp với mạch gamma hay delta, làm tăng tỷ lệ HbF và HbA<sub>2</sub>. Như vậy có sự liên quan rất chặt chẽ giữa kiểu gen và kiểu hình huyết học.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu 104 bệnh nhi  $\beta$ -thalassemia có thể rút ra kết luận:

### **1. Kiểu hình lâm sàng, huyết học bệnh nhi $\beta$ -thalassemia khá đặc hiệu**

Bệnh biểu hiện rất sớm, 88,4% dưới 5 tuổi, 55,7% dưới 1 tuổi. Biểu hiện lâm sàng rất đa dạng, thể hiện ba hội chứng: thiếu máu tan máu mạn tính nặng (64,9% phụ thuộc truyền máu), nhiễm sắt và chậm tăng trưởng. Hầu hết là  $\beta$ -thalassemia thể nặng (70.2%) và trung gian (26,9%), hơn nửa thể trung gian lại có biểu hiện giống như thể nặng;  $\beta$ -thalassemia, nặng hơn  $\beta$ -thalassemia/HbE.

Kiểu hình huyết học khá đặc hiệu, Hb giảm nặng, nhiều hồng cầu nhỏ (MCV=70,7  $\pm$  8fl), hồng cầu nhược sắc (MCH=23 $\pm$ 3,6 pg). Thành phần hemoglobin thay đổi đặc hiệu cho từng thể bệnh. Với  $\beta$ -thalassemia, HbA<sub>1</sub> giảm nhiều hoặc không có, HbF tăng cao, HbA<sub>2</sub> tăng nhẹ. Với  $\beta$ -thalassemia/HbE, HbA<sub>1</sub> giảm, HbF tăng cao, có nhiều HbE.

### **2. Đột biến gen beta-globin ở bệnh nhân $\beta$ -thalassemia rất đa dạng**

Trong 208 alen ở 104 bệnh nhân  $\beta$ -thalassemia tìm thấy 13 dạng đột biến. Có 4 dạng đột biến phổ biến nhất là CD41/42, CD17, CD26 và CD71/72 với tỷ lệ lần lượt là 30,3%, 30%, 23,5% và 4,8%. Có 9 dạng đột biến ít phổ biến hơn là IVS2.654, - 28, - 88, CD95, IVS 1.1, IVS 1-5, -140, c.441 - 442 ins AC, và 2,3kb deletion với tỷ lệ từ 0,96-2,9%. Chưa thấy sự khác biệt nhiều về phân bố các đột biến ở các dân tộc, trừ CD26 và -28. Đột biến CD26 thấy nhiều ở dân tộc Thái (50%), hơn Kinh (23,2%), và Tày (5%). Có sự khác biệt về đột biến -28 ở dân tộc Tày và Kinh.

- Phần lớn các đột biến xảy ra ở tiền trình dịch mã RNA (89,4%), hơn tiền trình hoàn thiện RNA (4,8%) và sao mã (4,3%); nhiều ở exon hơn

intron và vùng khởi động. Đa số đột biến có kiểu hình  $\beta^0$  (68%), nhiều hơn kiểu hình  $\beta^+$ . Đã phát hiện 25 kiểu gen phối hợp đột biến, 5 kiểu phối hợp đột biến phổ biến nhất là CD17–CD26, CD41/42–D26, CD41/42–CD17, CD41/42–CD41/42 và CD17–CD17. Các kiểu phối hợp đột biến được chia thành 5 nhóm kiểu gen:  $\beta^0\beta^0$  (38,46%) với 5 kiểu phối hợp đột biến, trong đó có 17 là thể đồng hợp tử và 23 là thể dị hợp tử kép,  $\beta^+\beta^+$  (0,96%) với 1 kiểu phối hợp,  $\beta^0\beta^+$  (13,46%), với 9 kiểu phối hợp đột biến,  $\beta^0\beta^E$  (45,2%) với 6 kiểu phối hợp và  $\beta^+\beta^E$  (1,92%), với 2 kiểu phối hợp đột biến.

### **3. Có sự liên quan giữa kiểu hình-kiểu gen $\beta$ -thalassemia nặng và trung gian**

- Các đột biến CD41/42, CD17, CD71/72 hoặc các kiểu phối hợp các đột biến này với các đột biến khác tương ứng với kiểu hình lâm sàng nặng và trung gian. Đột biến CD26 hoặc các kiểu phối hợp với đột biến khác thấy nhiều ở các kiểu hình lâm sàng nặng và trung gian, thấy ít ở kiểu hình nhẹ.

- Kiểu hình lâm sàng ở kiểu gen  $\beta^0\beta^0$  nặng hơn ở  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^E$ . Không có sự khác biệt về kiểu hình lâm sàng giữa kiểu gen  $\beta^0\beta^+$  và  $\beta^0\beta^E$ .

- Thành phần hemoglobin phụ thuộc vào kiểu gen, HbA<sub>1</sub> không có ở kiểu gen  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^0\beta^E$ , giảm ở kiểu gen  $\beta^0\beta^+$ ; HbE chỉ có ở kiểu gen  $\beta^0\beta^E$  và  $\beta^+\beta^E$ .

## **KIẾN NGHỊ**

1- Nghiên cứu đột biến gen ở bệnh nhân mắc bệnh hemoglobin có ý nghĩa lớn trong chẩn đoán, tiên lượng bệnh, đặc biệt là cơ sở khoa học cho việc tư vấn di truyền, dự phòng bệnh hemoglobin. Cần mở rộng nghiên cứu thêm ở nhiều vùng, dân tộc người Việt Nam.

2- Còn ít nghiên cứu về liên quan giữa kiểu gen – kiểu hình bệnh thalassemia và các bệnh hemoglobin khác, cần tiếp tục nghiên cứu để hiểu biết đầy đủ hơn và là cơ sở điều trị và dự phòng tốt hơn bệnh về hemoglobin.

3- Các đột biến CD41/42, CD17, CD71/72 hoặc các kiểu gen phối hợp giữa các đột biến này với các đột biến khác liên quan nhiều đến  $\beta$ -thalassemia nặng và trung gian. Trong chẩn đoán trước sinh, nếu phát hiện thấy các kiểu gen phối hợp đột biến này có thể xem xét đình chỉ thai.

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

1. Nguyễn Hoàng Nam, Lý thị Thanh Hà, Dương Bá Trục, Bùi Văn Viên, Ngô Diễm Ngọc (2017). Đột biến gen ở bệnh nhân beta thalassemia tại bệnh viện nhi trung ương, *Tạp chí Nhi Khoa*, 10;5: 46 – 51.
2. Nguyễn Hoàng Nam, Lý thị Thanh Hà, Dương Bá Trục, Bùi Văn Viên, Ngô Diễm Ngọc (2013). Một số đặc điểm lâm sàng, huyết học theo kiểu gen ở bệnh nhân beta thalassemia, *Tạp chí Nhi Khoa*, 6;6 :18 – 21.



MINISTRY OF EDUCATION & TRAINING    MINISTRY OF HEALTH  
**HANOI MEDICAL UNIVERSITY**



**NGUYEN HOANG NAM**

**PHENOTYPE AND GENOTYPE STUDY  
IN CHILDREN WITH BETA-THALASSEMIA**

**Speciality: Pediatrics  
Code: 62720135**

**SUMMARY OF THESIS**

**HÀ NỘI - 2019**

**The thesis was carried out at  
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

**Scientific Supervisors ;Ass.Prof. PhD. Dr Bui Van Vien  
PhD. Dr. Duong Ba Truc**

**Critic 1: .....**

**Critic 2: .....**

**Critic 3: .....**

**The thesis was defended at the Thesis Evaluation Council,  
Hanoi Medical University, at**

**The thesis can be found at:**

- The National Library**
- Library of Hanoi Medical University**

## INTRODUCTION

Beta-thalassemia is a hereditary disease that reduces or does not synthesize  $\beta$ -globin chain in hemoglobin due to  $\beta$ -globin gene mutations. This is a recessive hereditary disease in autosomal chromosomes.

Clinical  $\beta$ -thalassemia is very heterozygous, from mild with no symptoms to severe. The severity of the disease depends on the imbalance of  $\alpha$ -globin and  $\beta$ -globin chains, the mutations and the  $\beta$ -globin genotypes. Studies of the phenotypes and genotypes of  $\beta$ -thalassemia are the scientific basis for prenatal diagnosis. Studies on the  $\beta$ -thalassemia gene mutation in Vietnam are not enough, especially there is no study on the phenotype-genotype correlation of  $\beta$ -thalassemia. Hence that, we study the topic: "**Phenotype and genotype study in children with  $\beta$ -thalassemia.**"

### Study objectives :

1. *To describe clinical and hematologic phenotypes in patients with  $\beta$ -thalassemia at the National Hospital of Pediatrics;*
2. *To determine gene mutations in patients with  $\beta$ -thalassemia;*
3. *To compare phenotype with genotype of  $\beta$ -thalassemia major and intermedia.*

## NECESSITY OF THE THESIS

$\beta$ -thalassemia is a common genetic disease in Vietnam. The treatment of  $\beta$ -thalassemia major and intermedia are mainly by blood transfusions, iron chelation whole of life, and bone marrow transplant, that is a burden for the families and society. Prevention of major and intermediary  $\beta$ -thalassemia is therefore important. In order to have the scientific basis for prevention, to know the characteristics of the mutations is needed. So, this study is necessary, scientific and practically.

## NEW CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

- More mutation forms were found in the study than the previous published studies in, such as -88.
- The  $\beta$ -globin gene mutations are more common in the RNA

translation process than RNA processing and RNA transcription, in the exon than in the intron and the promoter region, so the majority of mutations have the  $\beta^0$  phenotype. It has been concluded that in Vietnam  $\beta^0$ -thalassemia are more common than  $\beta^+$ -thalassaemia.

- Comparisons the phenotypes with genotypes of major and intermediary  $\beta$ -thalassemia showed that CD41/42, CD17, CD71/72 mutations and their combined genotypes with other mutations related to severe  $\beta$ -thalassemia. Since then, aborting gestation indication can be suggested in prenatal diagnosis.

## FRAME OF THE THESIS

The thesis is presented in 112 pages, including: - 3 pages of Introduction, - 36 pages of Literature overview, - 12 pages of Subjects and Methods, - 28 pages of Results, - 29 pages of Discussions, - 2 pages of Conclusions, - 1 page of Recommendation. The thesis has 47 tables, 15 figures, 2 diagrams. There are 143 references, including 24 in Vietnamese and 119 in English.

## CHAPTER 1

### LITERATURE OVERVIEW

#### 1.1. Epidemiology

##### *Distribution of $\beta$ -thalassemia in the world*

$\beta$ -thalassemia is a genetic disease that is closely related to the national origin, distributed globally, but is geographically distinct. According to the International Federation of Thalassemia (2005) it is estimated that 1.5% of the world population, 80-90 million people carry the  $\beta$ -thalassemia gene, each year there are 60,000 new cases of disease. In Southeast Asia alone, the number of people carrying the  $\beta$ -thalassemia gene is up to 50% of global gene carriers, about 40 million.

##### *Distribution of $\beta$ -thalassemia in Vietnam*

The common hemoglobinopathies are  $\alpha$ -thalassemia,  $\beta$ -thalassemia and HbE. Hemoglobinopathies are prevalent in all provinces, in many different



ethnic groups, and more common in mountainous and highland ethnic minority.  $\beta$ -thalassemia is popular in the North, hemoglobin E is more common in central and southern of Vietnam. In Vietnam,  $\beta^0$ -thalassemia is more common than  $\beta^+$ -thalassaemia.

## **1.2. Genetic basis of $\beta$ -thalassemia**

### ***Normal hemoglobin***

Hemoglobin (Hb) consists of heme and globin. Globin consists of four polypeptide, two  $\alpha$ , two  $\beta$ . In humans there are 6 types of normal Hb. Hb in the embryonic stage is Hb Gower 1, Hb Gower 2 and Hb Portland. Hb in the fetus to adulthood is HbA1, HbA2 and HbF. The globin structure of HbA1 is  $\alpha_2\beta_2$ . The HbA2 is  $\alpha_2\delta_2$  and HbF is  $\alpha_2\gamma_1$ .

### ***The coding genes of globin chains for hemoglobin***

The genes coding for the synthesis of globin of Hb are arranged in two clusters. The  $\alpha$  genes in chromosome 16, while the  $\beta$  gene is found in chromosome 11. The alpha globin gene cluster includes three functional genes, one of which is the  $\xi_2$  gene coding for  $\xi$  chain of the HbGower 1 in embryo, the other two genes are  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  genes encoding for  $\alpha$ -globin. The globin  $\beta$  gene cluster consists five functional genes, the  $\epsilon$  gene coding for  $\epsilon$ -globin is in Hb Gower 1 and Hb Gower 2, the  $\gamma$  gene encodes for  $\gamma$  globin in HbF, the other two genes are  $\delta$  for  $\delta$ -globin and  $\beta$  for  $\beta$ -globin.

### ***$\beta$ -globin gene mutations causing $\beta$ -thalassemia***

$\beta$ -thalassemia mutations are specific heterogeneous changes in DNA. Mutations can be changed in a single base; or loss of one or more nucleotides; either invert or re-arrange the DNA sequence. The  $\beta$ -globin gene mutations affect one of several stages of gene expression, such as transcription, RNA processing and RNA translation, affecting globin production, altering the rate of globin synthesis, hemoglobin patterns in different clinical conditions. The forms of  $\beta$ -thalassemia depend on the genemutations. More than 200 mutations of  $\beta$ -thalassemia have been detected recently, different distribution on various regions and nations. Almost of mutations have been described, of which only about 20 mutations are common, accounting for 80% of the mutations in the

thalassemia genes in the world. Each region with a high frequency of thalassemia has 4 - 6 common mutations. The  $\beta$ -thalassemia gene mutations are classified into 3 classes, in different positions.

- (1) Transcriptional mutations, at promoterregulator elements and 5'-UTR (5' untranscriptional region);
- (2) RNA processing mutations at splice junctions, consensus splice sites, intron, exon and 3'-UTR
- (3) RNA translation mutations, at initiation codon, nonsensecodonsandframeshift.

There are also mutant deletion and mutation excluded.

Transcriptional mutations affect to the promoter of transcriptional process, reducing the  $\beta$ -globin synthesis, creating  $\beta^+$ -thalassaemia.

RNA translation mutations affect to termination the disruption RNA  $\beta$ -globin chain, resulting complete absence of  $\beta$ -globin production, creating  $\beta^0$ -thalassemia.

RNA processing mutations affect to finishing information process of mRNA altered nucleotides, resulting in  $\beta^0$ -thalassemia or  $\beta^+$ -thalassemia. Mutations in splice junctions, in introns or exonscauses  $\beta^0$ -thalassemia, also in 3'-UTR causes  $\beta^+$ -thalasemia

### ***Frequency of $\beta$ -thalassemia gene mutations in Vietnam***

Studies on  $\beta$ -globin gene mutation causing  $\beta$ -thalassemia in Vietnamese people are still incomplete. The published results showed that eight common types of mutations cause 95% of  $\beta$ -thalassemia cases, including CD17(AAG-TAG), CD 41/42(-TCTT), -28 (A> G), IVSI-1 G> T), IVSI-5(G> C), IVSI2-654(C> T) and CD26(GAG> AAG) ofHbE.

### **1.3. Phenotype–genotype correlation in $\beta$ -thalassemia**

$\beta$ -thalassemia is classified into 4 clinical categories: silent, minor, intermedia, and major. Clinical and hematologic patterns depend on the mutant genotype, on the combination of  $\beta^0$  or  $\beta^+$

## CHAPTER 2 STUDY SUBJECTS AND METHODS

### *Study subjects*

104 children, 55  $\beta$ -thalassemia and 49  $\beta$ -thalassemia / HbE were enrolled in the National Hospital of Paediatrics, of which 50 were under 1 year of age, 39 were 1- to 5-year-old, 12 to 5 and 10 years respectively. - 15 years old,. 59 male, 49 female; 71 are Kinh, 33 are ethnic minorities (12 of whom are Thai, 10 are Tay, 11 are 5 other ethnic groups including Muong, San Diu, Dao, Bo Y), 14 are residents in Hanoi , scattered in other 28 provinces and cities from Ha Tinh back to the northern border.

### *Study Methods*

Descriptive, analysis, collation and prospecting studies.

Clinical assessment by a doctor and a specialist. Hematologic, biochemical and genetic tests performed at the National Hospital of Pediatrics.

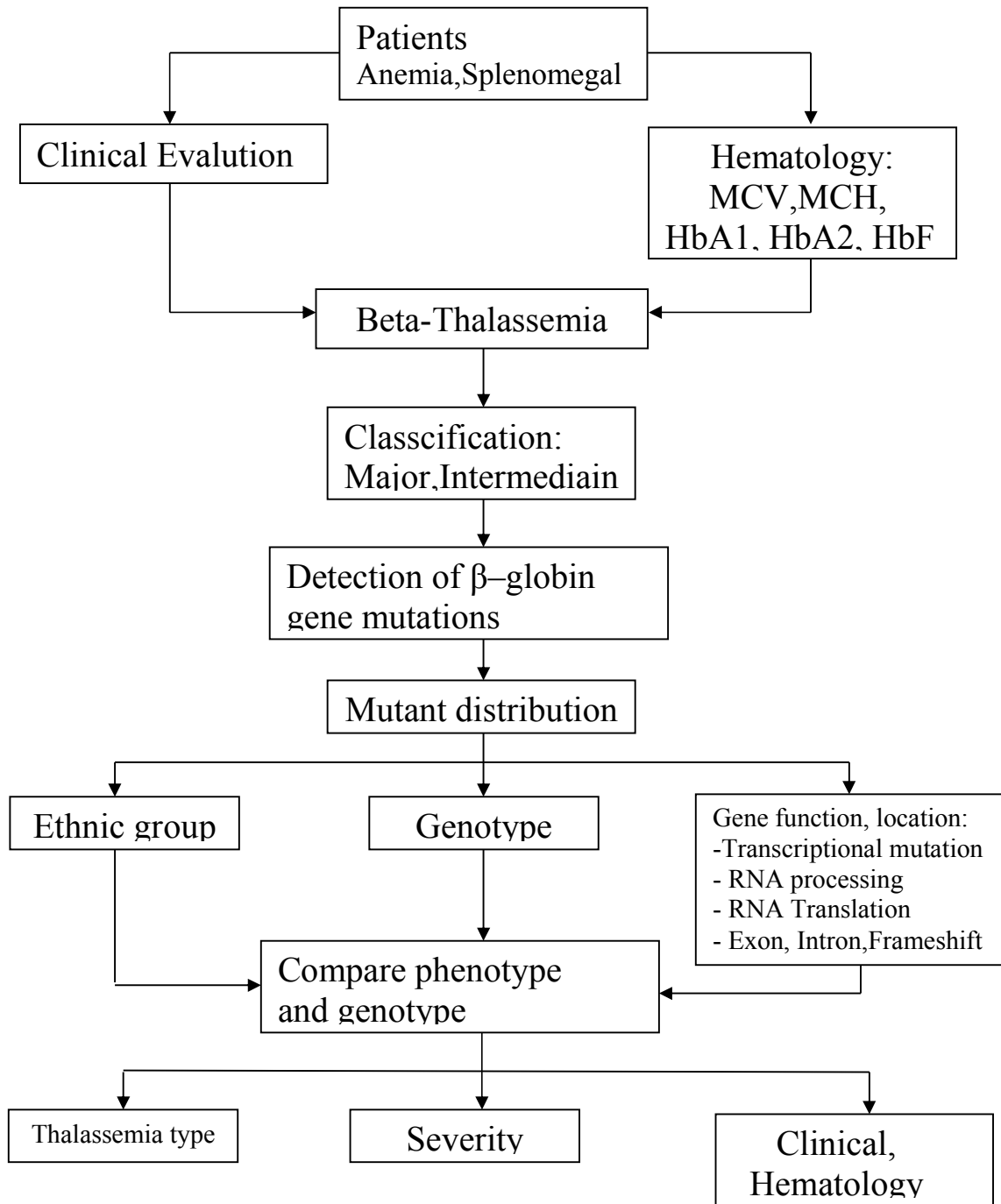
The process of detecting and analyzing  $\beta$ -globin gene mutations is as follows:

- Separation of DNA from peripheral blood with German commercial QIA kits.

Detecting 9 common point mutations in Southeast Asia, CD41 / 42, CD17, IVS 1-1, -28, IVS 2-654, CD 71/72, IVS 1-5, CD95 and CD26 ( HbE) Multiplex ARMS -PCR technique.

- Gene sequence of  $\beta$ -globin when no mutation is detected by Multiplex ARMS - PCR

- Carry out GAP PCR to detect deletion mutations as needed.

*Study Designing*

## CHAPTER 3

### STUDY RESULTS

#### 3.1. Clinical and hematological phenotype of $\beta$ -thalassemia

*Table 3.1. Clinical manifestations at hospitalization*

Clinical Symptoms	$\beta$ – thalassemia (n = 55)		$\beta$ – thalassemia/HbE (n = 49)		Total $\beta$ – thalassemia (n = 104)	
	n	%	n	%	n	%
Age of disease: <1 year	41	74.6	17	34.7	58	55.7
1-3years old	12	21.8	22	44.9	34	32.7
Anemia	55	100	49	100	104	100
+ Previous blood transfusion	52		42		94	
+ Age of blood transfusion						
- <1 year	34	65.4	10	23.8	44	46.8
- 1-3 years old	13	25.0	20	47.6	33	35.1
Blood transfusion > 5 times / year	40	76.9	21	50.0	61	64.0
Jaundice	7	12.7	14	28.5	21	20.2
Splenomegaly	48	87.3	36	73.5	84	80.8
Hepatomegaly	35	63.6	24	49.0	59	56.7
Thalassemic face	32	58.2	21	42.9	53	51.0
Dark skin	14	25,5	4	8.2	18	17.3
Weight - 2SD	13	23,6	12	24.5	25	24.0
Height - 2SD	12	21,8	12	24.8	24	23.0

Comments: - Early manifestation, 55.7% before 1 year old, 88.4% under 3 years old.

- Clinical symptoms are diversir\ty: 100% -anemia, 81.9%- blood transfusion before age 3, 64%- dependent blood transfusion, 20.2% - jaundice, 80.8% - splenomegaly, 51% -thalassemicface,56.7%- hepatomegaly, 17.3%- dark skin and 24%- growth retardation..

- Clinical manifestations of  $\beta$ -thalassemia and $\beta$ - thalassemia /HbEare similar, only different in severity.

*Table 3.2 - Classification of  $\beta$ -thalassemia*

<b>Type β – thalassemia</b>	<b>Major</b>		<b>Intermedia</b>		<b>Minor</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
β – thal. (n = 55)	48	87.3	6	10.9	1	1.8
β – thal./HbE (n = 49)	25	51.0	22	44.9	2	4.1
Total (n = 104)	73	70.2	28	26.9	3	2.9

Comment: Most patients were β-thalassemia major and intermedia

**Table 3.3. Classification of β-thalassemia intermedia.**

<b>β – thalassemia intermedia</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
Group I	7	25
Group II	5	17.9
Group III	16	57.1
Total	28	100

Comments :57.1% of β-thalassemia intermedia were in group III, which were closely to thalassemia major.

**Table 3.4. Hemoglobin, Hematocrit, RBC index**

<b>Full blood count</b>	<b>β – thalassemia (n = 55)</b>	<b>β – thalassemia/HbE (n = 49)</b>	<b>Total β – thalassemia (n = 104)</b>
RBC (T/l)	2.53 ± 0.73	3,15 ± 0,87	2.85 ± 0.88
Hb (g/l)	60.77±16.6	69.08±20.40	65.50±10.3
Hematocrit (%)	18.23±4.73	21.52±6.26	20.05±5.92
MCV (fl)	77.18±6.42	66.88±8,07	70.77±8.07
MCH (pg)	24.68±3.29	21.23±3.23	23.08±3.64
MCHC (%)	324.05±30.21	310.65±25.22	318.16±28.17
RDW	23.11±3.70	24.40±2.85	23.78±3.39

Comments: The number of red blood cells, Hb, hematosrit decreased,

MCV decreased below 70.77fl, MCH decreased below 23.08 pg. MCHC was normal and large RDW.

**Table 3.5. Hemoglobin patterns in  $\beta$ -thalassemia**

<b>Hb patterns (%)</b>	<b><math>\beta</math>-thalassemia (n = 55)</b>	<b><math>\beta</math>-thalassemia/HbE (n = 49)</b>	<b>Total <math>\beta</math>-thalassemia (n = 104)</b>
<b>Hb A1</b>			
- Median	36.04 $\pm$ 26.2	34.06 $\pm$ 28.82	35.03 $\pm$ 27.30
- Range	0 - 78.2	0 - 61.5	0- 78.2
<b>Hb A2</b>			
- Median	3.88 $\pm$ 5.20	3.92 $\pm$ 4.80	3.90 $\pm$ 4.96
- Range	1.4 - 9,9	1.8 - 9.2	1.4 - 9.9
<b>Hb F</b>			
- Median	47.83 $\pm$ 30.52	37.12 $\pm$ 18.50	40.52 $\pm$ 20.60
- Range	14.0 - 95.0	6.8 - 85.2	6.8- 95.0
<b>Hb E</b>			
- Median	-	40.32 $\pm$ 17.30	18.36 $\pm$ 10.60
- Range		12 - 63.1	13 - 63.1

Comments:

-  $\beta$ -thalassemia :HbA1 decreased significantly, possibly 0%, HbF increased, highest up to 95%, normal or slightly increased HbA2, up to 7.9%

-  $\beta$ -thalassemia / HbE : HbA1 decreased, lowest may be 0% and increased of

HbF highest was 85.2%, with high HbE, up to 63.1%, normal HbA2

### 3.2.β -globin gene mutations in patients with β-thalassemia

*Table 3.6. β -globin gene mutations in β-thalassemia patients*

β – globin mutations in β – thalassemia	Phenotype	Numbermutationalen	%
CD 41/42 (-TCTT)	β <sup>0</sup>	63	30.3
CD 17 (AA – TAG)	β <sup>0</sup>	62	30
CD 26 (GAG – AAG)	β <sup>+</sup>	49	23.5
CD 71/72 (+ A)	β <sup>0</sup>	10	4.8
IVS 2 -654 (C – T)	β <sup>0</sup> / β <sup>+</sup>	6	2.9
-28 (A – G)	β <sup>+</sup>	6	2.9
-88 (C – T)	β <sup>++</sup>	3	1.4
CD95 (TAC – TAA)	β <sup>0</sup>	2	1
IVS 1 – 1 (G – T)	β <sup>0</sup>	2	1
IVS 1- 5 (G – C)	β <sup>0</sup>	2	1
Rare mutation	β <sup>+</sup>	3	1.4
-140 (C – T)		1	0.5
c.441-c442 ins AC		1	0.5
2.3kb – deletion		1	0.5
Total		208	100

Comments: - 13 mutation types were identified, 4 common mutations are CD41/42, CD17, CD26, CD 71/72. 6 less common IVS2-654, -28, - 88, CD95, IVS1-1, IVS1-5, and 3 rare mutations are -140, c.441-c442ins AC, 2.3kb deletion. Most mutations have β<sup>0</sup> phenotype, β<sup>+</sup> phenotype is less common.

#### *Distribution of gene mutations by ethnic groups*

There are no difference in mutations in all ethnic groups except for CD26 and -28. CD26 mutations are more common in Thai (50%) than Kinh (23.2%) and Tay (5%) (p <0.01). -28 mutations were more common in the Tay (5%) than Kinh (p <0.05)

#### *Distribution of mutations by location and function of β-globin gene*



Study on the distribution of gene mutations by location and function has important implications for  $\beta$ -thalassemia phenotype, results as following.

- Mutations are much higher in exon 2 (124/208 - 59.6%), exon 1 (62/208 - 30%), less than at intron 2 (6/208 2.9%), intron 1 (4/208 - 1.9%) and promoter area (9/208 - 4.3%).

**Table 3.7. Distribution of the  $\beta$ -globin gene mutations by gene function.**

Functions of gene	n	Tỷ lệ %
<b>Transcriptional mutations ( Phenotype <math>\beta^+</math> and <math>\beta^{++}</math>)</b> - Promoter -28 (A – G) -88 (C – T)	9	4.3
<b>RNA processing( Phenotype <math>\beta^0</math> or <math>\beta^+</math>)</b> - Splice junction IVS 1 – 1 (G – T) IVS 1 – 5 (G – C) IVS 2 – 654 (C – T)	10	4.8
<b>RNA translation(Phenotype <math>\beta^0</math>)</b> - Nonsense codon CD17 (AAG – TAG) CD26 (GAG – AAG) CD95 (TAC – TAA) - Frameshift CD 41/42 (- TTCT) CD71/72 (+A)	186	89.4
Other rare mutations	3	1.4
Total	208	100

-Comment : Mutations were more in RNA translation than RNA

processing and transcription.

***Distribution of the  $\beta$ -globin gene mutations by genotypes***

There are 25 mutant combinations, with 5 genotype groups  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^+\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^E$ ,  $\beta^+\beta^E$ .

-  $\beta^0\beta^0$  genotype has 40 patients (38.46%), 17 homozygotes with 2 combinations CD41/42-CD41/42, CD17-CD17, and 23 compound heterozygous of with 5 types of combinations CD41/42-CD17, CD17-CD71/72, CD41/42-CD71/72, CD41/42-CD95, CD41/42-IVS1-5

-  $\beta^+\beta^+$  genotype has 1 patient (0.96%) with a combination IVS2-654-2.3kb

-  $\beta^0\beta^+$  genotype has 14 patients (13.46%) with 9 combinations, including -28-CD17, -28-CD41/42, -88-CD41/42, CD17-IVS2-65, CD41/42-IVS2654, CD71/72-IVS2-654, IVS1.1-IVS2-654, -140-CD17, CD71/72-c.441-442insAC.

-  $\beta^0\beta^E$  genotype has 47 patients (45.2%) with 6 combinations, including CD17-CD26, CD41/42-CD26, CD71/72-CD26, IVS1-1-CD26, IVS1-5-CD26, CD95-CD26.

-  $\beta^+\beta^E$  genotype has two patients (1.92%) with two combinations -28-CD26 and -88-CD26

**3.3. Comparison phenotype-genotype of  $\beta$ -thalassemia major and intermedia**

***Table 3.8. Comparison  $\beta$ -globin gene mutations with clinical severity***

Mutations	Number	Major		Intermedia		Minor	
		n	%	n	%	n	%
CD41/42	63	51	81	12	19		
CD17	62	48	77.4	14	22.6		
CD26	49	25	51	22	44.9	2	4.1
CD71/72	10	9	90	1	10		
IVS 2-654	6	3		2		1	
-28	6	4		1		1	

-88	3	-	2	1
CD95	2	1	1	
IVS 1-1	2	1	1	
IVS 1-5	2	1	1	
C-140	1	-	1	
C.441-C442ins AC	1	-	1	
2.3 kb del	1	-	-	1
Total	208	143	68.8	60 28.4

**Table 3.9. Comparison mutant combination genotypes with clinical severity**

Combination of mutations	n	Major n	Intermedia n	Minor n
CD17-Cd26	21	10	11	
CD41/42-CD26	20	15	5	
CD41/42-CD17	15	13	2	
CD41/42-CD41/42	9	9		
CD17-CD17	8	8		
CD17-CD71/72	3	3		
CD41/42-CD71/72	3	2	1	
CD71/72-CD26	3	2	1	
-28-CD17	3	3		
-28-CD41/42	2	1	1	
-88-CD41/42	2	1	1	
CD17-IVS2-654	2	1	1	
CD41/42-Cd95	1	1		
CD41/42-IVS1-5	1	1		
IVS2-654-2.3 kb deletion	1			1
nCD41/42-IVS2-654	1	1		

CD71/72-IVS2-654	1	1		
IVS1-1-IVS2-654	1		1	
-140-CD17	1	1		
Cd17-c.441-c442 insAC	1			1
IVS1-1-CD26	1		1	
IVS1-5-CD26	1		1	
CD95-CD26	1		1	
-28-CD26	1		1	
-88-CD26	1			1
Total	104	73	28	3

Comments: - The mutations CD17, CD41 / 42, CD71 / 72 and the type of combination of them with other mutations were related with major and intermediate types..

- CD26 mutations and combination genotypes with other mutations may be associated with major or intermediate, and less with minor types.

**Table 3.10. Comparison of clinical phenotype with genotypes**

<b>Clinical phenotypes</b>	<b><math>\beta^0\beta^0</math> (n = 40)</b>	<b><math>\beta^0\beta^+</math> (n = 14)</b>	<b><math>\beta^0\beta^E</math> (n = 47)</b>
Age of detection (years)	0.97 ± 1.22	1.28 ± 0.87	2.77 ± 0.72
Age of blood transfusion (years)	1 ± 1.4	1.32 ± 0.76	2.48 ± 2.1
Level of anemia (%)			
- Heavy	50	28.6	29.8
- Medium	50	35.7	61.7
- Light	-	35.7	8.5
Spleen (%)	90	78.6	76.6
Gan to (%)	60	71.4	51
Bone deformation (%)	32.5	42.8	23.4
Slow growth (%)			

- Weight	57.5	57.1	42.6
- Height	60	64.3	42.6

Comment: Clinical manifestation phenotype of  $\beta^0\beta^0$  gene were earlier, more severe anemia, earlier transfusion than  $\beta^0\beta^+$  and  $\beta^0\beta^E$ . Clinical manifestations and transfusion of  $\beta^0\beta^E$  genotype were later.

**Table 3.11. Comparison of  $\beta$ -globin genotype with some red blood cells index**

RBC characteristic	$\beta^0\beta^0$ (n = 40)	$\beta^0\beta^+$ (n = 14)	$\beta^0\beta^E$ (n = 47)
MCV (fl)	74.26 $\pm$ 7.5	73.81 $\pm$ 6.8	66.96 $\pm$ 5.6
MCH (pg)	24.87 $\pm$ 3.6	23.72 $\pm$ 3.1	21.24 $\pm$ 3.2

Comment: - All  $\beta^0\beta^0, \beta^0\beta^+, \beta^0\beta^E$  genotypes showed MCV < 75 fl, MCH < 25pg.

**Table 3.12. Comparison genotypes with hemoglobin pattern phenotypes**

Composition Hb (%)	$\beta^0\beta^0$ (n = 40)	$\beta^0\beta^+$ (n = 14)	$\beta^0\beta^E$ (n = 47)
HbA1	0	64.8 $\pm$ 15.2	0
HbA2	6.04 $\pm$ 2.1	3.68 $\pm$ 1.9	2.4 $\pm$ 1.6
HbF	94.5 $\pm$ 3.2	40.02 $\pm$ 14.3	51.9 $\pm$ 12.8
HbE	-	-	40.2 $\pm$ 11.5

Comments:

- $\beta^0\beta^0$ : HbA1 was absent, almost were HbF, HbA2 increased.
- $\beta^0\beta^+$ : HbA1 decreased, HbF increased, HbA2 normal or increased.
- $\beta^0\beta^E$ : HbA1 was absent, HbF increased, HbE presented, HbA2 increased

## CHAPTER 4 DISCUSSIONS

### 4.1. Clinical, hematologic phenotype of $\beta$ -Thalassemia

#### 4.1.1. Characters of clinical phenotype in $\beta$ -thalassemia

Most patients in the study were  $\beta$ -thalassemia major and intermedia. The results of the study (Table 3.1) showed that the clinical manifestation of  $\beta$ -thalassemia are very early with three major syndromes: chronic hemolytic anemia, iron overload, and physical growth retardation. Anemia is severe, almost patients are dependent blood transfusions, 64.9% of patients need to have blood transfusion over 5 times per year. Severe anemia due to hemolysis and ineffective production of red blood cells production in bone marrow. Iron infiltration is a consequence of multiple blood transfusions and increased intestinal iron absorption. Growth retardation is the result of chronic severe anemia, systemic iron overload, particularly in endocrine systems, and malnutrition.

Clinical manifestations of  $\beta$ -thalassemia are earlier than in  $\beta$ -thal/HbE ( $p < 0.001$ ); more severe in anemia, in blood transfusion  $< 1$  year ( $p < 0.01$ ), and over 5 times per year ( $p < 0.05$ ). Most patients with  $\beta$ -thalassemia are major and intermedia types. Classification  $\beta$ -thalassemia intermedia according to Shubba Phadke (Table 3.3.) showed that 57.1% of them in group III, that were more severe clinical manifestations, like major form.

Therefore we can conclude that clinical phenotype of  $\beta$ -thalassemia in Vietnam  $\beta$ -thalassemia is more severe.

#### 4.1.2. Characters of hematological phenotype in $\beta$ -thalassemia.

RBC, hematocrit, Hb reductions were significantly lower in  $\beta$ -

thalassemia than  $\beta$ -thalassemia / HbE ( $p < 0.05$ ).

Red blood cells are markedly different, small MCV, normal MCHC, large RDW with poikilocytosis.

Hemoglobin patterns are quite specific. HbA1 increased significantly, the lowest was 0%, HbF increased, the highest was 95% Hb, Hb A2 slightly increased, and HbE appeared in  $\beta$ -thalassemia / HbE. The mechanism of hemoglobin alteration is due to the absence or reduction of  $\beta$ -globin synthesis resulting from  $\beta$ -globin gene mutations, depending on  $\beta^0$ -thalassemia or  $\beta^+$ -thalassaemia.

## **4.2. $\beta$ -globin gene mutations in $\beta$ -thalassemia**

### **4.2.1. Detected $\beta$ -globin gene mutations**

208 mutant alleles were detected in 104 patients with  $\beta$ -thalassemia, with 13 various mutations. The rate of detected mutation is 100%, because almost all study subjects are  $\beta$ -thalassemia major and intermedia.

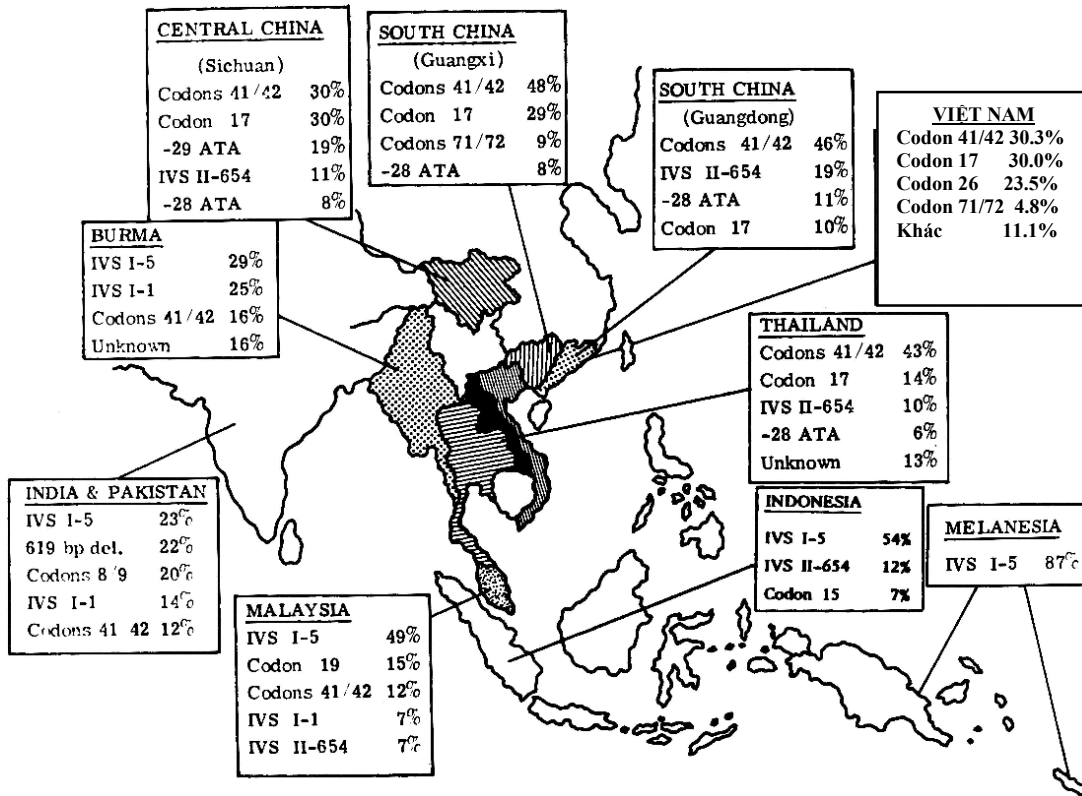
The four most common mutations are CD41/42, CD17, CD26, and CD71/72, six less common mutations are IVS2-654, -28, -88, CD95, IVS1-1, IVS1-5, and 3. Rare mutations are -140, c.441-c142ins AC and 2.3 kb deletion. This study has found one more mutation form than previous studies, that is -88. Comparison to previous studies in the country, the common mutations in this study are similar.

**Table 4.1. *B-globin gene mutations in  $\beta$ -thalassemia in Vietnam***

<b>Mutations</b>	<b>North (This study)</b>	<b>North 2000</b>	<b>Midle 2013</b>	<b>South 2002</b>	<b>South 1988</b>
CD41/42 (-TCTT)	30,3%	34,5%	+	35,7%	43,5%
CD17 (AAG--TAG)	30%	48,3%	+	25%	13%
CD26 GAG--AAG)	23,5%	-	+	-	-
CD71/72 (+A)	4,8%	3,5%	-	7,3%	8,7%
IVS 2-654 (C--T)	2,9%	13,8%	-	7,3%	13%
-28 (A—G)	2,9%		-	7,3%	-
-88 (C—T)	1,4%	-	-	-	-
CD95 (TAC--TAA)	1%	-	-	-	-
IVS 1-1 (G--T)	1%	-	+	6%	4,4%
IVS 1-5 (G—C)	1%	-	-	-	-
c-140 (C—T)	0,5%	-	-	-	-
c.441-c442 ins AC	0,5%	-	-	-	-
2.3 kb deletion	0,5%	-	-	-	-
Others	-	-	-	11,8%	17,4%

Compared with other countries, the common mutations found in Vietnam are quite similar to that in some Southeast Asian countries; but different from European countries. In Europe and the Mediterranean, the most common mutations are CD39, IVS1-110, IVS1-6, and IVS2-745.





**Figure 4.1. Distribution of common  $\beta$ -thalassemia gene mutation in Asia**

#### 4.2.2. Distribution of $\beta$ -globin gene mutations by function and, location

Gene mutation sites have significant implications for gene expression. Research results show that most of the mutations occur in the RNA translation, less in RNA processing and transcription; more in exon than intron and promoter area. . From that it can be concluded that in Vietnam  $\beta^0$ -thalassemia is more common than  $\beta^+$ -thalassemia. This review is in line with previous studies in Vietnam and is consistent with the characteristics of  $\beta$ -thalassemia in Southeast Asia. Clinical profiles,  $\beta$ -thalassemia in Vietnam are more severe.

#### 4.2.3. Distribution of gene mutations by genotypes

In the 208 mutation alleles, 25 mutation genotypes were identified, the most common combinations genotypes were CD17-CD26, CD41/42-CD17, CD41 /42-CD41/42, CD17-CD17, that were classified into 5 broad genotypes  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^+\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^E$  and  $\beta^+\beta^E$ . The most common was  $\beta^0\beta^E$  genotype, followed by  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^+\beta^E$ ,  $\beta^+\beta^+$ . That were similar with two

recent studies, in 2018, in southern and northern of Vietnam. Beta-thalassemia is a very heterogeneous with molecular and clinical features. Clinical and hematological manifestations, also the severity of the disease depend on the genotype.

### **4.3. Phenotype–genotype comparison of $\beta$ -thalassemia major and intermedia**

#### ***Comparison of clinical phenotype with genotype of $\beta$ -thalassemia***

Results of the study showed that CD41/42, CD17, CD71/72 mutations and their combination genotypes with other mutations were highly related to severe clinical presentations. These results can be explained by these mutations were  $\beta^0$ -thalassemia phenotypes, that did not synthesize  $\beta$ -globin chains. CD26 mutations and their combination genotypes with other mutations may be seen in major, intermedia and mild  $\beta$ -thalassemia.

Clinical manifestations varied by 3 genotype groups,  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^0\beta^+$  and  $\beta^0\beta^E$ . Clinical manifestations of  $\beta^0\beta^0$  genotype were more severe than those of  $\beta^0\beta^+$  and  $\beta^0\beta^E$ , indicating at onset age, early blood transfusion age, and the severity of anemia ( $p < 0.05$ ). The reason is that the  $\beta^0\beta^0$  gene does not synthesize of  $\beta$ -globin chains, and the imbalance of alpha / non-alpha chain is greater than the two  $\beta^0\beta^+$  and  $\beta^0\beta^E$  genotypes. Clinical manifestations of  $\beta^0\beta^+$  and  $\beta^+\beta^E$  genotypes were not differently, due to still a partial  $\beta$ -globin synthesis, less imbalance of alpha / non-alpha chain. From there, it can be concluded that *there is a clear correlation between clinical phenotype and genotype of  $\beta$ -thalassemia*.

#### ***Comparison of hematological phenotype with genotype of $\beta$ -thalassemia***

Almost of MCV, and MCH of  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^0\beta^+$  and  $\beta^0\beta^E$  were  $< 75$  fl and  $< 28$  pg. Microcytosis and hypochrome are the characters of  $\beta$ -thalassemia, that are used to screen thalassemia in community. Mechanisms of this characters are the results

of hemoglobin synthesis and ineffective erythropoiesis in bone marrow due to  $\beta$ -globin gene mutations.

Hemoglobin patterns vary by genotypes (table 3.12). In  $\beta^0\beta^0$  genotype, HbA<sub>1</sub> are absent, almost of Hb are HbF and small part of HbA<sub>2</sub>. In  $\beta^0\beta^+$  genotype HbA<sub>1</sub> are decreased with high HbF and normal or slightly high of HbA<sub>2</sub>. In  $\beta^0\beta^E$  genotype, HbA<sub>1</sub> are absent with high HbF and HbE. The alteration of hemoglobin patterns depend on the  $\beta$ -globin gene mutations with  $\beta^0$  or  $\beta^+$  phenotype, absent or decreased production of  $\beta$ -globin chains. Due to absent of production of  $\beta$ -globin chains in  $\beta^0\beta^0$  and  $\beta^0\beta^E$ , therefore HbA<sub>1</sub> are absent. Due to still hypoproduction of  $\beta$ -globin chains in  $\beta^0\beta^+$  phenotype, therefore HbA<sub>1</sub> are decreased. Because of absent or decreasing of  $\beta$ -globin chains, the residue  $\alpha$ -globin chains combine with gamma or delta chains, HbF and HbA<sub>2</sub> are increased. Like that, *there is the correlation closely between hematological phenotype and genotype.*

## CONCLUSIONS

Study 104 patients with  $\beta$ -thalassemia we may conclude:

### ***1. Clinical and hematological phenotypes of $\beta$ -thalassemia are rather specific***

Clinical manifestations are early, 88.4% under 5 years of age and 55.7% under 1 year of age. Clinical manifestations are diversity with three syndromes : severe chronic haemolytic anemia (64.9% of dependent on blood transfusion), iron overload and growth retardation. Almost of patients were  $\beta$ -thalassemia major (70.2%) and intermedia (26.9%). Over half of  $\beta$ -thalassemia intermedia manifested as  $\beta$ -thalassemia major.  $\beta$ -thalassemia was more severe than  $\beta$ -thalassemia/HbE.

Hematological phenotype is quite specific, with low Hb, microcytosis (MCV=70.7  $\pm$  8fl), hypochromic (MCH=23  $\pm$  3.6 pg). Hemoglobin pattern varies by disease types. In  $\beta$ -thalassemia, HbA1 decreased or absent, HbF increased, HbA2 increased slightly. In  $\beta$ -thalassemia/HbE, HbA1 decreased, HbF and HbE increased.

### ***2. Beta-globin gene mutations in patients with $\beta$ -thalassemia are diversity***

- 208 mutation alleles were detected in 104 patients with  $\beta$ -thalassemia, the mutation rate was 100%, with 13 mutations. The four most common mutations were CD41/42, CD17, CD26 and CD71/72 with 30.3%, 30%, 23.5% and 4.8%, respectively. There are 9 less common types of mutations, IVS2.654, - 28, - 88, CD95, IVS 1.1, IVS 1-5, -140, c.441-442insAC, and 2.3kb deletion with 1-2.9%. There was no significant difference in the distribution of mutations among ethnic groups except CD26 and -28. CD26 mutations were more common in Thai (50%) than in Kinh (23.2%) and Tay (5%). -28 mutation in Tay is differentiated in Kinh people.

Most of the mutations occurred more in RNA translation (89.4%) than in RNA processing (4.8%) and RNA translation (4.3%); more

in exon than in intron and promoter area. More mutations have the  $\beta^0$  phenotype (68%), than  $\beta^+$  phenotype. The most common mutation combinations are CD17-CD26, CD41/42-D26, CD41/42-CD17, CD41/42-CD41/42 and CD17-CD17. Combinations of mutations were divided into five groups of genotypes:  $\beta^0\beta^0$  (38.46%) with 5 mutation combinations, of which 17 were homozygotes and 23 were compound heterozygotes,  $\beta^+\beta^+$  (0.96%) with one type of combination,  $\beta^0\beta^+$  (13.46%), with 9 mutation combinations,  $\beta^0\beta^E$  (45.2%) with 6 mutation combinations and  $\beta^+\beta^E$  (1.92%), with two mutation combinations.

***3. There are the correlations between phenotype and genotype of  $\beta$ -thalassemia major and intermediate***

- CD41/42, CD17, CD71/72 mutations and their combinations with other mutations related to clinical phenotype major and intermedia. CD26 mutations and their combinations with other mutations can be seen both in clinical phenotype major and intermedia, and also can be seen in mild phenotype.

- Clinical phenotype of  $\beta^0\beta^0$  genotype is more severe than of  $\beta^0\beta^+$ ,  $\beta^0\beta^E$ . There is no difference in clinical phenotype between  $\beta^0\beta^+$  and  $\beta^0\beta^E$  genotypes.

- Hemoglobin patterns depend on genotype, HbA1 is absent in the  $\beta^0\beta^0$ ,  $\beta^0\beta^E$  genotype, decrease in the  $\beta^0\beta^+$  genotype, HbE is only present in  $\beta^0\beta^E$  and  $\beta^+\beta^E$  genotype.

## RECOMNENDATIONS

1. Gene mutation studies hemoglobinopathies have significant implications for the diagnosis, prognosis, especially to be the scientific basis for genetic counseling and hemoglobinopathies prevention. *Gene mutations studies in various regions and ethnic groups in Vietnam are needed.*

2. There are few studies on the phenotype- genotype correlation in thalassemia and other hemoglobinopathies, *therefore further studies are needed to* better understand and to have scientific basis for prevent and management of thalassemia and other hemoglobinopathies..

3. Because of CD41/42, CD17, CD71/72 mutations and the genotypes of their combinations with other mutations are associated with  $\beta$ -thalassemia major and intermedia. *Therefore, in prenatal diagnosis, if these mutation genotypes are detected, it will be an abortion indication*

**LIST OF SCIENTIFIC ARTICLES  
RELATED TO THIS THESIS**

1. Nguyen Hoang Nam, Ly ThiThanh Ha, Duong Ba Truc, Bui Van Vien, Ngo Diem Ngoc (2017).Gene mutation in patients with  $\beta$ -thalassemia at the NationalHospital of Pediatrics, Journal of Pediatrics, 10;5: 46 - 51.
2. Nguyen Hoang Nam, Ly ThiThanh Ha, Duong Ba Truc, Bui Van Vien, Ngo Diem Ngoc (2013).Characreristics of clinic, hematologicand genotypes in patients with beta-thalassemia. Journal of Pediatrics 6;6) :18 - 21.