

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐỖ THANH HƯƠNG

**PHÂN TÍCH MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA  
ĐỘT BIẾN GEN *ATP7B* VÀ KIỂU HÌNH CỦA  
BỆNH NHÂN WILSON Ở VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2016

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

**ĐỖ THANH HƯƠNG**

**PHÂN TÍCH MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA  
ĐỘT BIẾN GEN *ATP7B* VÀ KIỂU HÌNH CỦA  
BỆNH NHÂN WILSON Ở VIỆT NAM**

Chuyên ngành : Thần kinh

Mã số : 62720147

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Trần Văn Khánh
2. PGS.TS. Nguyễn Văn Liệu

**HÀ NỘI - 2016**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đỗ Thanh Hương, nghiên cứu sinh khóa 31 trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Thần kinh, xin cam đoan:

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

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

*Hà Nội, ngày 18 tháng 3 năm 2016*

**Người viết cam đoan**

**Đỗ Thanh Hương**

## LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, động viên của các Thầy, Cô, gia đình, bạn bè và đồng nghiệp cùng các cơ quan hữu quan.

Trước hết tôi xin bày tỏ lòng kính trọng, biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Nguyễn Văn Liệu và PGS.TS. Trần Văn Khánh - những người Thầy trực tiếp hướng dẫn khoa học, tận tình giúp đỡ, truyền đạt những kinh nghiệm quý báu và kiến thức cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng kính trọng, biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Tạ Thành Văn, Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Y Hà Nội, PGS.TS. Nguyễn Thị Hà và TS. Trần Huy Thịnh - Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội, những người Thầy đã động viên, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn trân trọng đến:

- Ban Giám Hiệu, Phòng Đào tạo Sau Đại học,
- Ban Chủ nhiệm, các Thầy, Cô Bộ môn Thần kinh; các Thầy, Cô Bộ môn Nhi đã tận tình hướng dẫn và tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án.

- Các Thầy, Cô trong Hội đồng thông qua đề cương, các Thầy Cô trong Hội đồng chấm Học phần Tiến sỹ, Chuyên đề Tiến sỹ, Tiểu luận tổng quan và Hội đồng đánh giá Luận án đã cho tôi những ý kiến đóng góp quý báu để hoàn thành chương trình học và hoàn thiện luận án.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến:

- Cán bộ và nhân viên Khoa Thần kinh, Khoa Gan mật, Khoa Tiêu hóa - Bệnh viện Bạch Mai và Bệnh viện Nhi Trung ương.

- Ban Giám đốc, Phòng Kế hoạch tổng hợp, Khoa Lưu trữ hồ sơ - Bệnh viện Bạch Mai.

- Ban Giám đốc, Phòng Kế hoạch tổng hợp, Khoa Lưu trữ hồ sơ - Bệnh viện Nhi Trung ương.

Tôi xin ghi nhớ sự động viên, giúp đỡ nhiệt tình của các Thầy, Cô, các cán bộ tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội, đã tạo điều kiện giúp tôi hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn đến bệnh nhân và gia đình các bệnh nhân đã đồng ý tham gia vào nghiên cứu để giúp tôi có được những số liệu trong luận án này.

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

Cuối cùng, tôi xin biết ơn gia đình, những người thân đã dành cho tôi sự giúp đỡ vật chất, tình thương yêu, sự chia sẻ và là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

*Hà Nội, ngày 18 tháng 03 năm 2016*

**Đỗ Thanh Hương**

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<i>ATP7B</i>	: P-type ATPase
CT	: Computer Tomography Scanner (Cắt lớp vi tính)
ddATP	: Dideoxyadenin triphosphat
ddCTP	: Dideoxycytosin triphosphat
ddGTP	: Dideoxyguanin triphosphat
ddNTP	: Dideoxynucleoside triphosphat
ddTTP	: Dideoxytimin triphosphat
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTP	: Deoxynucleoside triphosphat
Kb	: Kilobase
kD	: Kilo dantol
MRI	: Magnetic Resonance Image (Cộng hưởng từ)
MRS	: Magnetic Resonance Spectroscopy (Cộng hưởng từ quang phổ)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Phản ứng khuếch đại chuỗi)
pDHPLC	: Partially Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng cao áp biến tính một phần)
PET	: Positron Emission Tomography (Cắt lớp phát điện tử dương)
PRNP	: Protein prion
SNP	: Single Nucleotid Polymorphisms (Đa hình đơn nucleotid)
ALT	: Alanine aminotransferase
AST	: Aspartate aminotransferase
MBDs	: Metal Binding Domains (vùng gắn kim loại)

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....</b>	<b>3</b>
1.1. Đặc điểm bệnh Wilson .....	3
1.1.1. Khái niệm về bệnh Wilson.....	3
1.1.2. Lịch sử nghiên cứu bệnh Wilson .....	3
1.1.3. Dịch tễ bệnh Wilson.....	5
1.1.4. Sinh lý bệnh học bệnh Wilson .....	5
1.1.5. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh Wilson .....	7
1.1.6. Chẩn đoán .....	19
1.1.7. Điều trị .....	22
1.1.8. Tiên lượng và phòng bệnh .....	27
1.2. Bệnh học phân tử bệnh Wilson.....	28
1.2.1. Vị trí, cấu trúc và chức năng của gen <i>ATP7B</i> .....	28
1.2.2. Đột biến gen <i>ATP7B</i> gây bệnh Wilson .....	30
1.2.3. Đặc điểm di truyền của bệnh Wilson.....	35
1.2.4. Cơ chế bệnh học phân tử của bệnh Wilson .....	36
1.3. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen <i>ATP7B</i> .....	38
1.3.1. Kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp biến tính.....	38
1.3.2. Sử dụng enzym cắt giới hạn.....	39
1.3.3. Kỹ thuật giải trình tự gen .....	40
1.4. Mối tương quan giữa đột biến gen <i>ATP7B</i> và kiểu hình ở bệnh nhân Wilson.....	42
1.4.1. Mối tương quan giữa các dạng đột biến và kiểu hình .....	42
1.4.2. Tương quan giữa một số đột biến điểm trên gen <i>ATP7B</i> và kiểu hình.....	44
<b>CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>47</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	47
2.2. Địa điểm nghiên cứu.....	48

2.3. Thời gian nghiên cứu.....	48
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	48
2.4.1. Phương pháp nghiên cứu .....	48
2.4.2. Cỡ mẫu nghiên cứu .....	49
2.4.3. Các nội dung nghiên cứu .....	49
2.5. Các bước tiến hành nghiên cứu.....	50
2.5.1. Hỏi bệnh và khám lâm sàng.....	50
2.5.2. Xét nghiệm sinh hóa và chẩn đoán hình ảnh .....	52
2.5.3. Chẩn đoán .....	52
2.5.4. Quy trình phân tích đột biến gen <i>ATP7B</i> .....	53
2.6. Xử lý kết quả.....	56
2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	57
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>58</b>
3.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng .....	58
3.1.1. Đặc điểm lâm sàng.....	58
3.1.2. Triệu chứng cận lâm sàng.....	61
3.1.3. Thở lâm sàng của bệnh Wilson .....	65
3.2. Kết quả phân tích gen <i>ATP7B</i> .....	65
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA .....	65
3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen <i>ATP7B</i> .....	66
3.2.3 Các dạng đột biến gen <i>ATP7B</i> ở bệnh nhân Wilson.....	72
3.3. Mối tương quan giữa đột biến gen <i>ATP7B</i> và kiểu hình của bệnh Wilson .....	73
3.3.1. Mối tương quan giữa số alen đột biến và kiểu hình ở bệnh nhân Wilson .....	73
3.3.2. Mối tương quan giữa dạng đột biến và kiểu hình bệnh Wilson ..	78
<b>CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN .....</b>	<b>83</b>
4.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh Wilson.....	83
4.1.1. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh Wilson .....	83



4.1.2. Một số đặc điểm cận lâm sàng của bệnh Wilson.....	90
4.1.3. Các biến đổi về hình ảnh học.....	92
4.1.4. Các thể lâm sàng của bệnh.....	94
4.2. Kết quả phân tích gen <i>ATP7B</i> .....	95
4.3. Phân tích mối tương quan giữa số alen đột biến trên gen <i>ATP7B</i> và kiểu hình của bệnh nhân Wilson .....	100
4.3.1. Mối tương quan giữa tuổi khởi phát và số alen đột biến.....	100
4.3.2. Mối tương quan giữa nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và số alen đột biến .....	101
4.3.3. Mối tương quan giữa đồng niệu 24 giờ và số alen đột biến .....	102
4.3.4. Mối tương quan giữa thể lâm sàng và số alen đột biến.....	103
4.4. Phân tích mối tương quan giữa dạng đột biến trên gen <i>ATP7B</i> và kiểu hình của bệnh nhân Wilson .....	104
4.4.1. Mối tương quan giữa tuổi khởi phát và dạng đột biến .....	104
4.4.2. Mối tương quan giữa nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và dạng đột biến .....	106
4.4.3. Mối tương quan giữa đồng niệu 24 giờ và dạng đột biến.....	107
4.4.4. Mối tương quan giữa thể lâm sàng và dạng đột biến.....	108
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>119</b>
<b>KHUYẾN NGHỊ.....</b>	<b>120</b>
<b>DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Chỉ số tiên lượng suy gan tối cấp .....	26
Bảng 1.2.	Kế hoạch ứng dụng lâm sàng của liệu pháp gen .....	27
Bảng 1.3.	Một số dạng đột biến phổ biến trên thế giới.....	30
Bảng 1.4.	Kiểu gen trên bệnh nhân Wilson Trung Quốc .....	34
Bảng 2.1.	Thang điểm chẩn đoán bệnh Wilson theo Ferenci .....	47
Bảng 2.2.	Thành phần phản ứng PCR.....	54
Bảng 2.3.	Chu trình nhiệt phản ứng PCR.....	55
Bảng 2.4.	Thành phần của phản ứng sequencing.....	55
Bảng 2.5.	Chu trình nhiệt của phản ứng sequencing.....	56
Bảng 3.1.	Tuổi khởi phát bệnh .....	58
Bảng 3.2.	Triệu chứng ở giai đoạn khởi phát.....	59
Bảng 3.3.	Triệu chứng ở giai đoạn toàn phát .....	60
Bảng 3.4.	Tiền sử gia đình của bệnh nhân Wilson.....	61
Bảng 3.5.	Định lượng ceruloplasmin huyết thanh .....	61
Bảng 3.6.	Định lượng transaminase huyết thanh .....	62
Bảng 3.7.	Xét nghiệm đồng niệu 24 giờ .....	62
Bảng 3.8.	Kết quả siêu âm ổ bụng.....	63
Bảng 3.9.	Kết quả chụp MRI sọ não .....	64
Bảng 3.10.	Phân bố đột biến trên gen <i>ATP7B</i> của bệnh nhân Wilson.....	67
Bảng 3.11:	Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của các bệnh nhân Wilson mang đột biến mới và đột biến đã được công bố gây bệnh trên gen <i>ATP7B</i> .....	68
Bảng 3.12.	Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và số alen đột biến .....	74
Bảng 3.13.	Chỉ số tương quan giữa các thể lâm sàng và số alen đột biến....	77
Bảng 3.14.	Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và dạng đột biến.....	78
Bảng 3.15.	Chỉ số tương quan giữa các thể lâm sàng và dạng đột biến .....	82

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Chu trình chuyển hóa của đồng trong cơ thể .....	6
Hình 1.2.	Hình ảnh vòng Kayser-Fleischer ở rìa giác mạc .....	9
Hình 1.3.	Hình ảnh đục nhân mắt hình hoa hướng dương .....	10
Hình 1.4:	Hình ảnh giảm tỷ trọng trên CT sọ não bệnh nhân nữ 14 tuổi bị bệnh Wilson .....	15
Hình 1.5.	Hình ảnh MRI sọ não của bệnh nhân Wilson .....	16
Hình 1.6.	Hình ảnh chụp PET não của bệnh nhân Wilson .....	19
Hình 1.7.	Cấu trúc protein <i>ATP7B</i> .....	29
Hình 1.8.	Phân bố một số đột biến trên gen <i>ATP7B</i> .....	32
Hình 1.9.	Phân bố đột biến trên gen <i>ATP7B</i> .....	33
Hình 1.10.	Phả hệ một gia đình bị bệnh di truyền lặn trên NST thường .....	35
Hình 1.11.	Vị trí đột biến trên gen <i>ATP7B</i> .....	37
Hình 1.12.	Nguyên tắc kỹ thuật pDHPLC .....	39
Hình 1.13.	Hình ảnh minh họa xác định đột biến R778W trên gen <i>ATP7B</i> bằng kỹ thuật cắt enzym giới hạn .....	40
Hình 1.14.	Trình tự nucleotid được xác định trên máy giải trình tự gen .....	41
Hình 1.15.	Các dạng đột biến và thể lâm sàng của bệnh Wilson .....	43
Hình 3.1.	Tỷ lệ mắc bệnh theo giới .....	58
Hình 3.2.	Hình ảnh tăng tín hiệu nhân xám đối xứng 2 bên trên phim MRI của bệnh nhân mã số W56.00 (mũi tên màu đỏ) .....	64
Hình 3.3.	Các thể lâm sàng của bệnh Wilson .....	65
Hình 3.4.	Hình ảnh sản phẩm PCR đoạn gen ở exon 8 của gen <i>ATP7B</i> . ...	66
Hình 3.5.	Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W8.00 .....	72
Hình 3.6.	Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W37.00 .....	72
Hình 3.7.	Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W38.00 .....	73

Hình 3.8.	Phân bố tuổi khởi phát và số alen đột biến.....	75
Hình 3.9.	Phân bố nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và số alen đột biến...	75
Hình 3.10.	Phân bố nồng độ đồng niệu 24 giờ và số alen đột biến .....	76
Hình 3.11.	Phân bố thể lâm sàng và số alen đột biến .....	77
Hình 3.12.	Phân bố tuổi khởi phát và dạng đột biến .....	79
Hình 3.13.	Phân bố nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và dạng đột biến ..	80
Hình 3.14.	Phân bố đồng niệu 24 giờ và dạng đột biến.....	81
Hình 3.15.	Phân bố dạng đột biến và thể lâm sàng của bệnh Wilson .....	81
Hình 4.1.	Hình ảnh bệnh nhân mã số W55.00.....	111
Hình 4.2.	Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W55.00.....	112
Hình 4.3.	Hình ảnh bệnh nhân W31.00 (A) và hình ảnh MRI sọ não (B)	113
Hình 4.4.	Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W31.00.....	114
Hình 4.5.	Hình ảnh bệnh nhân W58.00 (A) và hình ảnh MRI sọ não (B) ...	115
Hình 4.6.	Hình giải trình tự gen của gia đình bệnh nhân mã số W58.00 .	116
Hình 4.7.	Hình ảnh gia đình bệnh nhân mã số W58.00.....	118

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Y học hiện đại đã có những bước tiến nhanh trong khoảng vài thập kỷ trở lại đây, sau sự kiện các nhà khoa học hoàn tất việc giải mã bộ gen người. Cơ chế bệnh sinh dần dần được sáng tỏ ở mức độ phân tử, làm tiền đề cho việc chẩn đoán và điều trị can thiệp trúng đích nhằm giải quyết tận gốc căn nguyên của bệnh. Năm 1993 Kary Mullis, người phát minh ra kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction: phản ứng khuếch đại chuỗi) được trao giải Nobel về hóa học. Từ đó kỹ thuật PCR được nhanh chóng được phát triển và ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu về lĩnh vực sinh học phân tử.

Những tiến bộ của ngành hoá sinh, sinh học phân tử đã giúp sàng lọc, chẩn đoán sớm, phòng bệnh, điều trị tốt hơn các bệnh rối loạn chuyển hóa và di truyền... Mặc dù không phổ biến như một số nhóm bệnh khác nhưng đây là nhóm gây nhiều khó khăn trong điều trị và để lại hậu quả rất nặng nề về sức khỏe, tinh thần cũng như chất lượng cuộc sống cho bệnh nhi, đồng thời trở thành, gánh nặng cho gia đình và toàn thể xã hội.

Bệnh Wilson thuộc nhóm bệnh lý rối loạn chuyển hóa và di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường với tỷ lệ mắc bệnh là 1/30.000 trẻ [1]. Bệnh gây nên do đột biến gen *ATP7B*, là gen có vai trò điều hòa quá trình chuyển hóa đồng trong cơ thể. Khi đột biến gen xảy ra sẽ gây rối loạn quá trình chuyển hóa đồng, làm cho lượng đồng tăng cao trong cơ thể và tích lũy dần ở các cơ quan (gan, não, mắt...) gây ra các triệu chứng đa dạng trên lâm sàng, các triệu chứng này tiến triển nặng dần cùng với quá trình lắng đọng đồng theo thời gian. Ngoài ra, đồng có thể lắng đọng ở hầu hết các cơ quan khác trong cơ thể nhưng thường biểu hiện nhẹ và muộn hơn. Bệnh nhân Wilson thường biểu hiện triệu chứng về gan nhiều hơn triệu chứng về thần kinh ở nhóm dưới 10 tuổi, các triệu chứng thần kinh hay gặp hơn ở bệnh nhân sau 30 tuổi [1].

Hiện nay, để chẩn đoán xác định bệnh cần có sự kết hợp giữa các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng điển hình như: nồng độ ceruloplasmin huyết thanh, nồng độ đồng trong nước tiểu 24 giờ, định lượng đồng trong gan hoặc chẩn đoán hình ảnh não và gan.

Trong thực hành lâm sàng, chẩn đoán và điều trị sớm bệnh Wilson đóng vai trò quan trọng vì có thể tránh được các tiên triển nặng của bệnh dẫn đến tử vong. Ngày nay, phát hiện đột biến trên gen *ATP7B* sẽ giúp chẩn đoán xác định bệnh sớm hơn, phát hiện người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh nhằm ngăn ngừa và làm giảm tỷ lệ mắc bệnh. Bên cạnh đó, xác định mối tương quan giữa kiểu gen *ATP7B* với thể lâm sàng của bệnh Wilson sẽ giúp cho tiên lượng bệnh và có phác đồ điều trị chính xác, hiệu quả hơn.

Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về xác định đột biến gen *ATP7B*, xác định mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh Wilson. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về bệnh Wilson trước đây chủ yếu là mô tả về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng [2],[3],[4]. Trong vài năm gần đây, một số nghiên cứu về phát hiện đột biến trên gen *ATP7B* đã bắt đầu được triển khai [5],[6],[7],[8]. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào về phân tích mối tương quan giữa kiểu gen *ATP7B* và kiểu hình của bệnh Wilson tạo cơ sở cho việc tiên lượng bệnh và đưa ra phác đồ điều trị chính xác, hiệu quả. Do đó đề tài: ***“Phân tích mối tương quan giữa đột biến gen *ATP7B* và kiểu hình trên bệnh nhân Wilson ở Việt Nam”*** được thực hiện với 2 mục tiêu:

1. Mô tả đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân Wilson.
2. Phân tích mối tương quan giữa kiểu gen *ATP7B* và kiểu hình của bệnh nhân Wilson.

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Đặc điểm bệnh Wilson

#### 1.1.1. Khái niệm về bệnh Wilson

Từ năm 1912, tác giả Wilson đưa ra những khái niệm đầu tiên về bệnh: bệnh thoái hóa gan - nhân đậu có tính chất gia đình [9].

Sau đó bệnh Wilson được mô tả là bệnh di truyền, rối loạn chuyển hóa đồng với các tổn thương đặc trưng ở não, gan và mắt.

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

##### *Trên thế giới*

Bệnh Wilson được mô tả từ cuối thế kỷ XIX với các triệu chứng mang tính chất đơn lẻ: triệu chứng run với tên gọi là bệnh "xơ cứng giả hiệu"; vòng Kayser và Fleischer màu xanh ở rìa giác mạc [10].

Năm 1912, bệnh mang tên Wilson, với những mô tả đầy đủ các triệu chứng tổn thương thoái hóa gan và não, có tính chất gia đình [9].

Những năm sau đó, các tác giả tìm thấy rối loạn chuyển hóa đồng ở các bệnh nhân Wilson, ứng dụng trong điều trị thải đồng và ghép gan [10],[11],[12],[13],[14],[15].

Từ sau năm 1993, các nhà khoa học đã phát hiện gen gây bệnh Wilson là gen lặn *ATP7B* trên nhiễm sắc thể số 13, ở vị trí 13q14.3 [16],[17].

Năm 1995, với những nghiên cứu phát hiện đột biến đầu tiên: đột biến p.H1069Q ở châu Âu và p.R778L ở châu Á đã mở ra một kỷ nguyên mới cho các nghiên cứu phát hiện đột biến gen *ATP7B* ở các bệnh nhân Wilson [18],[19].

Từ đó đến nay, có rất nhiều các công trình nghiên cứu về phát hiện đột biến gen *ATP7B* trên bệnh nhân Wilson và đã phát hiện ra hơn 500 dạng đột biến gen khác nhau được công bố trên ngân hàng dữ liệu gen (<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/>).

#### *Ở Việt Nam*

Năm 1969, Bùi Quốc Hương và cộng sự đã báo cáo 8 trường hợp bệnh nhân Wilson Việt Nam đầu tiên tại Hội nghị Thần kinh học Quốc tế lần thứ IX ở Mỹ [20].

Năm 1975, Chu Văn Tường và cộng sự nhận xét hai trường hợp bệnh Wilson đầu tiên tại Bệnh viện Nhi Trung Ương [21].

Từ năm 1977 đến năm 2003, Lê Đức Hinh và cộng sự đã nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của 81 bệnh nhân Wilson ở Việt Nam [2],[3].

Năm 2010, Đỗ Thanh Hương và cộng sự là nhóm nghiên cứu đầu tiên phân tích đột biến trên gen *ATP7B*. Tuy nhiên, nhóm nghiên cứu mới chỉ tập trung phân tích một dạng đột biến phổ biến ở vùng châu Á là đột biến Arg778Leu bằng phương pháp cắt enzym giới hạn. Nghiên cứu đã phát hiện được 2/29 bệnh nhân mang đột biến Arg778Leu dạng dị hợp tử [5].

Năm 2012, Lê Hoàng Phúc phát hiện 8/16 bệnh nhân mang đột biến trên các exon 8, 10, 12, 13, 15, 16 và 20 ở bệnh nhân Wilson tại Bệnh viện Nhi Đồng 1, Thành phố Hồ Chí Minh [6].

Năm 2015, nghiên cứu tại Bệnh viện Nhi Trung ương phát hiện 10/16 bệnh nhi mang đột biến khi giải trình tự gen trên các exon 2b, 8, 11, 12 và 13 [7].

Năm 2015, nghiên cứu của Phan Tôn Hoàng tại Trường Đại học Y Hà Nội tiến hành phát hiện đột biến trên 21 exon của gen *ATP7B*, nghiên cứu đã phát hiện 48/61 (78,6%) bệnh nhân Wilson có đột biến gen *ATP7B* [8].



### **1.1.3. Dịch tễ bệnh Wilson**

Tại Hoa Kỳ, tỷ lệ người mang gen bệnh là 1/90. Tỷ lệ mắc bệnh Wilson là 1/30.000 người.

Trên thế giới, tỷ lệ hiện mắc bệnh Wilson là 10 - 30 triệu người, trong đó tỉ lệ người mang dị hợp tử là 1/ 100.000 người, với tần số đột biến gen khác nhau 0,3-0,7%. Tại Nhật Bản, tỷ lệ này là 1/30.000 dân, so với 1/100.000 dân ở Úc. Sự gia tăng tần số bệnh ở một số nước là do tỷ lệ cao của hôn nhân cùng huyết thống. Các biểu hiện tối cấp của bệnh Wilson gặp ở nữ nhiều hơn nam [1].

Một nghiên cứu ở Đức cho thấy bệnh nhân bị bệnh Wilson biểu hiện triệu chứng sớm chủ yếu ở gan (tuổi khởi phát trung bình là 15,5 tuổi), các triệu chứng thần kinh xuất hiện muộn hơn (trung bình là 20,2 tuổi) [22].

Manolaki và các cộng sự đã phân tích các đột biến được tìm thấy trên gen *ATP7B* và phát hiện độ tuổi khởi phát của bệnh Wilson có khoảng dao động lớn hơn so với trước đây. Các đột biến hoàn toàn phá vỡ cấu trúc gen có thể gây tổn thương gan sớm trong thời thơ ấu, những bệnh nhân này không được chẩn đoán bệnh Wilson ở giai đoạn khởi phát bệnh [23].

Nói chung, các nghiên cứu chỉ ra rằng bệnh Wilson có thể khởi phát ở nhóm tuổi 5 - 40 tuổi. Tuy nhiên cũng có thể gặp một số rất ít các trường hợp dưới 3 tuổi và trên 70 tuổi [24].

### **1.1.4. Sinh lý bệnh học bệnh Wilson**

Tổng hàm lượng đồng bình thường trong cơ thể ước tính là 50-100mg và trung bình tiêu thụ hàng ngày là 2-5mg, tùy thuộc vào lượng thức ăn chứa đồng, bao gồm các loại đậu, các loại thịt, loài giáp xác và socola. Đồng là một thành phần quan trọng của một số enzym chuyển hóa như lysyl oxidase, cytochrome oxidase, superoxide dismutase và dopamine hydroxylase  $\beta$ .

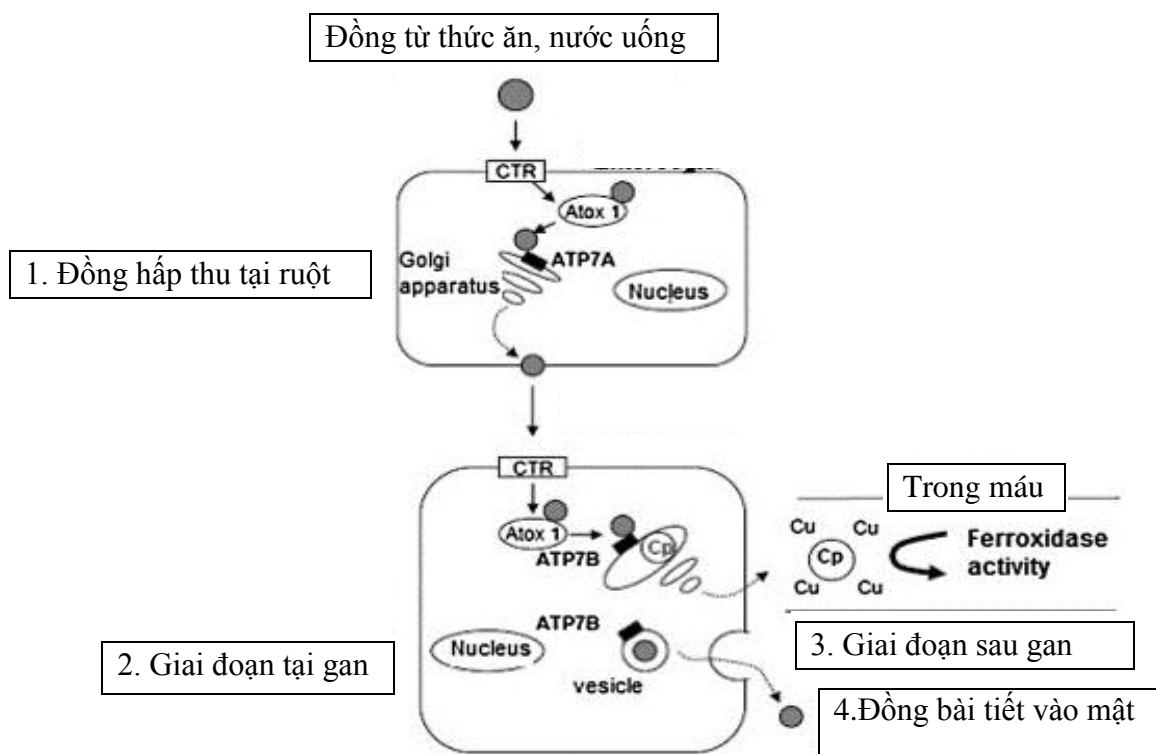
Khoảng 50-75% đồng được hấp thụ từ ruột non và sau đó vận chuyển đến các tế bào gan. Con đường này không bị ảnh hưởng trong bệnh Wilson. Sau khi đồng đến tế bào gan, nó được tích hợp vào các enzym có chứa đồng và protein gắn đồng (CBPs: Copper Binding Proteins), bao gồm ceruloplasmin và ferroxidase huyết thanh.

Đồng dư thừa có thể ở dạng không độc bằng cách hình thành phức hợp với apo-metallothionein, hoặc có thể được bài tiết ra ngoài cơ thể. Có khoảng 95% lượng đồng dư thừa bài tiết ra ngoài qua đường mật, số còn lại bài tiết qua phân, nước tiểu và mồ hôi.

Cân bằng lượng đồng bình thường trong cơ thể phụ thuộc vào sự bài tiết, không phụ thuộc vào sự hấp thu và đồng tồn tại trong cơ thể dưới 3 dạng:

- Một phần đồng gắn với protein, được bài tiết vào dịch mật và đào thải ra ngoài qua phân.
- Một phần nhỏ đồng vào huyết tương dưới dạng cation, rồi thải ra ngoài qua nước tiểu
- Phần lớn đồng gắn với protein của gan, tổng hợp thành ceruloplasmin, bản chất là  $\alpha$  globulin, trọng lượng phân tử là 12.000 Da, gắn với 8 nguyên tử đồng.

Trong bệnh Wilson, quy trình chuyển hóa của đồng thành ceruloplasmin và bài tiết của lượng đồng thừa qua đường mật bị suy giảm [25].



**Hình 1.1. Chu trình chuyển hóa của đồng trong cơ thể [25].**

Lượng đồng dư thừa hình thành các gốc tự do trong quá trình oxy hóa của chất béo và protein. Bất thường siêu cấu trúc trong các giai đoạn sớm nhất của tổn thương tế bào gan, liên quan đến các lưới nội chất, ty thể, peroxisome và hạt nhân đã được xác định. Ban đầu, đồng dư thừa tích tụ trong gan, dẫn đến tổn thương các tế bào gan. Cuối cùng, khi lượng đồng trong gan tăng, làm tăng lưu thông và lắng đọng ở các cơ quan khác gây ra các triệu chứng đa dạng trên lâm sàng. Ở giai đoạn toàn phát, bệnh có thể biểu hiện ở hầu hết các cơ quan trong cơ thể: gan, não, mắt, thận, da, xương...

Ngoài ra, có một số trường hợp tiến triển rất cấp tính ở thể suy gan bùng phát tối cấp và tử vong sớm. Các thể tiến triển mạn tính dẫn đến xơ gan mất bù hoặc số ít trường hợp bị ung thư tế bào gan nếu không được điều trị kịp thời.

### ***1.1.5. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh Wilson***

#### ***1.1.5.1. Các triệu chứng lâm sàng của bệnh Wilson***

Triệu chứng lâm sàng của bệnh Wilson biểu hiện khác nhau giữa các bệnh nhân tùy thuộc vào giai đoạn bệnh và cơ quan bị tổn thương do lắng đọng đồng.

Bệnh nhân đến khám và điều trị ở nhiều chuyên khoa (thần kinh, tiêu hóa, mắt, da liễu, thận, xương khớp...) nên việc chẩn đoán, theo dõi và điều trị gặp nhiều khó khăn.

Các triệu chứng tiêu hóa thường xuất hiện sớm nhất vì gan dự trữ khoảng 80% lượng đồng trong cơ thể và khi đồng tích tụ trong gan quá nhiều sẽ theo hệ tuần hoàn đi đến các cơ quan đích khác (não, mắt, thận, da, xương...).

#### ***Triệu chứng tại gan***

Tổn thương gan là biểu hiện gặp nhiều nhất ở những bệnh nhân bị bệnh Wilson (hơn 50% các trường hợp). Có 3 dạng tổn thương chính ở gan: viêm gan mạn tính hoạt động, xơ gan và suy gan tối cấp.

Các bệnh nhân có biểu hiện viêm gan mạn tính hoặc xơ gan hay bị bỏ sót chẩn đoán nguyên nhân.

Dấu hiệu của suy gan tối cấp bao gồm:

- Cổ trướng, tuần hoàn bàng hệ, sao mạch
- Bàn tay son, ngón tay dùi trống
- Nôn ra máu, hội chứng hoàng đả

Chẩn đoán bệnh Wilson thể suy gan tối cấp khi có các biểu hiện lâm sàng ở trên, các enzym gan tăng, phosphatase kiềm giảm, có biểu hiện tan máu và hội chứng tổn thương thận Fanconi.

Bệnh nhân ở nhóm suy gan tối cấp thường rất nặng với tỷ lệ tử vong cao và có chỉ định ghép gan cấp cứu [26].

### ***Triệu chứng thần kinh***

Hầu hết các bệnh nhân có biểu hiện triệu chứng thần kinh đã bị xơ gan. Các triệu chứng của hệ thần kinh trung ương do lắng đọng đồng ở các nhân xám của não.

Triệu chứng thường gặp nhất là run không đối xứng (khoảng 50%), chủ yếu là khi nghỉ ngơi, run tư thế, hoặc run động.

Triệu chứng ban đầu thường bao gồm:

- Nói khó, nuốt khó, chảy nước dãi.
- Vẽ mặt kém linh hoạt.
- Run tay, bàn tay vụng về, viết chữ xấu.
- Tăng nhẹ trương lực cơ kiểu ngoại tháp 2 chi trên, sau đó tăng dần trương lực cơ tứ chi làm cho người bệnh khó phối hợp động tác và rối loạn dáng đi.

Biểu hiện muộn bao gồm:

- Loạn trương lực cơ, vẽ mặt bất động.
- Liệt cứng tứ chi, chân tay co quắp, có các cơn xoắn vặn làm bệnh nhân đau cơ và các khớp.
- Có thể có cơn động kinh toàn thể.

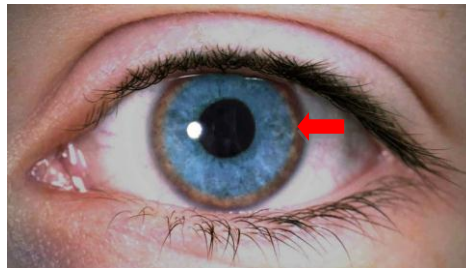
Triệu chứng tâm thần (10-20% bệnh nhân) bao gồm: rối loạn hành vi, cảm xúc, thay đổi nhân cách, suy giảm nhận thức.

Các bệnh nhân Wilson có triệu chứng tâm thần thường kèm theo tổn thương thần kinh và có tiền sử gia đình về bệnh gan, bệnh Wilson [26].

### ***Triệu chứng ở mắt***

Tổn thương mắt hay gặp nhất ở bệnh nhân Wilson là sự hiện diện của vòng Kayser-Fleischer và chủ yếu gặp ở thể thần kinh.

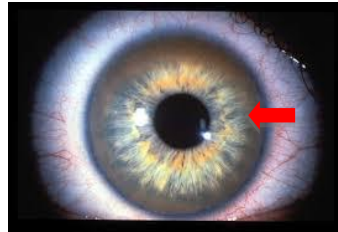
- Vòng Kayser-Fleischer ở rìa giác mạc do sự lắng đọng của đồng và sulfur ở mắt sau màng Descemet quanh giác mạc có màu vàng xanh sang nâu (tùy chủng tộc với màu mắt khác nhau).
- Vòng Kayser-Fleischer có thể có ở cả 2 mắt, ban đầu đồng lắng đọng ở phía trên của giác mạc, sau đó lan xuống dưới và cuối cùng bao quanh toàn bộ giác mạc.
- Vòng Kayser-Fleischer điển hình có thể dễ dàng nhìn thấy bằng mắt thường hoặc kính soi đáy mắt với vật kính 40<sup>+</sup> hoặc khó hơn phải xác định bằng đèn khe.
- Vòng Kayser-Fleischer chỉ được coi là triệu chứng của bệnh Wilson khi kèm theo các bất thường ở hệ thần kinh trung ương, vì cũng có thể quan sát thấy vòng Kayser-Fleischer ở những bệnh nhân không mắc bệnh Wilson nhưng bị bệnh tiêu hóa ứ mật mạn tính [26].



**Hình 1.2. Hình ảnh vòng Kayser-Fleischer ở rìa giác mạc (mũi tên đỏ)**

(<http://www.mindsofmalady.com/2015/03/wilsons-disease.html>)

Một số ít trường hợp khi lượng đồng lắng đọng ở củng mạc mắt và thủy tinh thể gây nên đục nhân mắt hình hoa hướng dương của Siebmerling và Ofloff [27].



**Hình 1.3. Hình ảnh đục nhân mắt hình hoa hướng dương (mũi tên đỏ)**

([imgkid.com/sunflower cataract](http://imgkid.com/sunflower-cataract))

### ***Triệu chứng huyết học***

Triệu chứng huyết học thường đi kèm với biểu hiện tổn thương gan. Những bệnh nhân xơ gan, viêm gan mạn tính có thể kèm thiếu máu, rối loạn đông máu, giảm tiểu cầu. Ngoài ra có thể gặp các biểu hiện:

- Thiếu máu tan máu là biểu hiện hiếm gặp ở bệnh nhân Wilson
- Test Coombs âm tính với bệnh nhân có tan máu nội mạch cấp tính, là hậu quả của sự phá hủy quá trình oxy hóa của các tế bào hồng cầu bị gắn đồng.
- Bất kỳ bệnh nhân nào có biểu hiện suy gan cấp, test Coombs âm tính, tan máu trong lòng mạch, tăng enzym gan nhẹ, phosphatase kiềm thấp hoặc chỉ số phosphatase kiềm/ bilirubin < 2 phải làm thêm các xét nghiệm để loại trừ chẩn đoán bệnh Wilson.

Rất hiếm gặp trường hợp bệnh nhân chỉ có biểu hiện giảm tiểu cầu hoặc rối loạn đông máu với chức năng gan bình thường [26].

### ***Triệu chứng ở xương khớp***

Các triệu chứng tổn thương khớp ở các bệnh nhân Wilson không điển hình. Các triệu chứng tại khớp có đặc điểm:

- Thường xuất hiện muộn sau 20 tuổi với tổn thương cột sống và các khớp lớn (gối, cổ tay, hông).

- Có thể tổn thương sụn: nhuyễn sụn gối và lắng đọng canxi ở sụn.

Một số bệnh nhân có biểu hiện đau xương khớp sau một quá trình điều trị các chế phẩm của kẽm và các thuốc tạo phức với đồng. Các thuốc này thuộc nhóm tranh chấp các kim loại nặng ở ruột nên có thể tranh chấp canxi [26].

#### ***Triệu chứng ở hệ thận tiết niệu***

- Biểu hiện triệu chứng tổn thương thận ở bệnh nhân Wilson thường xuất hiện muộn sau tổn thương các cơ quan khi mà lượng đồng bài tiết nhiều qua nước tiểu làm tổn thương ống thận.
- Có khoảng 16% bệnh nhân Wilson tổn thương thận có sỏi do tăng canxi niệu và giảm acid hóa.
- Canxi hóa ống thận, nước tiểu có máu, protein và peptide có thể thấy trước điều trị do tổn thương cầu thận hoặc xuất hiện sau điều trị do tác dụng phụ của D-penicillamine [26].

#### ***Triệu chứng khác***

- Biểu hiện tim mạch: rối loạn nhịp. Khám nghiệm tử thi thấy có biểu hiện phì đại cơ tim, mạch máu co nhỏ, viêm cơ tim cục bộ.
- Thiếu máu thiếu sắt có thể gặp ở một số bệnh nhân, đặc biệt hay gặp do tác dụng phụ của D-penicillamine, trientine gây lắng đọng sắt ở gan.
- Da xạm và giương móng tay, móng chân màu xanh. Tình trạng lắng đọng đồng ở da xảy ra chậm, da có màu nâu nhạt hoặc xám nhạt.

Những bệnh nhân Wilson không được điều trị có thể tiến triển suy gan cấp tính, suy chức năng gan mạn tính, xơ gan, ung thư biểu mô tế bào gan. Xuất huyết do giãn tĩnh mạch, bệnh não gan, hội chứng gan thận, và những bất thường đông máu xảy ra ở những bệnh nhân suy gan.

Những bệnh nhân suy gan tối cấp thường tử vong trong vài tuần đến vài tháng nếu không được ghép gan cấp [26].

### *1.1.5.2. Các xét nghiệm cận lâm sàng ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị bệnh Wilson*

#### **Ceruloplasmin huyết thanh**

Khoảng 95% các bệnh nhân bị bệnh Wilson giảm nồng độ ceruloplasmin dưới 20mg/dl (bình thường là 20-40mg/dl).

Nồng độ ceruloplasmin trong huyết thanh ở trẻ sơ sinh bình thường có thể dưới 20mg/dl. sau đó dần dần tăng lên và đạt mức đỉnh lúc 2-3 tuổi như người trưởng thành. Nồng độ ceruloplasmin có thể thấp trong trường hợp thiếu hụt protein, bao gồm hội chứng thận hư, kém hấp thu, bệnh mất protein qua ruột và suy dinh dưỡng. Có khoảng 5% số bệnh nhân bị bệnh Wilson có nồng độ ceruloplasmin trong giới hạn bình thường [26]. Vì vậy, không nên chỉ dựa vào xét nghiệm này để chẩn đoán và điều trị bệnh.

#### ***Xét nghiệm chức năng gan:***

Chức năng gan suy giảm ở các bệnh nhân Wilson có tổn thương gan, bao gồm: tăng transaminase huyết thanh (ALT và AST), giảm protid, giảm albumin, có thể kèm theo giảm tỷ lệ prothrombin.

#### ***Xét nghiệm chức năng thận:***

Tổn thương thận, suy thận (urê tăng, creatinin tăng, protein niệu tăng) có thể gặp ở những bệnh nhân có tổn thương thận kéo dài hoặc biến chứng tổn thương cầu thận do dùng thuốc thải đồng.

#### ***Nồng độ đồng tự do không gắn ceruloplasmin trong máu:***

Nồng độ đồng tự do trong máu tăng cao thường là biểu hiện của sự quá tải đồng của cơ thể. Đồng tự do đến các cơ quan đích trong cơ thể và gây tổn thương các mô.

Nồng độ đồng tự do trong huyết thanh không gắn ceruloplasmin (đơn vị  $\mu\text{g/l}$ ) được tính bằng công thức: đồng toàn phần (trong huyết thanh) - đồng gắn với ceruloplasmin (ceruloplasmin  $\text{mg/l} \times 3,15$ ).



Nồng độ đồng tự do trong máu bình thường là 50-100 $\mu\text{g/l}$ . Ở những bệnh nhân Wilson chỉ số này tăng cao, thường trên 200 $\mu\text{g/l}$  [28].

**Xét nghiệm đông máu cơ bản:**

Giảm tỷ lệ prthombin, thời gian đông máu kéo dài, hay gặp ở những bệnh nhân Wilson có xơ gan.

**Công thức máu:**

Bệnh nhân Wilson có thể giảm tiểu cầu trong bệnh cảnh suy gan hoặc giảm tiểu cầu là triệu chứng duy nhất của bệnh. Số ít trường hợp có thiếu máu hồng cầu nhỏ, có thể gặp do thiếu sắt ở những bệnh nhân điều trị thải đồng kéo dài.

**Nghiệm pháp Coombs:**

Nghiệm pháp Coombs âm tính ở những bệnh nhân Wilson có tan máu. Nghiệm pháp này có giá trị trong chẩn đoán bằng bảng điểm Ferenci [29]. Biểu hiện tan máu ở bệnh nhân Wilson là do đồng gắn vào màng tế bào hồng cầu, không phải tan máu do nguyên nhân miễn dịch.

***Định lượng đồng trong nước tiểu 24 giờ***

Lượng đồng trong nước tiểu ở người bình thường dưới 40 $\mu\text{g/ 24}$  giờ. Nồng độ này tăng trên 100 $\mu\text{g/ 24}$  giờ ở những bệnh nhân bị bệnh Wilson.

Định lượng đồng trong nước tiểu không chỉ là một trong những tiêu chuẩn giúp chẩn đoán xác định mà còn có giá trị trong chẩn đoán sàng lọc bệnh Wilson.

Tuy nhiên, chỉ số này cũng có thể tăng lên trong các bệnh gan ứ mật khác và đòi hỏi phải lấy nước tiểu chính xác trong 24 giờ. Sẽ khó thu thập nước tiểu ở trẻ nhỏ, đặc biệt là trẻ nữ.

### ***Nghiệm pháp D-penicillamine:***

Ở những bệnh nhân nghi ngờ bệnh Wilson, nếu định lượng đồng niệu 24 giờ cho kết quả bình thường thì có thể làm nghiệm pháp D-penicillamine: cho bệnh nhân uống 2 liều D-penicillamin, mỗi liều 250mg, cách nhau 12 giờ sau đó lấy nước tiểu 24 giờ làm xét nghiệm (nước tiểu được lấy ngay từ khi bắt đầu uống liều thuốc đầu tiên). Nếu lượng đồng niệu sau uống thuốc cao hơn từ 5 lần trở lên so với trước uống thuốc thì nghiệm pháp dương tính.

Độ nhạy và độ đặc hiệu của thử nghiệm này là tối ưu cho việc sử dụng như là một thử nghiệm sàng lọc. Bên cạnh đó, nó cũng có thể hữu ích để xác định chẩn đoán và đánh giá đáp ứng điều trị thải đồng [11].

### ***Định lượng đồng trong gan khô***

Định lượng đồng trong gan khô là một tiêu chuẩn trong chẩn đoán bệnh Wilson. Sinh thiết gan và bảo quản tránh nhiễm bẩn sau đó định lượng, ở bệnh nhân Wilson lượng đồng trên 250 $\mu$ g/g trọng lượng khô (bình thường là 15-55 $\mu$ g/g).

Nồng độ đồng gan bình thường có giá trị loại trừ chẩn đoán bệnh Wilson không được điều trị. Nồng độ đồng gan tăng có thể được tìm thấy trong bệnh gan mạn tính (chủ yếu là các bệnh gan ú mật) [26]. Tuy nhiên xét nghiệm này khó thực hiện vì phải làm thủ thuật can thiệp và càng khó hơn ở các bệnh nhân có rối loạn đông máu vì nguy cơ nguy cơ cao chảy máu trong quá trình làm thủ thuật.

### ***Chẩn đoán hình ảnh ổ bụng***

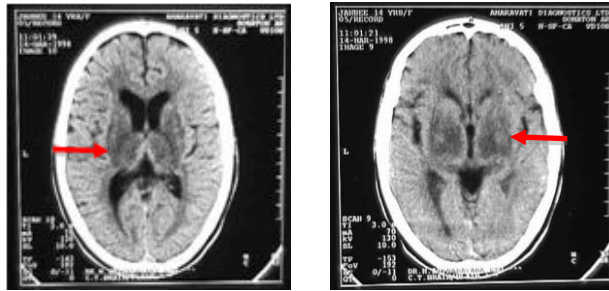
Chụp cắt lớp vi tính ổ bụng, chụp cộng hưởng từ, siêu âm ổ bụng, Fibroscan và y học hạt nhân nghiên cứu gan chỉ đưa ra các thông tin về mức độ tổn thương, tiến triển của gan mà không thay thế được các xét nghiệm tế bào và định lượng đồng trong gan trong quá trình chẩn đoán bệnh.

Các phương tiện chẩn đoán hình ảnh ổ bụng xác định tình trạng xơ gan, teo gan, đánh giá tình trạng mạch máu, dịch ổ bụng, các bất thường của lách và túi mật [26].

### ***Chụp cắt lớp vi tính sọ não (CT: Computer Tomography Scanner)***

Tổn thương sọ não quan sát thấy trên phim chụp cắt lớp vi tính thường đối xứng 2 bên: giảm tỷ trọng khu trú ở các nhân nền, đặc biệt hay gặp ở nhân vỏ hên (putamen nucleus).

Các tổn thương não khác ít gặp hơn là: giảm tín hiệu vùng đồi thị, giãn sừng trán não thất bên, teo não và tiểu não.



***Hình 1.4: Hình ảnh giảm tỷ trọng trên CT sọ não bệnh nhân nữ 14 tuổi bị bệnh Wilson [30]***

### ***Cộng hưởng từ sọ não (MRI: Magnetic Resonance Image)***

Nghiên cứu MRI đã xác định những bất thường khu trú ở chất trắng, cầu não, và các nhân tiểu não sâu. Các tổn thương này có đường kính 3-15mm, thường đối xứng 2 bên, giảm tín hiệu trên T1W, tăng tín hiệu trên T2W và Flair. Các nghiên cứu khác mô tả sự giảm tín hiệu ở nhân vỏ hên và hạch nền khác, do sự lắng đọng đồng hoặc ferritin, sắt.

Tổn thương đặc hiệu của bệnh Wilson được mô tả điển hình là "gương mặt gấu trúc khổng lồ", hình thành bởi cường độ tín hiệu cao trong nhân má (trừ nhân đỏ), tăng tín hiệu đối xứng chất lưới của liềm đen, và giảm tín hiệu ụ trên [27].



A

B

**Hình 1.5. Hình ảnh MRI sọ não của bệnh nhân Wilson [27]**

A. Hình ảnh gương mặt gấu trúc      B. Hình ảnh MRI sọ não

MRI sọ não có độ nhạy cao hơn CT, đặc biệt ở những bệnh nhân Wilson có tổn thương não ở giai đoạn sớm. Do đó, nên lựa chọn MRI để tránh bỏ sót tổn thương não ở những bệnh nhân Wilson có triệu chứng thần kinh [26].

### **Phân tích gen *ATP7B***

Phân tích gen *ATP7B* tìm đột biến gen đã được đưa vào tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh Wilson [29].

Ngày nay, trên thế giới đã áp dụng giải trình tự 21 exon trên gen *ATP7B* để tìm đột biến gen giúp cho quá trình chẩn đoán bệnh. Các bệnh nhân phát hiện đột biến gen gây bệnh Wilson kèm theo các biến đổi xét nghiệm sinh hóa máu, nước tiểu dù chưa có triệu chứng lâm sàng cũng được điều trị sớm để tránh các triệu chứng và các biến chứng nặng sau này. Tuy nhiên, do sự đa dạng của đột biến (hơn 500 đột biến của gen *ATP7B* đã được xác định) nên việc sàng lọc gen bệnh trong cộng đồng là không thực tế. Hiện nay chỉ sử dụng các xét nghiệm phân tử giới hạn sàng lọc các thành viên gia đình bệnh nhân bị bệnh Wilson [24].

Phân tích gen cũng được ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh: chọc hút dịch ối, sinh thiết gai rau hoặc chẩn đoán phôi tiền làm tổ. Các phương pháp

này giúp chẩn đoán sớm những trẻ sinh ra từ các gia đình mang gen đột biến gây bệnh Wilson giúp có kế hoạch điều trị sớm và tư vấn di truyền.

#### *1.1.5.3. Các xét nghiệm cận lâm sàng khác*

Các xét nghiệm này chủ yếu ứng dụng trong nghiên cứu, ít được ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị bệnh Wilson.

#### ***Đánh dấu đồng phóng xạ***

Đánh dấu phóng xạ trực tiếp quá trình chuyển hóa đồng ở gan. Máu được thu thập lúc 1, 2, 4, 24, và 48 giờ sau khi uống đồng đánh dấu phóng xạ ( $^{64}\text{Cu}$ ). Đồng phóng xạ hiện diện sau khi hấp thu, và giải phóng vào gan. Ở người khỏe mạnh, tái xuất hiện của các chất phóng xạ trong huyết thanh xảy ra khi lượng đồng đưa vào cơ thể tổng hợp thành ceruloplasmin mới và sau đó lưu hành trong máu.

Ở những người mang đột biến dị hợp thì sự tái xuất hiện của các chất phóng xạ chậm hơn, thấp hơn người bình thường và tiếp tục giảm ở những bệnh nhân mắc bệnh Wilson mang đột biến đồng hợp tử [26].

#### ***Chẩn đoán tổn thương gan bằng kính hiển vi điện tử***

Các phân tích bằng kính hiển vi điện tử và tia X cho thấy tín hiệu đồng đặc hiệu tích lũy dày đặc electron bên trong các lysosome tối và nguyên sinh chất. Việc phát hiện các nguyên tử đồng gắn ở các lysosome của gan bằng kính hiển vi điện tử là hữu ích trong chẩn đoán các giai đoạn sớm của bệnh Wilson, thay cho việc định lượng đồng trong gan bằng máy đo quang phổ hấp phụ [26].

#### ***Mô học gan***

Những thay đổi sớm nhất có thể phát hiện bằng kính hiển vi ánh sáng bao gồm glycogen lắng đọng trong nhân xung quanh tế bào gan và nhiễm mỡ

mức độ trung bình. Ty thể tế bào gan thường biểu hiện sự không đồng nhất về kích thước và hình dạng, có sự phân chia của màng ty thể bên trong và bên ngoài. Với sự tiến triển của bệnh, protein gắn đồng được cô lập trong lysosome và có thể thấy các hạt electron dày đặc xung quanh các tiểu quản.

Hình ảnh bệnh lý của gan ở bệnh nhân Wilson bao gồm: thâm nhiễm tế bào đơn nhân, trong đó bao gồm chủ yếu là các tế bào lympho và các tế bào plasma; hoại tử từng phần lan rộng; phá hủy nhu mô; bắc cầu hoại tử gan; và xơ hóa. Đồng được coi là tác nhân của quá trình hình thành xơ gan [26].

### ***Mô học não***

Quan sát cấu trúc giải phẫu thấy rằng tổn thương não bao gồm thoái hóa và tạo thành các hóc, chủ yếu ở nhân vỏ hén, nhân cầu nhạt, nhân đuôi, và đồi thị. Ít có sự tương quan giữa các mức độ tổn thương thần kinh và những tổn thương bệnh học tại não. Các vùng não bị tổn thương không thấy tăng rõ nồng độ đồng so với các vùng não khác [26].

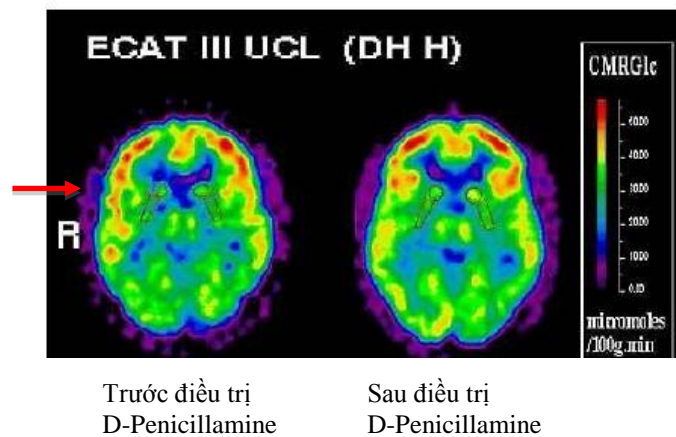
### ***Cộng hưởng từ phổ não (MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy)***

Tỷ lệ N-acetyl-aspartate/creatine giảm ở bệnh nhân tổn thương gan và thần kinh có mối liên quan giữa thoái hóa thần kinh và tất cả các biểu hiện của bệnh Wilson. Giảm myoinositol, choline và tăng glutamate não có thể thấy trên phim cộng hưởng từ phổ proton [31]. Giai đoạn muộn của bệnh, triệu chứng thần kinh càng nặng thì sự thay đổi này càng rõ rệt.

### ***Chụp cắt lớp phát xạ hạt electron dương (PET: Positron Emission Tomography)***

Chụp PET cho thấy một tỷ lệ giảm đáng kể tiêu thụ glucose ở tiểu não, thể vân, và giảm thấp hơn ở vỏ não, đồi thị.

Phân tích phim PET của bệnh nhân bị bệnh Wilson thấy giảm sự tập trung và hoạt tính của dopa-decarboxylase, biểu hiện suy giảm chức năng của đường dẫn truyền dopaminergic. Chụp PET cũng giúp theo dõi điều trị (sau điều trị thấy tăng các vùng chuyển hóa so với trước điều trị).



**Hình 1.6. Hình ảnh chụp PET não của bệnh nhân Wilson [26]**

### **Điện tâm đồ**

Các bất thường trên điện tâm đồ bao gồm phì đại tâm thất trái hoặc phì đại tâm thất cả 2 bên, tái cực sớm, ST chênh xuống, đảo ngược sóng T, và rối loạn nhịp. Các bất thường này rất ít gặp ở bệnh nhân Wilson khi có lắng đọng đồng ở tim [26].

### **1.1.6. Chẩn đoán**

#### **1.1.6.1. Chẩn đoán bệnh Wilson**

##### **- Tiêu chuẩn Sternlieb**

Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh Wilson của Sternlieb (1978), bao gồm:

1. Có triệu chứng thần kinh
2. Ceruloplasmin huyết thanh < 20mg/dl
3. Có vòng Kayser - Fleischer
4. Có các dấu hiệu tổn thương gan

Bệnh nhân được chẩn đoán bệnh Wilson khi có ít nhất 2 tiêu chuẩn 1 và 2 [32]. Ngoài ra, chụp cắt lớp vi tính sọ não cho thấy tăng tỷ trọng vùng nhân xám trung ương, teo vỏ não, giãn não thất, và chụp cộng hưởng từ sọ não thấy hình ảnh tăng tín hiệu trên thì T2W, giảm tín hiệu trên thì T1W ở vùng đồi thị, nhân bèo và các nhân ở cầu não, teo vỏ não, giãn não thất [33]. Tiêu chuẩn chẩn đoán này còn hạn chế vì không có thang điểm rõ ràng, không rõ tiêu chuẩn tổn thương gan và không phân loại thể lâm sàng.

*- Tiêu chuẩn Ferenci*

Tiêu chuẩn Ferenci được đưa ra tại Hội nghị bệnh Wilson và Menkes năm 2003 [29].

Với thang điểm này, chẩn đoán chủ yếu dựa vào các triệu chứng thần kinh, triệu chứng tại mắt cùng với các xét nghiệm máu, nước tiểu và phân tích gen. Tuy nhiên, các triệu chứng lâm sàng bệnh gan và các biến đổi transaminase huyết thanh không đưa vào tiêu chuẩn chẩn đoán, còn sinh thiết gan định lượng đồng trong gan khô lại rất khó thực hiện cho tất cả các bệnh nhân. Tăng lượng đồng trong nước tiểu 24 giờ có giá trị hơn tăng ceruloplasmin huyết thanh. Vì vậy thang điểm Ferenci cần phối hợp các yếu tố và phân tích gen là tiêu chuẩn rất tốt giúp chẩn đoán bệnh sớm.

Nghi ngờ chẩn đoán bệnh Wilson khi bệnh nhân có một trong các dấu hiệu: nồng độ ceruloplasmin dưới 20mg/dl; đồng niệu 24 giờ lớn hơn 100mcg, có vòng Kayser - Fleischer, nồng độ đồng trên mẫu sinh thiết gan > 250mcg/g trọng lượng khô.

Phân tích gen *ATP7B* được giới hạn để sàng lọc cho các thành viên gia đình có đột biến gen đã được xác định ở những bệnh nhân được chẩn đoán bệnh Wilson.



### 1.1.6.2. Chẩn đoán thể lâm sàng

*Phân chia thể lâm sàng dựa vào cơ quan chính bị tổn thương [29]*

- **Thể tổn thương gan** (những bệnh nhân bị bệnh Wilson có tổn thương gan và đã được khám kỹ để loại trừ các tổn thương thần kinh tại thời điểm chẩn đoán).

+ H1: *Bệnh Wilson có tổn thương gan cấp tính*

Bệnh nhân có biểu hiện vàng da cấp mà trước đó khỏe mạnh, vàng da biểu hiện giống như viêm gan cấp hoặc có biểu hiện tan máu cấp với nghiệm pháp Coombs âm tính hoặc kết hợp cả hai. Những bệnh nhân này có thể tiến triển thành suy gan và cần thiết phải ghép gan cấp cứu.

+ H2: *Bệnh Wilson có viêm gan mạn tính*

Bất kỳ bệnh nhân Wilson nào bị viêm gan mạn tính có triệu chứng hoặc không có triệu chứng đều có thể tiến triển thành xơ gan mất bù. Chẩn đoán thể này dựa vào hóa sinh học, chẩn đoán hình ảnh và bằng chứng giải phẫu bệnh gan.

- **Thể tổn thương thần kinh**

Tất cả các bệnh nhân bị bệnh Wilson có triệu chứng thần kinh hoặc tâm thần hoặc phối hợp được phát hiện tại thời điểm chẩn đoán đều được xếp vào thể thần kinh.

+ N1: *Thể phối hợp với triệu chứng gan*

Các bệnh nhân Wilson bị xơ gan tại thời điểm xác định triệu chứng thần kinh. Các biểu hiện bệnh lý gan mạn tính có thể xuất hiện trước các triệu chứng thần kinh nhiều năm hoặc xuất hiện trong quá trình làm các xét nghiệm chẩn đoán các tổn thương thần kinh.

+ N2: *Thể thần kinh không kèm biểu hiện tổn thương gan*

Các bệnh nhân này đã được làm các xét nghiệm tìm tổn thương gan, kể cả giải phẫu bệnh đều âm tính cho đến thời điểm chẩn đoán.

+ NX: *Có hoặc không có tổn thương gan* (tại thời điểm chẩn đoán chưa có kết quả xét nghiệm chẩn đoán bệnh gan).

- **Thể khác:** O (tổn thương thận, da, xương khớp ...)

**- Các bệnh nhân có triệu chứng thần kinh (N1, N2, Nx)**

Nếu có các biểu hiện triệu chứng ngoại tháp, có vòng Kayser-Fleischer, ceruloplasmin huyết thanh giảm, đồng niệu tăng trên  $100\mu\text{g}/24$  giờ, thì có thể chẩn đoán chắc chắn bệnh Wilson mà không cần làm thêm các xét nghiệm khác.

**- Các bệnh nhân có triệu chứng gan (H1, H2, N1)**

Nếu có vòng Kayser-Fleischer, ceruloplasmin huyết thanh giảm, đồng niệu tăng trên  $100\mu\text{g}/24$  giờ, thì có thể chẩn đoán chắc chắn bệnh Wilson mà không cần làm thêm các xét nghiệm khác. Có thể sinh thiết gan để đánh giá mức độ nặng tổn thương gan, đồng thời có thể định lượng đồng trong gan.

Tuy nhiên ở một số bệnh nhân, không có biểu hiện lâm sàng hoặc triệu chứng không điển hình, đặc biệt là ở trẻ em có tổn thương gan. Cần được bác sỹ chuyên khoa mắt có kinh nghiệm soi mắt bằng đèn khe để tìm vòng Kayser-Fleischer. Trong một số trường hợp đặc biệt, các xét nghiệm có thể không thay đổi, vì vậy cần phân tích chi tiết các xét nghiệm trước khi chẩn đoán bệnh [29].

**- Thể không rõ triệu chứng (giai đoạn tiền lâm sàng):** ở giai đoạn trước khi có biểu hiện lâm sàng chỉ thấy lượng ceruloplasmin giảm, đồng huyết thanh giảm và đồng niệu tăng.

**1.1.7. Điều trị**

Đây là bệnh di truyền đã được xác định do đột biến gen *ATP7B* gây nên. Tuy nhiên, cho đến nay liệu pháp điều trị gen vẫn chưa được tiến hành, biện pháp điều trị chủ yếu là lập lại cân bằng lượng đồng trong các mô của cơ thể, bao gồm: làm giảm lượng đồng hấp thu ở ruột và tăng bài tiết đồng qua nước tiểu cùng với một số biện pháp hỗ trợ khác như ghép gan, lọc huyết tương...

### 1.1.7.1. Chế độ ăn uống

Bệnh nhân bị bệnh Wilson có rối loạn chuyển hóa đồng trong cơ thể gây lắng đọng đồng tại các cơ quan. Do đó những bệnh nhân này cần hạn chế lượng đồng đưa vào cơ thể.

Thức ăn và nước uống có hàm lượng đồng thấp có thể làm chậm sự tiến triển của bệnh và kiểm soát bệnh, nhưng quản lý chế độ ăn uống không được khuyến cáo như một liệu pháp điều trị duy nhất. Cần phải phối hợp các thuốc tăng thải đồng và chế độ ăn uống giảm lượng đồng [34].

- *Kiêng các thực phẩm có nồng độ đồng cao:* sò, ốc, hến, các loại hạt khô, socola, nấm, rau cải, cà chua, bí đỏ, tiết canh và nội tạng động vật (đặc biệt là gan).

- *Kiểm soát nguồn nước:* nước giếng hoặc nước đưa vào các hộ gia đình qua các đường ống bằng đồng cần được kiểm tra hàm lượng đồng. Nếu hàm lượng đồng cao thì cần có hệ thống lọc nước. Không uống các loại nước ngọt có gaz.

### 1.1.7.2. Các thuốc điều trị bệnh Wilson

- *Thuốc D-penicillamine.*

Penicillamine là thuốc uống đầu tiên để điều trị bệnh nhân Wilson, được sử dụng từ năm 1956 [25]. Thuốc nhóm này chứa sulfhydryl tự do, có chức năng tạo phức gấp đồng.

Tác dụng chính của penicillamine trong bệnh Wilson là thúc đẩy sự bài tiết đồng vào nước tiểu. Penicillamine cũng có thể tạo ra metallothionein không độc với cơ thể [35].

Penicillamine được hấp thu nhanh qua đường tiêu hóa, lúc đói với nồng độ đỉnh ở ruột. Hơn 80% các penicillamine bài tiết qua thận.

Penicillamine được sử dụng cho điều trị bệnh nhân có triệu chứng, và tiền triệu chứng [36].

Khả năng dung nạp của pencillamine có thể tăng với liều tăng dần, 250-500mg/ngày, tối đa đến 1.500mg/ngày, uống chia 2-4 liều/ngày. Liều duy trì thường là 750 đến 1000 mg/ngày, uống chia 2 lần. Trẻ em là 20mg/kg/ngày, uống chia 2 hoặc 3 lần.

Đối với phụ nữ có thai nên dùng liều  $\leq 750\text{mg/ngày}$ , và có chỉ định mổ đẻ chủ động. Liều D-penicillamine giảm thêm 250mg/ngày vào 6 tuần cuối của thai kỳ và đến khi lành vết mổ hoàn toàn.

#### - *Thuốc trientine*

Trientine vào cơ thể sẽ đến các mô gấp đồng bằng cách tạo thành phức hợp ổn định của đồng với 4 nitro trong một vòng phẳng ( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{N}_4$ ) và thúc đẩy đào thải đồng qua nước tiểu.

Trientine là loại thuốc điều trị hiệu quả cho bệnh nhân Wilson và được chỉ định đặc biệt ở những bệnh nhân không dung nạp penicillamine. Trientine cũng có hiệu quả điều trị ban đầu cho bệnh nhân Wilson thể gan, hoặc bệnh gan mất bù ở giai đoạn khởi phát [37],[38].

Liều lượng trientine ở người lớn là 750 đến 1.500mg/ngày, chia 2 hoặc 3 liều/ngày, với 750mg hoặc 1.000 mg được sử dụng để điều trị duy trì. Ở trẻ em liều theo cân nặng thường dùng là 20mg/kg/ngày, xa bữa ăn.

#### - *Muối kẽm*

Kẽm lần đầu tiên được Schouwink sử dụng để điều trị cho bệnh nhân Wilson ở Hà Lan vào đầu những năm 1960 [14].

Kẽm gây cản trở sự hấp thu đồng từ đường tiêu hóa (cạnh tranh hấp thu đồng từ ruột). Lượng đồng dư thừa sẽ bị thải ra ngoài qua phân.

Hiện nay, kẽm đang được điều trị duy trì và cũng được sử dụng như một liệu pháp đầu tiên, phổ biến nhất cho những bệnh nhân không có triệu chứng hoặc tiền triệu chứng. Điều trị kết hợp trientine với kẽm hoặc penicillamine với kẽm uống chia đều các khoảng thời gian trong ngày được áp dụng có hiệu quả.

Liều dùng với trẻ lớn và người lớn, liều 150mg/ngày, uống chia 3 lần/ngày. Đối với trẻ em, liều dùng là 75mg/ngày chia làm 3 lần, và khó xác định liều cho trẻ em dưới 5 tuổi, uống xa bữa ăn.

Muối kẽm acetate rất ít gây triệu chứng khó chịu ở dạ dày ruột, và muối gluconate ít tác dụng phụ hơn muối sulfate. Kẽm sulfate không dung nạp ở dạ dày, ruột và gây tăng bạch cầu ưa acid.

#### - *Thuốc Dimercaprol*

Dimercaprol dùng để điều trị ngộ độc kim loại nặng. Sau khi tiêm, thuốc phân bố vào mọi tổ chức, bao gồm cả não. Phức hợp dimercaprol - kim loại tương đối bền vững, nhanh chóng được đào thải ra ngoài chủ yếu qua thận.

#### *Liều lượng và cách dùng*

Tiêm bắp liều 2,5-3mg/kg thể trọng, cứ 4 giờ một lần trong 2 ngày đầu, 2 - 4 lần trong ngày thứ ba, sau đó 1-2 lần trong 10 ngày hoặc cho tới khi hồi phục.

#### - *Thuốc ammonium tetrathiomolybdate*

Thuốc gắn với đồng, protein tại ruột non và trong máu, có tác dụng thải độc đồng và ngăn chặn hấp thu đồng tại ruột non. Liều dùng: 0,2-0,3mg/kg/ngày (uống trong hoặc giữa các bữa ăn) [39].

#### - *Thuốc curcumin*

Curcumin là tinh chất nghệ vàng, được thử nghiệm trong phòng thí nghiệm để khôi phục một phần bất thường protein của một số đột biến *ATP7B*. Curcumin cũng là một chất chống oxy hóa lý tưởng và có thể hoạt

động như một chất tạo phức với đồng. Tuy nhiên, chưa có dữ liệu lâm sàng của curcumin trên bệnh nhân bị bệnh Wilson [40].

#### - Điều trị thuốc chống oxy hóa

Chất chống oxy hóa, chủ yếu là vitamin E, có vai trò như điều trị hỗ trợ và giúp cải thiện triệu chứng ở bệnh nhân Wilson (vì những bệnh nhân này có nồng độ vitamin E trong gan và huyết thanh thấp).

Cần bổ sung vitamin B6 cho các bệnh nhân bị rối loạn chuyển hóa piridoxine do dùng thuốc D-penicilamine với liều 25-50mg/ngày.

Cucurmin là tinh chất nghệ vàng được sử dụng như một chất chống oxy hóa, có tác dụng khử độc và bảo vệ tế bào gan [40],[41].

#### 1.1.7.3. Lọc huyết tương

Phương pháp này được chỉ định trong viêm gan nặng, viêm gan mất bù gây hoại tử tế bào gan dẫn tới giải phóng ra một lượng ion đồng lớn ( $\text{Cu}^{++}$ ) vào hệ tuần hoàn có thể gây thiếu máu tan máu và suy thận. Lọc huyết tương làm giảm lượng đồng trong huyết thanh cho đến khi thay ghép gan được thực hiện. Phương pháp này tốn kém nên hiện nay ít được sử dụng trong điều trị [42].

#### 1.1.7.4. Ghép gan

Ghép gan (Orthotopic liver transplantation: OLT) được chỉ định cho tất cả các bệnh nhân bị bệnh Wilson không đáp ứng với điều trị nội khoa, và đó là lựa chọn duy nhất có hiệu quả đối với những người có biểu hiện suy gan bùng phát tối cấp.

**Bảng 1.1. Chỉ số tiên lượng suy gan tối cấp [43]**

Điểm	0	1	2	3	4
Bilirubin huyết thanh (mmol/L)	<100	100-500	151-200	201-300	>300
AST huyết thanh (IU/L)	<100	100-150	151-200	201-300	>300
Thời gian Prothrombin (giây)	<4	4-8	9-12	13-20	>20

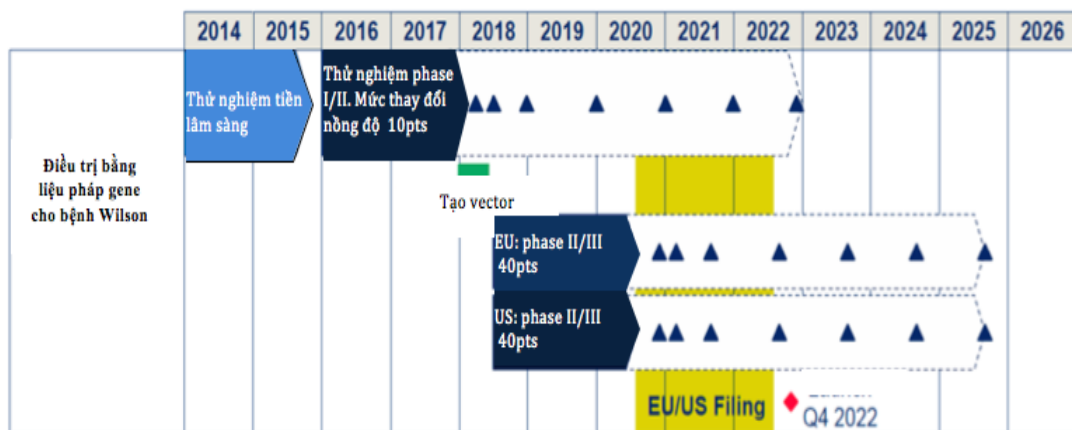
Cần ghép gan để cứu sống những bệnh nhân có tổng điểm tiên lượng  $\geq 7$ . Những bệnh nhân này sẽ tử vong trong vòng 2 tháng nếu không được điều trị thích hợp. Trong thời gian chờ ghép gan, bệnh nhân cần được thay huyết tương hoặc lọc máu để bảo vệ ống thận khỏi bị đồng phá hủy [44],[45].

#### 1.1.7.5. Liệu pháp gen

Liệu pháp gen hướng vào gan qua vector AAV (Adeno - Associated Virus) là một lựa chọn tốt cho bệnh Wilson. Gen gắn vector AAV được thử nghiệm trên chuột đã thu được hiệu quả điều trị ban đầu: làm giảm nồng độ đồng trong gan, cải thiện trên hình ảnh giải phẫu bệnh khi so sánh với các con chuột mang đột biến gen *ATP7B* không được điều trị liệu pháp gen.

Cách tiếp cận này vẫn đang còn trong giai đoạn nghiên cứu thử nghiệm tiền lâm sàng và mục tiêu phát triển ứng dụng lâm sàng trong 5 - 6 năm nữa.

**Bảng 1.2. Kế hoạch ứng dụng lâm sàng của liệu pháp gen [46].**



#### 1.1.8. Tiên lượng và phòng bệnh

Bệnh Wilson là bệnh rối loạn chuyển hóa xếp vào nhóm bệnh mạn tính. Tiên lượng bệnh phụ thuộc vào thể bệnh, giai đoạn được chẩn đoán và điều trị.

Thể bệnh suy gan tối cấp thường tử vong nhanh nếu không được ghép gan cấp cứu. Các thể bệnh khác tiến triển nặng dần nếu không được điều trị sớm.

Các biến chứng nặng của bệnh Wilson không được điều trị liên quan đến suy gan cấp tính, rối loạn chức năng gan mạn tính với một trong hai dạng tiến triển xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan. Ngoài ra có thể gặp xuất huyết do giãn tĩnh mạch, bệnh gan não có suy gan và co cứng, co vắn các chi, hội chứng gan thận, và rối loạn đông máu ở bệnh nhân suy gan. Những bệnh nhân này thường tử vong ở độ tuổi 30, nếu không được ghép gan.

Những bệnh nhân được điều trị sớm, đúng phác đồ, điều trị cả đời và đặc biệt là nhóm tiền triệu chứng cho kết quả tốt.

Tiền lượng sau khi ghép gan là tương đối tốt, tỷ lệ sống trên 72% sau 20 năm [45].

Những người trong dòng họ và những người trong gia đình có bệnh nhân bị bệnh Wilson nên được khám sớm, phân tích gen *ATP7B*, xét nghiệm sinh hóa để được chẩn đoán và điều trị sớm. Xác định gen đột biến bằng sàng lọc sau sinh và chẩn đoán trước sinh có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong việc chẩn đoán sớm và tư vấn di truyền.

## **1.2. Bệnh học phân tử bệnh Wilson**

### ***1.2.1. Vị trí, cấu trúc và chức năng của gen ATP7B***

Gen đột biến gây bệnh Wilson được phát hiện trên nhiễm sắc thể số 13 từ năm 1985 và được xác định là gen *ATP7B* vào năm 1993 [47],[48].

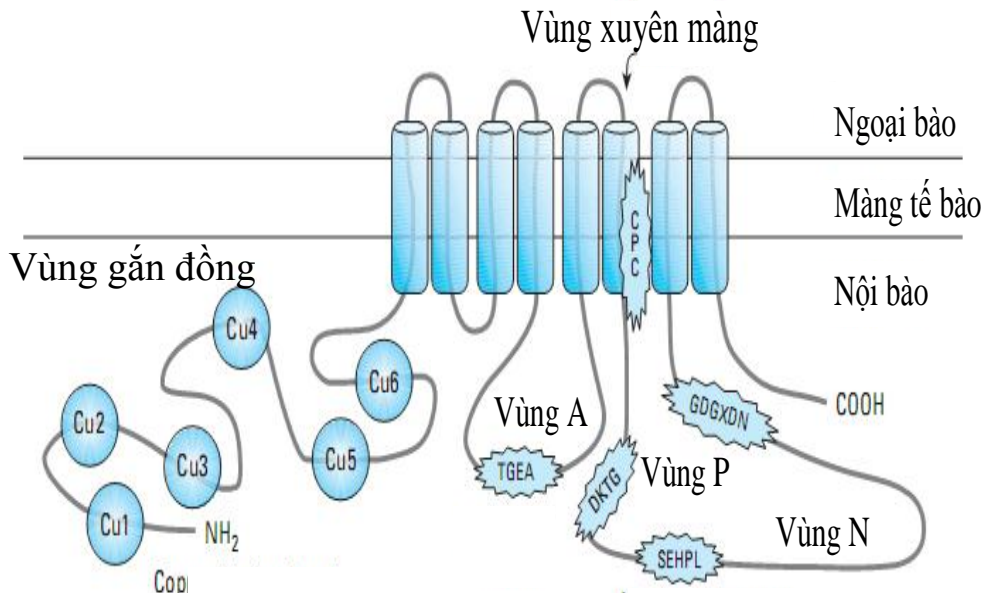
Cho đến nay cấu trúc gen, cơ chế bệnh học phân tử đã được nghiên cứu đầy đủ và rõ ràng. Gen *ATP7B* gồm 21 exon, có chiều dài 121.013 cặp base (từ cặp base 51.891.085 đến 52.012.098), mã hóa 1465 acid amin [49].

Gen *ATP7B* là một protein đặc trưng của nhóm vận chuyển kim loại trong tế bào với các vùng chức năng: vùng xuyên màng, vùng N- vị trí bám nucleotid; vùng P- phosphoryl hóa; vùng A - khử phosphoryl hóa và vùng MBDs (Metal Binding Domains) là vị trí bám cho các nguyên tử đồng [50].



Gen *ATP7B* điều khiển quá trình sản xuất protein gọi là ATPase 2 vận chuyển đồng. Protein này thuộc họ ATPase P, thuộc nhóm protein vận chuyển kim loại ra vào tế bào bằng cách sử dụng năng lượng được lưu trữ trong các phân tử adenosine triphosphate (ATP). Protein ATPase 2 vận chuyển đồng được tìm thấy chủ yếu ở gan và một lượng nhỏ trong thận và não, đóng vai trò trong việc vận chuyển đồng từ gan đến các bộ phận khác của cơ thể. Đồng là một phần quan trọng của một số enzym giúp duy trì chức năng tế bào bình thường. ATPase 2 vận chuyển cũng tham gia vào quá trình loại bỏ đồng thừa ra khỏi cơ thể.

Trong các tế bào gan, ATPase 2 vận chuyển đồng được tìm thấy trong bộ máy Golgi, tham gia vào quá trình sản xuất một số enzyme và protein. Ở đây, ATPase 2 vận chuyển đồng sẽ cung cấp đồng cho một protein gọi là ceruloplasmin, đồng sẽ đến các cơ quan khác của cơ thể qua đường máu. Nếu lượng đồng trong gan quá cao ATPase 2 sẽ vận chuyển đồng ra khỏi bộ máy Golgi và đào thải ra ngoài qua đường mật. Mật là một chất được sản xuất bởi gan, rất quan trọng trong quá trình tiêu hóa và loại bỏ chất thải [49].



**Hình 1.7. Cấu trúc protein ATP7B [50].**

### 1.2.2. Đột biến gen *ATP7B* gây bệnh Wilson

Cho đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã xác định được hơn 500 đột biến khác nhau trên gen *ATP7B* gây bệnh Wilson. Các đột biến này khác nhau giữa các vùng quốc gia lãnh thổ; đột biến phổ biến khác nhau giữa các chủng tộc.

Đột biến p.H1069Q dẫn đến acid amin histidine bị thay thế bởi glutamine ở vị trí 1069. Đột biến đặc biệt này xảy ra ở gần 40% các bệnh nhân Wilson ở Bắc và Đông Âu. Khoảng 30% số người châu Á mắc bệnh Wilson có một đột biến thay thế acid amin arginine thành leucine ở vị trí 778 trên exon 8 (p.R778L).

Thống kê ở nhiều nghiên cứu cho thấy phân bố đột biến phổ biến khác nhau giữa các quốc gia (bảng 1.3).

**Bảng 1.3: Một số dạng đột biến phổ biến trên thế giới**

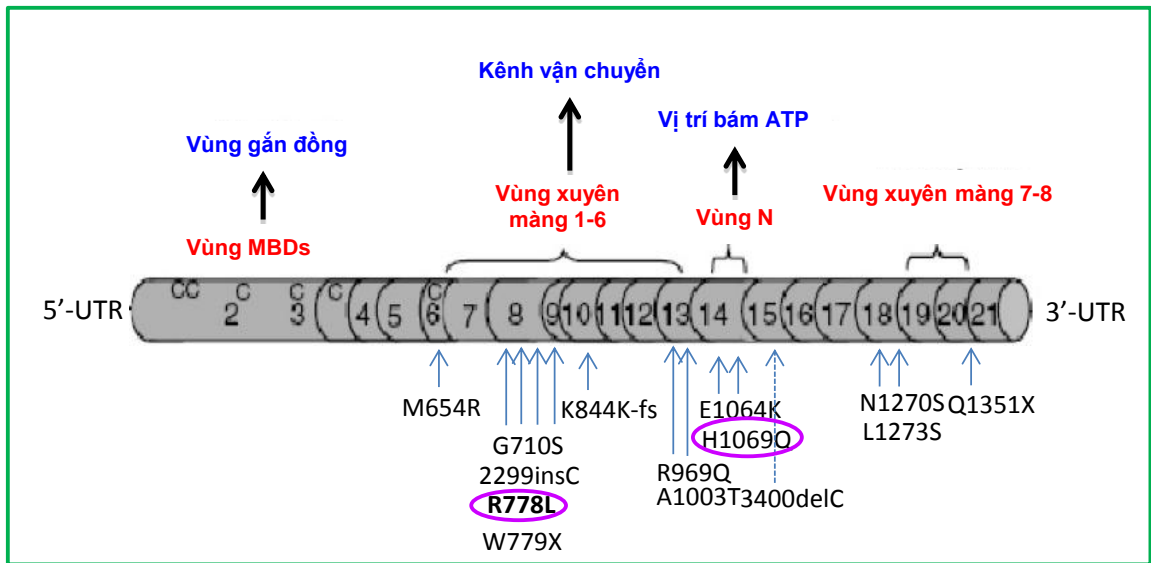
STT	Tên quốc gia	Đột biến phổ biến nhất	Tần số	Tài liệu tham khảo
1	Cáp-ca	p.H1069Q	33,3%	[51]
2	Anh	p.H1069Q	19%	[52]
3	Romani	p.H1069Q	38,1%	[53]
4	Bắc Mỹ	p.H1069Q	38%	[54]
5	Nga	p.H1069Q	39%	[54]
6	Thụy Điển	p.H1069Q	38%	[54]
7	Saudia Arabia	4193delC	53,3%	[55]
8	Hàn Quốc	p.R778L	37,9%	[56]
9	Đài Loan	p.R778L	29,63%	[57]
10	Trung Quốc	p.R778L	23,29%	[58]
11	Nhật Bản	p.R778L	20%	[59]
		2871delC	20%	

Ở các quốc gia, châu lục có sự đa dạng sắc tộc cũng thấy sự khác biệt tần số đột biến phổ biến. Phân tích gen *ATP7B* cho 108 người Mỹ trắng bị bệnh Wilson phát hiện 78% số bệnh nhân mang đột biến: đột biến phổ biến nhất là p.H1069Q (chiếm 40,3% số alen đột biến), sau đó là đột biến N1270S [60]. Ngược lại, đột biến phổ biến nhất ở Brazil (Nam Mỹ) là c.3402 delC (30,8% số alen đột biến), sau đó là đột biến p.L708P (15,7% alen đột biến), không có bệnh nhân nào mang đột biến p.H1069Q [61].

Hầu hết các nghiên cứu đều thấy đột biến phổ biến nhất ở châu Á là p.R778L, nhưng phân tích gen *ATP7B* cho 52 bệnh nhân Wilson ở Ấn Độ lại thấy đột biến phổ biến nhất là p.C271X (chiếm 20,1% số alen đột biến), sau đó là đột biến p.E122fs (chiếm 10,6% số alen đột biến) [62].

Nghiên cứu ở Ai Cập (châu Phi) cho thấy đột biến phổ biến nhất ở 48 bệnh nhi bị bệnh Wilson là p.N1270S, sau đó là đột biến p.H1069Q. Nghiên cứu còn phát hiện được 75% số bệnh nhi này có bố mẹ cùng huyết thống [63]. Các nghiên cứu khác ở Iran (vùng Trung Đông), ở Sec-bi-a (Đông Nam châu Âu), Phần Lan, cộng hòa Séc và Slovakia cũng thấy đột biến phổ biến nhất gây bệnh Wilson là p.H1069Q [64],[65],[66],[67].

Phân tích đột biến gen cho 138 bệnh nhân Wilson từ nhiều quốc gia khác nhau cũng thấy đột biến phổ biến khác nhau giữa các quốc gia này: p.H1069Q là đột biến phổ biến ở Romani; đột biến p.G1281D phổ biến ở Thụy Điển; đột biến p.M645R và p.A1278V phổ biến ở Ecuador; đột biến c.3852-3875del24 phổ biến ở Sardinia [68].

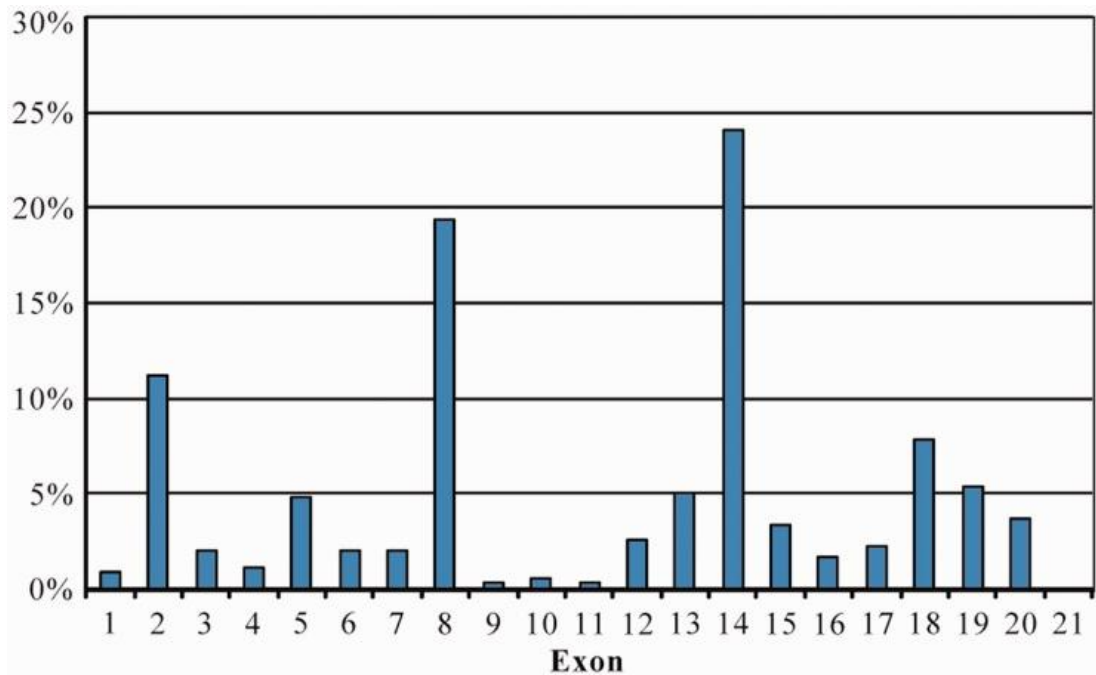


**Hình 1.8. Phân bố một số đột biến trên gen ATP7B [69].**

*p.R778L* là đột biến hay gặp ở vùng châu Á và *p.H1069Q* là đột biến hay gặp ở vùng Trung, Bắc và Đông Âu

Đột biến gen gây bệnh Wilson cũng tập trung ở một số exon phổ biến và có sự khác nhau giữa các quốc gia: đột biến phổ biến trên exon 14 và 18 ở người Mỹ trắng, người Iran; đột biến phổ biến trên exon 2, 8, 13, 14 và 18 phổ biến ở người Ấn Độ; khoảng 2/3 số bệnh nhân mang đột biến gen ở Brazil trên exon từ 8 đến 15 [60],[64],[62],[61].

Nghiên cứu khác cho thấy đột biến gen tập trung nhiều nhất trên exon 2, 8 và 14 (hình 1.8) [52].



**Hình 1.9. Phân bố đột biến trên gen *ATP7B* [52]**

Ngoài ra đột biến gen *ATP7B* cũng rất đa dạng trên cùng một quốc gia, cùng một chủng tộc. Một nghiên cứu 75 bệnh nhân Wilson ở Trung Quốc (năm 2000), cho thấy các dạng đột biến gen rất đa dạng (bảng 1.4).

**Bảng 1.4. Kiểu gen trên bệnh nhân Wilson Trung Quốc [70]**

Exon	Đột biến	Thay đổi acid amin	Thay đổi nucleotid
3	1384del17	His stop	1384 delete 17 bp
7	C656X	Cys > X	1971 C
8	R778L	Arg > Leu (CGG>CTG)	2333 G>T
12	G943D	Gly > Asp (GGT>GAT)	2828 G>A
15	V1106I	Val > Ile (GTC>ATC)	3316 G>A
16	V1140A	Val > Ala (GTC>GCC)	3419 T>C
17	V1216M	Val > Met (GTG>ATG)	3646 G>A
<b>Đa hình</b>			
4	IVS4-5T/C		1708-5 t>c
8	L/L770		2310 C>G
10	2495A > G		2495 A>G
18	IVS18 + 6C/T		3903 + 6 c>t
20	IVS20 + 5A/G		4124 + 5 a>g
21	IVS21 + 3		4398 + 3 t>g

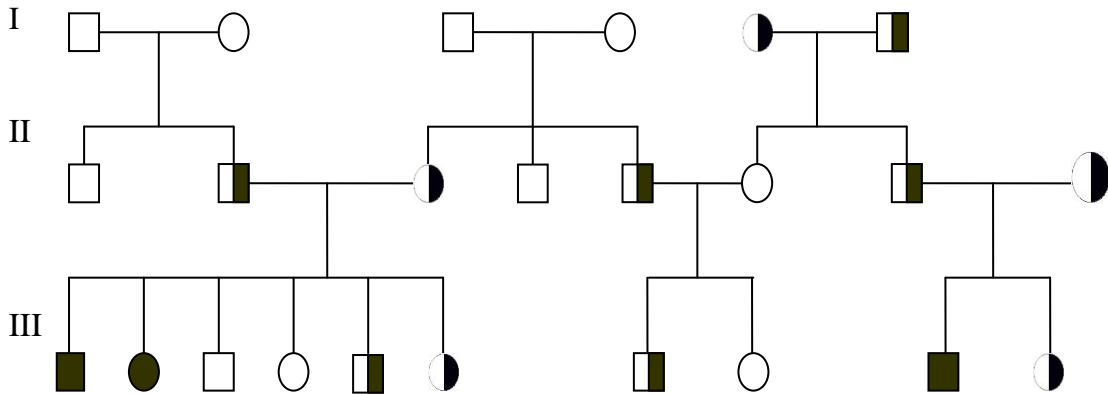
Do phần lớn các đột biến gây bệnh là đột biến điểm cho nên cho đến thời điểm hiện tại phương pháp giải trình tự gen vẫn được coi là ưu việt nhất trong việc chẩn đoán phát hiện các đột biến gen *ATP7B*.

Cho đến nay, ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu phát hiện đột biến bằng giải trình tự gen giúp cho quá trình chẩn đoán sớm, điều trị và tư vấn di truyền như bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh, loạn dưỡng cơ Duchenne, thoái hóa cơ tủy...

Bệnh Wilson bắt đầu được áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen để phát hiện đột biến trong chẩn đoán, điều trị và tư vấn di truyền vào năm 2011 sau nghiên cứu xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen *ATP7B* của Tạ Thành Văn và cộng sự [71].

### 1.2.3. Đặc điểm di truyền của bệnh Wilson

Bệnh Wilson là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, thuộc vị trí 13q14.3, tuân theo quy luật Mendel.



**Hình 1.10. Phả hệ một gia đình bị bệnh di truyền lặn trên NST thường**

*Thế hệ I, II không có người bị bệnh, thế hệ III có người bị bệnh.*

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

Từ phả hệ ở hình 1.10 cho thấy bệnh nhân có thể mang một alen bệnh của bố hoặc một alen bệnh của mẹ hoặc cả hai alen bệnh của bố và mẹ. Bố, mẹ của bệnh nhân có thể mang gen đồng hợp lặn hoặc gen dị hợp. Các anh chị em của bệnh nhân có thể mang gen bệnh hoặc không. Những người mang gen bệnh đều có khả năng truyền cho con cháu. Tỷ lệ nam và nữ bị bệnh là như nhau.

+ Nếu cha mẹ là dị hợp tử ( $Rr$ ) khả năng con bị bệnh ( $rr$ ) là 25%, con dị hợp tử ( $Rr$ ) mang gen lặn là 50%, con bình thường hoàn toàn ( $RR$ ) là 25%. Trong quần thể trường hợp này hay gặp nhất.

+ Nếu cha (hoặc mẹ) là người bình thường ( $RR$ ) kết hôn với người mang gen dị hợp tử ( $Rr$ ) thì khả năng sinh ra con bình thường ( $RR$ ) là 50%, con bị dị hợp tử ( $Rr$ ) là 50%.

+ Nếu cha (hoặc mẹ) là người bình thường kết hôn với người bị bệnh ( $rr$ ) thì khả năng sinh con mang gen dị hợp tử ( $Rr$ ) là 100%.

#### **1.2.4. Cơ chế bệnh học phân tử của bệnh Wilson**

Enzym P-ATPase đóng vai trò vận chuyển đồng qua màng tế bào. Ở bệnh nhân Wilson mang đột biến trên gen *ATP7B* gây thiếu hụt enzym này làm rối loạn quá trình vận chuyển đồng trong cơ thể và gây ra các triệu chứng đa dạng trên lâm sàng do tích lũy đồng tại các cơ quan đích [48].

Khoảng một nửa các đột biến làm thay đổi một trong các cấu trúc protein (acid amin) được sử dụng để tạo nên ATPase 2 vận chuyển đồng. Loại đột biến này làm thay đổi cấu trúc 3 chiều của protein hoặc tính ổn định của nó, ngăn chặn ATPase 2 vận chuyển đồng.

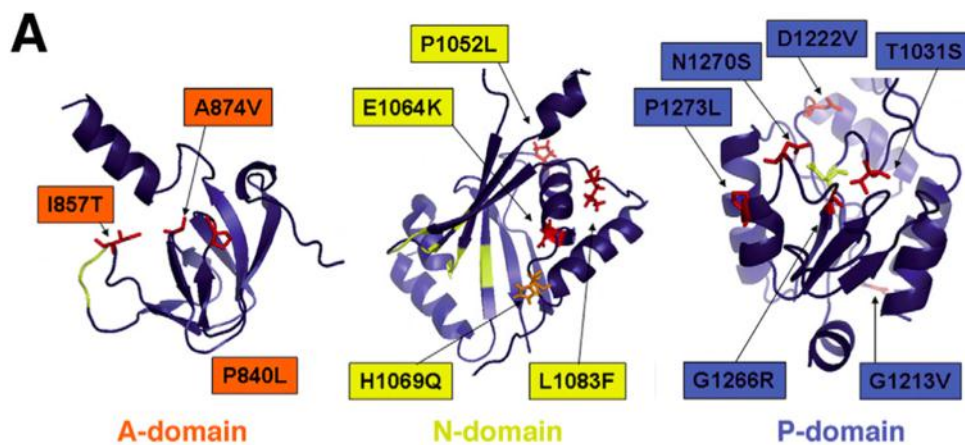
Loại đột biến xóa hoặc chèn các phân đoạn nhỏ của DNA trên gen *ATP7B* hoặc tạo mã kết thúc sớm của gen ATPase 2 vận chuyển đồng. Kết quả là không sản xuất được protein, hoặc tạo ra một lượng nhỏ protein bất thường. Những loại đột biến này thường dẫn đến các triệu chứng nghiêm trọng hơn những đột biến mà chỉ thay đổi một acid amin duy nhất.

Với tình trạng thiếu các protein chức năng, quá trình loại bỏ các đồng thừa ra khỏi cơ thể bị suy giảm, đồng tích lũy dần đến mức độ độc hại có thể làm hỏng mô và cơ quan, đặc biệt là gan và não [49].

Biên thể *ATP7B* có một phổ rộng các thuộc tính. Khi phân tích các đột biến gây bệnh Wilson với các hoạt động chức năng của gen *ATP7B* cần đánh giá các hoạt động chức năng của đột biến có liên quan đến biểu hiện lâm sàng. Phân tích đặc tính chi tiết của từng đột biến gây bệnh có thể cần thiết cho sự hiểu biết tốt hơn về các mối tương quan kiểu gen-kiểu hình trong bệnh Wilson. Mặc dù đột biến nằm trong cùng một vùng có thể có tính chất tương tự nhưng ảnh hưởng đến chức năng vận chuyển của các protein khác nhau như đột biến p.P840L và p.I857T, cả hai đều nằm ở vùng A (Hình 1.11). Những ảnh hưởng nghiêm trọng hơn của đột biến p.P840L về chức năng protein có thể do tính khác biệt giữa sự thay thế P > L so với sự thay thế của I > T.



Việc so sánh p.A874V với các biến thể p.G875R gần đây minh họa kiến trúc cực kỳ tinh tế và chính xác của *ATP7B*. Đột biến p.A874V nằm trong vòng lặp linh hoạt của vùng A (Hình 1.11) và dự kiến sẽ không làm thay đổi rõ rệt cấu trúc protein. Nhưng trong các tế bào, sự thiếu chính xác gấp khúc của cấu trúc protein do đột biến p.A874V gây rối loạn quá trình bài tiết đồng và có khả năng gây bệnh Wilson [72].



**Hình 1.11. Vị trí đột biến trên gen *ATP7B* [72]**

Kết hợp trong ống nghiệm và trong thử nghiệm *in vivo* cũng phân biệt giữa tác động của đột biến gấp khúc protein và chức năng. Khi xuất hiện các đột biến làm mất tính ổn định của protein có thể làm mất một phần hay hoàn toàn chức năng protein, dẫn đến thay đổi kiểu hình ở cá thể mang đột biến.

Do đó, trong tương lai cần nỗ lực sửa kiểu hình đột biến bằng cách cải thiện sự ổn định protein. Các nghiên cứu gần đây trong dược lý sử dụng 4-phenylbutyrate và curcumin minh họa cho khả năng điều chỉnh sự ổn định hoặc cải thiện khiếm khuyết của một số đột biến của gen *ATP7B* trong tế bào. Ngược lại, cải thiện sự ổn định của các đột biến khác (như p.G85V hoặc đột biến nằm trong vùng lân cận của vùng chức năng chính: hình 1.11) có thể không có tác dụng vì những đột biến thiếu hoạt tính xúc tác và vận chuyển.

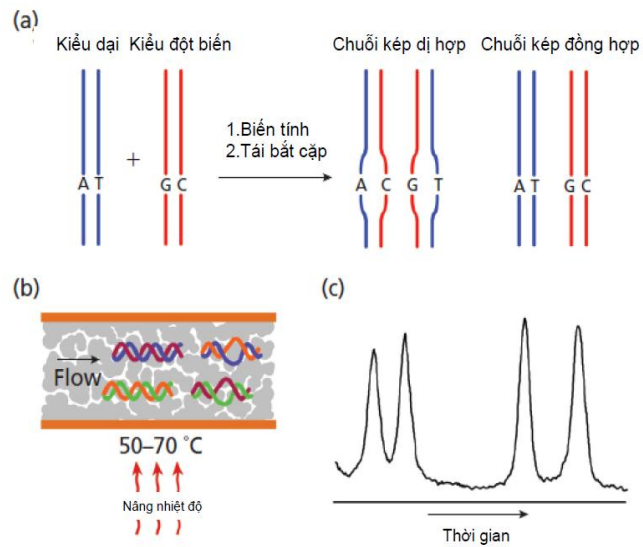
Những thay đổi không gây bệnh (p.V456L và p.K832R) có thể làm giảm hoạt tính của gen *ATP7B*. Sự hiện diện của các biến thể này dù không thể đơn độc gây bệnh, nhưng có thể có một tác động kép khi kết hợp với những đột biến khác gây bệnh.

Như vậy, những đột biến trên gen *ATP7B* có mức độ ảnh hưởng khác nhau lên sự thay đổi protein, hoạt động xúc tác và vận chuyển, cũng như định vị trong tế bào. Đột biến ảnh hưởng đến chức năng vận chuyển có thể gây khởi phát muộn của bệnh hoặc mất tính ổn định nếu rối loạn trạng thái trao đổi chất trong các tế bào. Đặc tính chi tiết của đột biến *ATP7B* có thể góp phần vào việc phân tích các mối tương quan kiểu gen-kiểu hình trong bệnh Wilson [72].

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

#### ***1.3.1. Kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp biến tính***

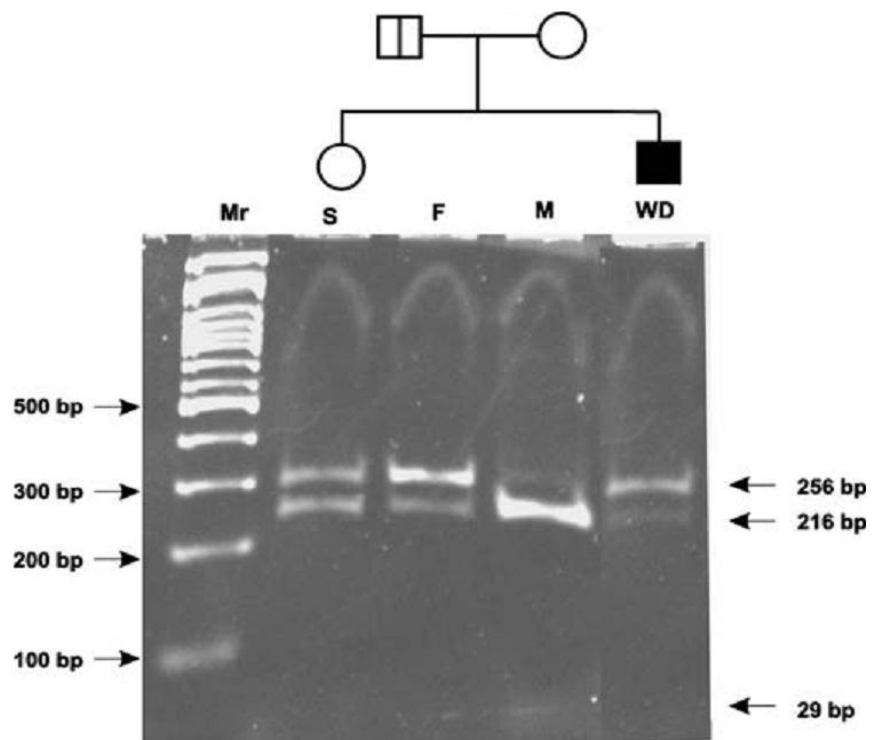
Sắc ký lỏng cao áp biến tính một phần (pDHPLC) là một phương pháp phát hiện sự thay đổi trình tự nucleotid (các đột biến điểm hoặc các đa hình gen-SNP) trên gen. Kỹ thuật này phân biệt được alen kiểu dại và alen đột biến nhờ vào đặc tính sắc ký tại nhiệt độ gây biến tính một phần và pH của chúng. Nếu thực hiện trên một số lượng mẫu lớn, pDHPLC giúp tiết kiệm chi phí và thời gian hơn nhiều so với kỹ thuật giải trình tự. Tuy nhiên, đây chỉ là phương pháp gián tiếp xác định sự thay đổi trình tự nucleotid. Kết quả vẫn cần kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp.



**Hình 1.12. Nguyên tắc kỹ thuật pDHPLC [73]**

### 1.3.2. Sử dụng enzym cắt giới hạn

Xác định đột biến bằng kỹ thuật cắt enzym giới hạn là phương pháp gián tiếp, tại các vị trí có điểm cắt của enzym. Ưu điểm của phương pháp này là nhanh, chính xác, giá thành rẻ, ít phức tạp. Nhược điểm là không phát hiện được toàn diện các đột biến trên gen mà chỉ xác định được đột biến tại vị trí đã biết trước và thường là các đột biến phổ biến. Kỹ thuật này ít được sử dụng để phát hiện đột biến gen *ATP7B* do đột biến trên gen *ATP7B* ít tập trung tại một vị trí mà nằm rải rác khắp chiều dài gen.



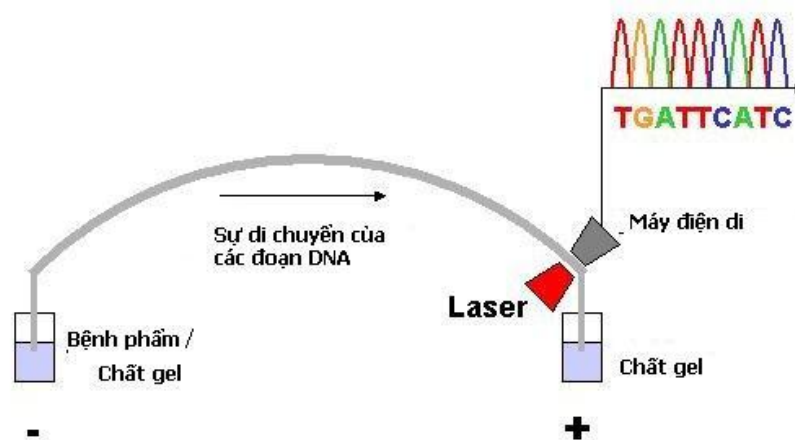
**Hình 1.13: Hình ảnh minh họa xác định đột biến R778W trên gen ATP7B bằng kỹ thuật cắt enzym giới hạn..** Mr: Marker 100bp. M: mẹ bệnh nhân; F: bố bệnh nhân; S: chị gái bệnh nhân; WD: bệnh nhân. Nếu bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử R778W thì sản phẩm 256 bp sẽ không bị cắt và chỉ có 1 vạch, trong trường hợp đột biến dị hợp tử, 1 alen sẽ bị cắt và sản phẩm PCR sẽ có 3 vạch 256 bp, 216 bp và 29 bp, nếu không có đột biến sản phẩm PCR sẽ bị cắt thành 2 sản phẩm với kích thước 216 bp và 29 bp [74].

Năm 2010, Đỗ Thanh Hương và cộng sự đã sử dụng phương pháp này để xác định đột biến gen Arg778Leu ở bệnh nhân Wilson Việt Nam [5].

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

Do phần lớn các đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson là đột biến điểm và thường nằm rải rác khắp chiều dài của gen nên phương pháp giải trình tự gen ATP7B vẫn được coi là một tiêu chuẩn vàng để phát hiện các đột biến gen gây bệnh.

Giải trình tự gen tự động được thiết kế trên nguyên tắc sử dụng dideoxynucleotid (ddNTP) do Sanger và CS phát minh. Với các máy thế hệ sau này, 4 màu huỳnh quang khác nhau được dùng để đánh dấu 4 loại ddNTP, nhờ vậy phản ứng giải trình tự có thể thực hiện trong một ống nghiệm và chỉ cần điện di trên một hàng chứ không phải trên 4 hàng khác nhau như trước đây. Đối với phương pháp giải trình tự tự động, hệ thống điện di thường sử dụng là điện di mao quản. Mỗi khi có một vạch điện di đi qua, phân tử ddNTP cuối cùng ở đầu 3' của đoạn DNA sẽ phát ra một màu huỳnh quang tương ứng và sẽ được máy ghi nhận rồi chuyển về máy tính phân tích. Máy phân tích sẽ nhận diện được các nucleotid tương ứng với mỗi màu huỳnh quang khác nhau từ đó biết được trình tự của DNA đích. Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự gen trên Genebank (National Center for Biotechnology Information - NCBI) để phát hiện đột biến.



**Hình 1.14. Trình tự nucleotid được xác định trên máy giải trình tự gen [75].**

Kỹ thuật giải trình tự gen đã được ứng dụng trong nhiều nghiên cứu để xác định các đột biến mất nucleotid, thay thế nucleotid hoặc thêm nucleotid trên gen *ATP7B*.

## **1.4. Môi trường quan giữa đột biến gen *ATP7B* và kiểu hình ở bệnh nhân Wilson**

### ***1.4.1. Môi trường quan giữa các dạng đột biến và kiểu hình***

Có nhiều dạng đột biến trên gen *ATP7B*, phổ biến nhất là đột biến sai nghĩa. Ngoài ra còn có các dạng đột biến khác như: đột biến vô nghĩa, đột biến mất và thêm nucleotid gây lệch khung dịch mã, đột biến tại vị trí cắt nối gen.

Các dạng đột biến khác nhau sẽ có môi trường quan với biểu hiện lâm sàng ở bệnh nhân Wilson. Hầu hết các nghiên cứu đều thấy rằng đột biến gen *ATP7B* dạng vô nghĩa, lệch khung dịch mã đều có biểu hiện lâm sàng nặng với tổn thương gan tối cấp hoặc hỗn hợp gan-thần kinh nặng hoặc biểu hiện bệnh sớm.

Đột biến DRD2 -141 C Ins/Del thể đa hình ảnh hưởng đến sự biểu hiện các triệu chứng thần kinh, tâm thần do làm mất cân bằng chất dẫn truyền thần kinh Dopamin, làm tăng tính nhạy cảm hơn với sự nhiễm độc các nhân xám trung ương do sự lắng đọng đồng. Do đó, các bệnh nhân mang đột biến H1069Q có biểu hiện triệu chứng thần kinh và tâm thần sớm hơn khoảng 6 năm so với nhóm không mang các alen này [76].

Các dạng đột biến lệch khung dịch mã thường biểu hiện triệu chứng lâm sàng sớm hơn các dạng đột biến khác [77]. Hầu hết các nghiên cứu đều cho kết quả nhóm đột biến lệch khung dịch mã gặp tỷ lệ suy gan tối cấp cao hơn các nhóm đột biến khác, khởi phát bệnh sớm hơn và ceruloplasmin huyết thanh thấp hơn dạng đột biến sai nghĩa [78],[79].

Nghiên cứu 77 bệnh nhân tại Hy Lạp cho thấy đột biến sai nghĩa có tỷ lệ cao nhất, trong đó đột biến xóa đoạn gây lệch khung dịch mã biểu hiện thể lâm sàng nặng với tổn thương thần kinh và suy gan tối cấp [80].

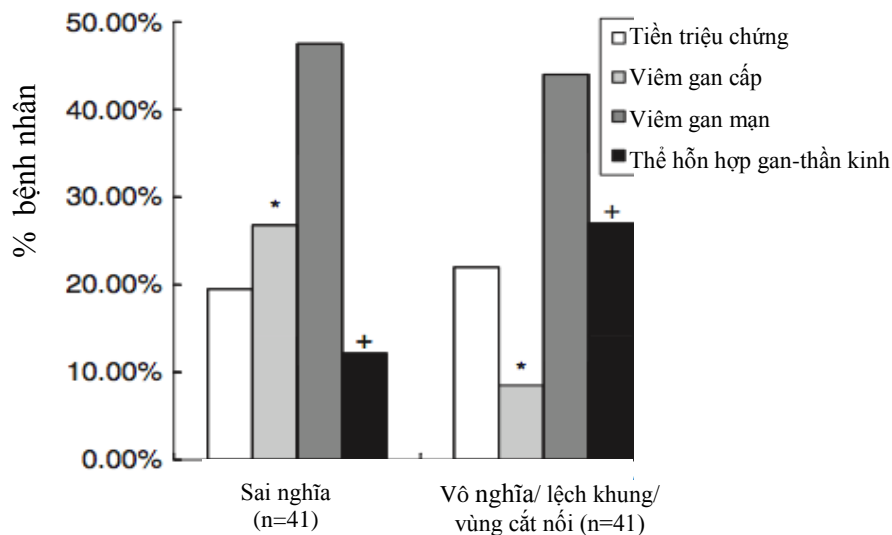
Phân tích gen trên 182 bệnh nhân bị bệnh Wilson cho kết quả nhóm đột biến dạng vô nghĩa, lệch khung dịch mã và vùng cắt nối biểu hiện sớm hơn và nặng hơn với suy gan tối cấp so với nhóm mang các dạng đột biến khác [81].

Nghiên cứu ở Phần Lan cho kết quả đột biến vô nghĩa và đột biến lệch khung dịch mã khởi phát bệnh sớm hơn và rối loạn chuyển hóa nặng hơn so với dạng đột biến sai nghĩa [82]. Nghiên cứu khác ở Bungary trên 126 bệnh nhân cho thấy nhóm đột biến dạng vô nghĩa và lệch khung dịch mã có biểu hiện triệu chứng lâm sàng sớm hơn, nặng hơn và ceruloplasmin huyết thanh thấp hơn so với nhóm đột biến sai nghĩa [83].

Nghiên cứu tại Trung Quốc cũng cho kết quả nhóm đột biến dạng vô nghĩa và lệch khung dịch mã thường gặp triệu chứng tiên phát tại gan với thay đổi sớm nhất là tăng enzym gan (tăng ALT) và ceruloplasmin huyết thanh thấp [84].

Đột biến ở vị trí cắt nối c.3244 - 2 A> C thường khởi phát sớm với triệu chứng nặng và tiên lượng xấu [82].

Nghiên cứu của tác giả Lee thấy rằng nhóm mang đột biến nặng thể vô nghĩa/ lệch khung/đột biến vùng cắt nối thường biểu hiện lâm sàng thể nặng (thể hỗn hợp gan - thần kinh) (hình 1.14) [81].



**Hình 1.15. Các dạng đột biến và thể lâm sàng của bệnh Wilson [81].**

## ***1.4.2. Tương quan giữa một số đột biến điểm trên gen ATP7B và kiểu hình***

### ***1.4.2.1. Tương quan giữa đột biến và tuổi khởi phát***

Các đột biến hay gặp p.R778L và p.H1069Q biểu hiện lâm sàng nặng ở nhóm bệnh nhân Wilson khởi phát trước 20 tuổi và mức độ nhẹ ở nhóm sau 20 tuổi [85]. Những bệnh nhân mang đột biến p.R778L thường khởi phát bệnh sớm, nhóm mang đột biến p.H1069Q biểu hiện bệnh muộn hơn [77]. Nhóm bệnh nhân mang đột biến gen p.R778L khởi phát bệnh ở tuổi  $8,1 \pm 1,7$  tuổi [86]; nhóm mang đột biến p.H1069Q khởi phát bệnh muộn hơn ở tuổi trung bình là 18,7 tuổi nếu đột biến dị hợp và 16,4 tuổi nếu đột biến đồng hợp [87].

Nghiên cứu khác trên 227 bệnh nhân Wilson cho thấy nhóm mang đột biến p.H1069Q triệu chứng khởi phát muộn nhất ở thể thần kinh ( $20,9 \pm 4,9$  tuổi) so với nhóm thể hỗn hợp gan - thần kinh ( $17,9 \pm 5,9$  tuổi) và nhóm thể gan ( $13,3 \pm 4,5$  tuổi) [67].

Nhóm bệnh nhân Wilson mang đột biến c.3207C>A khởi phát bệnh muộn và chẩn đoán muộn: tuổi khởi phát là 10 - 41 tuổi; tuổi chẩn đoán là 12 - 63 tuổi [88].

Một số dạng đột biến gen khác cũng liên quan đến tuổi khởi phát muộn: đột biến p.S932X và p.W779X [89].

### ***1.4.2.2. Tương quan giữa đột biến và thể lâm sàng***

Hầu hết các nghiên cứu thấy rằng đột biến p.H1069Q biểu hiện thể lâm sàng tổn thương thần kinh và đột biến p.R778L biểu hiện tổn thương gan [77],[78].

Nghiên cứu 66 bệnh nhân ở Trung Quốc cho kết quả 74% bệnh nhân thể gan mang đột biến p.R778L [70].



Một nghiên cứu khác ở Trung Quốc phân tích gen *ATP7B* cho 62 bệnh nhân Wilson 31,9% mang đột biến p.R778L, những bệnh nhân này có biểu hiện tổn thương gan với tăng transaminase huyết thanh sớm [84].

Đột biến gen p.H1069Q thường biểu hiện lâm sàng muộn với các triệu chứng thần kinh [90].

Nghiên cứu 68 người mang gen đột biến p.H1069Q dạng dị hợp trong cộng đồng cho thấy những cá thể này có tỷ lệ ceruloplasmin cao hơn những người mang gen đột biến khác, có thể do đột biến này không nặng nên ít biến đổi kiểu hình [91].

Một số dạng đột biến gen khác cũng có thể có thể liên quan đến các thể lâm sàng: đột biến p.D765N biểu hiện tổn thương gan và thần kinh nặng; đột biến p.S932X gặp ở bệnh nhân có xơ gan và rối loạn đông máu; đột biến c.2335T>G (p.W779G) có tổn thương thần kinh nặng [89],[92].

Bên cạnh đó cũng có một số nghiên cứu không tìm thấy mối tương quan giữa đột biến gen *ATP7B* và các biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng như: hàm lượng ceruloplasmin, đồng niệu và đồng trong gan khô; không tìm thấy mối tương quan giữa các thể lâm sàng và đột biến p.H1069Q [67],[93],[54].

#### 1.4.2.3. Các mối tương quan khác với kiểu gen *ATP7B*

Nghiên cứu của Tawhida Y tại Ai Cập cho thấy 75% bệnh nhân mang đột biến đồng hợp có bố mẹ cùng huyết thống [63]. Điều này phù hợp với quy luật di truyền gen lặn trên nhiễm sắc thể thường của Mendel.

Anh chị em ruột mang cùng đột biến trong đó 86% có tương đồng triệu chứng lâm sàng thể gan; 66% tương đồng triệu chứng lâm sàng thể thần kinh. Như vậy, anh chị em ruột mang cùng gen vẫn có tỷ lệ lớn biểu hiện lâm sàng khác nhau. Điều đó có thể do tác động của gen khác hoặc do yếu tố môi trường [82].

Phân tích gen *ATP7B* ở các gia đình bệnh nhân Wilson ở Ấn Độ cho thấy bệnh nhân mang gen đột biến thể dị hợp cũng biểu hiện bệnh. Điều này gợi ý rằng có yếu tố khác tác động vào kiểu hình gây bệnh hoặc có sự cộng hưởng của nhiều đột biến dạng dị hợp gây bệnh Wilson [87].

Một số gen khác có thể tác động đến biểu hiện lâm sàng của bệnh Wilson: gen *MTHFR*, *ATOX1*, *XIAP*, *COMMD1*. Tuy nhiên các gen này đang trong giai đoạn thử nghiệm để chứng minh vai trò gây bệnh đối với các bệnh nhân bị bệnh Wilson [41].

Gen *MURR1* có tác động đến biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân mang đột biến gen *ATP7B* nhưng nó không có vai trò sinh bệnh học nếu ceruloplasmin huyết thanh trong giới hạn bình thường [94].

## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu gồm 60 bệnh nhân đã được chẩn đoán bệnh Wilson thỏa mãn các tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân.

#### *Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân:*

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân theo thang điểm Ferenci (bảng 2.1) [29]:

**Bảng 2.1. Thang điểm chẩn đoán bệnh Wilson theo Ferenci [29]**

Các chỉ số	Điểm
<b>Vòng Kayser-Fleischer</b>	
- Có	2
- Không	0
<b>Các triệu chứng thần kinh</b>	
- Có	2
- Không	1
<b>Xét nghiệm khác</b>	
<b>Ceruloplasmín huyết thanh</b>	
- Bình thường (>20mg/dl)	0
- 10-20mg/dl	1
- <10mg/dl	2
<b>Thiếu máu tan máu Test Coombs âm tính</b>	
- Có	1
- Không	0
<b>Đồng trong mô gan</b>	
- >5 giới hạn trên (>250µg/g)	2
- 50-250µg/g	1
- Bình thường (<50µg/g)	-1
- Có các hạt Rhodamine (+)	1
<b>Đồng/nước tiểu 24 giờ</b>	
- Bình thường	0
- Tăng 1-2 lần	1
- Tăng >2 lần	2
Bình thường, nhưng tăng > 5 lần giới hạn trên sau khi dùng D-penicillamine	2
<b>≥ 4: chẩn đoán xác định bệnh Wilson</b>	
<b>3: có thể bị bệnh Wilson, cần làm thêm xét nghiệm</b>	
<b>≤ 2: rất ít khả năng mắc bệnh Wilson</b>	

**Tất cả các bệnh nhân có tổng điểm ≥ 4, được đưa vào nghiên cứu**

***Tiêu chuẩn loại trừ:***

Nghiên cứu loại trừ những bệnh nhân không tự nguyện tham gia vào nghiên cứu

***Nhóm đối chứng***

- Nhóm đối chứng gồm 40 người khỏe mạnh, tiền sử gia đình không có người mắc bệnh di truyền, được dùng để làm mẫu đối chứng cùng với mẫu nghiên cứu khi thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử và chạy kiểm chứng các đột biến mới phát hiện trên bệnh nhân.

**2.2. Địa điểm nghiên cứu**

- Bệnh viện Nhi Trung Ương, Bệnh viện Bạch Mai, nơi chẩn đoán, điều trị và quản lý bệnh nhân bị bệnh Wilson.
- Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein Trường Đại học Y Hà Nội, nơi tiến hành các kỹ thuật di truyền phân tử.

**2.3. Thời gian nghiên cứu**

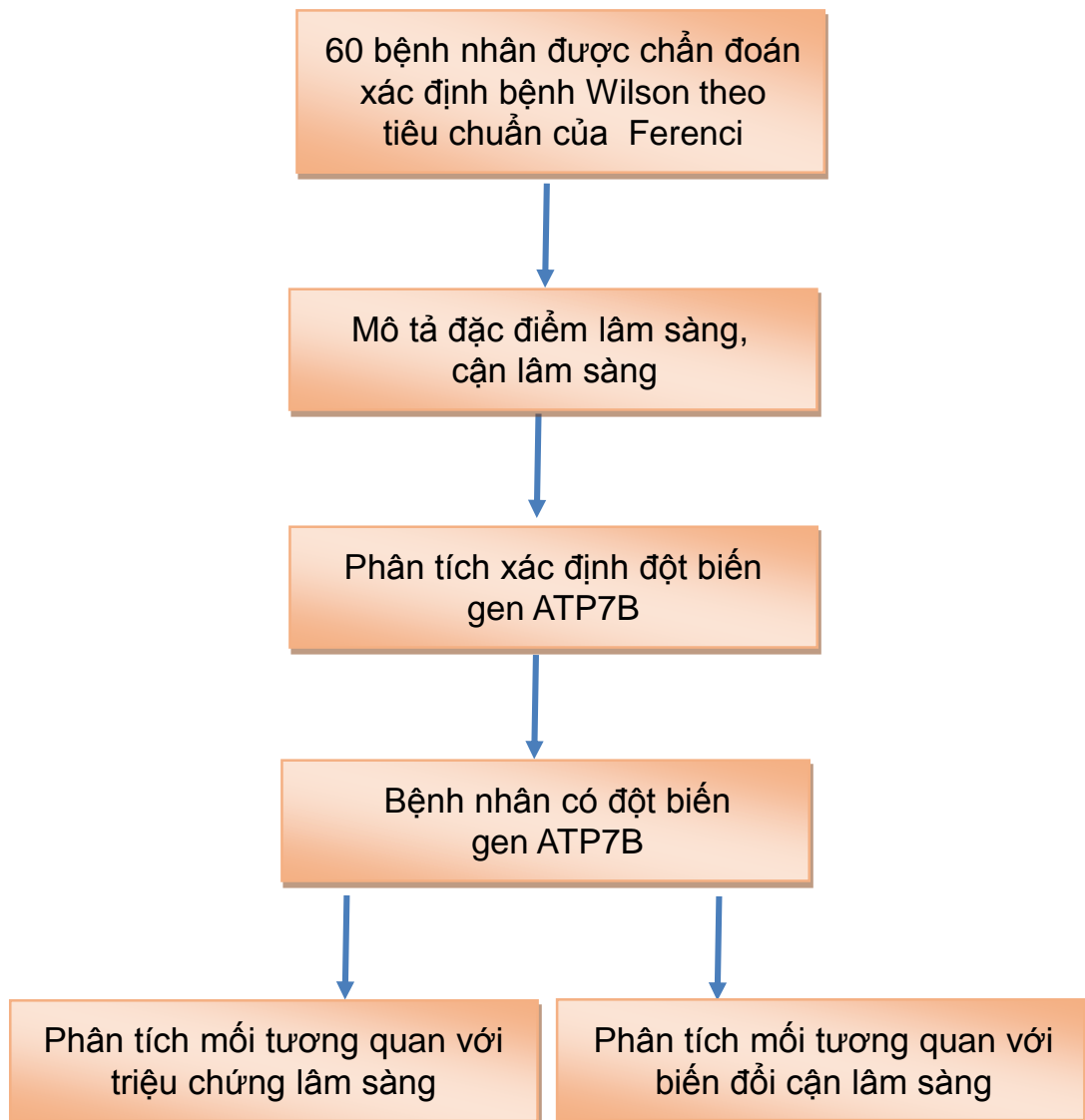
Thời gian từ tháng 9 năm 2012 đến tháng 9 năm 2015.

**2.4. Phương pháp nghiên cứu*****2.4.1. Phương pháp nghiên cứu***

Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Mỗi đối tượng nghiên cứu sẽ có một hồ sơ nghiên cứu bao gồm các thông tin về bệnh nhân (triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, chẩn đoán, kết quả phân tích đột biến gen, điều trị) và phả hệ của gia đình, các thông tin về bố, mẹ, anh, chị, em ruột của bệnh nhân.

## SƠ ĐỒ THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU



### 2.4.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

+ Bệnh Wilson là bệnh di truyền hiếm gặp nên lấy cỡ mẫu thuận tiện.

### 2.4.3. Các nội dung nghiên cứu

*Nội dung nghiên cứu cho mục tiêu 1:*

- Các đặc điểm về bệnh nhân và gia đình bệnh nhân: tuổi, giới, tiền sử gia đình (mắc bệnh Wilson, bố mẹ hôn nhân cùng huyết thống).
- Các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân: tuổi khởi phát, các triệu chứng lâm sàng giai đoạn khởi phát, các triệu chứng giai đoạn toàn phát.

- Các đặc điểm cận lâm sàng của bệnh nhân: đồng niệu 24 giờ, nồng độ ceruloplasmin huyết thanh, ALT, AST huyết thanh, các hình thái tổn thương gan trên siêu âm ổ bụng và trên phim chụp cộng hưởng từ sọ não.

- Phân chia thể lâm sàng theo Ferenci: thể gan, thể thần kinh, thể hỗn hợp gan - thần kinh.

*Nội dung nghiên cứu cho mục tiêu 2:*

- Xác định các đột biến trên gen *ATP7B* bằng giải trình tự gen.
- Phân bố đột biến trên các vùng gen *ATP7B*.
- Phân bố các dạng đột biến gen và số lượng đột biến trên bệnh nhân.
- Phân tích mối tương quan giữa tuổi khởi phát, nồng độ ceruloplasmin huyết thanh, đồng niệu 24 giờ và các thể lâm sàng với số alen đột biến gen *ATP7B*.

- Phân tích mối tương quan giữa tuổi khởi phát, nồng độ ceruloplasmin huyết thanh, đồng niệu 24 giờ và các thể lâm sàng với các dạng đột biến gen *ATP7B*.

## **2.5. Các bước tiến hành nghiên cứu**

### **2.5.1. Hỏi bệnh và khám lâm sàng**

Tất cả các bệnh nhân đều được hỏi và khám bệnh theo một mẫu bệnh án thống nhất (phụ lục 2).

*Phân hỏi bệnh*

- Các thông tin chung: tuổi, giới, nghề nghiệp, địa chỉ, ngày vào viện, lý do vào viện.

- Quá trình bị bệnh: thời gian mắc bệnh, triệu chứng khởi phát, diễn biến các triệu chứng

- Bệnh nhân đã được khám ở đâu? Chẩn đoán bệnh gì? Điều trị thuốc gì? Diễn biến trong quá trình dùng thuốc?

- Tiền sử bản thân: có bị bệnh viêm gan? Suy yếu trí tuệ?

- Tiền sử gia đình: trong gia đình có ai bị bệnh Wilson, viêm gan, rối loạn tâm thần? bố mẹ có cùng huyết thống?

*Phần khám bệnh*

- Khám thần kinh

Đánh giá ý thức, nhận thức (sự phát triển tâm thần vận ở trẻ nhỏ)

Vận động: phát hiện các triệu chứng: liệt vận động, các động tác tự động (múa vờn, múa giật, run chân tay).

Trương lực cơ: tìm biểu hiện tăng trương lực cơ ngoại tháp.

Cảm giác: bệnh nhân có rối loạn cảm giác nông, cảm giác sâu hay không.

Các dây thần kinh sọ não: có liệt hay không liệt?

Cơ tròn: tự chủ hay không tự chủ, tiểu khó, đại tiện táo?

Dấu hiệu màng não.

Hội chứng tiểu não.

Hội chứng tăng áp lực nội sọ.

- Khám tâm thần phát hiện các biểu hiện: Rối loạn hành vi, tác phong, hoang tưởng, ảo giác, kích động.

- Khám mắt: Các bệnh nhân đều được khám tại Viện Mắt Trung ương và được đánh giá về thị lực, thị trường, soi đáy mắt, tìm vòng Kayser - Fleischer, đục thủy tinh thể kiểu hoa hướng dương.

- Khám tiêu hóa phát hiện các triệu chứng: Chảy máu chân răng, gan to, lách to, phù, Cổ trướng, Tuần hoàn bàng hệ.

- Khám toàn thân phát hiện các triệu chứng: Xạm da, xuất huyết dưới da, phù.

- Khám các cơ quan khác: Tuần hoàn; Hô hấp; Tiết niệu; Cơ xương khớp.

### 2.5.2. Xét nghiệm sinh hóa và chẩn đoán hình ảnh

#### - Xét nghiệm máu

Công thức máu, đông máu cơ bản, nghiệm pháp Coombs, đường, protid máu, albumin máu, ure, creatinin, AST, ALT, ceruloplasmin huyết thanh, được tiến hành tại Khoa Sinh hóa, Khoa Huyết học Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Nhi Trung ương.

#### - Định lượng đồng niệu 24 giờ:

Được tiến hành tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam.

#### - Siêu âm ổ bụng, chụp cộng hưởng từ sọ não:

Được tiến hành tại Khoa Chẩn đoán hình ảnh, Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Nhi Trung Ương.

### 2.5.3. Chẩn đoán

#### 2.5.3.1. Chẩn đoán xác định

Bệnh nhân được chẩn đoán bệnh Wilson nếu đạt  $\geq 4$  điểm theo thang điểm Ferenci (bảng 2.1) [29].

#### 2.5.3.1. Chẩn đoán thể lâm sàng:

*Phân chia thể lâm sàng dựa vào cơ quan chính bị tổn thương theo tiêu chuẩn Ferenci [29].*

#### - Thể tổn thương gan

Những bệnh nhân bị bệnh Wilson có tổn thương gan và đã được khám kỹ để loại trừ các tổn thương thần kinh tại thời điểm chẩn đoán.

#### - Thể tổn thương thần kinh

Tất cả các bệnh nhân bị bệnh Wilson có triệu chứng thần kinh hoặc tâm thần hoặc phối hợp được phát hiện tại thời điểm chẩn đoán đều được xếp vào thể thần kinh.

#### - Thể hỗn hợp gan - thần kinh

Các bệnh nhân có tổn thương gan phối hợp tổn thương thần kinh.



#### **2.5.4. Quy trình phân tích đột biến gen ATP7B**

##### **2.5.4.1. Quy trình lấy mẫu**

Bệnh nhân được lấy 2-3 ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA với hàm lượng 1,5mg/ml. Quy trình đảm bảo tuyệt đối vô trùng.

##### **2.5.4.2. Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi**

- Máu tươi chống đông EDTA tách DNA trong vòng 24 giờ.
  - Cho 0,5ml máu tươi toàn phần đã chống đông vào ống Eppendorf 1,5ml sau đó cho thêm vào 0,5ml dung dịch Lysis buffer rồi để trên đá trong 10 phút.
  - Ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, bỏ dịch nổi và thu cặn. lặp lại quá trình này 4 lần.
  - Cho 0,5 ml dung dịch K vào, ly tâm 8000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C, bỏ dịch nổi và thu cặn.
  - Cho 0,5 ml Lysis buffer; 12,5µl SDS 10%; 10µl Proteinase K; ủ ở 56°C trong 2 ÷ 3 giờ.
  - Cho 0,5 ml phenol: chloroform: isoamyl, ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, hỗn hợp được chia làm 3 phần: Lớp dung dịch phía trên có chứa DNA; Lớp ở giữa là cặn tế bào; Lớp dưới cùng là dịch chiết
- Hút lấy phần dịch chứa DNA phía trên cùng và tiến hành lặp lại các bước trên một lần nữa sẽ đảm bảo không còn tạp chất trong mẫu.
- Cho 0,5 ml chloroform: isoamyl, ly tâm mẫu 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Hút lấy phần dịch trên cùng và lặp lại lần 2.
  - Tủa DNA bằng 1ml ethanol 100%, cho thêm 50µl sodium acetate, để lạnh qua đêm ở -20°C.

- Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, bỏ dịch nổi, thu tủa.
- Rửa tủa bằng ethanol 70%. Tủa DNA được hoà tan bằng 50 ml nước tinh khiết hoặc TE.
- DNA tách chiết sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280nm và điện di trên gel agarose 0,8%.

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

Sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại toàn bộ 21 exon của gen *ATP7B*. Trình tự cặp môi và quy trình phát hiện đột biến gen được thực hiện theo nghiên cứu của Tạ Thành Văn và cộng sự tại Trung tâm Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội [71].

Các thành phần của phản ứng trong bảng 2.2 và chu trình nhiệt trong bảng 2.3.

**Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR**

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

**Bảng 2.3. Chu trình nhiệt phản ứng PCR**

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

Kiểm tra đột biến trên gel agarose 1,5%. Nghiên cứu có sử dụng mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương để so sánh.

#### 2.5.4.4. Giải trình tự gen

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

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

#### + Giai đoạn 1: Chuẩn bị master mix cho phản ứng PCR

- Chuẩn bị effendorf 0,2ml đã đánh dấu sẵn thứ tự các mẫu
- Chuẩn bị hóa chất để thực hiện phản ứng
- Làm tan hoàn toàn hóa chất, trộn đều sau đó ly tâm nhẹ để toàn bộ dịch trên nắp ống rơi xuống. Thành phần của phản ứng trong bảng 2.4.

**Bảng 2.4. Thành phần của phản ứng sequencing**

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

### + Giai đoạn 2: Phản ứng giải trình tự gen (Sequencing)

- Sau khi chuẩn bị master mix cho phản ứng xong, ly tâm nhanh các ống PCR để toàn bộ dịch dính trên thành và nắp ống xuống dưới và làm tan bọt.
- Xếp các ống master mix vào máy PCR
- Chọn chương trình nhiệt đã được cài đặt sẵn trong máy theo chu trình đã được tối ưu hóa (bảng 2.5).

**Bảng 2.5. Chu trình nhiệt của phản ứng sequencing**

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

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

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

So sánh kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân với trình tự GeneBank của gen *ATP7B* (National Center for Biotechnology Information, NCBI) NG\_008806 bằng phần mềm CLC.

So sánh trình tự các acid amin của bệnh nhân với trình tự acid amin chuẩn của Genebank NM\_000053.3 bằng phần mềm Blast của NCBI.

## 2.6. Xử lý kết quả

Các số liệu được nhập bằng phần mềm SPSS 16.0. Tất cả các số liệu và kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê y học. Phân tích

thống kê mô tả, so sánh, tính các giá trị trung bình ( $\bar{X}$ ), tỷ lệ phần trăm (%), tính chỉ số tương quan r bằng phương pháp Kendall, phân tích mối tương quan bằng test ANOVA.

## **2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu**

Đề tài tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học. Bệnh nhân và gia đình hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu: có sự chấp thuận của bệnh nhân và gia đình (có sự chấp thuận của người bảo hộ nếu bệnh nhân dưới 18 tuổi).

Các gia đình và bệnh nhân có thể rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia. Các bệnh nhân và người bảo hộ đều được thông báo về kết quả xét nghiệm, đồng thời giải thích về khả năng điều trị và phòng bệnh.

Các thông tin của bệnh nhân và gia đình sẽ được đảm bảo bí mật: nhóm nghiên cứu chỉ thông báo các thông tin về tiền sử, bệnh sử, kết quả khám bệnh và kết quả xét nghiệm cho bệnh nhân và người bảo hộ của bệnh nhân.

Nghiên cứu được tiến hành hoàn toàn vì mục đích khoa học và lợi ích điều trị của bệnh nhân.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng

##### 3.1.1. Đặc điểm lâm sàng

##### 3.1.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi khởi phát

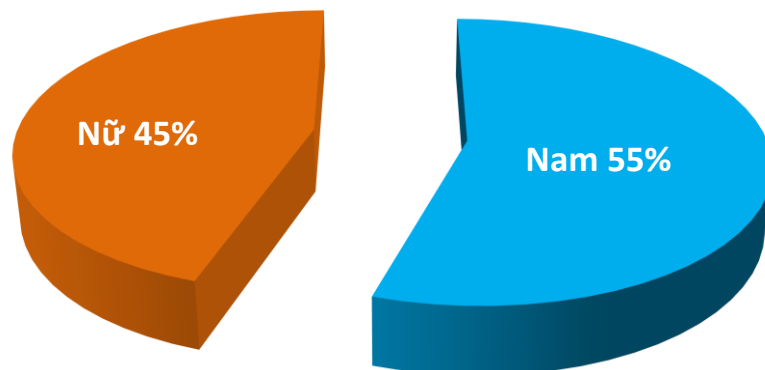
Tuổi khởi phát được tính là tuổi lúc vào viện trừ đi thời gian mắc bệnh

**Bảng 3.1. Tuổi khởi phát bệnh**

Tuổi khởi phát	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
< 10 tuổi	10	16,7
từ 10 đến 19 tuổi	31	51,7
từ 20 đến 29 tuổi	11	18,3
≥ 30 tuổi	8	13,3
Tổng	60	100

*Nhận xét:* Tuổi khởi phát bệnh hay gặp nhất từ 10-19 tuổi (chiếm 51,7%). Trung bình là 16,3 tuổi, nhỏ nhất là 3 tuổi, lớn nhất là 53 tuổi.

##### 3.1.1.2. Phân bố bệnh nhân theo giới



**Hình 3.1. Tỷ lệ mắc bệnh theo giới**

*Nhận xét:* Nam mắc bệnh nhiều hơn nữ. Tỷ lệ nam/nữ là 1,22.

3.1.1.3. Triệu chứng ở giai đoạn khởi phát của bệnh Wilson

**Bảng 3.2. Triệu chứng ở giai đoạn khởi phát**

Các triệu chứng khởi phát	Số bệnh nhân	Tỷ lệ % (n=60)
Run tay	39	65,0
Bàn tay vụng về, viết xấu	34	56,7
Vàng da	27	45,0
Tăng nhẹ trương lực cơ đều tứ chi	22	36,7
Nói khó	17	28,3
Nuốt khó	12	20,0
Chảy nước dãi	9	15,0
Xạm da	5	11,7
Chảy máu chân răng	4	6,7
Rối loạn cảm xúc	2	3,3

*Nhận xét:* Các triệu chứng lâm sàng khởi phát thường gặp là: run tay, bàn tay vụng về, vàng da, tăng nhẹ trương lực cơ đều tứ chi. Trong đó triệu chứng run tay chiếm tỷ lệ cao nhất (65,0%). Các triệu chứng chảy máu chân răng, xạm da và rối loạn cảm xúc hiếm gặp hơn.

3.1.1.4. Triệu chứng ở giai đoạn toàn phát của bệnh Wilson

**Bảng 3.3. Triệu chứng ở giai đoạn toàn phát**

Các triệu chứng khởi phát	Số bệnh nhân	Tỷ lệ % (n=60)
Tăng trương lực cơ đều tứ chi	41	68,3
Nói khó	37	61,7
Nuốt khó	35	58,3
Vòng Kayser-Fleischer	32	53,3
Vàng da	31	51,7
Run tay	24	40,0
Chảy nước dãi	22	36,7
Xạm da	15	25,0
Chảy máu chân răng	9	15,0
Phù	7	11,7
Đục thủy tinh thể	6	10,0
Rối loạn cảm xúc	5	8,3
Suy giảm trí tuệ	4	6,7

*Nhận xét:* Triệu chứng lâm sàng giai đoạn toàn phát thường gặp là: tăng trương lực cơ đều tứ chi (68,3%), nói khó (61,7%), nuốt khó (53,8%), vàng da (51,7%) và 32/60 trường hợp có vòng Kayser-Fleischer ở rìa giác mạc (53,3%). Hiếm gặp biểu hiện rối loạn cảm xúc (8,3%) và suy giảm trí tuệ (6,7%).



### 3.1.1.5. Tiền sử gia đình

**Bảng 3.4. Tiền sử gia đình của bệnh nhân Wilson**

Các trường hợp bệnh	Số bệnh nhân	Tỷ lệ % (n=49)
Anh, chị, em ruột bị bệnh Wilson	11	18,3
Bố, mẹ bị bệnh Wilson	9	15,0
Cô, dì, chú, bác ruột bị bệnh Wilson	7	11,7
Bố, mẹ cùng huyết thống	0	0,0
Không liên quan đến bệnh Wilson	38	63,3

*Nhận xét:* Trong số 60 bệnh nhân Wilson khai thác tiền sử gia đình, có 22 bệnh nhân có tiền sử gia đình mắc bệnh Wilson (chiếm 37,7%).

### 3.1.2. Triệu chứng cận lâm sàng

#### 3.1.2.1. Định lượng ceruloplasmin huyết thanh

**Bảng 3.5. Định lượng ceruloplasmin huyết thanh**

Nồng độ ceruloplasmin huyết thanh	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
Từ 0 đến 5mg/dl	9	15,0
Từ 5,1 đến 10mg/dl	37	61,7
Từ 10,1 đến 15mg/dl	11	18,3
Từ 15,1 đến 19,9mg/dl	3	5,0
≥ 20mg/dl	0	0,0
Tổng	60	100

*Nhận xét:* Tất cả các bệnh nhân đều có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh giảm, nhóm giảm 5,1-10mg/dl chiếm tỷ lệ cao nhất (61,7%). Trong nhóm nghiên cứu chỉ có 1 trường hợp nồng độ ceruloplasmin cao nhất là 16,9mg/dl (nồng độ ceruloplasmin ở người bình thường là 20-40mg/dl).

## 3.1.2.2. Định lượng transaminase huyết thanh

**Bảng 3.6. Định lượng transaminase huyết thanh**

Transaminase huyết thanh	Bình thường		Tăng	
	Bệnh nhân (n)	Tỷ lệ %	Bệnh nhân (n)	Tỷ lệ %
ALT	29	48,3	31	51,7
AST	32	53,3	28	46,7
Tổng	60	100	60	100

*Nhận xét:* Tất cả các bệnh nhân thể gan và thể hỗn hợp gan - thần kinh đều tăng transaminase huyết thanh (chiếm 51,7% tổng số bệnh nhân).

## 3.1.2.3. Định lượng đồng niệu 24 giờ

**Bảng 3.7. Xét nghiệm đồng niệu 24 giờ**

Đồng niệu/24 giờ	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
> 100 µg/24 giờ	47	100
≤ 100 µg/ 24 giờ	0	0,0
Tổng	47	100

*Nhận xét:* 47 bệnh nhân được xét nghiệm đồng trong nước tiểu 24 giờ đều tăng cao (chiếm tỷ lệ 100%). Trung bình là 673µg/24 giờ, cao nhất là 2457µg/24 giờ (đồng niệu ở người bình thường dưới 40µg/24 giờ).

## 3.1.2.4. Siêu âm ổ bụng

**Bảng 3.8. Kết quả siêu âm ổ bụng**

<b>Triệu chứng</b>	<b>Số bệnh nhân</b>	<b>Tỉ lệ % (n=60)</b>
Mật độ gan không đều	31	51,7
Lách to	11	18,3
Dịch ổ bụng	9	15,5
Gan to	7	11,7
Giãn tĩnh mạch cửa	6	10,0
Gan teo nhỏ	4	6,7

*Nhận xét:* Mật độ gan không đều là triệu chứng hay gặp nhất trên siêu âm ổ bụng cho các bệnh nhân Wilson (chiếm 51,7%), lách to và dịch ổ bụng chiếm 33,8%. Các triệu chứng gan teo nhỏ, gan to, giãn tĩnh mạch cửa ít gặp hơn.

3.1.2.5. Chụp cộng hưởng từ (MRI: Magnetic Resonance Image) sọ não

**Bảng 3.9. Kết quả chụp MRI sọ não**

Hình ảnh chụp MRI sọ não	Số bệnh nhân	Tỷ lệ % (n=45)
Thay đổi tín hiệu vùng nhân xám đối xứng hai bên.	39	86,7
Thay đổi tín hiệu vùng đồi thị, nhân xám không đối xứng hai bên	2	4,4
Teo vỏ não	3	6,7
Thay đổi tín hiệu vùng thân não	3	6,7
Không thấy hình ảnh bất thường	4	8,9

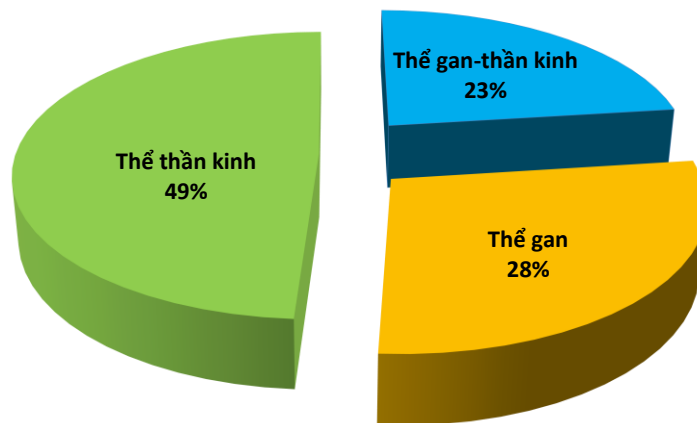
*Nhận xét:* Trong số 45 bệnh nhân được chụp MRI sọ não, 39 bệnh nhân (86,7%) có tổn thương nhân xám đối xứng hai bên (tăng tín hiệu trên thì T2W và Flair, giảm tín hiệu trên thì T1W). Hình ảnh teo vỏ não, thay đổi tín hiệu vùng thân não ít gặp hơn (13,4%). Có bệnh nhân tổn thương phối hợp nhiều vị trí.



**Hình 3.2: Hình ảnh tăng tín hiệu nhân xám đối xứng 2 bên trên phim MRI của bệnh nhân mã số W56.00 (mũi tên màu đỏ)**

### 3.1.3. Thể lâm sàng của bệnh Wilson

Dựa vào các kết quả khám lâm sàng và kết quả xét nghiệm, chúng tôi phân chia các thể lâm sàng theo tiêu chuẩn Ferenci [29]. Nghiên cứu của chúng tôi trên 60 bệnh nhân được chia thành 3 nhóm: thể thần kinh; thể gan và thể hỗn hợp gan-thần kinh (hình 3.3).



**Hình 3.3. Các thể lâm sàng của bệnh Wilson**

*Nhận xét:* Trong số 60 bệnh nhân Wilson, thể thần kinh đơn thuần chiếm tỷ lệ cao nhất (49,0%), các thể gan và thể hỗn hợp gan-thần kinh chiếm tỷ lệ thấp hơn.

## 3.2. Kết quả phân tích gen *ATP7B*

### 3.2.1. Kết quả tách chiết DNA

DNA của các bệnh nhân, cùng các đối chứng nam và nữ được tách chiết theo quy trình phenol/chloroform. Sau khi tách chiết, các mẫu DNA được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nano-drop.

Tất cả mẫu DNA được tách chiết đều có nồng độ và độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280nm nằm trong khoảng 1,8-1,9 (phụ lục 3).

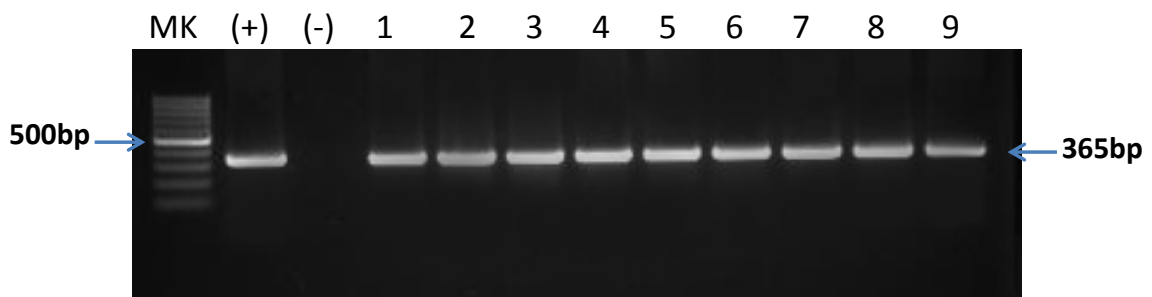
### 3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen *ATP7B*

#### 3.2.2.1. Kết quả PCR

Sử dụng 21 cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại 21 exon của gen *ATP7B*, theo quy trình phát hiện đột biến gen gây bệnh Wilson của Tạ Thành Văn và cộng sự năm 2011 [71].

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Hình 3.4 là hình ảnh minh họa kết quả PCR khuếch đại exon 8 của gen *ATP7B* trong số 21 exon được khuếch đại.

(Hình ảnh sản phẩm PCR của các exon khác ở phụ lục 4)



**Hình 3.4. Hình ảnh sản phẩm PCR đoạn gen ở exon 8 của gen *ATP7B*.**

*MK: Marker  $\Phi$ 174, (+) mẫu đối chứng dương, (-) đối chứng âm, 1-9 mẫu bệnh nhân.*

*Nhận xét:* Sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu, rõ nét và đảm bảo cho phản ứng giải trình tự gen tiếp theo tiếp theo để phát hiện đột biến điểm.

#### 3.2.2.2. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến

Sản phẩm PCR tiếp tục được giải trình tự gen để phát hiện đột biến. Kết quả cho thấy, 44/60 trường hợp (73%) được phát hiện đột biến. Trong số các đột biến đã được phát hiện, có 19 đột biến gen *ATP7B* đã được công bố gây bệnh trên ngân hàng dữ liệu GeneBank và 7 đột biến mới được phát hiện: c.-118insCGCCG, c.305G>A (p.G50S); c.1336T>G (p.V446G); c.2712\_2713 insT (p.E905X); c.2939G>C (p.C980S); c.3399\_3400insT (p.P1133EfsX19); c.3810delT (p.N1270IfsX35) (bảng 3.10). Các đột biến mới này không tìm thấy trên 40 mẫu DNA đối chứng của người bình thường.

**Bảng 3.10. Phân bố đột biến trên gen ATP7B của bệnh nhân Wilson**

STT	Exon/ 5'UTR	Thay đổi nucleotide	Thay đổi amino acid	Chú thích	Số alen	Tỷ lệ %	Số TLTK
1	5'UTR	c.-75C>A		DV	28	26,92	17
2	1	c.-118insCGCCG		new	2	1,93	0
3	2	c.305G>A	p.G50S	new	1	0,96	0
4		c.314C>A	p.S105X	DV	28	26,92	3
5	3	c.1336T>G	p.V446G	new	1	0,96	0
6	4	c.1607T>C	p.V536A	DV	7	6,73	1
7	5	c.1771G>A	p.G591S	DV	2	1,93	1
8		c.1810G>C	p.A604P	DV	4	3,85	2
9	8	c.2160delA	p.K720NfsX3	DV	1	0,96	1
10		c.2333G>T	p.R778L	DV	10	9,62	25
11	10	c.2549C>T	p.T850I	DV	2	1,93	1
12	11	c.2862T>C	p.L902P	DV	1	0,96	1
13		c.2712_2713insT	p.E905X	new	1	0,96	0
14	12	c.2817G>C	p.W939C	DV	1	0,96	8
15		c.2982G>A	p.G943D	DV	2	1,93	1
16	13	c.2939G>C	p.C980S	new	1	0,96	0
17	14	c.3097A>G	p.T1033I	DV	1	0,96	1
18		c.3155C>T	p.P1052L	DV	1	0,96	1
19		c.3193G>C	p.A1065P	DV	1	0,96	2
20	15	c.3399_3400insT	p.P1133EfsX19	new	1	0,96	0
21		c.3295G>A	p.G1099S	DV	1	0,96	3
22	16	c.3547G>A	p.A1183T	DV	1	0,96	1
23	17	c.3638G>A	p.G1213D	DV	1	0,96	1
24	18	c.3818C>A	p.P1273Q	DV	3	2,88	3
25		c.3810delT	p.N1270IfsX35	new	1	0,96	0
26	20	c.4112T>C	p.L1371P	DV	1	0,96	1

Chú thích: **New**: Đột biến mới; **DV**: Disease Variant (đột biến gây bệnh)

TLTK: số tài liệu tham khảo trên ngân hàng dữ liệu gen (<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/>).

**Nhận xét:** Có 26 đột biến được phát hiện trong tổng số 44 bệnh nhân mang đột biến với 104 alen, trong đó 3 đột biến chiếm tỷ lệ alen cao nhất: c.-75C>A (26,92%); p.S105X (26,92%) và p.R778L (9,62%).

**Bảng 3.11: Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của các bệnh nhân Wilson mang đột biến mới và đột biến đã được công bố gây bệnh trên gen ATP7B**

Mã số	Đột biến	Dạng đột biến	Thể đột biến	Chú thích	Số alen	Tuổi khởi phát (tuổi)	Ceruloplasmिन huyết thanh (mg/dl)	Đồng niệu 24 giờ (μg)	ALT huyết thanh (U/l)	AST huyết thanh (U/l)	MRI sọ não	Thể lâm sàng
W1.00	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV	2	12	10	426	112	78	ND	H
W3.00	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV	2	18	7	473	280	314	ND	H
W6.00	p.L1371P	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	21	17	198	31	39	+	N2
	p.T850I	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W8.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	20	17	312	367	412	ND	H
	c.-118insCGCCG		Dị hợp	new								
W9.00	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV	2	8	9	501	97	53	ND	H
W10.00	p.A604P	Sai nghĩa	Đồng hợp	DV	2	11	8,9	432	34	28	+	N2
W12.00	p.V536A	Sai nghĩa	Đồng hợp	DV	2	16	14	347	31	26	+	N2
W13.00	c.-75C>A		Dị hợp	DV	2	13	16	213	24	32	+	N2
	c.-118insCGCCG		Dị hợp	new								
W17.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	2	9	12	359	439,8	143	ND	H
W18.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	3	20	11	549	23	26	+	N2
	p.G1099S	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W19.00	p.W939C	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	20	11	362	213	138	ND	H
	p.C980S	Sai nghĩa	Dị hợp	new								
W21.00	p.T850I	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	3	9	17	527	81	34	ND	H
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV								
W23.00	p.G943D	Sai nghĩa	Đồng hợp	DV	3	17	9	527	81	34	ND	H
	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W24.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	3	7	11	1231	231	167	ND	H
	p.P1273Q	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								

**Chú thích:** *New*: Đột biến mới; *DV*: Disease Variant (đột biến gây bệnh); *ND* (No Data): không có dữ liệu; "+": Có tổn thương;

*H*: Thể gan; *N1*: Thể gan - thần kinh; *N2*: Thể thần kinh. Bệnh nhân mang 1 đột biến dị hợp có 1 alen; mang 1 đột biến đồng hợp có 2 alen; mang 1 đột biến đồng hợp và 1 đột biến dị hợp có 3 alen; mang 2 đột biến dị hợp có 2 alen; mang 2 đột biến đồng hợp có 4 alen.



Mã số	Đột biến	Dạng đột biến	Thể đột biến	Chú thích	Số alen	Tuổi khởi phát (tuổi)	Ceruloplasmic huyết thanh (mg/dl)	Đồng niệu 24 giờ (µg)	ALT huyết thanh (U/l)	AST huyết thanh (U/l)	MRI sọ não	Thể lâm sàng
W25.00	p.A1065P	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	10	15	310	97,1	115,9	ND	H
	c.-75C>A		Dị hợp	DV								
W29.00	p.G591S	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	12	12	286	31	24	+	N2
	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W30.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	4	11	2,5	987	115	98	+	N1
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV								
W31.00	p.G1213D	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	10	8,9	572	112,3	70,4	+	N1
	p.N1270ifsX35	Lệch khung	Dị hợp	new								
W33.00	c.-75C>A		Dị hợp	DV	3	15	9	1825	29	34	+	N2
	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV								
	p.V536A	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W37.00	p.P1273Q	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	12	16	189	34	29	+	N2
	p.E905X	Vô nghĩa	Dị hợp	new								
W38.00	p.P1273Q	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	19	13	270	25	31	+	N2
	p.G50S	Sai nghĩa	Dị hợp	new								
W40.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	4	7	3	1228	23	31	+	N2
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV								
W42.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	1	15	9	412	78	86	+	N1
	c.-75C>A		Đồng hợp	DV								
W43.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	4	7	4	1231	27	33	+	N2
	p.G591S	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W44.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	2	4	9	765	26	29	+	N2
W47.00	p.K720NfsX3	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	1	13	10	402	23	34	+	N2
W48.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	3	12	13	430	35	31	+	N2
	p.P1133EfsX19	Lệch khung	Dị hợp	new								

**Chú thích:** *New*: Đột biến mới; *DV*: Disease Variant (đột biến gây bệnh); *ND* (No Data): không có dữ liệu; "+": Có tổn thương;

*H*: Thể gan; *N1*: Thể gan - thận kinh; *N2*: Thể thận kinh. Bệnh nhân mang 1 đột biến dị hợp có 1 alen; mang 1 đột biến đồng hợp có 2 alen; mang 1 đột biến đồng hợp và 1 đột biến dị hợp có 3 alen; mang 2 đột biến dị hợp có 2 alen; mang 2 đột biến đồng hợp có 4 alen.

Mã số	Đột biến	Dạng đột biến	Thể đột biến	Chú thích	Số alen	Tuổi khởi phát (tuổi)	Ceruloplasmic huyết thanh (mg/dl)	Đồng niệu 24 giờ ( $\mu\text{g}$ )	ALT huyết thanh (U/l)	AST huyết thanh (U/l)	MRI sọ não	Thể lâm sàng
W49.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	4	9	5	1879	21	34	+	N2
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV								
W50.00	p.P1052L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	16	14	173	32	28	+	N2
	p.T1033I	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W51.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	14	16	231	35	32	+	N2
	p.V446G	Sai nghĩa	Dị hợp	new								
W52.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	25	14	157	69	34	+	N1
	p.L902P	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W53.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	4	15	8	886	49	73	+	N1
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV								
W54.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	40	15	271	88	136	+	N1
	p.V536A	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W55.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	1	7	12	379	49,9	104	ND	H
W56.00	p.A604P	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	3	13	17	369	30	28,6	+	N2
	p.V536A	Sai nghĩa	Đồng hợp	DV								
W57.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	1	16	10	315	134	217	ND	H
W58.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	2	9	6,2	832	54,1	63,2	+	N1
	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W59.00	p.A604P	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	22	10	406	48	79	ND	H
	p.A1183T	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W60.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	4	7	5	1657	70	103	+	N1
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV								
W61.00	c.-75C>A		Đồng hợp	DV	4	8	2,2	1513	64	70	+	N1
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV								

**Chú thích:** New: Đột biến mới; DV: Disease Variant (đột biến gây bệnh); ND (No Data): không có dữ liệu; "+": Có tổn thương;

H: Thể gan; N1: Thể gan - thần kinh; N2: Thể thần kinh. Bệnh nhân mang 1 đột biến dị hợp có 1 alen; mang 1 đột biến đồng hợp có 2 alen; mang 1 đột biến đồng hợp và 1 đột biến dị hợp có 3 alen; mang 2 đột biến dị hợp có 2 alen; mang 2 đột biến đồng hợp có 4 alen.

Mã số	Đột biến	Dạng đột biến	Thể đột biến	Chú thích	Số alen	Tuổi khởi phát (tuổi)	Ceruloplasmिन huyết thanh (mg/dl)	Đồng niệu 24 giờ ( $\mu\text{g}$ )	ALT huyết thanh (U/l)	AST huyết thanh (U/l)	MRI sọ não	Thể lâm sàng
W62.00	p. V536A	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	12	9	564	119,5	54,3	+	N1
	p. R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV								
W64.00	p. S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	1	42	12	313	68	35	+	N1
W65.00	p. S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	DV	2	14	8	461	32	31	+	N2
W66.00	p. R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	DV	2	13	13	396	28	36	+	N2
	c. -75C>A		Dị hợp	DV								

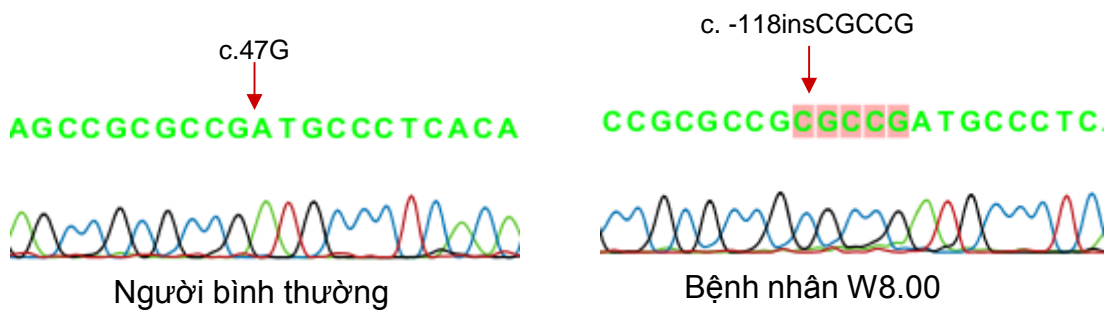
**Chú thích:** *New:* Đột biến mới; *DV:* Disease Variant (đột biến gây bệnh); *ND (No Data):* không có dữ liệu; "+": Có tổn thương; *H:* Thể gan; *N1:* Thể gan - thần kinh; *N2:* Thể thần kinh. Bệnh nhân mang 1 đột biến dị hợp có 1 alen; mang 1 đột biến đồng hợp có 2 alen; mang 1 đột biến đồng hợp và 1 đột biến dị hợp có 3 alen; mang 2 đột biến dị hợp có 2 alen; mang 2 đột biến đồng hợp có 4 alen.

*Nhận xét:* Bảng trên cho thấy, bệnh chủ yếu khởi phát ở bệnh nhân dưới 20 tuổi; Tất cả bệnh nhân có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh giảm dưới 20mg/dl và có nồng độ đồng niệu 24 giờ tăng trên 100 $\mu\text{g}$ . Các bệnh nhân thể gan đơn thuần và thể gan - thần kinh đều tăng transamin huyết thanh (ALT và AST). Các bệnh nhân thể thần kinh đơn thuần hoặc thể gan-thần kinh đều có tổn thương trên phim MRI sọ não. Hầu hết các bệnh nhân đều có từ 2 đến 4 đột biến trên gen *ATP7B* bao gồm các đột biến đồng hợp tử, đột biến đồng hợp tử kết hợp với đột biến dị hợp tử hoặc các đột biến dị hợp tử kết hợp, tổng cộng là 39/44 trường hợp (chiếm 88,64%). Tuy nhiên, có 5 bệnh nhân (11,36%) chỉ có 1 đột biến dị hợp tử, trong đó 4 bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm (3 bệnh nhân có đột biến p.S105X, 1 bệnh nhân có đột biến p.K720NfsX3) và 1 bệnh nhân có đột biến thay thế nucleotid (p.R778L).

### 3.2.3 Các dạng đột biến gen *ATP7B* ở bệnh nhân Wilson

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 3 dạng đột biến hay gặp nhất là đột biến tạo mã kết thúc sớm c.314C>A (p.S105X) trên exon 2; đột biến sai nghĩa c.2333G>T (p.R778L) trên exon 8; đột biến (c.-75C>A) ở vùng 5'UTR. Nghiên cứu phát hiện được 7 đột biến mới bao gồm: c.-118insCGCCG, c.305G>A (p.G50S); c.1336T>G (p.V446G); c.2712\_2713 insT (p.E905X); c.2939G>C (p.C980S); c.3399\_3400insT (p.P1133EfsX19); c.3810delT (p.N1270IfsX35) (bảng 3.10).

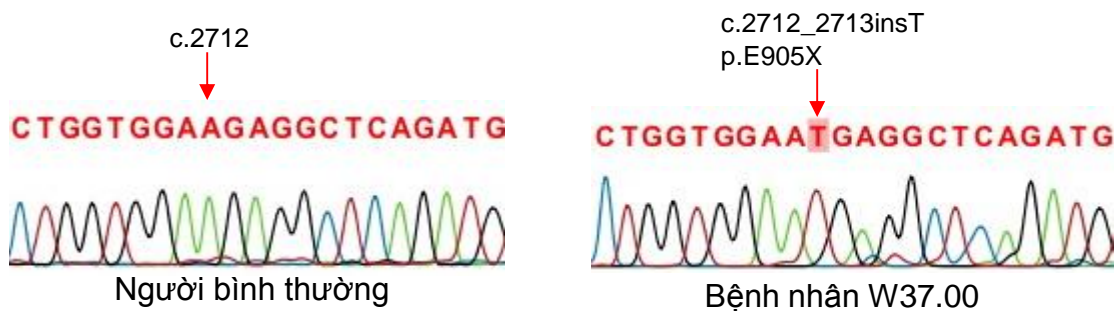
#### Hình ảnh minh họa bệnh nhân có đột biến mới ở vùng 5'UTR



**Hình 3.5. Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W8.00**

*Nhận xét:* Hình 3.5 là hình ảnh minh họa một trường hợp bệnh nhân mã số W8.00 có đột biến c.-118insCGCCG ở exon 1 trên gen *ATP7B*. Kết quả trên cho thấy bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử thêm 5 nucleotid CGCCG nằm ở vị trí -118 trước mã khởi đầu Methionine.

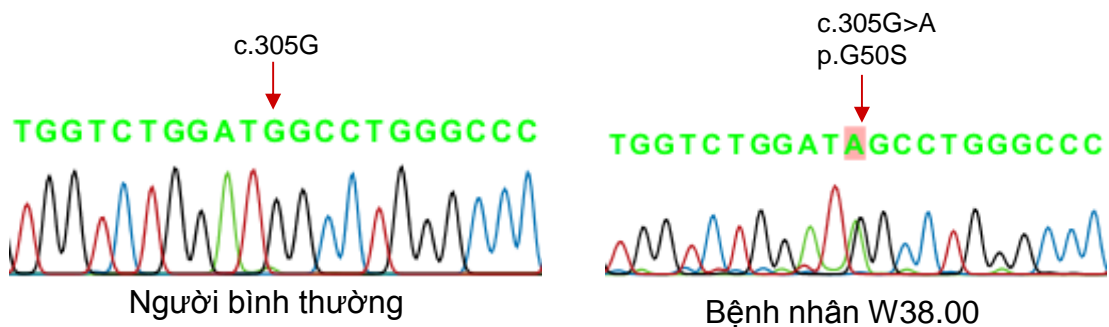
#### Hình ảnh minh họa bệnh nhân có đột biến mới thêm nucleotid



**Hình 3.6. Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W37.00**

*Nhận xét:* Hình 3.6 là hình ảnh minh họa một trường hợp bệnh nhân mã số W37.00 có đột biến c.2712-2713insT (p.E905X) ở exon 11 trên gen *ATP7B*. Kết quả trên cho thấy bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử thêm nucleotid T nằm giữa vị trí 2712-2713, dẫn đến bộ ba thứ 905 GAG mã hóa Glutamate (E) chuyển thành bộ ba kết thúc TGA (X).

**Hình ảnh minh họa bệnh nhân có đột biến mới sai nghĩa**



**Hình 3.7. Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W38.00**

*Nhận xét:* Hình 3.7 là hình ảnh minh họa một trường hợp bệnh nhân mã số W38.00 có đột biến (c.305G>A) tại exon 2. Kết quả trên cho thấy bệnh nhân có đột biến dị hợp tử G thay thế thành A, dẫn đến bộ ba thứ 50 GGC mã hóa Glycine (G) chuyển thành bộ ba AGC mã hóa Serine (S).

**3.3. Mối tương quan giữa đột biến gen *ATP7B* và kiểu hình của bệnh Wilson**

**3.3.1. Mối tương quan giữa số alen đột biến và kiểu hình ở bệnh nhân Wilson**

**3.3.1.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và số alen đột biến**

Kết quả từ bảng 3.11 cho thấy bệnh nhân có số alen đột biến khác nhau: có bệnh nhân mang 1 alen đột biến (có 1 đột biến dị hợp); có bệnh nhân mang 2 alen đột biến (có 2 đột biến dị hợp hoặc 1 đột biến đồng hợp); có bệnh nhân mang 3 alen đột biến (có 3 đột biến dị hợp hoặc 1 đột biến đồng hợp và 1 đột biến dị hợp) và có bệnh nhân mang 4 alen đột biến (có 2 đột biến đồng hợp hoặc 1 đột biến đồng hợp và 2 đột biến dị hợp). Số alen đột biến khác nhau có thể ảnh hưởng đến kiểu hình của bệnh Wilson.

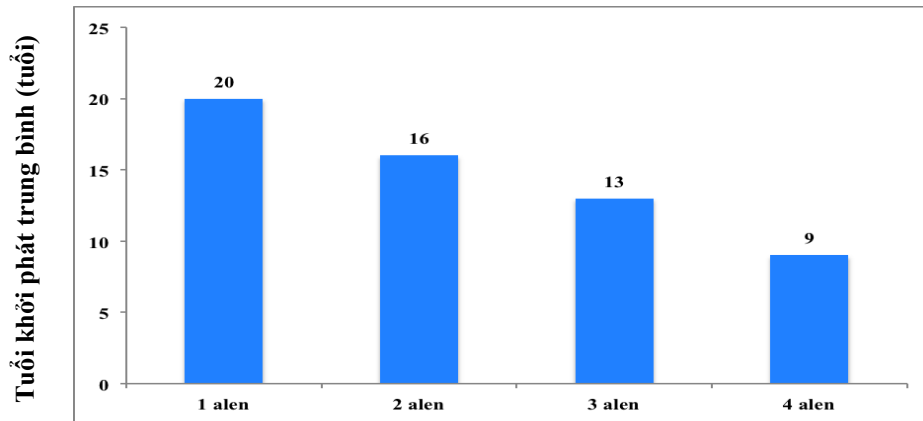
Chúng tôi tiến hành phân tích mối tương quan giữa số alen đột biến và kiểu hình của 44 bệnh nhân mang đột biến, chia thành 4 nhóm: nhóm 1 gồm 5 bệnh nhân mang 1 alen đột biến; nhóm 2 gồm 25 bệnh nhân mang 2 alen đột biến; nhóm 3 gồm 7 bệnh nhân mang 3 alen đột biến và nhóm 4 gồm 7 bệnh nhân mang 4 alen đột biến (bảng 3.12).

**Bảng 3.12. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và số alen đột biến**

Số alen đột biến	Chỉ số	Ceruloplasmin (mg/dl)	Tuổi khởi phát (tuổi)	Đồng niệu 24 giờ ( $\mu\text{g}$ )
<b>1</b>	Số bệnh nhân	5	5	5
	Độ lệch chuẩn	1,0	13,39	39,354
	Trung bình	11,0	20	354,20
<b>2</b>	Số bệnh nhân	25	25	25
	Độ lệch chuẩn	3.305	6,776	156.726
	Trung bình	12,16	16	359,68
<b>3</b>	Số bệnh nhân	7	7	7
	Độ lệch chuẩn	3,298	5,080	531,740
	Trung bình	10,76	13	813,71
<b>4</b>	Số bệnh nhân	7	7	7
	Độ lệch chuẩn	2,003	2,968	359,605
	Trung bình	4,24	9	1340,14
<b>Tổng</b>	Số bệnh nhân	44	44	44
	Độ lệch chuẩn	4,035	7,471	456,516
	Trung bình	10,55	15	587,27

*Nhận xét:* Nồng độ ceruloplasmin và tuổi khởi phát trung bình thấp ở nhóm mang nhiều alen đột biến. Nồng độ đồng trong nước tiểu 24 giờ trung bình cao hơn ở nhóm mang nhiều alen đột biến.

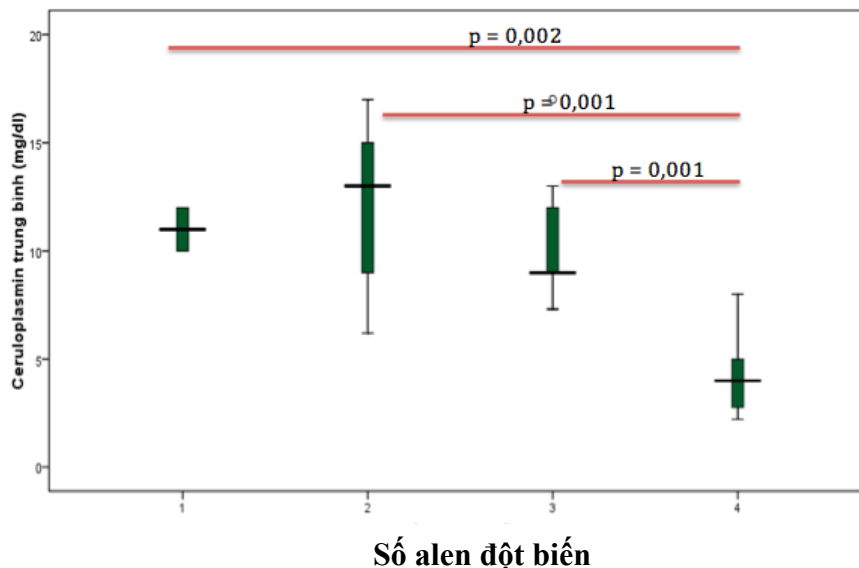
### 3.3.1.2. Mối tương quan giữa tuổi khởi phát và số alen đột biến



**Hình 3.8. Phân bố tuổi khởi phát và số alen đột biến**

*Nhận xét:* Tuổi khởi phát trung bình giảm khi số alen đột biến tăng. Nhóm mang 4 alen đột biến có tuổi khởi phát sớm nhất. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các nhóm ( $p > 0,05$ ).

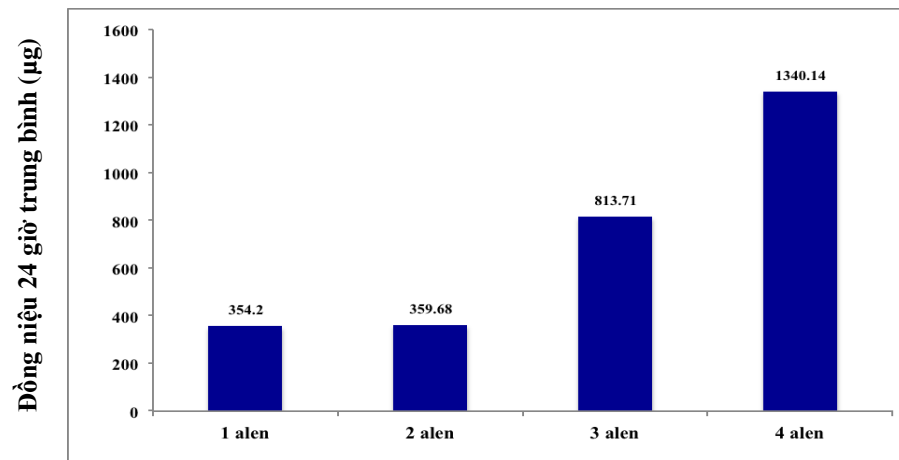
### 3.3.1.3. Mối tương quan giữa nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và số alen đột biến



**Hình 3.9. Phân bố nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và số alen đột biến**

*Nhận xét:* Nhóm bệnh nhân mang 4 alen đột biến có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh trung bình thấp nhất với  $p < 0,05$  khi so sánh với các nhóm bệnh nhân mang 1, 2 và 3 alen đột biến.

### 3.3.1.4. Mối tương quan giữa nồng độ đồng niệu 24 giờ và số alen đột biến



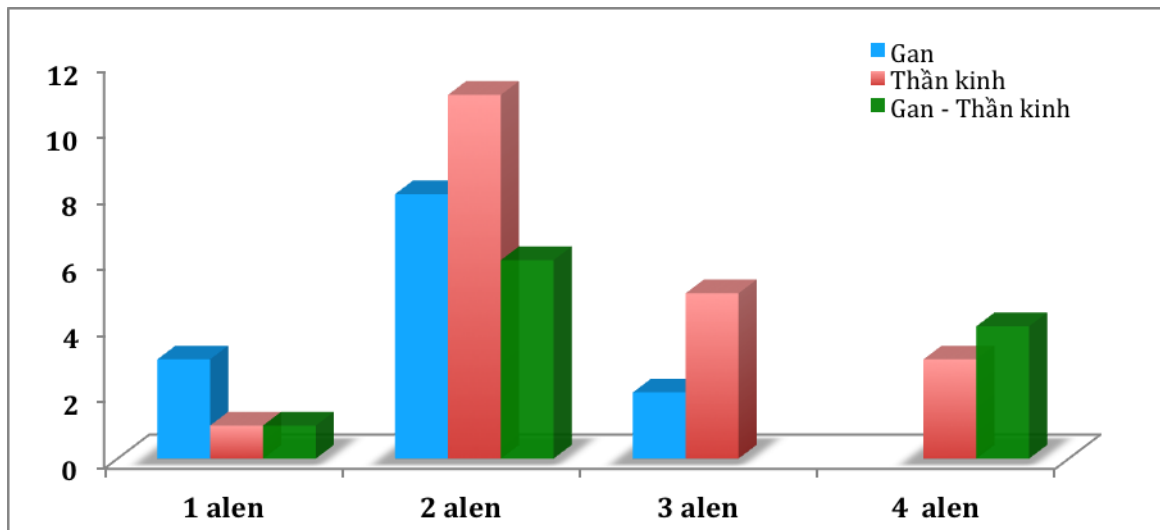
**Hình 3.10. Phân bố nồng độ đồng niệu 24 giờ và số alen đột biến**

*Nhận xét:* Số lượng alen đột biến càng nhiều thì đồng niệu 24 giờ càng tăng cao. Nhóm bệnh nhân mang 4 alen đột biến có hàm lượng đồng trong nước tiểu cao nhất, nhóm mang 1 alen đột biến có hàm lượng đồng thấp nhất. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  khi so sánh các nhóm mang số alen đột biến khác nhau.

### 1.3.1.5. Mối tương quan giữa thể lâm sàng và số alen đột biến

Bệnh Wilson là bệnh rối loạn chuyển hóa với biểu hiện bệnh ở nhiều cơ quan khác nhau do sự lắng đọng đồng. Bệnh thường biểu hiện sớm và triệu chứng nhẹ khi chỉ có tổn thương gan đơn thuần. Thể thần kinh đơn thuần ít gặp hơn với các triệu chứng nhẹ ở giai đoạn sớm. Thể hỗn hợp gan - thần kinh, thể suy gan tối cấp và giai đoạn muộn của thể thần kinh là thể nặng của bệnh. Bệnh nhân có thể tử vong trong giai đoạn suy gan tối cấp. Thể hỗn hợp gan - thần kinh với biểu hiện xơ gan và các triệu chứng thần kinh không hồi phục. Bệnh nhân mang số alen khác nhau có thể biểu hiện thể lâm sàng khác nhau.





**Hình 3.11. Phân bố thể lâm sàng và số alen đột biến**

*Nhận xét:* Thể hỗn hợp gan - thần kinh gặp ở nhóm bệnh nhân mang 1 alen, 2 alen và 4 alen đột biến. Trong đó nhóm mang 4 alen đột biến có tỷ lệ bệnh nhân thể hỗn hợp cao nhất và không có bệnh nhân thể gan đơn thuần.

Tính chỉ số tương quan  $r$  bằng phương pháp Kendall giữa các nhóm mang số alen đột biến khác nhau và thể lâm sàng.

**Bảng 3.13. Chỉ số tương quan giữa các thể lâm sàng và số alen đột biến**

Số alen đột biến/ Thể lâm sàng	$r$	$p$
Số alen đột biến - Thể thần kinh	- 0,12	0,89
Số alen đột biến - Thể gan	- 0,02	0,12
Số alen đột biến - Thể gan - Thần kinh	0,17	0,32

*Nhận xét:* Tất cả các chỉ số tương quan  $r$  giữa các thể lâm sàng và số alen đột biến đều thấp (mối tương quan yếu và không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ ).

### 3.3.2. *Mối tương quan giữa dạng đột biến và kiểu hình bệnh Wilson*

#### 3.3.2.1. *Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và dạng đột biến*

Trong số 60 bệnh nhân được phân tích gen đã phát hiện 44 bệnh nhân mang đột biến đã được công bố gây bệnh (một số bệnh nhân có đột biến mới kết hợp). Vì bệnh Wilson là bệnh rối loạn chuyển hóa di truyền nên các bệnh nhân mang các dạng đột biến gen khác nhau và số alen đột biến khác nhau có thể biểu hiện kiểu hình khác nhau.

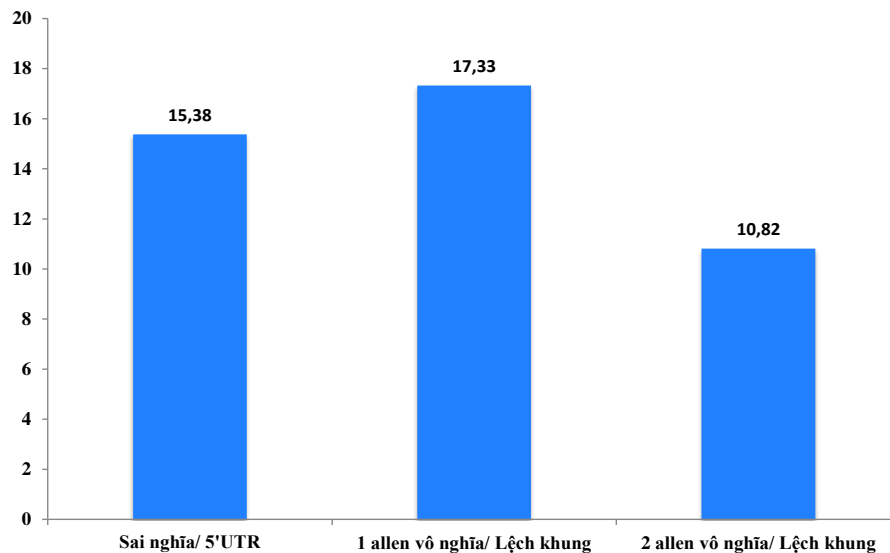
Nghiên cứu tiến hành phân tích mối tương quan giữa các dạng đột biến và kiểu hình của 44 bệnh nhân, chia thành 3 nhóm: nhóm 1 có 23 bệnh nhân không mang alen đột biến vô nghĩa/lệch khung (chỉ mang đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR), nhóm 2 có 10 bệnh nhân mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và nhóm 3 có 11 bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung (bảng 3.14).

**Bảng 3.14. *Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và dạng đột biến***

<b>Dạng đột biến</b>	<b>Chỉ số</b>	<b>Ceruloplasmin (mg/dl)</b>	<b>Tuổi khởi phát (tuổi)</b>	<b>Đồng niệu 24 giờ (µg)</b>
<b>Sai nghĩa/ Vùng 5'UTR</b>	Số bệnh nhân	23	23	23
	Độ lệch chuẩn	2,943	15,38	390,17
	Trung bình	12,92	20	354,20
<b>1 alen vô nghĩa/lệch khung</b>	Số bệnh nhân	10	10	10
	Độ lệch chuẩn	2,977	10,161	545,389
	Trung bình	9,47	17,33	654,78
<b>2 alen vô nghĩa/lệch khung</b>	Số bệnh nhân	11	11	11
	Độ lệch chuẩn	2,819	3,601	533,546
	Trung bình	6,24	10,82	962,09
<b>Tổng</b>	Số bệnh nhân	44	44	44
	Độ lệch chuẩn	4,035	7,471	456,516
	Trung bình	10,55	14,64	587,27

*Nhận xét:* Tuổi khởi phát và nồng độ ceruloplasmin huyết thanh trung bình ở nhóm bệnh nhân mang đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung thấp hơn nhóm mang đột biến khác (sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR) và nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có tuổi khởi phát và nồng độ ceruloplasmin thấp hơn nhóm mang 1 alen. Hàm lượng đồng trung bình trong nước tiểu 24 giờ cao hơn ở nhóm mang alen đột biến vô nghĩa/lệch khung, và nhóm mang 2 alen đột biến có hàm lượng đồng cao hơn nhóm mang 1 alen.

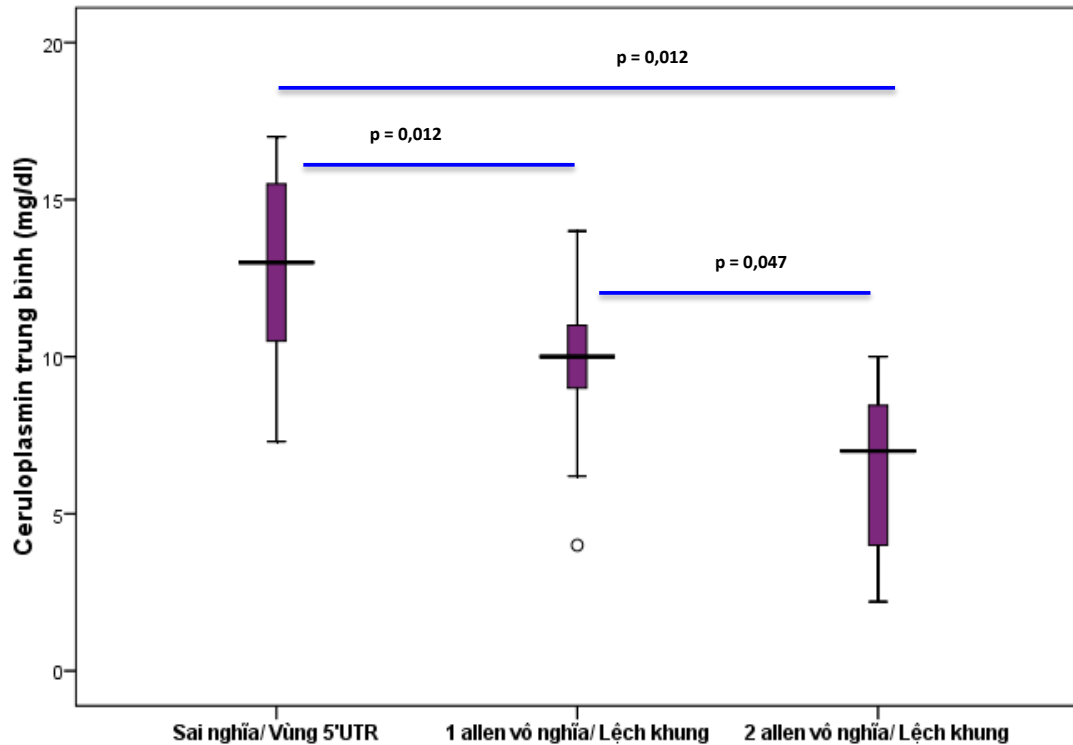
### 3.3.2.2. *Mối tương quan giữa tuổi khởi phát và dạng đột biến*



**Hình 3.12. Phân bố tuổi khởi phát và dạng đột biến**

*Nhận xét:* Tuổi khởi phát trung bình của nhóm mang 2 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung thấp hơn nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và nhóm mang các alen đột biến khác. Sự khác biệt giữa các nhóm không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

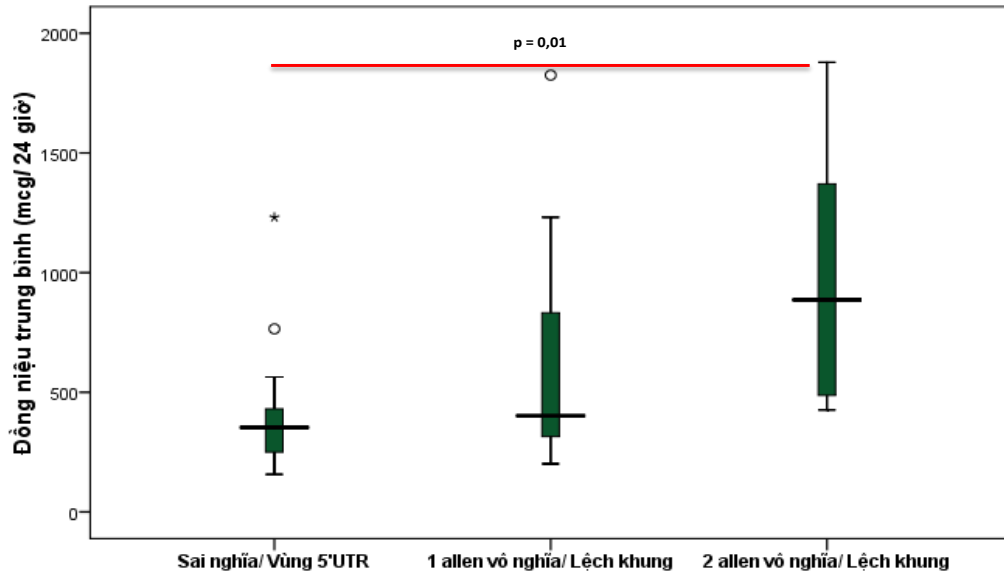
### 3.3.2.3. Mối tương quan giữa nồng độ ceruloplasmin và dạng đột biến



**Hình 3.13. Phân bố nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và dạng đột biến**

*Nhận xét:* Nồng độ ceruloplasmin huyết thanh trung bình ở nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung thấp nhất, tiếp theo là nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và nhóm đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5' UTR. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các nhóm mang đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung với nhóm mang dạng đột biến khác và khi so sánh nhóm mang 1 alen đột biến với 2 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung ( $p < 0,05$ ).

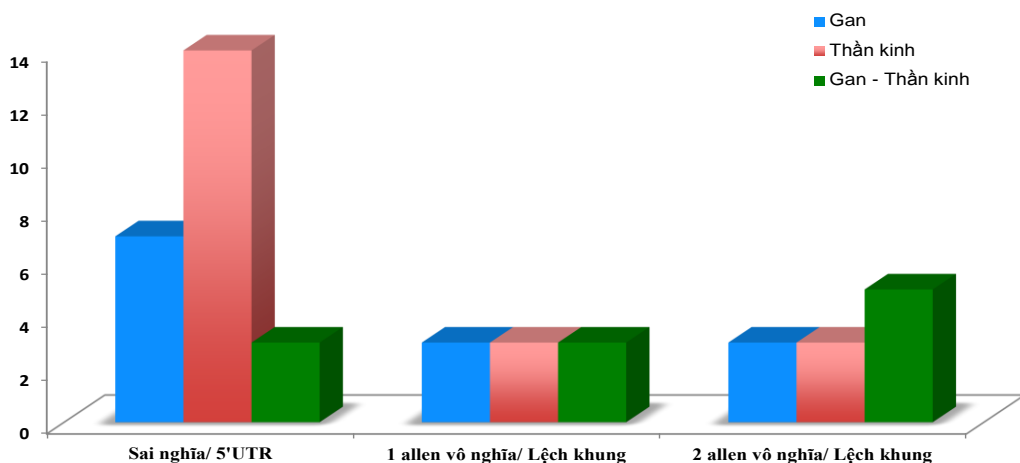
### 3.3.2.4. Mối tương quan giữa đồng trong nước tiểu 24 giờ và dạng đột biến



**Hình 3.14. Phân bố đồng niệu 24 giờ và dạng đột biến**

*Nhận xét:* Hàm lượng đồng trong nước tiểu 24 giờ ở nhóm mang alen đột biến dạng vô nghĩa/lềch khung cao hơn nhóm mang các alen đột biến khác. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê giữa nhóm mang 2 alen đột biến dạng vô nghĩa/lềch khung và nhóm mang alen đột biến khác ( $p = 0,01$ ).

### 3.3.2.5. Mối tương quan giữa các thể lâm sàng và dạng đột biến



**Hình 3.15. Phân bố dạng đột biến và thể lâm sàng của bệnh Wilson**

*Nhận xét:* Nhóm mang 2 alen đột biến dạng vô nghĩa/lềch khung có tỷ lệ bệnh thể hỗn hợp gan - thần kinh cao nhất. Nhóm mang các alen đột biến khác có tỷ lệ bệnh thể gan và thể thần kinh đơn thuần cao hơn.

**Bảng 3.15. Chỉ số tương quan giữa các thể lâm sàng và dạng đột biến**

<b>Dạng đột biến/ Thể lâm sàng</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Dạng đột biến - Thể thần kinh	- 0,19	0,21
Dạng đột biến - Thể gan	0,01	0,25
Dạng đột biến - Thể gan - Thần kinh	0,73	0,03

*Nhận xét:* Các chỉ số tương quan giữa các thể thần kinh, thể gan đơn thuần và dạng đột biến đều rất thấp và không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ . Dạng đột biến có mối tương quan thuận mức độ cao có ý nghĩa thống kê với thể hỗn hợp gan - thần kinh ( $r = 0,73$  và  $p = 0,03$ ).

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh Wilson

##### 4.1.1. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh Wilson

###### 4.1.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi khởi phát

Hầu hết các bệnh nhân vào viện đều có thời gian mắc bệnh dài vì đã được điều trị ở các cơ sở y tế trước đó không rõ chẩn đoán. Tuổi khởi phát bệnh được tính bằng tuổi lúc nhập viện trừ đi thời gian mắc bệnh.

Nghiên cứu của Lê Đức Hình, tuổi khởi phát bệnh trung bình là 12,6 tuổi, nhỏ nhất là 8 tuổi, lớn nhất là 28 tuổi, lứa tuổi hay gặp nhất là 10 - 15 tuổi [2].

Một nghiên cứu ở Đức cho thấy tuổi khởi phát trung bình của nhóm bệnh nhân Wilson là 15,5 tuổi [23].

Nghiên cứu 307 bệnh nhân Wilson ở Ấn Độ cho thấy tuổi khởi phát trung bình là 13,5 tuổi (thấp nhất là 3 tuổi, cao nhất là 44 tuổi) [95].

Nghiên cứu 75 bệnh nhân Wilson tại Trung Quốc của Liu và cộng sự năm 2004, cho thấy tuổi khởi phát từ 4 tuổi đến 39 tuổi, trong đó 72/75 trường hợp dưới 18 tuổi [70].

Theo y văn, bệnh Wilson thường gặp ở người trẻ, ở độ tuổi dao động 5 - 40 tuổi, hiếm gặp dưới 3 tuổi và sau 70 tuổi [24].

Nghiên cứu của chúng tôi gồm 60 bệnh nhân, tuổi khởi phát sớm nhất là 3 tuổi, muộn nhất là 53 tuổi. Tuổi trung bình là 16,3 tuổi. Kết quả từ bảng 3.1, thấy rằng nhóm bệnh nhân dưới 20 tuổi chiếm 68,4%, trong đó nhóm tuổi 10 - 19 chiếm tỷ lệ cao nhất (51,7%).

Như vậy, bệnh Wilson là bệnh rối loạn chuyển hóa di truyền thường khởi bệnh ở trẻ em và người trẻ.

#### 4.1.1.2. Phân bố bệnh nhân theo giới

Trong số 60 bệnh nhân của chúng tôi, có 55% bệnh nhân nam và 45% bệnh nhân nữ (tỷ lệ nam/nữ là 1,23) (hình 3.1).

Nghiên cứu của Lê Đức Hình, tỷ lệ nam/nữ là 1,3 [2]. Nghiên cứu tại Ấn Độ cho kết quả, tỷ lệ nam/ nữ là 2,2 (211 bệnh nhân nam và 96 bệnh nhân nữ) [95]. Tác giả Xiao - Qing Liu và cộng sự nghiên cứu 75 bệnh nhân Wilson gồm 44 bệnh nhân nam và 31 bệnh nhân nữ [70].

So sánh với các nghiên cứu trên thì nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự, bệnh nhân nam mắc bệnh nhiều hơn bệnh nhân nữ ( $p < 0,01$ ). Tuy nhiên, tỷ lệ này chênh lệch không nhiều có thể do cỡ mẫu chưa đủ lớn hoặc do sự mất cân bằng giới tính trong dân số (trẻ trai mới sinh nhiều hơn trẻ gái). Thực chất có thể là tỷ lệ giữa bệnh nhân nam và bệnh nhân nữ bằng nhau vì bệnh Wilson do đột biến gen lặn trên nhiễm sắc thể thường.

#### 4.1.1.3. Các triệu chứng lâm sàng ở giai đoạn khởi phát

Theo y văn Thế giới, triệu chứng lâm sàng ở giai đoạn khởi phát thường là các biểu hiện vàng da, chán ăn, tăng trương lực cơ vùng môi, miệng, lưỡi, hầu làm cho bệnh nhân nói khó, nuốt khó cùng với các động tác ngoại tháp. Tăng nhẹ trương lực cơ và run tay ở giai đoạn khởi phát làm cho bệnh nhân viết chữ xấu, bàn tay vụng về. Số ít các trường hợp có thể biểu hiện viêm gan tối cấp bùng phát, tiên lượng bệnh rất nặng và có chỉ định ghép gan để cứu sống bệnh nhân [26].

Kết quả nghiên cứu của Lê Đức Hình và Đỗ Thanh Hương đều thấy rằng phần lớn các triệu chứng ở giai đoạn khởi phát là tăng nhẹ trương lực cơ và run tay, nói khó, nuốt khó. Như vậy, các triệu chứng chính của nhóm bệnh nhân này chủ yếu là các triệu chứng thần kinh, có thể do cả 2 nhóm bệnh nhân này được nghiên cứu ở khoa Thần kinh Bệnh viện Bạch Mai [3],[4].



Nghiên cứu 126 bệnh nhân ở Bungary năm 2012 thấy rằng 66,7% các trường hợp xuất hiện triệu chứng thần kinh trong giai đoạn khởi phát: triệu chứng phổ biến nhất là run, sau đó là nói khó [83].

Nghiên cứu của chúng tôi gồm 60 bệnh nhân điều trị ở nhiều chuyên khoa tại Bệnh viện Bạch Mai và Bệnh viện Nhi Trung ương với các triệu chứng đa dạng. Ở bảng 3.2 cho thấy run tay là triệu chứng hay gặp nhất (chiếm 65%), run với biên độ nhỏ, tăng khi nghỉ ngơi, giảm khi vận động cùng với tăng nhẹ trương lực cơ làm cho các động tác của chi trên trở nên vụng về, viết chữ xấu. Ngoài ra có thể gặp các triệu chứng ngoại tháp khác và vàng da. Giai đoạn này hầu hết các bệnh nhân chưa đến khám ở các cơ sở y tế cho đến khi các triệu chứng run tay rõ kèm theo nói khó, nuốt khó, đi đứng khó khăn được chẩn đoán hội chứng Parkinson hoặc viêm gan chưa rõ nguyên nhân, được uống thuốc điều trị triệu chứng hoặc điều trị đông y châm cứu.

Như vậy, các triệu chứng ở giai đoạn khởi phát thường biểu hiện kín đáo bằng run tay, nói khó. Các bệnh nhân này hay bị bỏ sót chẩn đoán hoặc chẩn đoán nhầm cho nên phần lớn các bệnh nhân không được điều trị đúng ở giai đoạn này.

#### *4.1.1.4. Các triệu chứng lâm sàng ở giai đoạn toàn phát*

Ở giai đoạn toàn phát, các triệu chứng thần kinh rất đa dạng và phong phú, nổi bật là rối loạn trương lực cơ và các động tác bất thường. Tăng trương lực cơ lan tỏa kiểu ngoại tháp thấy rõ ở các cơ mặt, cơ phát âm, cơ vùng cổ và thất lưng. Cổ điển mô tả “bộ mặt Wilson” với đặc điểm bất động mặt - miệng - hầu. Bệnh nhân thường nói khó, nuốt khó, chảy nước dãi, đi đứng khó khăn. Có các động tác bất thường bao gồm run, múa vờn, múa giật, các cơn rối loạn trương lực cơ vận, động tác định hình. Những cơn co vận ở bệnh nhi gây đau và dễ nhầm chẩn đoán bại não cơ cứng ở trẻ em [1].

Nghiên cứu của Lê Đức Hình cho thấy triệu chứng hay gặp ở giai đoạn toàn phát là tăng trương lực cơ kiểu ngoại tháp tứ chi (91,6%), nói khó (66,6%), nuốt khó (46,6%), run ngón chi (45%) [3].

Nghiên cứu của Liu và cộng sự (Trung Quốc) cho 75 bệnh nhân Wilson có 32% biểu hiện tăng trương lực cơ kèm run ngón chi, nói khó, nuốt khó, các chứng loạn động [70].

Nghiên cứu năm 2012 tại Ai Cập cho đưa ra kết luận: các triệu chứng thần kinh phổ biến nhất của bệnh nhân Wilson là run và nói khó [80].

Nghiên cứu khác ở bệnh nhân Wilson Ấn Độ có các triệu chứng thần kinh hay gặp nhất là run, sau đó là nói khó, rối loạn dáng đi, tăng trương lực cơ và chảy nước dãi [95].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ở bảng 3.3 cũng thấy rằng các triệu chứng thần kinh hay gặp ở giai đoạn toàn phát là tăng trương lực cơ tứ chi (chiếm tỷ lệ 68,3%), nói khó (61,7%), nuốt khó (58,3%). Các triệu chứng ít gặp hơn là: run tay, chảy nước dãi.

Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự các nghiên cứu trước đó với các triệu chứng thần kinh ở giai đoạn toàn phát hay gặp là tăng trương lực cơ kiểu ngoại tháp tứ chi, nói khó, nuốt khó.

Rối loạn tâm thần không phải là triệu chứng phổ biến của bệnh Wilson nhưng cũng có trường hợp chẩn đoán nhầm được điều trị ở chuyên khoa tâm thần. Các triệu chứng rối loạn cảm xúc và khí sắc, suy giảm tư duy, suy giảm trí nhớ, có khi kèm theo cơn kích động, loạn thần, rối loạn hành vi tác phong [3].

Nghiên cứu 75 bệnh nhân Wilson của Liu và cộng sự (Trung Quốc), có 4 trường hợp rối loạn hành vi tác phong kèm loạn thần [70].

Nghiên cứu của Prashanth cho 307 bệnh nhân Wilson cho thấy triệu chứng tâm thần hiếm gặp: 14/307 trường hợp có rối loạn hành vi, 6/307 suy giảm các hoạt động ở trường học [95].

Nghiên cứu 126 bệnh nhân Wilson ở Bungary chỉ có 15 bệnh nhân biểu hiện triệu chứng tâm thần, trong đó 7 bệnh nhân có biểu hiện trầm cảm; 6 bệnh nhân có biểu hiện giống tâm thần phân liệt [83].

Nghiên cứu 60 bệnh nhân của tác giả Lê Đức Hinh, 19 trường hợp có biểu hiện triệu chứng tâm thần (trong đó 5 trường hợp điều trị tại Bệnh viện Tâm thần trước khi vào khoa Thần kinh) [3].

Nghiên cứu của chúng tôi ở bảng 3.3 có 5/60 trường hợp rối loạn cảm xúc, 4/ 60 trường hợp biểu hiện suy giảm trí tuệ, suy giảm trí nhớ.

Như vậy, triệu chứng tâm thần ít gặp trong bệnh Wilson với các biểu hiện rối loạn cảm xúc, suy giảm trí nhớ, suy giảm tư duy tiến triển nặng dần có thể dẫn đến sa sút trí tuệ kèm theo các cơn kích động và loạn thần. Những biểu hiện này thường kèm theo các triệu chứng thần kinh và ở những gia đình bệnh nhân có tiền sử gia đình bị bệnh gan hoặc bệnh Wilson [26].

Triệu chứng tiêu hóa của bệnh Wilson thường xuất hiện rất sớm (khoảng 40% xuất hiện trước các triệu chứng thần kinh) nhưng hay bị bỏ sót chẩn đoán vì ban đầu có thể chỉ tăng enzym gan đơn thuần hoặc vàng da, vàng mắt, chảy máu chân răng, đi ngoài phân lỏng thoáng qua [26]. Đôi khi bệnh nhân thể gan - thần kinh đến khoa tiêu hóa trước khi đến khoa thần kinh với chẩn đoán viêm gan, gan - lách to hoặc xơ gan cổ trướng chưa rõ nguyên nhân.

Bệnh nhân Wilson thường biểu hiện triệu chứng về gan nhiều hơn triệu chứng về thần kinh ở nhóm dưới 10 tuổi, các triệu chứng thần kinh hay gặp hơn ở bệnh nhân sau 30 tuổi [1].

Nghiên cứu 60 bệnh nhân Wilson của tác giả Lê Đức Hình, có 11 trường hợp phát hiện gan to, 6 trường hợp lách to, 4 trường hợp đồng thời có gan to và lách to ở giai đoạn toàn phát [3].

Nghiên cứu khác ở Ấn Độ thấy rằng triệu chứng tiêu hóa hay gặp là vàng da, chướng bụng nhưng các triệu chứng này ít gặp hơn các triệu chứng thần kinh [95].

Nghiên cứu 60 bệnh nhân Wilson của chúng tôi với kết quả ở bảng 3.3 có 31/60 trường hợp vàng da, 13/60 trường hợp chảy máu chân răng và 7/60 trường hợp phù.

Như vậy, các triệu chứng tiêu hóa ở giai đoạn toàn phát trong nghiên cứu của chúng tôi cũng như của các tác giả trước khá phong phú. Triệu chứng tiêu hóa thường xuất hiện sớm hơn triệu chứng thần kinh. Tuy nhiên, với thể gan - thần kinh mà triệu chứng tiêu hóa chiếm ưu thế thường hay bị bỏ sót chẩn đoán. Do đó, với các triệu chứng tiêu hóa ở giai đoạn sớm của bệnh hoặc những bệnh nhân được chẩn đoán viêm gan mạn tính, gan lách to hoặc xơ gan cổ trướng không rõ nguyên nhân cần làm thêm các xét nghiệm loại trừ bệnh Wilson.

Vòng Kayser - Fleischer màu xanh nâu ở rìa giác mạc là triệu chứng điển hình hay gặp của bệnh Wilson, đục thủy tinh thể kiểu hoa hướng dương và giảm thị lực là triệu chứng hiếm gặp ở giai đoạn muộn của bệnh [27].

Nghiên cứu 75 bệnh nhân Wilson ở Trung Quốc của tác giả Xiao - Qing Liu, thấy 49 trường hợp có vòng Kayser - Fleischer (chiếm tỷ lệ 65%) [70].

Khám mắt bằng đèn khe cho 101 bệnh nhân Wilson trong nhóm nghiên cứu của Violeta phát hiện 80 bệnh nhân có vòng Kayser - Fleischer chiếm tỷ 79% [83].

Nghiên cứu của Lê Đức Hình, phát hiện 71,6% bệnh nhân Wilson có vòng Kayser - Fleischer, 25% đục thủy tinh thể kiểu hoa hướng dương [3].

Nghiên cứu của chúng tôi gồm 60 bệnh nhân, trong đó 32/60 trường hợp có vòng Kayser - Fleischer, 6/60 trường hợp đục thủy tinh thể kiểu hoa hướng dương, không có trường hợp nào giảm thị lực. Các bệnh nhân có vòng Kayser - Fleischer chủ yếu là thể thần kinh hoặc thể hỗn hợp gan - thần kinh (bảng 3.3).

Như vậy triệu chứng ở giai đoạn toàn phát rất đa dạng với các triệu chứng tổn thương tại não, gan, mắt và biểu hiện triệu chứng tâm thần. Do đó bệnh nhân có thể đến khám tại các chuyên khoa khác nhau.

#### 4.1.1.5. Tiền sử gia đình

Khi khai thác tiền sử gia đình của 60 bệnh nhân, chúng tôi thấy có 11 trường hợp có anh, chị, em ruột bị bệnh Wilson, 9 trường hợp bố mẹ bị bệnh Wilson, 7 trường hợp có cô, dì, chú, bác ruột bị bệnh Wilson, không có trường hợp nào bố mẹ cùng huyết thống (bảng 3.4).

Nghiên cứu 60 bệnh nhân của Lê Đức Hình, 6 trường hợp có anh, chị, em bị bệnh Wilson, 3 trường hợp viêm gan và 1 trường hợp bị suy yếu trí tuệ [3].

Nghiên cứu 83 bệnh nhân Wilson từ 72 gia đình và 98 người có quan hệ họ hàng với 11 bệnh nhân mang gen đột biến đồng hợp tại Úc, phát hiện 9 anh, chị, em ruột của bệnh nhân mang gen đột biến, 46 người có quan hệ họ hàng với bệnh nhân mang gen đột biến gây bệnh Wilson [96].

Nghiên cứu tại Ai Cập cho kết quả 75% bệnh nhân Wilson có bố mẹ cùng huyết thống [63].

Như vậy, các bệnh nhân bị bệnh Wilson có bố, mẹ, anh chị em ruột hoặc người trong dòng họ bị bệnh Wilson hoặc bố mẹ hôn nhân cùng huyết thống: điều này phù hợp với qui luật di truyền Mendel. Do vậy, khi khám các bệnh nhân nghi ngờ bị bệnh Wilson cần khai thác kỹ tiền sử gia đình và

chẩn đoán sớm cho các thành viên khác trong gia đình bệnh nhân giúp điều trị sớm cho họ.

#### **4.1.2. Một số đặc điểm cận lâm sàng của bệnh Wilson**

##### *4.1.2.1. Các xét nghiệm sinh hóa*

##### *Định lượng ceruloplasmin huyết thanh*

Theo y văn Thế giới, ceruloplasmin có trị số bình thường là 20-40mg/dl, ở bệnh nhân Wilson chỉ số này thường giảm dưới 10mg/dl, có thể giảm còn dạng vết hoặc bằng 0mg/dl. Tuy nhiên có khoảng 5% trường hợp bệnh nhân Wilson có nồng độ ceruloplasmin trong giới hạn bình thường [26].

Nghiên cứu của tác giả Lê Đức Hình, cho thấy hàm lượng ceruloplasmin trong khoảng 0-5mg/dl chiếm 75%, từ 6-10mg/dl chiếm 20%, từ 11-15mg/dl chiếm 5% [3].

Nghiên cứu của Tawhida ở Ai Cập cho thấy có 93,5% số bệnh nhân biểu hiện giảm nồng độ ceruloplasmin huyết thanh dưới 20mg/dl [80].

Nghiên cứu của chúng tôi gồm 60 bệnh nhân (bảng 3.5), trong đó 9 trường hợp có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh dưới 5mg/dl, 37 trường hợp có giá trị từ 5,1-10mg/dl (chiếm tỷ lệ cao nhất 61,7%), 11 trường hợp trong khoảng 10,1 - 15mg/dl và 3 trường hợp có giá trị 15,1-19,9mg/dl (trong đó có 1 trường hợp ceruloplasmin cao nhất là 16,9mg/dl).

Như vậy kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự các tác giả trong và ngoài nước với hàm lượng ceruloplasmin giảm thấp ở hầu hết các bệnh nhân Wilson. Xét nghiệm định lượng ceruloplasmin không những là một chỉ số quan trọng trong tiêu chuẩn chẩn đoán xác định mà còn giúp theo dõi điều trị.

### *Định lượng transaminase huyết thanh*

Theo y văn, tổn thương gan là biểu hiện sớm nhất của bệnh Wilson. Tuy nhiên trên lâm sàng thường chưa rõ triệu chứng, chỉ phát hiện transaminase huyết thanh tăng dựa vào xét nghiệm sinh hoá máu [26].

Tác giả Lê Đức Hình nghiên cứu 60 bệnh nhân, trong đó 25 trường hợp tăng transaminase huyết thanh và hầu hết các trường hợp mắc bệnh dưới 1 năm. Khám lâm sàng phát hiện 11 bệnh nhân gan to, 6 bệnh nhân lách to và 4 bệnh nhân vừa gan to vừa lách to [3].

Nghiên cứu ở Ý cho thấy 50/58 bệnh nhân có biểu hiện tổn thương gan: nồng độ ALT huyết thanh trung bình là 202 U/l; 21/58 bệnh nhân có nồng độ ALT tăng dai dẳng sau điều trị ít nhất là 12 tháng (trung bình là 78 U/l). Các bệnh nhân này có triệu chứng khởi đầu là gan to, chán ăn, vàng da hoặc đau bụng [97].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ở bảng 3.6 cho kết quả: 31/60 trường hợp tăng ALT và AST. Các bệnh nhân này trong nhóm tổn thương gan đơn thuần hoặc thể hỗn hợp gan - thần kinh. Trong nhóm thể hỗn hợp gan - thần kinh, có 7 bệnh nhân chỉ có triệu chứng thần kinh và tăng transaminase huyết thanh mà không có triệu chứng lâm sàng của cơ quan tiêu hóa.

Như vậy, tăng transaminase huyết thanh là biểu hiện sớm và có thể là biểu hiện duy nhất của bệnh nhân Wilson. Do đó tất cả các bệnh nhân tăng transaminase huyết thanh dai dẳng không rõ nguyên nhân, đặc biệt là ở người trẻ thì cần làm thêm các xét nghiệm để chẩn đoán sớm bệnh Wilson.

### *Định lượng đồng trong nước tiểu*

Định lượng đồng niệu giúp chẩn đoán và theo dõi điều trị cho các bệnh nhân Wilson. Lượng đồng bình thường trong nước tiểu dưới  $100\mu\text{g}/24\text{giờ}$ . Với bệnh nhân Wilson đồng niệu có thể tăng gấp 30 lần trị số trên [26].

Tác giả Lê Đức Hình định lượng đồng niệu cho 3 bệnh nhân đều tăng trên  $1\mu\text{mol}/24\text{giờ}$  [3].

Nghiên cứu của Emanuele cho thấy nồng độ đồng niệu 24 giờ trung bình ở bệnh nhân Wilson Ý là  $157\mu\text{g}$ , cao nhất là  $1500\mu\text{g}$  [97].

Nghiên cứu khác ở bệnh nhân Wilson Ai Cập cho kết quả 84,2% bệnh nhân có nồng độ đồng trong nước tiểu tăng [80].

Trong số 60 bệnh nhân của chúng tôi, có 47 bệnh nhân được làm xét nghiệm định lượng đồng niệu trong 24 giờ, cho kết quả 100% đều tăng trên  $100\mu\text{g}/24\text{giờ}$ . Giá trị trung bình là  $673\mu\text{g}/24\text{giờ}$ , cao nhất là  $2457\mu\text{g}/24\text{giờ}$  (bảng 3.7).

Như vậy, đồng niệu tăng cao ở hầu hết các bệnh nhân Wilson. Điều đó chứng tỏ lượng đồng tự do tăng quá cao trong máu không được bài tiết qua đường mật ở những bệnh nhân này. Đồng niệu 24 giờ là một trong những tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh Wilson, giúp chẩn đoán sớm, chẩn đoán sàng lọc và theo dõi các bệnh nhân trong quá trình điều trị.

### **4.1.3. Các biến đổi về hình ảnh học**

#### **4.1.3.1. Siêu âm ổ bụng**

Nghiên cứu 60 bệnh nhân Wilson của tác giả Lê Đức Hình, thấy 25 trường hợp có hình ảnh mật độ gan không đều, 18 trường hợp có biểu hiện gan to, lách to, tăng áp lực tĩnh mạch cửa, có dịch ổ bụng hoặc teo gan.

Nghiên cứu của Liu và cộng sự cũng chỉ ra hình ảnh tổn thương gan gặp khá phổ biến trên siêu âm ổ bụng (chiếm tỷ lệ 75%) [70].

Nghiên cứu 60 bệnh nhân của chúng tôi thấy rằng mật độ gan không đều là triệu chứng hay gặp nhất trong siêu âm ổ bụng cho các bệnh nhân Wilson (chiếm 31/ 60), lách to (11/60 bệnh nhân). Còn các triệu chứng gan teo nhỏ,



gan to, giãn tĩnh mạch cửa ít gặp hơn (bảng 3.8). Mật độ gan không đều gặp ở tất cả các bệnh nhân Wilson thể gan và thể gan - thần kinh.

Như vậy nghiên cứu của chúng tôi cũng như nghiên cứu của các tác giả trước, đều nhận thấy các biến đổi về xét nghiệm chức năng gan cũng như hình ảnh trên siêu âm ổ bụng của bệnh nhân Wilson khá phổ biến và xuất hiện sớm. Tuy nhiên, siêu âm ổ bụng và xét nghiệm sinh hóa máu không phải là tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh Wilson mà cần phải làm thêm các xét nghiệm khác giúp chẩn đoán xác định (định lượng ceruloplasmin, đồng niệu, đồng trong gan khô).

#### 4.1.3.2. Chụp MRI sọ não

Theo y văn, hình ảnh tổn thương trên MRI sọ não rất phong phú với độ nhạy cao, đặc biệt ở thì T2W và Flair. Tổn thương hay gặp là giảm tín hiệu trên thì T1W, tăng tín hiệu trên T2W và Flair ở vùng đồi thị, nhân bèo đối xứng hai bên. Có thể kèm theo giãn não thất, teo vỏ não (ít gặp tổn thương vùng thân não và tiểu não). Tổn thương đặc hiệu của bệnh Wilson được mô tả điển hình là "gương mặt gấu trúc khổng lồ", hình thành bởi cường độ tín hiệu cao trong nhân mác (trừ nhân đỏ), tăng tín hiệu đối xứng chất lưới của liềm đen, và giảm tín hiệu ụ trên [27].

Nghiên cứu 4 trường hợp bệnh nhân Wilson của tác giả Nguyễn Năng Tấn thấy cả 4 trường hợp trên phim chụp MRI đều có tổn thương hạch đáy đặc biệt là nhân vỏ hén và nhân cầu nhạt. Trong đó có 2 trường hợp kèm theo teo thể trai, teo tiểu não và não thất bên giãn rộng, 1 trường hợp kèm theo tổn thương vùng đồi thị và teo thùy thái dương [98].

Chụp MRI cho 18 bệnh nhân Wilson Ấn Độ phát hiện 16 bệnh nhân có tổn thương não, trong đó: 14 bệnh nhân tổn thương nhân vỏ hén; 12 bệnh nhân có tổn thương nhân đuôi; 10 bệnh nhân có tổn thương nhân cầu nhạt; số ít bệnh nhân có tổn thương đồi thị, thân não, vỏ não [99].

Tác giả Shantala Hegde phân tích hình ảnh chụp MRI sọ não cho 12 bệnh nhân bị bệnh Wilson có biểu hiện triệu chứng thần kinh và tâm thần cho thấy: 9 bệnh nhân có thay đổi tín hiệu vùng nhân xám trung ương; 5 bệnh nhân có tổn thương thân não; 3 bệnh nhân có teo bán cầu não; 2 bệnh nhân teo thân não; không có bệnh nhân nào tổn thương chất trắng dưới vỏ [100].

Chụp MRI sọ não cho 45 trường hợp trong số 60 bệnh nhân nghiên cứu, chúng tôi phát hiện 43 trường hợp có tổn thương não với biểu hiện giảm tín hiệu trên T1W, tăng tín hiệu trên T2W và Flair. Trong đó, tổn thương vùng nhân xám đối xứng hai bên chiếm tỷ lệ cao nhất (86,7%). Ít trường hợp biểu hiện thay đổi tín hiệu nhân xám, đồi thị không đối xứng, tổn thương vùng thân não hoặc teo vỏ não (bảng 3.9). Trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi có 3 bệnh nhân có hình ảnh chụp CT sọ não không rõ tổn thương (đặc biệt là các tổn thương vùng thân não), nhưng trên phim MRI thấy hình ảnh tổn thương rất rõ ở thì T2W và Flair. Tất cả các bệnh nhân có tổn thương não trên phim chụp MRI sọ não là những bệnh nhân trong nhóm thể lâm sàng thần kinh và gan - thần kinh.

Như vậy, các nghiên cứu đều thống nhất tổn thương hay gặp nhất trên phim chụp MRI sọ não của bệnh nhân Wilson là giảm tín hiệu ở thì TW1, tăng tín hiệu trên TW2 và Flair ở vùng đồi thị, nhân xám đối xứng hai bên. Các tổn thương ở vùng thân não, teo bán cầu não hiếm gặp hơn. Chụp MRI có độ nhạy và hình ảnh rõ nét hơn phim chụp CT cho nên đối với các bệnh nhân nghi ngờ bị bệnh Wilson, chỉ định chụp MRI sọ não có giá trị hơn trong việc xác định tổn thương.

#### **4.1.4. Các thể lâm sàng của bệnh**

Qua nghiên cứu các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở trên cùng với bệnh sử và quá trình tiến triển của bệnh, 60 bệnh nhân của chúng tôi được

chia thành các thể lâm sàng: thể thần kinh đơn thuần chiếm 49%; thể gan (28%) và thể gan - thần kinh (23%) (hình 3.3).

Nghiên cứu của Lê Đức Hình, gồm 60 bệnh nhân ở Khoa Thần kinh, Bệnh viện Bạch Mai thấy rằng hai thể lâm sàng hay gặp nhất là thần kinh đơn thuần (58,3%) và gan - thần kinh (31,6%) [3].

Nghiên cứu 75 bệnh nhân Wilson Trung Quốc thấy sự phân bố các thể lâm sàng: 39 bệnh nhân thể gan đơn thuần, 16 bệnh nhân thể thần kinh đơn thuần, 27 bệnh nhân thể hỗn hợp gan-thần kinh, 3 bệnh nhân tổn thương khớp và 8 bệnh nhân có các triệu chứng khác [70].

Từ các kết quả trên cho thấy sự phân bố các thể lâm sàng không giống nhau giữa các nghiên cứu. Có nghiên cứu cho thấy thể gan đơn thuần chiếm tỷ lệ thấp hơn các thể khác dù y văn mô tả các tổn thương đầu tiên xuất hiện ở gan do đồng tích lũy ở gan trước khi đến các cơ quan đích khác. Điều này có thể lý giải do nghiên cứu của tác giả Lê Đức Hình chỉ tiến hành ở Khoa Thần kinh và các bệnh nhân tổn thương gan thường biểu hiện lâm sàng không quá nặng nên được theo dõi ngoại trú và một số bệnh nhân có tổn thương gan chưa được chẩn đoán bệnh Wilson. Như vậy, sự phân bố các thể lâm sàng có thể bị ảnh hưởng của nơi lấy mẫu. Do đó, nên chọn nghiên cứu đa trung tâm: bệnh nhân ở các khoa khác nhau, các bệnh viện khác nhau (gồm cả trẻ em và người lớn) để xác định rõ hơn sự phân bố các thể lâm sàng, đặc biệt là ở giai đoạn khởi phát của bệnh.

#### **4.2. Kết quả phân tích gen *ATP7B***

Theo thống kê tại ngân hàng dữ liệu về bệnh Wilson (<http://www.wilsondiseas.med.ualberta.ca>) cho đến thời điểm hiện tại, có 7 dạng đột biến trên gen *ATP7B*: đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn, đột biến đảo đoạn, đột biến thêm/mất nucleotid, đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa và đột biến tại vùng 5'UTR hoặc vùng intron.

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu xác định đột biến gen cho 60 bệnh nhân Wilson bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ gen *ATP7B*, đã phát hiện được 44 bệnh nhân mang đột biến mới hoặc đột biến đã được công bố gây bệnh. Nghiên cứu phát hiện được 4/7 dạng đột biến đã công bố bao gồm: đột biến thêm/mất nucleotid, đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa và đột biến tại vùng 5'UTR. Nghiên cứu cũng phát hiện được 26 kiểu đột biến khác nhau: 3/26 đột biến vô nghĩa (nonsense), 2/26 đột biến ở vùng 5'UTR, 2 /26 đột biến thêm nucleotide, 2/26 đột biến mất nucleotide và 17/26 đột biến sai nghĩa (missense) (bảng 3.10).

Kết quả từ bảng 3.10 cho thấy các đột biến được tìm thấy nằm trải dài trên toàn bộ gen *ATP7B*. Các dạng đột biến trên các vùng gen khác nhau được công bố trên ngân hàng dữ liệu gen về khả năng gây bệnh. Cụ thể như sau:

\* Đột biến vô nghĩa (nonsense): trong nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 2 dạng đột biến vô nghĩa, trong đó có 1 đột biến đã được công bố gây bệnh: p.S105X; 1 đột biến mới: p.E905X.

\* Nghiên cứu phát hiện được 3 đột biến mới là đột biến thêm và mất nucleotid gây lệch khung dịch mã: và p.K720NfsX3, p.P1133EfsX19 và p.N1270IfsX35.

\* Có 17 đột biến sai nghĩa (missense) nằm trong vùng mã hoá (thay thế nucleotide dẫn đến thay đổi acid amin), trong đó có 14/17 đột biến đã được công bố gây bệnh; 3/17 đột biến mới.

\* Có 1 đột biến thay thế nucleotide không làm thay đổi acid amin nằm trước vùng mã hoá (hay còn gọi là vùng 5'UTR) đã được công bố gây bệnh là c.-75C>A, 1 đột biến nằm trước vùng mã hóa chưa được công bố gây bệnh: c.-118insCGGCG.

Nghiên cứu của Phan Tôn Hoàng (2015), phát hiện 28 đột biến trên gen *ATP7B* ở những bệnh nhân bị bệnh Wilson [8].

So sánh với nghiên cứu của Phan Tôn Hoàng, chúng tôi phát hiện thêm được 14 đột biến khác: p.V446G, p.V536A, p.G591S, p.K720NfsX3, p.E905X, p.T1033I, p.P1052L, p.A1065P, p.P1133EfsX19, p.G1099S, p.A1183T, p.G1213D, p.P1273Q và p.N1270IfsX35. Trong đó có 4/14 đột biến mới chưa được công bố gây bệnh trên ngân hàng dữ liệu gen: p.V446G, p.E905X, p.P1133EfsX19 và p.N1270IfsX35 [8].

Thống kê số alen từ bảng 3.10 thấy 3 dạng đột biến phổ biến nhất gây bệnh Wilson trong nghiên cứu của chúng tôi là: c.-75C>A ở vùng 5'UTR với số alen đột biến chiếm 26,92%; đột biến p.S105X trên exon 2 với số alen đột biến chiếm 26,92% và đột biến p.R778L trên exon 8 với số alen đột biến chiếm 9,62% (không có bệnh nhân nào mang đột biến p.H1069Q trên exon 14).

Dựa trên các công bố quốc tế, các công bố trên ngân hàng dữ liệu về bệnh Wilson (<http://www.wilsondiseas.med.ualberta.ca>) và kết quả nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.10 và 3.11), thấy rằng 3 đột biến quan trọng được xác định gây bệnh gồm: c.-75A>C ở vùng 5'UTR; p.S105X (c.471C>A) trên exon 2 và p.R778L (c.2333G>T) trên exon 8. Ba đột biến này được công bố gây bệnh trên nhiều tài liệu quốc tế và có tỷ lệ phát hiện cao trong nhóm nghiên cứu.

*- Đột biến c.-75A>C*

Khi tiến hành giải trình tự trên toàn bộ gen *ATP7B* cho các bệnh nhân Wilson, nhóm nghiên cứu phát hiện được 28/44 trường hợp (26,92%) mang đột biến c.-75A>C (C thay thế thành A ở vùng 5'UTR cách vị trí mã khởi đầu 75 bp). Tất cả các bệnh nhân này đều có  $\geq 2$  đột biến, nhiều nhất có 8 đột biến. Đột biến này đã được công bố gây bệnh trên bệnh nhân người Nhật và

Trung Quốc (bảng 3.10). Tỷ lệ mang đột biến này ở nhóm bệnh nhân Wilson Trung Quốc là 14/26 trường hợp [101].

Đột biến này nằm ở vùng 5'UTR ngay trước vị trí bám của đồng ( $\text{Cu}^{++}$  binding). Tất cả những bệnh nhân mang đột biến này đều kết hợp với các đột biến khác (bảng 3.11) cũng tạo ra sự “cộng hưởng” tác động tới sự hình thành của protein ở các mức độ khác nhau và làm ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển đồng qua màng tế bào.

- Đột biến *p.S105X (c.417C>A)*

Nghiên cứu của chúng tôi có 26,92% alen đột biến tạo mã kết thúc c.314C>A (*p.S105X*): đột biến thay thế nucleotid 314C>A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG (bảng 3.10).

Đây là đột biến đã được công bố gây bệnh Wilson 3 lần (2 lần ở Đức và 1 lần ở Trung Quốc) (bảng 3.10).

Đột biến nằm trên exon 2, thuộc vùng MBDs (Metal-Binding Domains)-là vị trí bám cho các nguyên tử đồng. Các MBDs trên gen *ATP7B* có các chức năng quan trọng: hoạt hóa men ATPase, chuyển vị đồng, hợp nhất đồng trong phức hợp enzym, tương tác giữa protein với protein [32]. Đột biến này làm cho cấu trúc và chức năng của protein *ATP7B* thay đổi, dẫn đến giảm một phần khả năng vận chuyển đồng hoặc mất hoàn toàn khả năng vận chuyển đồng của protein *ATP7B*. Do đó những bệnh nhân mang đột biến gây bệnh trên exon này có thể biểu hiện lâm sàng nặng.

Ngoài ra, có một số nghiên cứu cho kết quả các đột biến gen dạng vô nghĩa (nonsense) biểu hiện bệnh sớm hơn dạng sai nghĩa với thể lâm sàng nặng, ceruloplasmin giảm nặng. Với các dạng đột biến cắt cụt protein có biểu hiện suy gan tối cấp, là thể lâm sàng rất nặng đòi hỏi phải ghép gan cấp cứu [81],[82],[83].

- Đột biến p.R778L

Các nghiên cứu chỉ ra rằng đột biến thay thế nucleotid 2333G>T dẫn đến bộ ba thứ 778 CGG mã hóa Arginine chuyển thành CTG mã hóa Leucine (p.R778L) trên exon 8 phổ biến nhất ở các nước châu Á với tỷ lệ phát hiện đột biến là: 31,9% ở Trung Quốc, 35% ở Nhật và 43,1% ở Đài Loan [84],[102]. Đột biến này đã được công bố gây bệnh 25 lần trong các nghiên cứu quốc tế tại ngân hàng dữ liệu gen (bảng 3.10). Ngoài ra, tại vị trí 778 trên exon 8 còn có các đột biến khác đã công bố gây bệnh: p.R778Q, p.R778W và p.R778G. Như vậy, có thể thấy 778 là vị trí đột biến quan trọng gây bệnh Wilson, ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển đồng qua màng tế bào.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, với 44 bệnh nhân đã phát hiện đột biến, có 9,62 % mang alen đột biến p.R778L (bảng 3.10).

Một số nghiên cứu khác ở Việt Nam phát hiện tỷ lệ đột biến khác nhau: nghiên cứu năm 2010, bằng cắt enzym giới hạn thấy tỷ lệ phát hiện đột biến gen p.R778L là 2/29 bệnh nhân nghiên cứu [5]. Nghiên cứu của tác giả Lê Hoàng Phúc, cho 16 bệnh nhân Wilson ở Bệnh viện Nhi Đồng 1, không phát hiện được trường hợp nào mang đột biến c.2333G>T (p.R778L) [6].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Mai Hương và cộng sự cho 16 bệnh nhân phát hiện được các đột biến p.S105X, p.V176Sfs, p.R778L, p.G943D, p.C985T, p.K1010T; trong đó đột biến p.S105X chiếm tỷ lệ cao nhất (21,9%) [7].

Như vậy, đột biến phổ biến trên gen *ATP7B* khác nhau giữa các quốc gia, chủng tộc trên thế giới.

Ba đột biến c.-75C>A; p.S105X; p.R778L có tỷ lệ cao nhất trong nghiên cứu của chúng tôi tại Việt Nam cũng gặp ở các quốc gia châu Á nhưng tỷ lệ mắc khác nhau (đột biến p.R778L trên exon 8 phổ biến nhất ở các nước châu

Á lại xếp thứ 3 ở Việt Nam); không có bệnh nhân nào mang đột biến p.H1069Q phổ biến ở châu Âu.

### **4.3. Phân tích mối tương quan giữa số alen đột biến trên gen *ATP7B* và kiểu hình của bệnh nhân Wilson**

Bệnh Wilson là bệnh đột biến gen lặn và là bệnh rối loạn chuyển hóa với hơn 500 đột biến khác nhau. Nghiên cứu của chúng tôi cho 60 bệnh nhân phát hiện được 44 bệnh nhân mang 19 đột biến đã được công bố gây bệnh và 7 đột biến mới (bảng 3.10).

Bảng 3.11 cho thấy có 5 bệnh nhân mang 1 alen đột biến; 25 bệnh nhân mang 2 alen; 7 bệnh nhân mang 3 alen và 7 bệnh nhân mang 4 alen. Các bệnh nhân này có triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng rất đa dạng. Do đó, để giúp cho quá trình điều trị, tiên lượng bệnh và tư vấn lâm sàng chính xác, chúng tôi tiến hành phân tích mối tương quan giữa số alen đột biến và kiểu hình cho 44 bệnh nhân này.

#### **4.3.1. Mối tương quan giữa tuổi khởi phát và số alen đột biến**

Kết quả từ bảng 3.12 cho thấy tuổi khởi phát bệnh Wilson trong nhóm nghiên cứu tỷ lệ nghịch với số alen đột biến: nhóm mang 4 alen đột biến có tuổi khởi phát trung bình thấp nhất là 9 tuổi; nhóm mang 3 alen đột biến là 13 tuổi; nhóm mang 2 alen đột biến là 16 tuổi và nhóm mang 1 alen đột biến có tuổi khởi phát trung bình cao nhất là 20 tuổi. Nghĩa là bệnh nhân càng mang nhiều alen đột biến thì tuổi khởi phát càng sớm.

Tuy nhiên, khi so sánh 4 nhóm bệnh nhân ở trên có số alen đột biến khác nhau với tuổi khởi phát trên hình 3.8 thì thấy rằng sự khác biệt giữa các nhóm bệnh nhân này không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .



Ngoài ra, có một số dạng đột biến đã được khẳng định từ các nghiên cứu trước là liên quan đến tuổi khởi phát bệnh: ví dụ đột biến p.R778L biểu hiện tổn thương gan sớm, trong khi các đột biến c.3207 C>A, p.S932X hoặc p.W779X lại hay gặp ở nhóm khởi phát bệnh muộn [67],[88],[89]. Do đó có thể vẫn nhìn thấy mối tương quan nghịch giữa tuổi khởi phát và số alen đột biến. Nhưng thực chất đó có thể là do sự xuất hiện của các đột biến quan trọng trong từng nhóm bệnh nhân xác định.

Như vậy, việc tăng số lượng bệnh nhân để có sự phân bố đồng đều của các loại đột biến trên toàn bộ nhóm bệnh nhân sẽ giúp thấy rõ hơn mối tương quan này.

#### ***4.3.2. Mối tương quan giữa nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và số alen đột biến***

Kết quả từ bảng 3.12 cho thấy nồng độ ceruloplasmin huyết thanh trung bình khác nhau giữa các nhóm bệnh nhân: nhóm bệnh nhân mang 4 alen đột biến có nồng độ ceruloplasmin trung bình thấp nhất (4,24mg/dl); nhóm mang 2 alen đột biến có nồng độ ceruloplasmin trung bình cao nhất là 12,16mg/dl có số alen đột biến khác nhau. Nghĩa là nhóm bệnh nhân mang nhiều alen đột biến có nồng độ ceruloplasmin trong huyết thanh thấp hơn nhóm mang ít alen đột biến. Điều này phù hợp về đặc điểm sinh học phân tử: sự xuất hiện càng nhiều các biến dị/đột biến trên gen *ATP7B* thì cấu trúc và tính chất của protein càng thay đổi, gây ảnh hưởng đến chức năng vận chuyển đồng.

Khi so sánh từng nhóm bệnh nhân có số alen đột biến khác nhau với nồng độ ceruloplasmin huyết thanh (hình 3.9), cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm bệnh nhân mang 4 alen đột biến với các

nhóm bệnh nhân mang 1, 2 và 3 alen đột biến (với p lần lượt là 0,002; 0,001 và 0,001).

Tác giả Hyung - Doo Park (2010), nghiên cứu 71 bệnh nhân thấy rằng có mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ ceruloplasmin và số đột biến [103].

Như vậy, bệnh nhân càng mang nhiều alen đột biến thì nồng độ ceruloplasmin huyết thanh càng giảm và quá trình chuyển hóa đồng trong cơ thể càng giảm, lượng đồng tích lũy trong cơ thể càng tăng.

#### ***4.3.3. Mối tương quan giữa đồng niệu 24 giờ và số alen đột biến***

Nồng độ đồng niệu trong nước tiểu 24 giờ trung bình tỷ lệ thuận với số alen đột biến: nhóm mang 1 alen đột biến có nồng độ đồng thấp nhất (354,20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ); nhóm mang 4 alen đột biến có nồng độ đồng cao nhất là 1340,14  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (bảng 3.12).

So sánh các nhóm mang số lượng alen đột biến khác nhau với nồng độ đồng trong nước tiểu 24h thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm mang 1 alen đột biến và 3 alen đột biến ( $p = 0,035$ ); nhóm mang 1 alen đột biến và 4 alen đột biến ( $p < 0,001$ ); nhóm mang 2 alen đột biến và 4 alen đột biến ( $p = 0,001$ ); nhóm mang 2 alen đột biến và nhóm mang 3 alen đột biến ( $p = 0,02$ ) (hình 3.10).

So sánh nồng độ đồng trong nước tiểu 24h của các bệnh nhân Wilson Hàn Quốc ở các nhóm mang các alen đột biến khác nhau cũng cho kết quả: bệnh nhân mang 2 alen đột biến có nồng độ đồng niệu cao nhất, sau đó là nhóm mang 1 alen đột biến và nhóm không mang alen đột biến [103].

Như vậy, bệnh nhân càng mang nhiều alen đột biến thì nồng độ đồng trong nước tiểu 24 giờ càng cao.

#### ***4.3.4. Môi trường quan giữa thể lâm sàng và số alen đột biến***

Kết quả từ bảng 3.11 cho thấy sự phân bố không đều giữa các thể lâm sàng ở nhóm bệnh nhân bị bệnh Wilson điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Bạch Mai. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 44 bệnh nhân mang đột biến mới và đột biến gây bệnh với 13 bệnh nhân thể gan (29,5%); 20 bệnh nhân thể thần kinh (45,5%) và 11 bệnh nhân thể hỗn hợp gan - thần kinh (25%).

Chúng tôi tiến hành phân tích môi trường quan giữa số alen đột biến với các thể lâm sàng của 44 bệnh nhân này (hình 3.11) cho kết quả: nhóm mang 1 và 2 alen đột biến có tỷ lệ bệnh nhân thể gan đơn thuần cao nhất; nhóm mang 4 alen gồm bệnh nhân thể thần kinh và thể hỗn hợp gan - thần kinh (không có bệnh nhân thể gan đơn thuần) với tỷ lệ bệnh nhân nhóm hỗn hợp cao nhất. Nghĩa là nhóm bệnh nhân mang 4 alen chủ yếu là bệnh nhân thể nặng (thể hỗn hợp gan - thần kinh).

Để tính môi trường quan giữa số alen đột biến với các thể lâm sàng, chúng tôi tính chỉ số  $r$  bằng phương pháp Kendall, cho kết quả lần lượt là -0,02; -0,12 và 0,17 (bảng 3.13). Chỉ số  $r$  rất thấp, nghĩa là không thấy môi trường quan giữa thể lâm sàng và số alen đột biến. Đây là kết quả quan trọng cho thấy ảnh hưởng của tính đa biến dị/đột biến đến kiểu hình. Bệnh nhân mang nhiều đột biến có thể có sự tác động cộng hưởng đa dạng lên kiểu hình.

Các nghiên cứu thấy rằng có những đột biến đặc trưng cho thể lâm sàng. Nghiên cứu của Trung Quốc cho 66 bệnh nhân thấy 74% mang đột biến p.R778L có biểu hiện lâm sàng thể gan [70]. Một số nghiên cứu khác ở châu Âu lại cho kết quả đột biến gen p.H1069Q hay gặp ở bệnh nhân thể thần kinh [76, 90].

Nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.11) có 10 bệnh nhân mang đột biến p.R778L với 3 bệnh nhân thể gan, 4 bệnh nhân thể thần kinh, 4 bệnh nhân thể hỗn hợp gan - thần kinh. Trong đó có 1/10 bệnh nhân mang duy nhất 1 đột biến p.R778L (bệnh nhân mã số W55.00, thể gan), còn 9/10 bệnh nhân mang thêm đột biến khác kết hợp (các bệnh nhân mã số W8.00, W23.00, W29.00, W51.00, W52.00, W54.00, W58.00, W62.00 và W66.00).

Điều này khẳng định bệnh Wilson thuộc nhóm bệnh chuyển hóa, di truyền đa biến dị/đột biến, nên từ các kết quả ở trên, nhóm nghiên cứu đã khẳng định tầm quan trọng của việc phân tích tổng thể sự ảnh hưởng của nhiều biến dị/ đột biến trên từng cá thể bệnh nhân Wilson.

#### **4.4. Phân tích mối tương quan giữa dạng đột biến trên gen *ATP7B* và kiểu hình của bệnh nhân Wilson**

Phân tích 44 bệnh nhân mang đột biến mới và đột biến đã công bố gây bệnh, cho kết quả: 23 bệnh nhân mang đột biến sai nghĩa và đột biến sai nghĩa kết hợp với đột biến vùng 5'UTR (số alen đột biến vô nghĩa = 0); 10 bệnh nhân mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và 11 bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung (bảng 3.14). Dạng đột biến có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân Wilson.

##### **4.4.1. Mối tương quan giữa tuổi khởi phát và dạng đột biến**

Kết quả ở bảng 3.14 cho thấy tuổi khởi phát trung bình ở nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung thấp hơn nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và nhóm mang đột biến sai nghĩa/ đột biến vùng 5'UTR.

Khi so sánh mối tương quan giữa 3 nhóm đột biến này với tuổi khởi phát (hình 3.12) thì thấy rằng sự khác biệt giữa các nhóm là không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

Điều này có thể lý giải do số lượng mẫu tương đối nhỏ ở từng nhóm bệnh nhân nên chỉ số  $p$  không mang nhiều ý nghĩa và thể lâm sàng còn phụ thuộc vào vị trí, chức năng của đột biến trên gen *ATP7B* [81]. Hơn nữa có nhiều bệnh nhân mang  $\geq 2$  đột biến nên có thể có sự tác động cộng hưởng của nhiều gen lên tuổi khởi phát.

Nghiên cứu của Lee cho thấy bệnh nhân mang đột biến vô nghĩa/lệch khung thường khởi phát bệnh sớm hơn các dạng đột biến khác [81]. Ngoài ra, đột biến vô nghĩa/lệch khung đã được khẳng định từ các nghiên cứu trước là liên quan đến tuổi khởi phát bệnh sớm: p.S932X; p.W779X [67],[88],[89].

Tác giả Gromadzka G. nghiên cứu bệnh nhân Wilson ở Ba Lan cũng thấy tuổi khởi phát khác nhau giữa các dạng đột biến: nhóm bệnh nhân mang 2 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung là  $14 \pm 7$  tuổi; nhóm mang 1 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung dịch mã là  $25 \pm 9$  tuổi, nhóm mang alen đột biến sai nghĩa là  $29 \pm 9$  tuổi [66].

Nghiên cứu khác cho 126 bệnh nhân Wilson ở Bungary cũng thấy rằng bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung biểu hiện bệnh sớm hơn những bệnh nhân mang 2 alen đột biến sai nghĩa [83].

Như vậy, các đột biến lệch khung hình thành mã kết thúc sẽ tạo nên một protein *ATP7B* bị cắt ngắn thường khởi phát bệnh sớm hơn các dạng đột biến khác. Điều này phù hợp với cơ chế bệnh học phân tử của các bệnh chuyển hóa di truyền. Do đó, việc tăng số lượng bệnh nhân để có sự phân bố đồng đều của các dạng đột biến trên toàn bộ nhóm bệnh nhân là cần thiết để thấy rõ hơn mối tương quan này.

#### ***4.4.2. Môi trường quan giữa nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và dạng đột biến***

Nồng độ ceruloplasmin trung bình trong huyết thanh tỷ lệ nghịch với số alen đột biến vô nghĩa/lệch khung: nhóm mang đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR là 12,92mg/dl; nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung là 9,47mg/dl; nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung là 6,24mg/dl (bảng 3.14).

So sánh môi trường quan giữa 3 nhóm đột biến này với nồng độ ceruloplasmin trung bình trong huyết thanh (hình 3.13) cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung với nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và nhóm mang đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR; nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và nhóm mang đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR với  $p < 0,05$ . Điều này một lần nữa khẳng định những bệnh nhân mang đột biến vô nghĩa/lệch khung có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh thấp hơn bệnh nhân mang các dạng đột biến khác và nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có nồng độ ceruloplasmin thấp hơn nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa.

Tác giả Hyung - Doo Park (2010), nghiên cứu 71 bệnh nhân thấy rằng có mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ ceruloplasmin và số lượng đột biến [103].

Nghiên cứu cho những bệnh nhi bị bệnh Wilson ở Ý cho kết quả: nhóm bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh trung bình thấp hơn nhóm mang đột biến sai nghĩa [97].

Nghiên cứu khác của Gromadzka G. ở Ba Lan cũng thấy sự khác nhau giữa các dạng đột biến: nhóm bệnh nhân mang 2 alen đột biến dạng vô

nghĩa/lệch khung dịch mã có nồng độ ceruloplasmin thấp hơn nhóm mang 1 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung dịch mã, nồng độ ceruloplasmin cao nhất ở nhóm mang alen đột biến sai nghĩa [66].

Điều này phù hợp về đặc điểm sinh học phân tử: đột biến vô nghĩa/lệch khung trên gen *ATP7B* là đột biến nặng gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng vận chuyển đồng. Nồng độ ceruloplasmin trong máu giảm làm tăng nồng độ đồng tự do trong huyết thanh và lắng đọng đồng tại các cơ quan đích gây nên các biểu hiện lâm sàng của bệnh Wilson.

#### **4.4.3. Mối tương quan giữa đồng niệu 24 giờ và dạng đột biến**

Hàm lượng đồng trung bình trong nước tiểu 24 giờ ở các nhóm đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR, nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung, nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung tăng dần, lần lượt là: 390,17 $\mu$ g, 654,78 $\mu$ g và 962,09 $\mu$ g (bảng 3.14).

Khi so sánh tương quan nồng độ đồng niệu 24 giờ giữa các nhóm đột biến, chỉ có nhóm mang 2 alen đột biến với nhóm không mang alen đột biến (nhóm đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR) có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,01$  (hình 3.14).

Tác giả Gromadzka G. nghiên cứu ở Ba Lan cũng thấy nồng độ đồng trong nước tiểu 24 giờ khác nhau giữa các dạng đột biến: nhóm bệnh nhân mang 2 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung dịch mã có nồng độ đồng cao hơn nhóm mang 1 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung dịch mã, nồng độ đồng thấp nhất ở nhóm mang alen đột biến sai nghĩa [66].

Như đã đề cập, bệnh do sự bất thường của enzyme typ P- ATPase. Đây là 1 protein vận chuyển đồng từ gan tới các cơ quan và đóng vai trò trong việc đào thải đồng ra khỏi cơ thể chủ yếu qua đường mật. Khi bệnh nhân mang đột biến vô nghĩa/lệch khung sẽ tạo mã kết thúc sớm làm protein bị cắt ngắn sẽ

ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng chuyển hóa đồng. Lượng đồng không được chuyển hóa, không được đào thải ra ngoài qua đường mật sẽ ứ đọng ở gan, đồng tự do tăng lưu thông trong máu và tăng đào thải qua nước tiểu.

#### **4.4.4. Môi trường quan giữa thể lâm sàng và dạng đột biến**

Kết quả nghiên cứu ở hình 3.15 cho thấy nhóm mang đột biến vô nghĩa/lệch khung có tỷ lệ bệnh nhân thể hỗn hợp gan - thần kinh cao hơn nhóm mang đột biến dạng khác. Trong đó, nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có tỷ lệ bệnh nhân thể hỗn hợp cao nhất.

Tính tỷ số tương quan  $r$  bằng phương pháp Kendall khi so sánh dạng đột biến với thể gan, thể thần kinh, thể hỗn hợp gan - thần kinh chỉ thấy nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có mối tương quan thuận với thể lâm sàng có ý nghĩa thống kê ( $r = 0,73$ ,  $p = 0,03$ ) (bảng 3.15). Nghĩa là bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa thường biểu hiện thể lâm sàng nặng nhất, sau đó là nhóm mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và nhóm không mang alen đột biến vô nghĩa/lệch khung (đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR). Tuy nhiên, kết quả ở bảng 3.13 lại không tìm thấy mối tương quan giữa số alen đột biến và thể lâm sàng. Điều này chứng tỏ số alen đột biến không ảnh hưởng nhiều đến thể lâm sàng mà do các đột biến quan trọng quyết định.

Một số nghiên cứu thấy rằng thể lâm sàng có thể gặp ở một số dạng đột biến nhất định. Nghiên cứu của Lee (Hàn Quốc) cho 237 bệnh nhân thấy những bệnh nhân mang đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung biểu hiện thể lâm sàng nặng hơn các dạng đột biến khác, ngoài ra vị trí đột biến trên gen cũng liên quan đến thể lâm sàng của bệnh: đột biến ở vùng xuyên màng (Transduction, Td) và vùng gắn ATP (ATP hinge) chỉ gặp ở thể gan, thể tiền lâm sàng, không gặp ở thể thần kinh [81].



Tác giả Gromadzka G. nghiên cứu ở Ba Lan không thấy mối tương quan rõ rệt giữa thể lâm sàng (thể gan; thể thần kinh; thể hỗn hợp gan - thần kinh) với các dạng đột biến nhóm mang 2 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung dịch mã; nhóm mang 1 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung dịch mã; nhóm mang 2 alen đột biến sai nghĩa) [66].

Nghiên cứu khác tại Nhật Bản thấy rằng các đột biến lệch khung trên gen *ATP7B* gặp tỷ lệ cao thể lâm sàng suy gan tối cấp khi so sánh thể lâm sàng của 2 nhóm mang 2 alen đột biến lệch khung và nhóm mang 1 hoặc 2 alen đột biến sai nghĩa [79].

Như đã bàn luận ở trên (mục 4.3.4), một số nghiên cứu chỉ ra các đột biến đặc trưng với một số thể lâm sàng tương ứng: đột biến p.R778L hay gặp thể gan ở bệnh nhân Wilson châu Á; đột biến p.H1069Q hay gặp thể thần kinh ở bệnh nhân Wilson châu Âu [76],[104]; đột biến c.2299insC hay gặp thể gan và đột biến p.Ala1003Thr hay gặp thể thần kinh ở bệnh nhân Wilson ở Leban [105].

Một thử nghiệm của Anjali B. Shah ở 4 bệnh nhân Wilson mang 4 đột biến khác nhau trên gen *ATP7B* thấy rằng hoạt độ của ATPase với đồng giảm so với người bình thường và khác nhau giữa các bệnh nhân. Tác giả cho là nguyên nhân của tính đa hình trên bệnh nhân Wilson. Tuy nhiên, tác giả cũng đề cập các nguyên nhân khác liên quan đến dịch tễ và yếu tố môi trường [54].

Nghiên cứu khác ở Trung Quốc (năm 2004), hoạt độ của Cu-ATPase ở màng tế bào lympho giảm có ý nghĩa thống kê ở các bệnh nhân mang đột biến p.R778L. Sự giảm hoạt độ enzym này khác nhau khi kết hợp các gen đột biến khác nhau và có liên quan với mức độ nặng của bệnh [70].

Các bệnh nhân mang đột biến gen p.H1069Q thường biểu hiện triệu chứng thần kinh sớm do mang alen xóa đoạn rs1799732 gây giảm thụ thể dopamin D2 ở thể vân ở não và làm lắng đọng đồng [76].

Như vậy, bệnh Wilson là bệnh rối loạn chuyển hóa di truyền do đó mức độ nặng của bệnh hay thể lâm sàng phụ thuộc vào dạng đột biến. Bệnh nhân mang các đột biến vô nghĩa hay lệch khung dịch mã thường biểu hiện thể lâm sàng nặng hơn các thể đột biến khác. Vị trí đột biến trên các vùng chức năng của gen cũng ảnh hưởng đến kiểu hình.

Kết quả từ bảng 3.11 cho thấy có 5 bệnh nhân chỉ có 1 đột biến dị hợp tử, trong đó 4 bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm (3 bệnh nhân có đột biến p.S105X, 1 bệnh nhân có đột biến p.K720NfsX3) và 1 bệnh nhân có đột biến thay thế nucleotid (p.R778L). Các đột biến vô nghĩa đã được chứng minh từ các nghiên cứu trước là các đột biến tạo nên protein bị cắt ngắn - đột biến nặng thường biểu hiện triệu chứng nặng. Các bệnh nhân mang đột biến này có thể biểu hiện triệu chứng lâm sàng ngay cả khi chỉ mang 1 alen đột biến. Đột biến p.R778L cũng được khẳng định là đột biến quan trọng và phổ biến ở châu Á, hay gây bệnh thể gan.

Nghiên cứu khác lại thấy rằng, kiểu hình của bệnh Wilson còn phụ thuộc vào các yếu tố dịch tễ, chủng tộc và yếu tố môi trường [66].

Một số gen khác có thể tác động đến biểu hiện lâm sàng của bệnh Wilson: gen *MTHFR*, *ATOX1*, *XIAP*, *COMMD1*. Tuy nhiên các gen này đang trong giai đoạn thử nghiệm để chứng minh vai trò gây bệnh đối với các bệnh nhân bị bệnh Wilson [41].

Gen *MURR1* có tác động đến biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân mang đột biến gen *ATP7B* nhưng nó không có vai trò sinh bệnh học nếu ceruloplasmin huyết thanh trong giới hạn bình thường [94].

Như vậy, các đột biến tạo nên protein bị cắt ngắn (đột biến vô nghĩa, lệch khung dịch mã) là các thể đột biến nặng hay gây ra các thể lâm sàng nặng. Ngoài ra thể lâm sàng còn có thể bị ảnh hưởng bởi một số gen khác, hoặc yếu tố môi trường, chủng tộc, các đột biến quan trọng và vị trí của đột biến trên gen *ATP7B*.

### **Minh họa một số trường hợp lâm sàng điển hình**

#### ***Minh họa trường hợp 1: bệnh nhân thể nhẹ có đột biến sai nghĩa***



Bệnh nhân Chu Ngọc M.

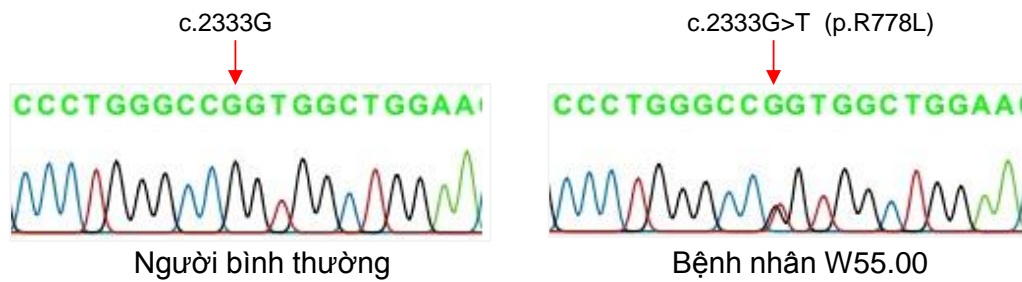
Giới tính nữ, 7 tuổi

Mã số W55.00.

Biểu hiện thể gan nhẹ.

#### ***Hình 4.1. Hình ảnh bệnh nhân mã số W55.00***

Bệnh nhân không có triệu chứng lâm sàng, chán ăn, phát hiện enzym gan tăng nhẹ không rõ nguyên nhân (ALT: 49,9 U/l; AST: 104 U/l). Sau đó bệnh nhân được làm thêm các xét nghiệm để khẳng định chẩn đoán: ceruloplasmin là 5,36mg/dl; đồng niệu 24 giờ là 379 $\mu$ g. Bệnh nhân này đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh Wilson theo thang điểm Ferenci. Tiến hành giải trình tự cả 21 exon trên gen *ATP7B* cho bệnh nhân phát hiện đột biến sai nghĩa c.2333G>T (p.R778L) dạng dị hợp tử. Bệnh nhân được điều trị D-penicillamin, kẽm acetat, bổ sung vitamin B6 và vitamin E theo đúng phác đồ, bệnh tiến triển tốt.



**Hình 4.2. Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W55.00**

(đột biến  $c.2333G>T$  ( $p.R778L$ ) ở exon 8 trên gen  $ATP7B$ ).

Kết quả trên cho thấy bệnh nhân có đột biến dị hợp tử  $p.R778L$ , do trình tự nucleotid G thay thế thành T dẫn đến bộ ba thứ 778 CGG mã hóa Arginine (R) chuyển thành CTG mã hóa Leucin (L).

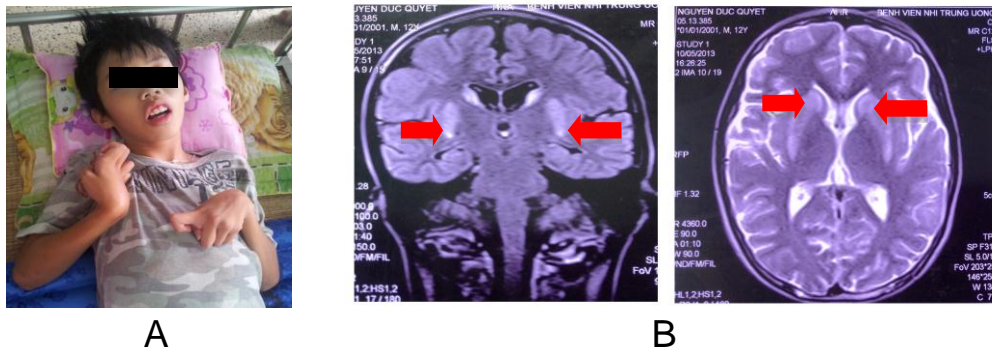
Như đã bàn luận ở phần 4.2: đột biến  $c.2333G>T$  ( $p.R778L$ ) đã được công bố gây bệnh Wilson 25 lần trong các nghiên cứu ở châu Á và vị trí 778 là vị trí đột biến quan trọng ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển đồng qua màng tế bào. Đột biến này nằm trên exon 8, ở vùng xuyên màng Tm4 trên gen  $ATP7B$ . Arginin (R) là một acide amine phân cực mang tính kiềm, rất quan trọng cho quá trình cân bằng điện tích của màng tế bào, sự thay đổi tính chất acide amin tại vị trí này có thể ảnh hưởng lớn đến quá trình chuyển hoá cation và anion, trong đó có  $Cu^{2+}$ .

Như vậy, đột biến  $p.R778L$  ( $c.2333G>T$ ) trên exon 8 là đột biến quan trọng đã được khẳng định gây bệnh và là đột biến phổ biến ở châu Á. Tuy nhiên, đột biến này không phổ biến nhất ở Việt Nam và thường kết hợp với các đột biến khác với kiểu hình đa dạng.

Đột biến này cũng được chứng minh hay gây bệnh Wilson thể gan. Như vậy, đột biến ở vùng chức năng quan trọng trên gen  $ATP7B$  có thể gây thể bệnh lâm sàng tương ứng dù mang 1 đột biến dị hợp.

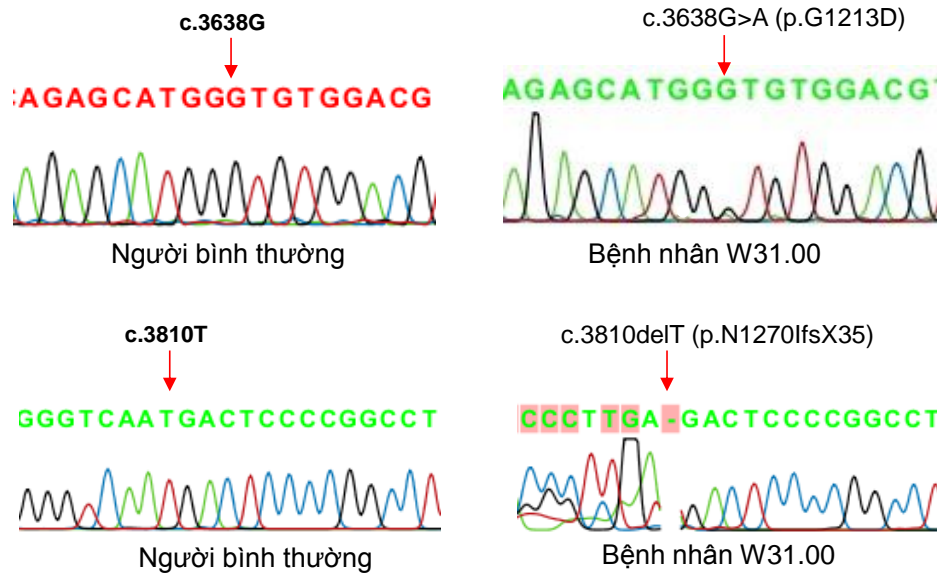
**Minh họa trường hợp 2:** bệnh nhân thể hỗn hợp gan - thần kinh với biểu hiện nặng, có đột biến sai nghĩa và đột biến mất nucleotid gây lệch khung dịch mã.

Bệnh nhân Nguyễn Đức Q., nam, 12 tuổi (mã W31.00). Bệnh diễn biến nặng tăng dần trong 1 tháng: run tay, nói khó, tăng trương lực cơ tứ chi, chảy nước dãi. Bệnh nhân được làm các xét nghiệm chẩn đoán bệnh Wilson thể hỗn hợp gan - thần kinh: ALT 144,3U/l; AST: 119U/l; Ceruloplasmin 3,9mg/dl; Đồng niệu 24 giờ 3768 $\mu$ g. Siêu âm ổ bụng: hình ảnh xơ gan. MRI sọ não: hình ảnh tổn thương nhân bào, nhân đuôi đối xứng 2 bên.



**Hình 4.3. Hình ảnh bệnh nhân W31.00 (A) và hình ảnh MRI sọ não (B)**  
(mũi tên màu đỏ chỉ tổn thương nhân bào (trái) và tổn thương nhân đuôi (phải) đối xứng 2 bên)

Phân tích gen *ATP7B*, phát hiện đột biến c.3638G>T (p.G1213D) trên exon 17 đã được công bố gây bệnh và đột biến mới c.3810delT (p.N1270IfsX35) trên exon 18, là vị trí bám cho ATP. Bệnh nhân được điều trị bệnh Wilson bằng các thuốc tạo phức với đồng (D-penicillamin và trientin), kẽm acetat, bổ sung vitamin B6 và vitamin E theo đúng phác đồ. Bệnh tiến triển nặng dần với biểu hiện tăng trương lực cơ toàn thân, co quắp các ngón tay, co vắn tứ chi.



**Hình 4.4. Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W31.00**

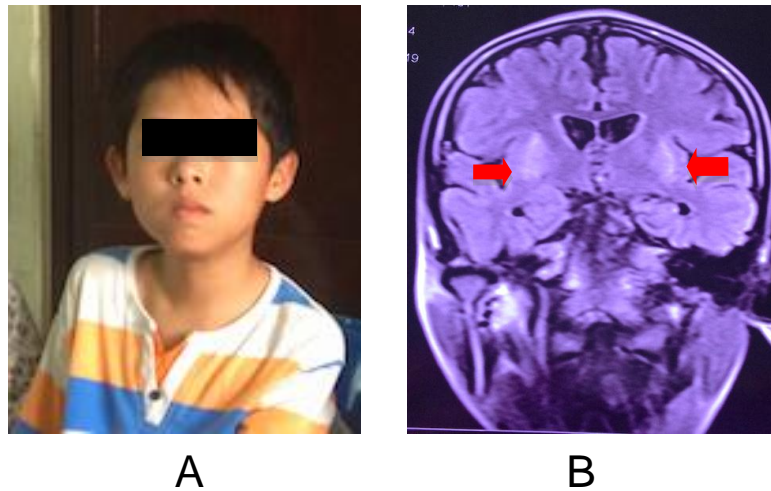
(đột biến  $c.3638G>A$  ( $p.G1213D$ ) trên exon 17 và đột biến  $c.3810delT$  ( $p.N1270IfsX35$ ) trên exon 18 của gen *ATP7B*).

Kết quả trên cho thấy bệnh nhân có 2 đột biến dị hợp tử kết hợp là đột biến  $p.G1213D$  và  $p.N1270IfsX35$ . Với đột biến  $p.G1213D$ , do nucleotid G thay thế thành A dẫn đến bộ ba thứ 1213 GGT mã hóa Glycine (G) chuyển thành GAT mã hóa Aspartate (D). Với đột biến  $p.N1270IfsX35$ , do mất nucleotid T ở vị trí 1270 gây lệch khung dịch mã và tạo nên mã kết thúc sớm ở vị trí acid amin thứ 35 tính từ vị trí đột biến.

Như đã phân tích ở trên, đây là đột biến mất nucleotid gây lệch khung dịch mã, tạo nên mã kết thúc sớm làm cho protein *ATP7B* bị cắt ngắn, là đột biến nặng biểu hiện bệnh sớm hơn đột biến sai nghĩa với thể lâm sàng nặng, ceruloplasmin giảm nhiều ngay cả khi chỉ mang đột biến dạng dị hợp. Tuy nhiên, bệnh nhân này mang thêm 1 đột biến dị hợp dạng sai nghĩa đã được công bố gây bệnh trên exon 17. Sự tác động cộng hưởng của các alen đột biến dị hợp cũng tạo nên tính đa hình của bệnh.

**Minh họa trường hợp số 3:** bệnh nhân thể hỗn hợp gan - thần kinh với biểu hiện trung bình, có đột biến sai nghĩa và đột biến tạo mã kết thúc sớm

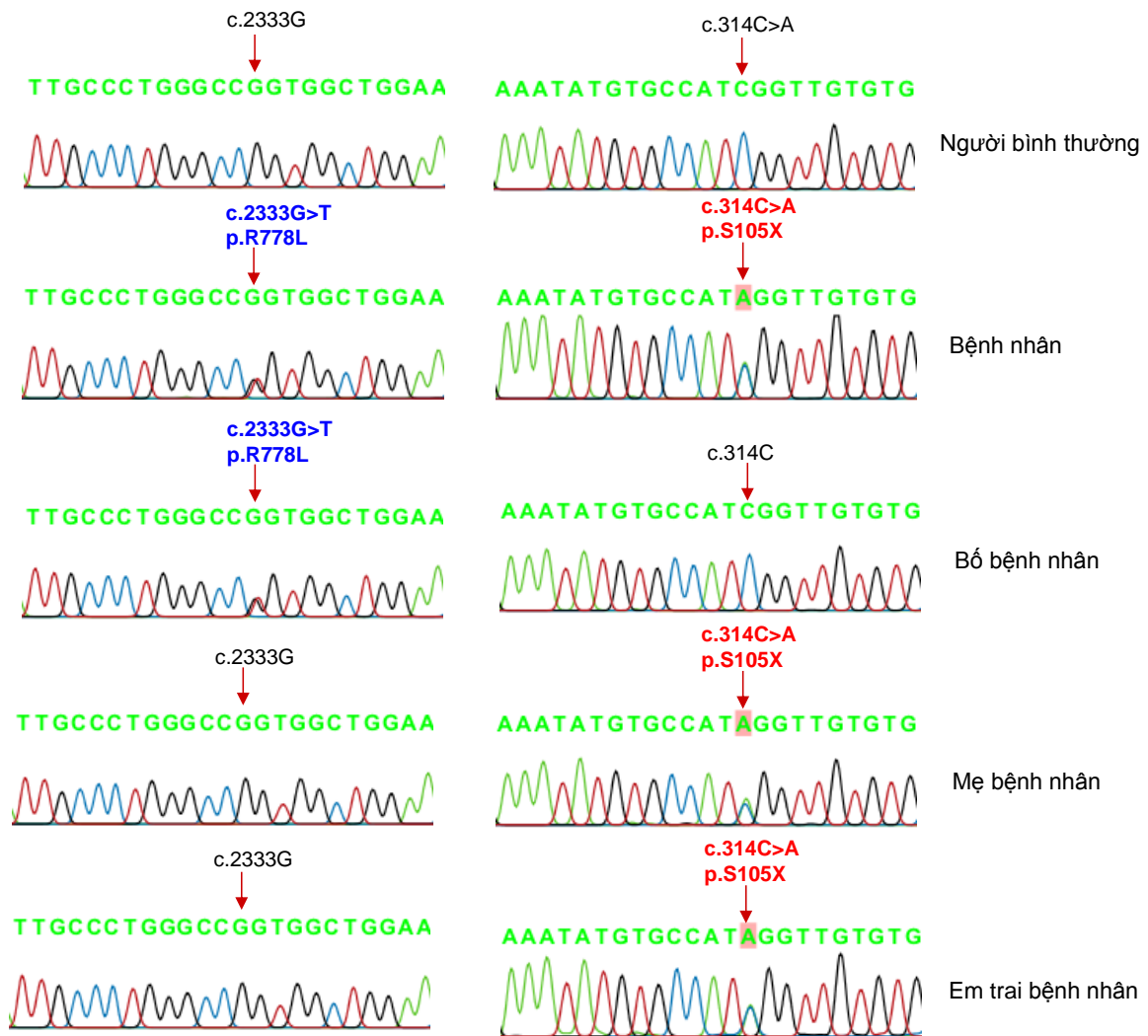
Bệnh nhân Hoàng Phương P., 12 tuổi (mã số W58.00) được chẩn đoán bệnh Wilson thể hỗn hợp gan - thần kinh với biểu hiện lâm sàng không quá nặng. Tuy nhiên, bệnh nhân uống thuốc thải đồng không liên tục do nhà xa, không khám định kỳ theo hẹn. Sau 3 năm các triệu chứng thần kinh nặng dần: run tay, nói khó, nuốt khó. Chụp MRI sọ não xuất hiện các tổn thương nhân xám và đồi thị đối xứng 2 bên.



**Hình 4.5.** Hình ảnh bệnh nhân W58.00 (A) và hình ảnh MRI sọ não (B) (mũi tên màu đỏ chỉ tổn thương tăng tín hiệu vùng nhân xám và đồi thị).

Phân tích gen *ATP7B* cho bệnh nhân phát hiện các đột biến sai nghĩa p.R778L và đột biến vô nghĩa p.S105X.





**Hình 4.6. Hình giải trình tự gen của gia đình bệnh nhân mã số W58.00**

(đột biến  $c.2333G>T$  ( $p.R778L$ ) ở exon 8 trên gen  $ATP7B$  và đột biến  $c.314C>A$  ( $p.S105X$ ) ở exon 2).

Kết quả trên cho thấy bệnh nhân có 2 đột biến dị hợp tử kết hợp là đột biến  $p.R778L$  và  $p.S105X$ . Với đột biến  $p.R778L$ , do trình tự nucleotid G thay thế thành T dẫn đến bộ ba thứ 778 CGG mã hóa Arginine (R) chuyển thành CTG mã hóa Leucine (L). Với đột biến  $p.S105X$ , do trình tự nucleotid C thay thế thành A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine (S) thay thế thành bộ ba kết thúc TAG (X). Phân tích đột biến gen  $ATP7B$  tại 2 vùng đột biến chỉ điểm trên các thành viên gia đình bệnh nhân bao gồm bố, mẹ và em trai



*bệnh nhân, kết quả cho thấy bố bệnh nhân có đột biến dị hợp tử p.R778L, mẹ bệnh nhân có đột biến dị hợp tử p.S105X và em trai bệnh nhân có đột biến dị hợp tử p.S105X. Như vậy bệnh nhân đã nhận gen bệnh p.R778L từ người bố và p.S105X từ người mẹ. Em trai bệnh nhân chỉ nhận gen bệnh p.S105X từ người mẹ.*

Theo các nghiên cứu trước đây, với bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm hoặc lệch khung dịch mã thường sẽ tiến triển thành thể bệnh nặng. Tuy nhiên, bệnh nhân này có biểu thể hỗn hợp gan - thần kinh nhưng triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng không nặng và không tiến triển nhanh như bệnh nhân mang đột biến lệch khung dịch mã (minh họa trường hợp bệnh thứ 2: bệnh nhân Nguyễn Đức Q. mã W31.00). Điều này có thể lý giải là do bệnh nhân này được phát hiện sớm hơn (lúc 9 tuổi) và đã được điều trị kịp thời, trong khi đó bệnh nhân minh họa ở trường hợp số 2 (mã W31.00) phát hiện muộn hơn, lúc 12 tuổi. Tuy nhiên, sau 3 năm điều trị bệnh vẫn tiến triển với sự xuất hiện của triệu chứng thần kinh do bệnh nhân uống thuốc không liên tục.

Em trai của bệnh nhân chỉ có một đột biến dị hợp tử p.S105X giống như người mẹ, cũng có khả năng mắc bệnh Wilson vì là đột biến dạng vô nghĩa có thể biểu hiện bệnh dù chỉ mang 1 alen đột biến. Người bố mang đột biến p.R778L dạng dị hợp (giống bệnh nhân mã số W55.00 ở trên) cũng có khả năng gây bệnh Wilson thể gan. Do đó, cần phải xét nghiệm sinh hóa máu và nước tiểu định kỳ cho bố, mẹ và em trai bệnh nhân để chẩn đoán và điều trị sớm, đặc biệt là điều trị sớm cho mẹ và em trai ngay cả khi chưa có biểu hiện lâm sàng để tránh tiến triển và biến chứng nặng của bệnh. Bên cạnh đó, cũng cần tư vấn cho người em trước khi kết hôn để tránh sinh con bị bệnh Wilson. Điều này cho thấy vai trò quan trọng của việc chẩn đoán sớm bệnh Wilson và xác định các đột biến gen gây thể bệnh nặng để có phương pháp điều trị phù hợp nhằm ngăn ngừa tiến triển và làm giảm các biến chứng của bệnh.



***Hình 4.7. Hình ảnh gia đình bệnh nhân mã số W58.00***

*Hình ảnh từ trái sang gồm: mẹ bệnh nhân, bệnh nhân (12 tuổi), em trai bệnh nhân (10 tuổi) và bố bệnh nhân.*

## KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 60 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh Wilson theo tiêu chuẩn Ferenci (2003), chúng tôi rút ra một số nhận xét như sau:

### 1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh Wilson

Đặc điểm lâm sàng biểu hiện: tuổi khởi phát hay gặp nhất từ 10-19 tuổi (51,7%); giai đoạn khởi phát hay gặp triệu chứng: run tay (65%), bàn tay vụng về, viết chữ xấu (56,7%), vàng da (45%); giai đoạn toàn phát hay gặp triệu chứng: tăng trương lực cơ tứ chi (68,3%), nói khó (61,7%), nuốt khó (58,3%).

Đặc điểm cận lâm sàng biểu hiện: ceruloplasmin huyết thanh giảm, nhóm 5,1-10 mg/dl chiếm tỷ lệ cao nhất (61,7%); đồng niệu 24 giờ tăng, trung bình là 673 $\mu$ g, cao nhất là 2475 $\mu$ g; siêu âm ổ bụng cho thấy mật độ gan không đều (51,7%) lách to và dịch ổ bụng (33,8%); tổn thương chủ yếu trên phim chụp cộng hưởng từ sọ não là tổn thương nhân xám đối xứng hai bên (86,7%).

### 2. Mối tương quan giữa đột biến gen *ATP7B* và kiểu hình của bệnh Wilson

Nghiên cứu phát hiện 26 đột biến, trong đó có 4 đột biến mới: p.V446G, p.E905X, p.P1133EfsX19 và p.N1270IfsX35 và 3 đột biến phổ biến nhất gây bệnh Wilson là c.-75C>A; p.S105X; p.R778L.

Bệnh nhân Wilson càng mang nhiều alen đột biến trên gen *ATP7B* thì nồng độ ceruloplasmin huyết thanh càng thấp và đồng niệu 24 giờ càng cao.

Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa số alen đột biến và dạng đột biến với tuổi khởi phát.

Bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung thường gặp ở thể nặng (thể hỗn hợp gan - thần kinh) hơn các thể lâm sàng khác.

Bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh thấp hơn so với bệnh nhân mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và bệnh nhân mang đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR. Tương tự như vậy, bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có nồng độ đồng niệu 24 giờ cao hơn so với bệnh nhân mang 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và bệnh nhân mang đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR.

## **KHUYẾN NGHỊ**

1. Cần phân tích gen *ATP7B* cho tất cả các bệnh nhân bị bệnh Wilson và các thành viên trong gia đình bệnh nhân giúp phát hiện sớm đột biến, có giải pháp điều trị thích hợp để hạn chế các biến chứng.
2. Cần phân tích gen với cỡ mẫu lớn hơn để tìm sự ảnh hưởng của từng đột biến trên gen *ATP7B* đến khả năng gây bệnh Wilson và tác động của các gen khác.

## **DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Đỗ Thanh Hương, Tạ Thành Văn, Nguyễn Văn Liệu, Hồ Cẩm Tú, Trần Vân Khánh (2013). Phân tích đột biến gen *ATP7B* ở bệnh nhân Wilson Việt Nam. *Tạp chí Thần kinh học Việt Nam*. 6, 164-170.
2. Đỗ Thanh Hương, Trần Huy Thịnh, Ninh Quốc Đạt, Trần Vân Khánh (2015). Đột biến gen *ATP7B* ở bệnh nhân Wilson thể gan. *Tạp chí nghiên cứu Y học*. 95(3), 1-7.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Richard K Gilroy (2014). Wilson disease clinical presentation. <http://emedicine.medscape.com/article/183456-clinical.showall>.
2. Lê Đức Hình, (1990). *Một số đặc điểm bệnh Wilson ở Việt Nam*. Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học, Viện bảo vệ sức khỏe trẻ em. 3, 316-334.
3. Lê Đức Hình (2006). Đặc điểm lâm sàng của bệnh Wilson Việt Nam. *Y học Việt Nam*. 363, 1-9.
4. Đỗ Thanh Hương, Nguyễn Văn Liệu (2012). Đặc điểm lâm sàng và hình ảnh cộng hưởng từ sọ não của bệnh Wilson. *Tạp chí Nhi khoa*. 3(5), 26-30.
5. Đỗ Thanh Hương, Nguyễn Văn Liệu, Phan Tuấn Nghĩa và cộng sự (2010). Đột biến gen R778L ở bệnh nhân Wilson Việt Nam. *Tạp chí Nhi khoa*. 3(3,4), 231-235.
6. Hoàng Lê Phúc, Krsin Zinober, Claudia Willheim và cộng sự (2012). Bước đầu phân tích đột biến phân tử gen *ATP7B* ở bệnh nhi Wilson Việt Nam. *Y học Thành Phố Hồ Chí Minh*. 16(4).
7. Thi Mai Huong Nguyen, Ngo Diem Ngoc, Thi Phuong Mai Nguyen, et al (2015). Mutation analysis of 16 Vietnamese Wilson patients. *Annals Translational Medicine*. 3, 57-58.
8. Phan Tôn Hoàng (2016). *Nghiên cứu phát hiện đột biến gen gây bệnh Wilson*. Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
9. Wilson SAK (1912). Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. 34, 295-507.
10. Menkes Jonh H (1980). Wilson disease. *Text book of Child Neurology*. 80-86.

11. Martins DC., Baldwin D., Portmann B., et al (1992). Value of urinary copper excretion after penicillamin challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology*. 15(4), 609-615.
12. Gitlin, J. D (2003). Wilson disease. *Gastroenterology*. 125, 1868-1877.
13. Walshe, J.M (1956). Penicillamine, a new oral therapy for Wilson disease. *American Journal of Medicine*. 21, 487-495.
14. Hoogenraad TU., Koevoet R., De Ruyter Korver (1979). Oral zinc sulphat as long treatment in Wilson's disease (Hepatolenticular degeneration). *European Neurology*. 18, 205-211.
15. Schylsky, M (1979). Liver transplantation for Wilson's disease indication and out come. *Hepatology*. 19, 583.
16. Bull PC., Thomas GR., Romens JM., et al (1993). The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genetics*. 5, 327-337.
17. Thomas GR, Bull PC., Roberts EA., et al (1994). Halotype studies in Wilson's disease. *American Journal of Human Genetics*. 54, 71-78.
18. Figus A., Anginus A., Loudianos G. (1995). Molecular pathology and halotype analysis of Wilson disease in Mediterranean population. *American Journal of Human Genetics*. 57, 1318-1324.
19. Kim EK., Yoo OJ., Song KY., et al (1998). Identification of three novel mutations and a high frequency of the Arg778-to-Leu mutation in Korean patients with Wilson's disease. *Human Mutation*. 11, 275-278.
20. Bùi Quốc Hương, Nguyễn Nhật Thông, và cộng sự (1970). Tám trường hợp bệnh thoái hóa gan - nhân đậu ở Việt Nam. *Hội nghị Thần kinh học Mỹ*. 25, 1147.

21. Chu Văn Tường, Lê Văn Thiêng và cộng sự (1979). Bệnh Wilson ở trẻ em (qua 2 trường hợp). *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học, Viện bảo vệ sức khỏe trẻ em.*
22. Merle U., Ferenci P., Stremmel W. (2007). Clinical presentation, diagnosis and long term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gastroenterology*. 56(1), 115-120.
23. Manolaki N., Daikos G L., Panagiotakaki E., et al (2009). Wilson disease in children: analysis of 57 cases. *Journal Pediatrics Gastroenterology Nutrition*. 48(1), 72-77.
24. Roberts EA., Schilsky ML., et al (2008). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*, 47(6), 2089-2111.
25. Schylsky, M.L (2009). Wilson disease: Current status and the future. *Journal of Biochemistry*. 30.
26. Richard Gilroy K (2014). Wilson Disease workup. <http://emedicine.medscape.com/article/183456-workup>.
27. Shyamal K. Das, Kunal Ray (2006). Wilson's disease: an update. *Nature clinical practice neurology*. 2(9), 482-493.
28. Walshe, J.M. (2003). Wilson's disease: the importance of measuring serum ceruloplasmin non-immunologically. *Annals of Clinical Biochemistry*. 40, 115-121.
29. Ferenci P., Caca K., Georgios Loudianos, et al (2003). Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver International*. 23, 139-142.
30. Vijada, D.M. (1990). Wilson disease - a CT Scan teaching file. [www.radiologyworld.com/Ctscan-wilson.htm](http://www.radiologyworld.com/Ctscan-wilson.htm).
31. Tarnacka B., Szeszkowski W., Golebiowski M., et al (2009). Metabolic changes in 37 newly diagnosed Wilson's disease patients assessed by magnetic resonance spectroscopy. *Parkinsonism and Related Disorders*. 15(8), 582-586.



32. Sternlieb I. (1978). Diagnosis of Wilson's disease. *Gastroenterology*. 774-787.
33. Hitoshi S., Iwata M., Yoshikawa K. (1991). Midbrain pathology of Wilson's disease: MRI analysis of three cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 54, 624-626.
34. Brewer GJ., Yuzbasiyan-Gurkan V., Dick R., et al (1993). Does a vegetarian diet control Wilson's disease? *Journal of American College of Nutrition*. 12, 527-530.
35. Scheinberg IH., Sternlieb I., Schilsky M., et al (1987). Penicillamine may detoxify copper in Wilson's disease. *Lancet*. 95.
36. Walshe JM., Yealland M. (1993). Chelation treatment of neurological Wilson's disease. *International Journal of Medicine*. 86, 197-204.
37. Santos Silva EE., Sarles J., Buts JP., et al (1996). Successful medical treatment of severe decompensated Wilson disease. *Journal Pediatrics of Gastroenterology Nutrition*. 128, 285-287.
38. Saito H., Watanabe K., et al (1991). Triethylene-tetramine (trien) therapy for Wilson's disease. *The Tohoku Journal of Experimental Med*. 164, 29-35.
39. George J. Brewer (2006). Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate IV. Comparison of tetrathiomolybdate and trientine in a double blind study of treatment of the neurologic presentation of Wilson disease. *Archives of Neurology*. 63(4), 34-39.
40. Van den Berghe PV., Stapelbroek JM., Krieger E., et al (2009). Reduced expression of *ATP7B* affected by Wilson disease causing mutations is rescued by pharmacological folding chaperones 4-phenylbutyrate and curcumin. *Hepatology*. 50, 1783-1795.

41. Karl Heinz Weiss (2013). *Wilson Disease*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1512>.
42. Kiss JE., Berman D., Van Thiel (1998). Defective removal of copper by plasma exchange in fulminant Wilson's disease. *Transfusion*. 18(4), 327-331.
43. Eghtesad B., Nezakatgoo N., Geraci LC., et al (1999). Liver transplantation for Wilson's disease: a single center experience. *Liver Transplantation Surgery*. 5, 467-474.
44. Medici V., Mirante VG., Fassati LR., (2005). Liver transplantation for Wilson's disease: The burden of neurological and psychiatric disorders. *Liver Transplantation*. 11, 1056-1063.
45. Yoshitoshi EY., Takada Y., Oike F., et al (2009). Long term outcomes for 32 cases of Wilson's disease after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 87(2). 261-267.
46. Olivier Danos (2014). Gene therapy for Wilson's disease. *Wilson disease association*. 9, 14-17.
47. Frydman M., Bonn Tarmir B., Frarrer LA., et al (1985). Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82, 1819-1821.
48. Thomas GR., Forbes JR., Roberts EA., et al (1995). The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genetics*. 9, 210-217.
49. David H. Abramson. *ATP7B* - ATPase, Cu<sup>++</sup> transporting, beta polypeptide. *Genetics Home Reference*. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/-ATP7B>.
50. Ray K., Gupta A. (2005). Gene symbol: *ATP7B* Wilson's disease. *Human genetics*. 118, 541.

51. Olivarez L., Caggana M., Pass KA., et al (2001). Estimate of the frequency of Wilson's disease in the US Caucasian population: a mutation analysis approach. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806854>.
52. Alison J. Coffey, Miranda Durkie, Stephen Hague (2013). A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain*, 136(5), 1476- 1487.
53. Razvan Iacob, Speranta Iacob, Anca Nastase (2012). The His1069Gln mutation in the *ATP7B* gene in Romanian patients with Wilson's disease referred to a tertiary gastroenterology. *Journal of Gastrointestinal Liver*. 21(2), 181-185.
54. Anjali B. Shah, Igor Chernov, Hong Tao Zhang (1997) Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (*ATP7B*): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *American Journal of Human Genetics*. 61, 317-318.
55. Majumdar R., M Al Jumah, M Fraser (2003). 4193delC, a common mutation causing Wilson's disease in Saudi Arabia: rapid molecular screening of patients and carriers. *Journal of Clinical Pathology*. 56, 302-304.
56. Han-Wook Yoo (2002). Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human *ATP7B* gene of Korean patients with Wilson disease. *Genetics in Medicine*, 4, 43-38.
57. Lei Wan, Chang-Hai Tsai, Chin-Moo Hsu, et al (2010). Mutation analysis and characterization of alternative splice variants of the Wilson disease gene *ATP7B*. *Hepatology*. 52(5), 1662-1670.
58. Li-Hua Wang, Ye-Qing Huang, Xuan Shang, et al (2011). Mutation analysis of 73 southern Chinese Wilson's disease patients: identification of 10 novel mutations and its clinical correlation. *Journal of Human Genetics*. 56, 660-665.

59. Yasuaki Tatsumi, Ai Hattori, Hisao Hayashi, et al (2010). Current state of Wilson disease patients in central Japan. *International Medicine*. 49, 809-815.
60. Danadevi Kuppala, Jie Deng, et al (2009). Wilson disease mutations in the American population: Identification of five novel mutations in *ATP7B*. *The Open Hepatology Journal*. 1, 1-4.
61. Marta M. Deguti, Janine Genschel, et al (2004). Wilson disease: Novel mutation in the *ATP7B* gene and clinical correlation in Brazilian Patients. *Human mutation*. 698.
62. Annu Aggarwal, Gursimran Chandhok, Theodor Todorrov, et al (2013). Wilson disease mutation pattern with genotype-phenotype correlations from Western India: Confirmation of p.C271\* as a common Indian mutation and identification of 14 novel mutation. *Annals of Human Genetics*. 77, 299-307.
63. Tawhida Y, Abdelghaffar, et al (2008). Mutational analysis of *ATP7B* gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *Journal of Human Genetics*. 53, 681-687.
64. Narges Zali, Seyed Reza Mohebbi, et al. (2011). Prevalence of *ATP7B* gene mutations in Italian patients with Wilson disease. *Hepatitis Monthly*. 11(11). 890-894.
65. Aleksandra Tomic, Valerija Dobricie, et al (2013). Mutational analysis of *ATP7B* gene the genotype-phenotype correlation in patients with Wilson's disease in Serbia. *Vojnosanitetski Pregled*. 70(5), 457-462.
66. Gromadzka G., Schmidt HJ., Genschel J., et al (2005). Frameshift and nonsense mutations in the gene for *ATP7B* are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clinical Genetics*. 68, 524-532.

67. Slavka Vrabelova, Ondrej Letocha, Marek Borsky, et al (2005). Mutation analysis of the *ATP7B* gene and genotype-phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 86, 277-285.
68. Maria-Barbara Lepori, Antonietta, et al (2012). Mutation analysis of the *ATP7B* gene in a new group of Wilson's disease patients: contribution to diagnosis. *Molecular and Cellular Probes*. 26, 147-150.
69. Ferenci P. (2006). Regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Human Genetics*. 120(2), 151-159.
70. Xiao-Qing Liu, Ya-Fen Zhang, Tze-Tze Liu, et al (2004). Correlation of *ATP7B* genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World Journal of Gastroenterology*. <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v10/i4/590.htm>. 10(4), 590-593.
71. Tạ Thành Văn, Hồ Cẩm Tú, Tạ Minh Hiếu và cộng sự (2011). Xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen *ATP7B* gây bệnh Wilson. *Tạp chí nghiên cứu Y học*. 3.
72. Dominik Huster, Angelika Kühne, Ashima Bhattacharjee (2012). Diverse functional properties of Wilson disease *ATP7B* variants. *Gastroenterology*. 142(4), 947-956.
73. Theru A. Sivakumaran, Kiran Kucheria and Peter J. Oefner (2003). Denaturing high performance liquid chromatography in the molecular diagnosis of genetic disorders. *Current science*. 84(3), 293.
74. Sandeep Kumar, Baburam Thapa, et al (2007). Analysis of most common mutations R778G, R778L, R778W, I1102T and H1069Q in Indian Wilson disease patients: Correlation between genotype/phenotype/copper ATPase activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 294, 1-10

75. Khuất Hữu Thanh (2005). *Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
76. Litwin T., G. Gromadzka, J. Samochowiec, et al (2012). Association of dopamine receptor gene polymorphisms with the clinical course of Wilson disease. *JIMD Reports*. 163.
77. J. Jason L. Burkhead., Lawrence W. Gray, Svetlana Lutsenko (2011). System biology approach to Wilson's disease. *Biometals*. 24(3), 455-466.
78. Peter Ferenci (2014). Phenotype-genotype correlations in patients with Wilson's disease. *Annals New York Academy of Sciences*. 1315, 1-5.
79. Toshihide Okada, Yuta Shiono, Yoshiyuki Kaneko (2010). High prevalence of fulminant hepatic failure among patients with mutant alleles for truncation of *ATP7B* in Wilson's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 45, 1232-1237.
80. Tawhida Y Abdel Ghaffar, Solaf M Elsayed, Suzan Elnaghy, et al (2011). Phenotypic and genetic characterization of a cohort of pediatric Wilson disease patients. *BMC Pediatrics*, <http://www.biomed-central.com/14712431/11/56>, 11(56).
81. Beom H. Lee, Joo H. Kimim, Sun Y. Lee, Hye Y. Jin, et al (2011). Distinct clinical courses according to presenting phenotypes and their correlations to *ATP7B* mutations in a large Wilson's disease cohort. *Liver International*.
82. Członkowska (2014). Concordance rates of Wilson's disease phenotype among siblings. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 37. 131-135.
83. Violeta Mihaylova, Teodor Todorov, Hristo Jelev (2012). Neurological symptoms, genotype-phenotype correlations and ethnic specific differences in Bulgarian patients with Wilson disease. *The Neurologist*. 18(4), 13-16.

84. Xin-Hua Li, Yi Lu, Yun Ling, Qing-Chun Fu, et al (2011). Clinical and molecular characterization of Wilson's disease in China: identification of 14 novel mutations. *BMC Medical Genetics*. 12(6). 16-21.
85. Lisbeth Birk Moller, Nina Horn, Tina Dysgard Jeppesen (2011). Clinical presentation and mutations in Danish patients with Wilson disease. *European Journal of Human Genetics*. 19, 935-941.
86. Sheng Ye, Liang Gong, Quan-Xiang Shui, et al (2007). Wilson disease: Identification of two novel mutations and clinical correlation in Eastern Chinese patients. *World Journal of Gastroenterology*. 13(38), 5147-5150.
87. Santhosh S., RV Shaji, CE Eapen, (2008). Genotype-phenotype correlation in Wilson's disease within families a report on four south Indian families. *World Journal of Gastroenterology*, <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v10/i4/590.htm>. 14(29), 4672-4676.
88. Ricardo Schmitt de Bem, Salmo Raskin (2013). Wilson's disease in Southern Brazil: genotype-phenotype correlation and description of two novel mutations in *ATP7B* gene. *Archives of Neuropsychiatry*. 71(8), 503-507.
89. Waldenström E., Lagerkvist A., Dahlman T., et al (1996). The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genetics*. 9, 210-217.
90. Stapelbroek JM., Bollen CW., Ploos van Amstel JK., et al (2004). The H1069Q mutation in *ATP7B* is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol*. 41, 758-763.
91. Gromadzka G., Chabik G., Mendel T., (2010). Middle-aged heterozygous carriers of Wilson's disease do not present with significant phenotypic deviations related to copper metabolism. *Journal of Genetics*. 89(4), 463-467.

92. Dastsooz H., Dehghani SM., Imanieh MH. (2013). A new *ATP7B* gene mutation with severe condition in two unrelated Iranian families with Wilson disease. *Gene Reviews*, 514(1), 48-53.
93. Radan Bruha, Zdenek Marecek, Lenka Pospisilova (2010). Long term follow up of Wilson Disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver International*. ISSN 1478-3223, 83-91.
94. Karl Heinz Weiss, Uta Merle, Mark Schaefer (2006). Copper toxicosis gene *MURR1* is not changed in Wilson disease patients with normal blood ceruloplasmin levels. *World Journal of Gastroenterology*. <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v10/i4/590.htm>. 12(14), 2239-2242.
95. Prashanth LK., Taly AB., et al. (2004). Wilson's disease: diagnosis errors and clinical implications. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 907-909.
96. Maier Dobersberger T., Peter Ferenci (1997). Detection His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction. *Pubmed ID*. 127(1), 21-26.
97. Emanuele Nicastro, et al (2009). Genotype-phenotype correlation in Italian children with Wilson's disease. *Hepatology*. 50, 555-561.
98. Tan Nguyen Nang (2005). Clinical feature and magnetic resonance imaging of Wilson disease-4 cases report. *Parkinson and related disorders: international congress on PD and related disorder Berlin*. 11, 149.
99. Jayantee Kalita, Bindu I Somarajan, et al. R778L, H1069, and I1102T mutation study in neurologic Wilson disease (2010). *Neurology India*. 58, 627-630.



100. Shantala Hegde, Sanjib Sinha, et al (2010). Cognitive profile and structural findings in Wilson's disease: A neuropsychological and MRI-based study. *Neurology India*. 58, 708-813.
101. Cullen LM, Prat L, Cox DW (2003). Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, *ATP7B*, in patients with Wilson disease. *Clinical Genetics*, 64, 429-432.
102. Lee CC., Wu JY., Tsai FJ., et al (2000). Molecular analysis of Wilson disease in Taiwan: identification of one novel mutation and evidence of haplotype-mutation association. *Journal of Human Genetics*. 45, 275-279.
103. Huyng-Doo Park, Huyn Kyung Park (2010). Association of *ATP7B* mutation detection rate with biochemical characteristics in Korean patients with Wilson disease. *Annals of clinical laboratory science*. 40(1), 15-19.
104. Curtis D, Durkie M. A (1999). Study of Wilson disease mutations in Britain. *Human Mutations*. 14, 4-11.
105. Julnar Usta J., Antonios Wehbeh, Khaled Rida et al (2014). Phenotype-genotype correlation in Wilson disease in a large Lebanese family: Association of c.2299insC with hepatic and of p.Ala1003Thr with neurologic phenotype. *Plos one*, [www.plosone.org](http://www.plosone.org). 9(11), e109727, 1-9.

## **PHỤ LỤC 1**

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

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

**PHỤ LỤC 2**  
**BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU BỆNH WILSON**

STT: ..... Mã bệnh án: ..... Mã nghiên cứu: .....

Ngày thu thập bệnh án:

**I. Hành chính**

Họ và tên bệnh nhân:

Tuổi

Giới: 1. Nam 2. Nữ

Nghề nghiệp:

Dân tộc:

Địa chỉ:

Điện thoại liên hệ:

Họ tên bố: Tuổi: Nghề nghiệp:

Họ và tên mẹ: Tuổi: Nghề nghiệp:

Ngày vào viện

Ngày ra viện:

Lý do vào viện:

**II. Phần hỏi bệnh**

**1. Bệnh sử:**

- Thời gian mắc bệnh: tháng ..... năm ..... (khoảng thời gian: .....)

- Cách thức khởi phát bệnh: 1. Cấp 2. Bán cấp 3. Mạn tính

- Triệu chứng khởi phát:

- Triệu chứng toàn phát:

- Đã được khám ở đâu:

- Chẩn đoán bệnh gì:

- Thuốc điều trị:

- Diễn biến điều trị

**2. Tiền sử**

2.1. Tiền sử bản thân:

- Sản khoa:

- Bệnh tật:

2.2. Tiền sử gia đình

- Bố mẹ hôn nhân cùng huyết thống

- Bô mẹ bị bệnh:
- Anh chị em bị bệnh:
- Họ hàng bị bệnh:

### **III. Khám bệnh**

#### **1. Khám toàn thân**

- Phù
- Da xạm
- Da xanh, niêm mạc nhợt
- Xuất huyết dưới da
- Móng tay màu xanh

#### **2. Khám thần kinh**

- Ý thức:
- Giảm vận động
- Run ngón chi:     1. Đối xứng                    2. Không đối xứng
- Nói khó:
- Nuốt khó
- Chảy nước dãi
- Thất điều
- Bàn tay vụng về
- Bộ mặt bất động (vô cảm)
- Tăng trương lực cơ ngoại tháp
- Múa vờn, múa giật
- Cơn động kinh
- Rối loạn cơ tròn

#### **2. Khám tâm thần**

- Thay đổi nhân cách
- Rối loạn hành vi
- Dễ xúc động
- Suy giảm nhận thức
- Suy giảm trí nhớ

#### **3. Khám mắt**

- Vòng Kayser – Fleischer
- Đục thủy tinh thể hình hoa hướng dương
- Giảm thị lực

#### **4. Khám tiêu hoá**

- Cổ trướng
- Gan to
- Lách to
- Xao mạch
- Dấu hiệu bàn tay son
- Tuần hoàn bàng hệ
- Vàng da, vàng mắt
- Phân đen

#### **5. Khám hệ tiết niệu**

- Đái máu

#### **6. Khám xương khớp**

- Viêm xương khớp
- Tổn thương sụn

#### **7. Khám cơ quan khác**

- Tiếng tim bất thường

### **IV. Xét nghiệm**

#### **1. Xét nghiệm máu**

- Công thức máu:

HC                      BC                      TC                      Hb:

- Sinh hoá máu:

Ure:                      Creatinin:                      GOT:                      GPT:

ALP

Protein:                      Albumin

Billirubin TP:                      Billirubin TT:                      Billirubin GT:

Đồng

Ceruloplasmin:

- Đông máu cơ bản:                      Fibrinogen:                      APTT:

PT

- Test Coomb

#### **2. Nước tiểu**

- Protein
- Calci
- Hồng cầu

- Đồng niệu 24 giờ:

- Test D-Penicilamin: Trước:

Sau:

### **3. Siêu âm ổ bụng**

- Mật độ gan
- Kích thước gan
- Kích thước lách
- Đường mật trong gan
- Tĩnh mạch cửa
- Dịch ổ bụng

### **4. Chụp cắt lớp vi tính sọ não**

### **5. Chụp cộng hưởng từ sọ não**

### **6. Phân tích gen ATP7B**

- Bệnh nhân:
- Anh, chị, em ruột của bệnh nhân:
- Bố, mẹ của bệnh nhân:
- Người thân khác cùng huyết thống với bệnh nhân:

## **V. Chẩn đoán**

Tổng điểm theo Ferrenci:

## **VI. Điều trị**

1. D - Penicillamin 300mg
2. Trientine 250 mg
3. Kẽm
4. Vitamin E
5. Vitamin B6
6. Điều trị khác

*Người làm bệnh án*

### PHỤ LỤC 3

#### Nồng độ và độ tinh sạch của 60 mẫu DNA ở nhóm bệnh nhân

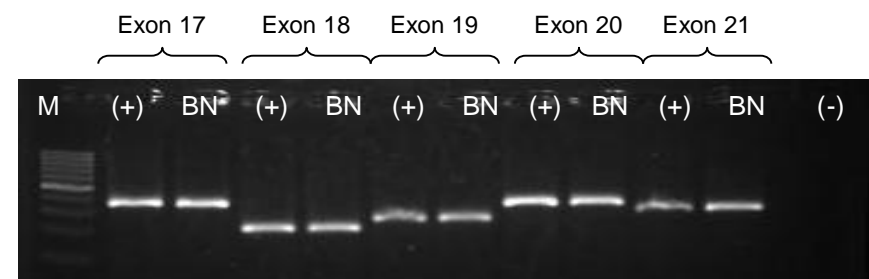
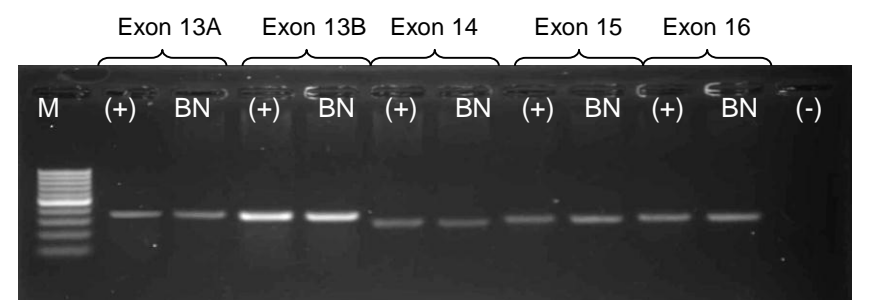
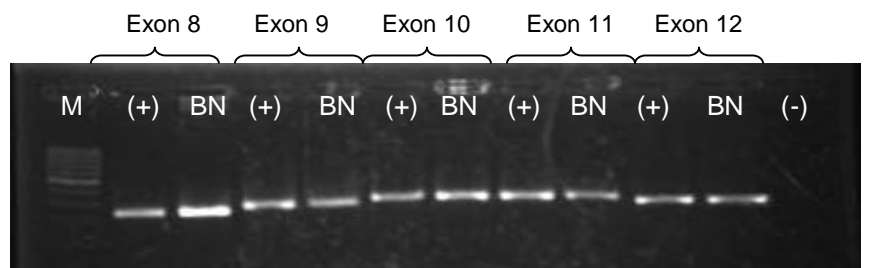
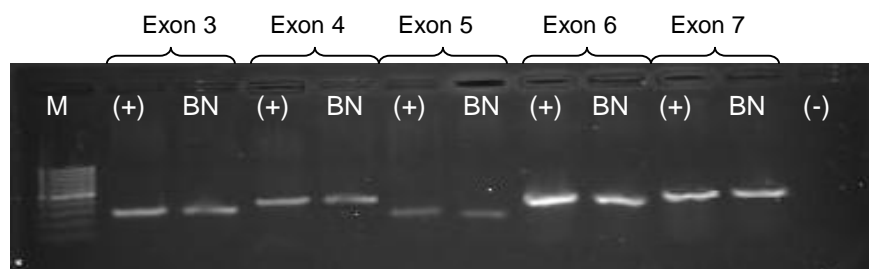
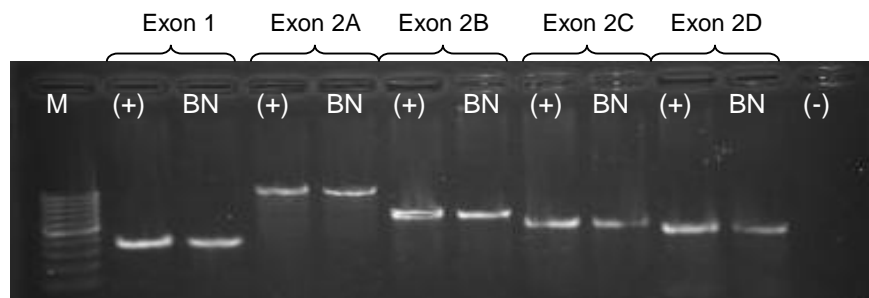
STT	Nồng độ DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )	STT	Nồng độ DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )	STT	Nồng độ DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )
<b>1</b>	237	1,7	<b>21</b>	303	1,7	<b>41</b>	315	1,7
<b>2</b>	313	1,7	<b>22</b>	264	1,8	<b>42</b>	382	1,8
<b>3</b>	291	1,8	<b>23</b>	213	1,7	<b>43</b>	279	1,7
<b>4</b>	256	1,7	<b>24</b>	214	1,7	<b>44</b>	290	1,7
<b>5</b>	351	1,8	<b>25</b>	319	1,7	<b>45</b>	263	1,7
<b>6</b>	257	1,7	<b>26</b>	244	1,7	<b>46</b>	219	1,7
<b>7</b>	255	1,9	<b>27</b>	213	1,8	<b>47</b>	280	1,8
<b>8</b>	321	1,8	<b>28</b>	216	1,8	<b>48</b>	211	1,8
<b>9</b>	365	1,8	<b>29</b>	249	1,8	<b>49</b>	301	1,9
<b>10</b>	238	1,9	<b>30</b>	264	1,9	<b>50</b>	199	1,9
<b>11</b>	275	1,8	<b>31</b>	322	1,8	<b>51</b>	322	1,8
<b>12</b>	221	1,7	<b>32</b>	227	1,8	<b>52</b>	265	1,8
<b>13</b>	343	1,8	<b>33</b>	298	1,8	<b>53</b>	322	1,8
<b>14</b>	312	1,7	<b>34</b>	230	1,7	<b>54</b>	287	1,7
<b>15</b>	278	1,7	<b>35</b>	312	1,7	<b>55</b>	391	1,7
<b>16</b>	239	1,7	<b>36</b>	234	1,7	<b>56</b>	203	1,7
<b>17</b>	278	1,8	<b>37</b>	309	1,8	<b>57</b>	280	1,8
<b>18</b>	299	1,7	<b>38</b>	325	1,7	<b>58</b>	283	1,7
<b>19</b>	284	1,7	<b>39</b>	224	1,7	<b>59</b>	230	1,7
<b>20</b>	293	1,7	<b>40</b>	312	1,7	<b>60</b>	293	1,7

### Nồng độ và độ tinh sạch của 40 mẫu DNA ở nhóm chứng

STT	Nồng độ DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )	STT	Nồng độ DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )	STT	Nồng độ DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )
<b>1</b>	256	1,7	<b>15</b>	263	1,7	<b>29</b>	254	1,7
<b>2</b>	254	1,9	<b>16</b>	254	1,7	<b>30</b>	352	1,9
<b>3</b>	320	1,8	<b>17</b>	253	1,8	<b>31</b>	259	1,7
<b>4</b>	265	1,8	<b>18</b>	256	1,8	<b>32</b>	260	1,8
<b>5</b>	258	1,9	<b>19</b>	245	1,8	<b>33</b>	251	1,8
<b>6</b>	255	1,8	<b>20</b>	254	1,9	<b>34</b>	305	1,9
<b>7</b>	225	1,7	<b>21</b>	352	1,8	<b>35</b>	199	1,9
<b>8</b>	347	1,8	<b>22</b>	257	1,8	<b>36</b>	352	1,8
<b>9</b>	332	1,7	<b>23</b>	268	1,8	<b>37</b>	245	1,8
<b>10</b>	378	1,8	<b>24</b>	235	1,7	<b>38</b>	352	1,8
<b>11</b>	259	1,7	<b>25</b>	352	1,8	<b>39</b>	267	1,7
<b>12</b>	258	1,8	<b>26</b>	254	1,7	<b>40</b>	371	1,7
<b>13</b>	249	1,7	<b>27</b>	369	1,8			
<b>14</b>	254	1,7	<b>28</b>	345	1,7			

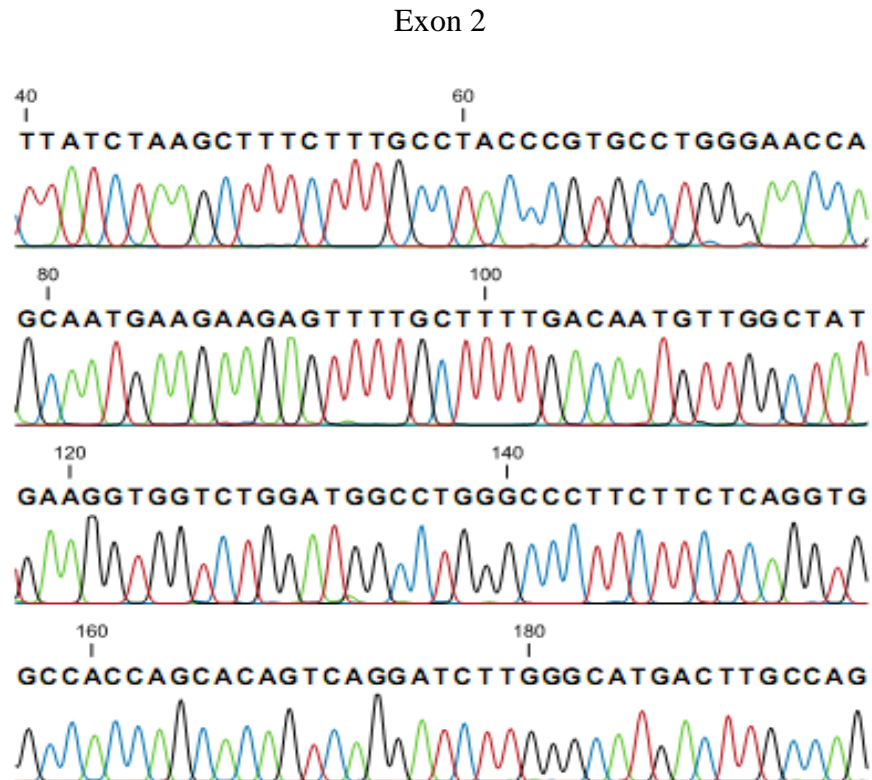
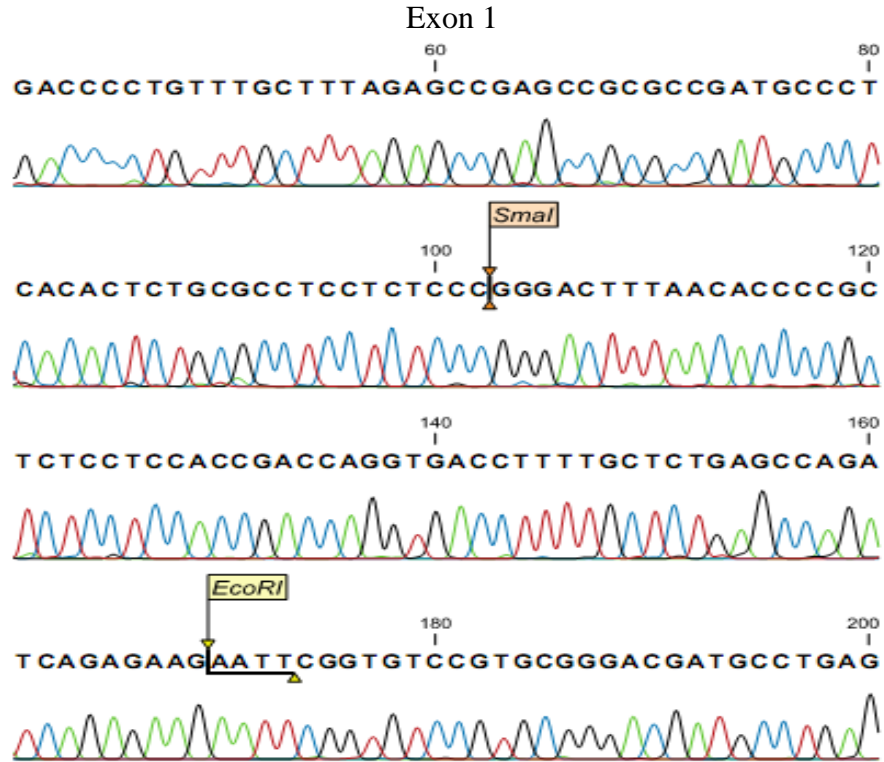


**PHỤ LỤC 4**  
**HÌNH ẢNH KHUẾCH ĐẠI CHUỖI CỦA 21 EXON TRÊN GEN *ATP7B***



**Chú thích:** M: Marker 100bp. BN: Bệnh nhân. (+): mẫu đối chứng dương. (-): mẫu đối chứng âm không có DNA

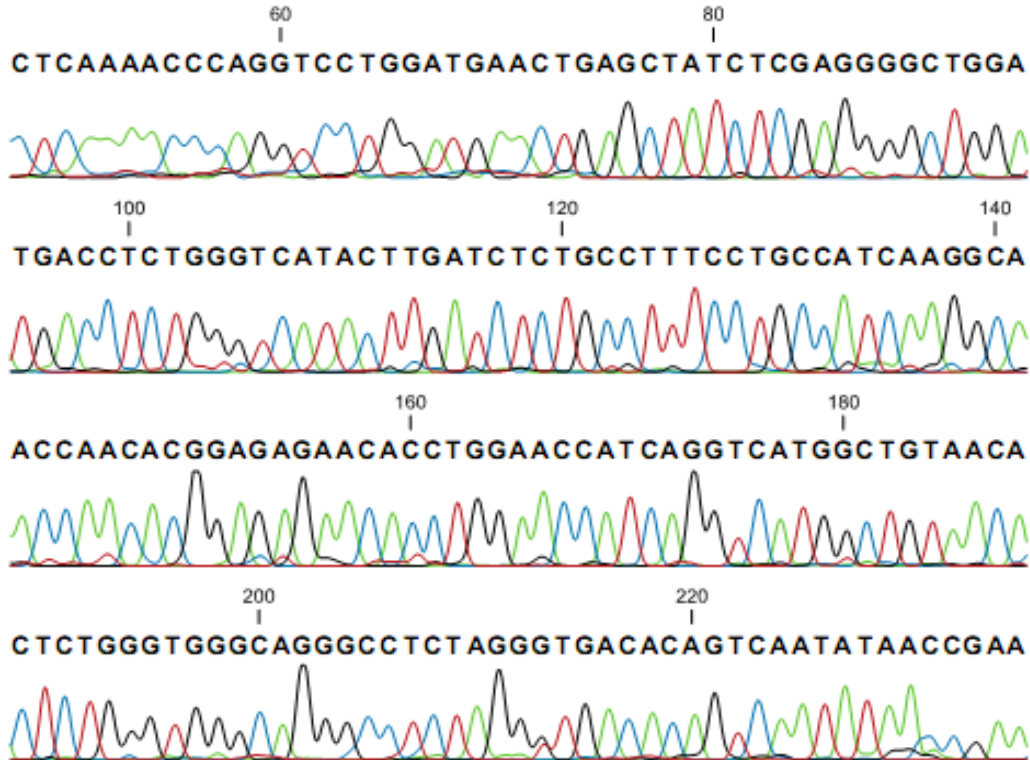
## PHỤ LỤC 5 HÌNH ẢNH GIẢI TRÌNH TỰ 21 EXON TRÊN GEN *ATP7B*



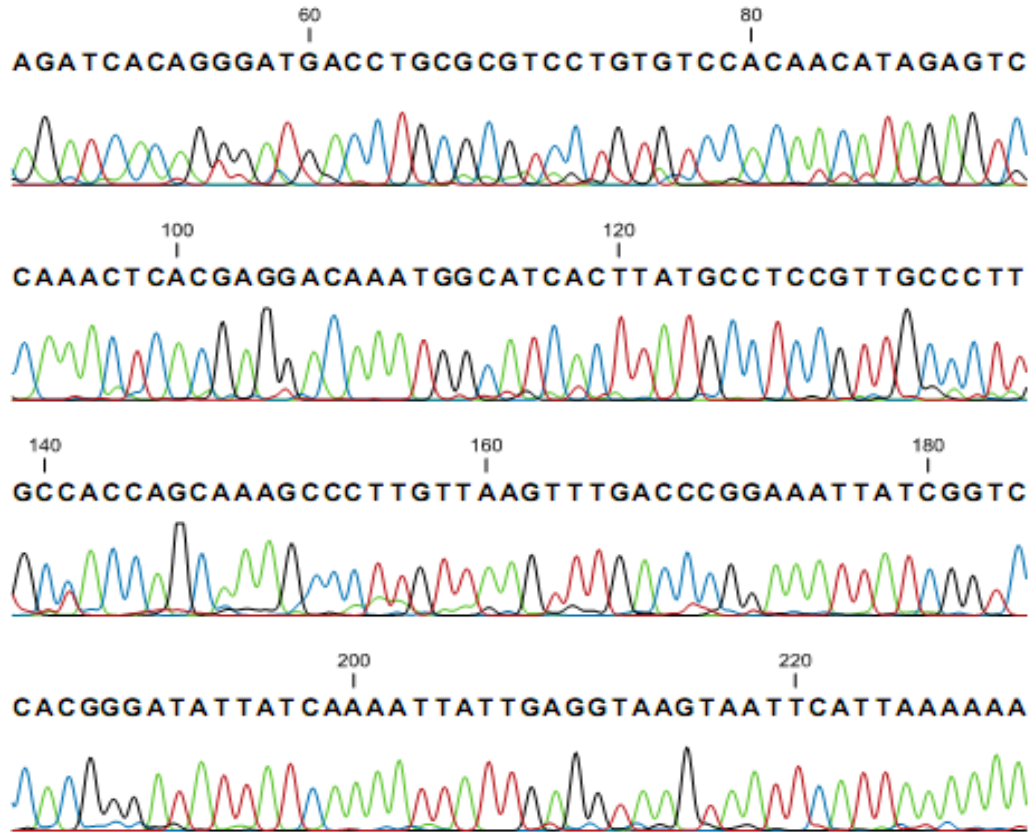
Exon 3



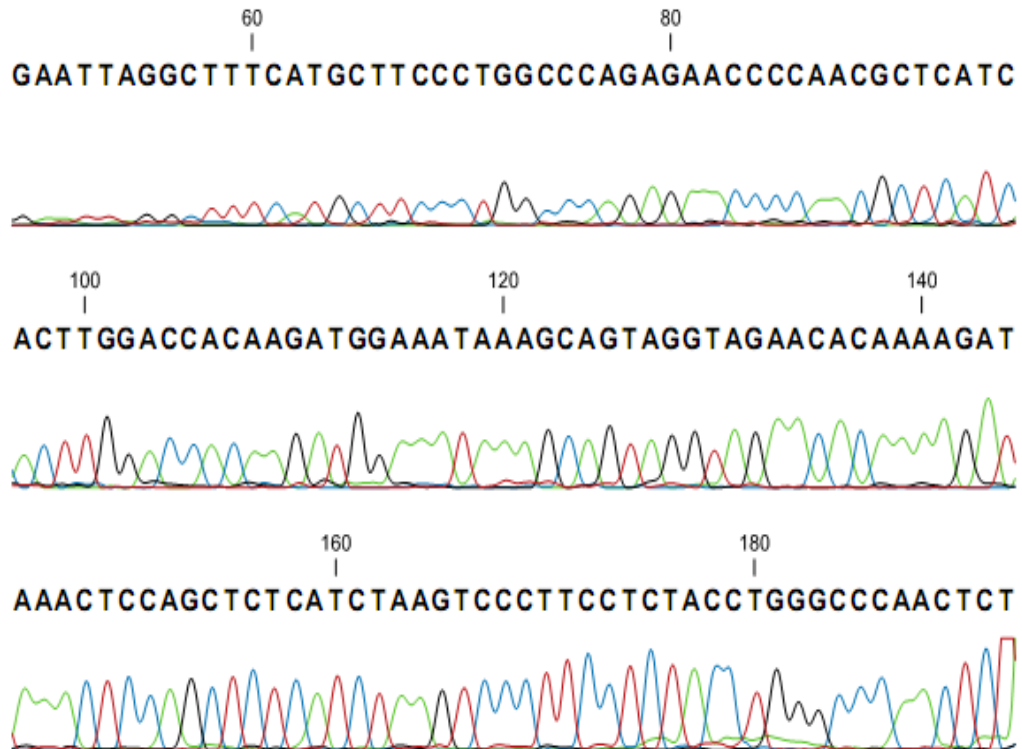
Exon 4



Exon 5



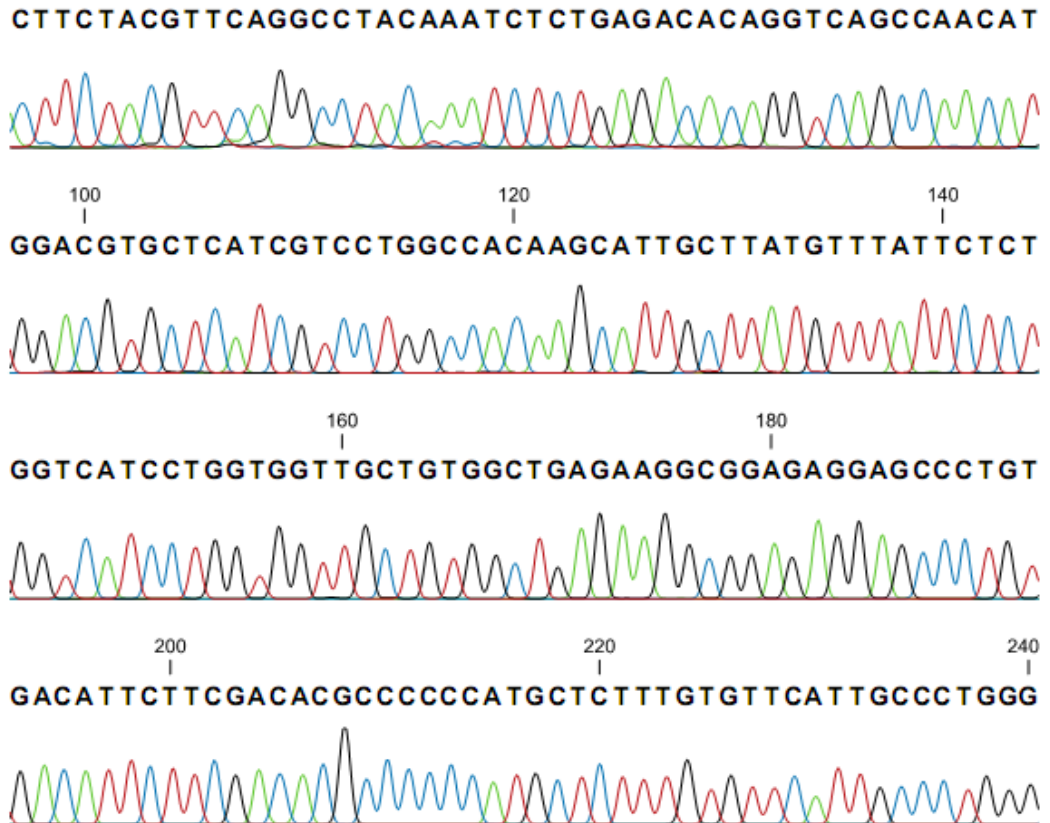
Exon 6



Exon 7

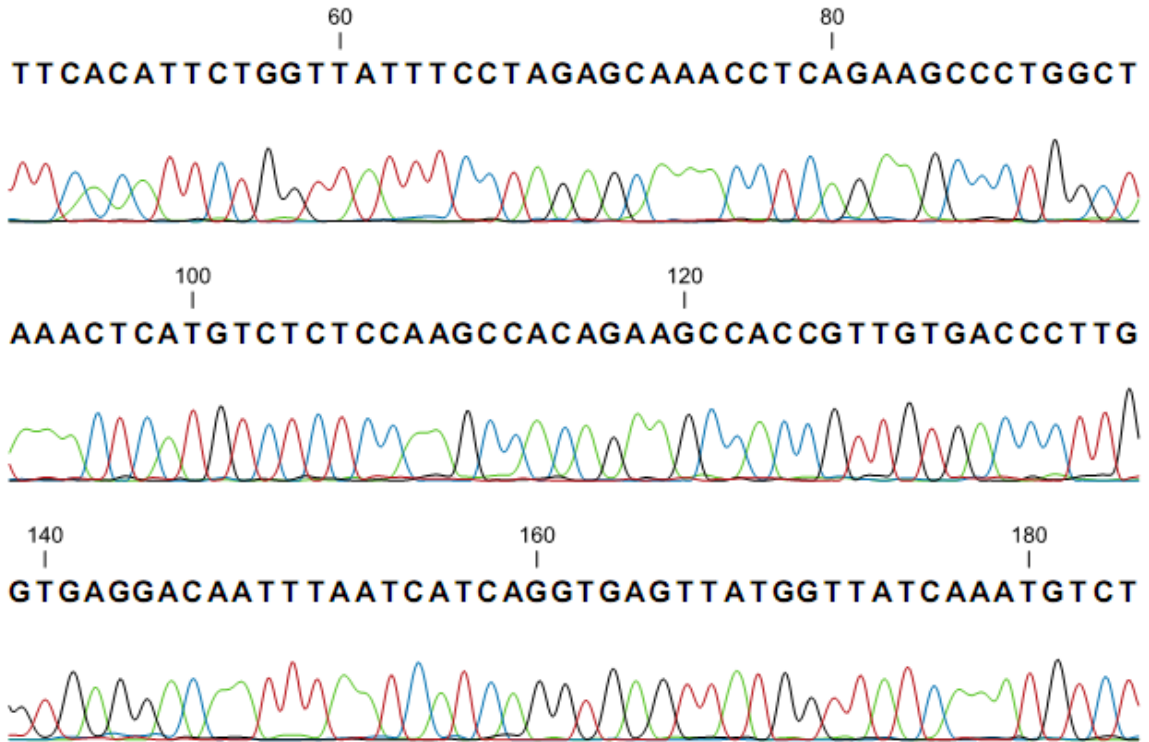


Exon 8

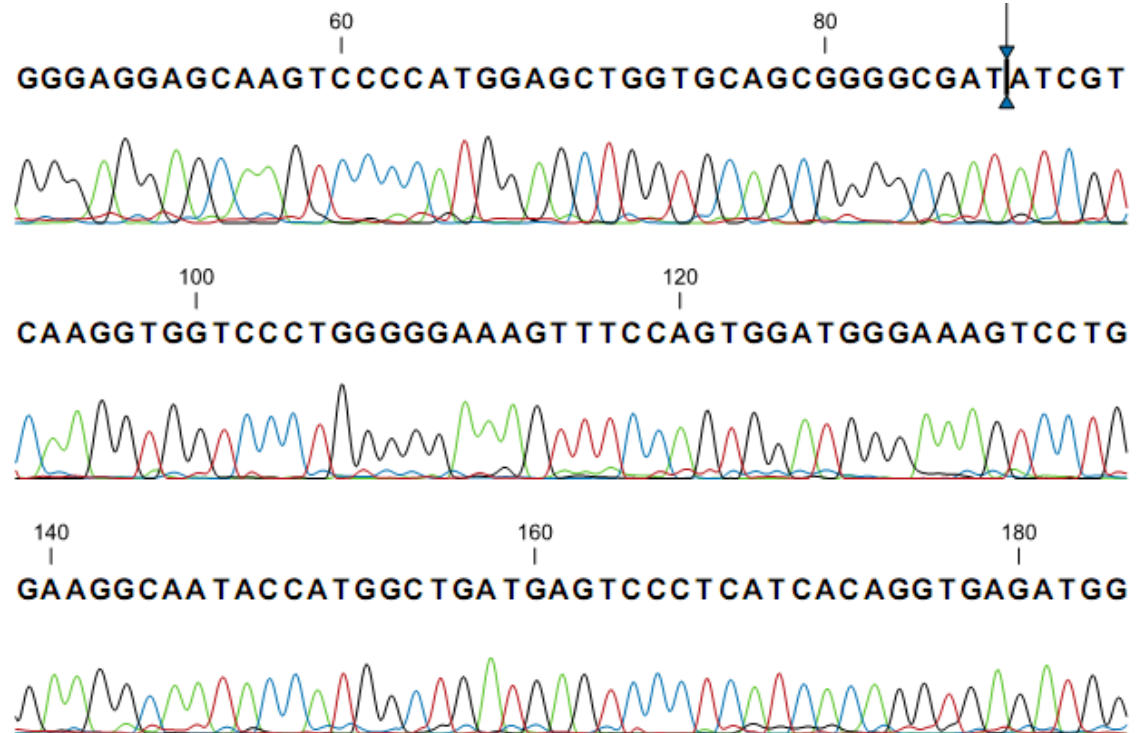




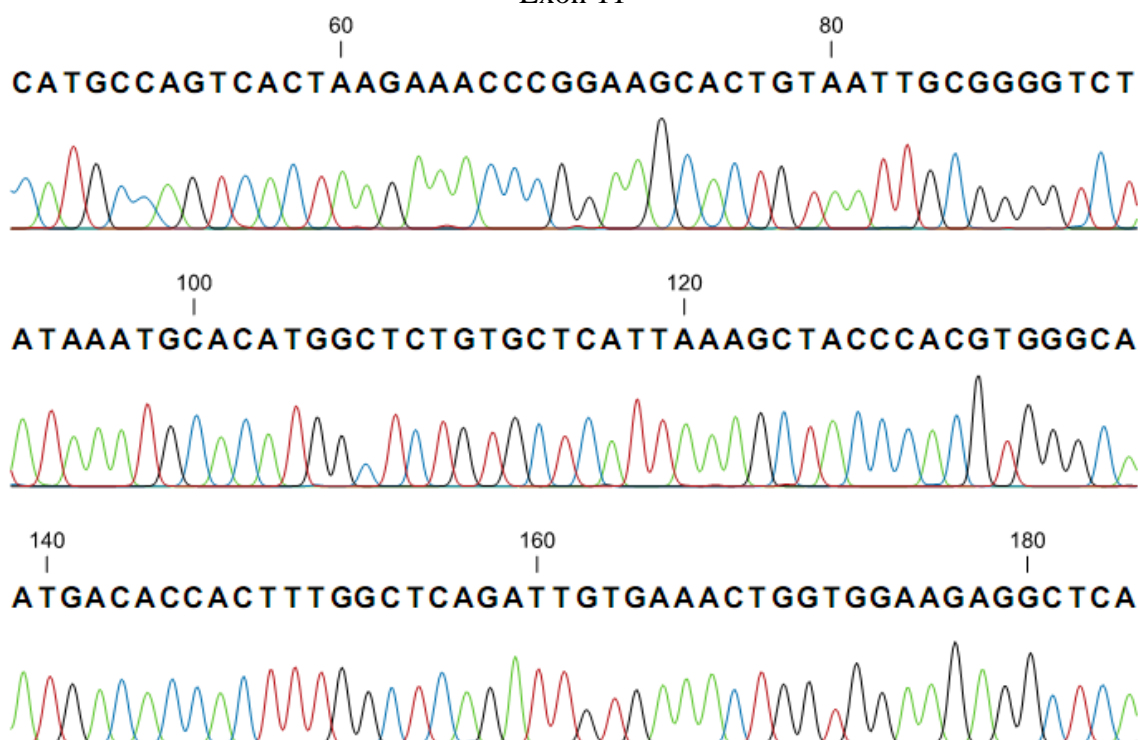
Exon 9



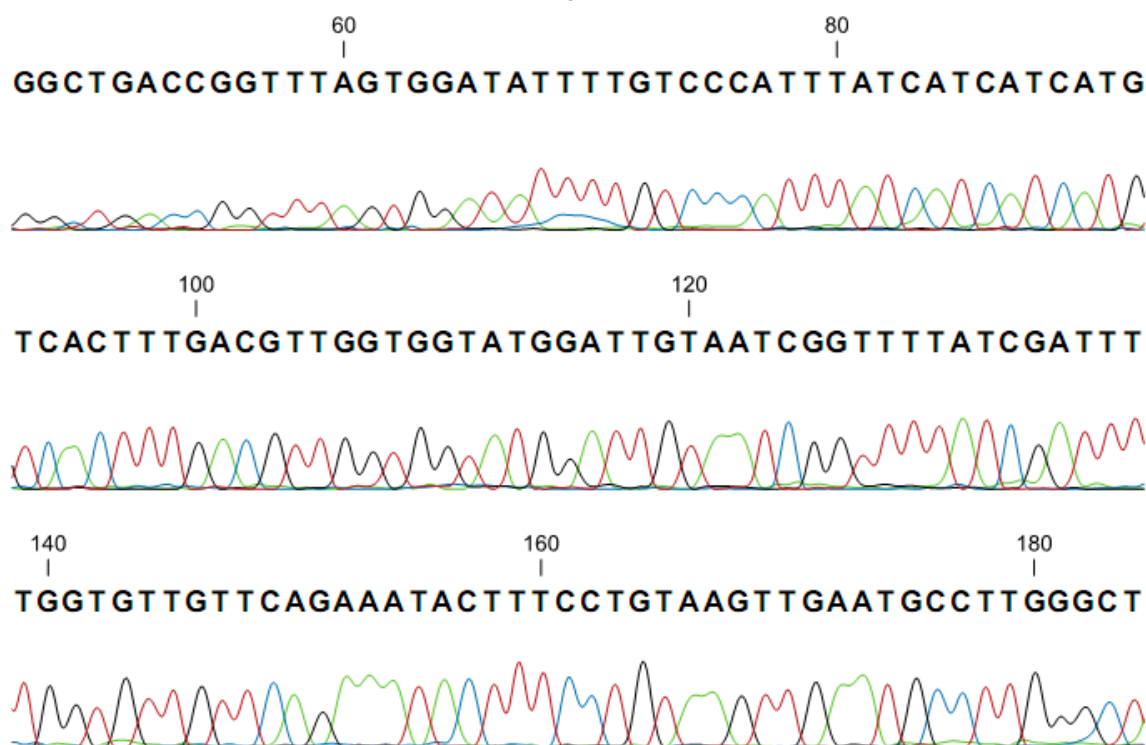
Exon 10



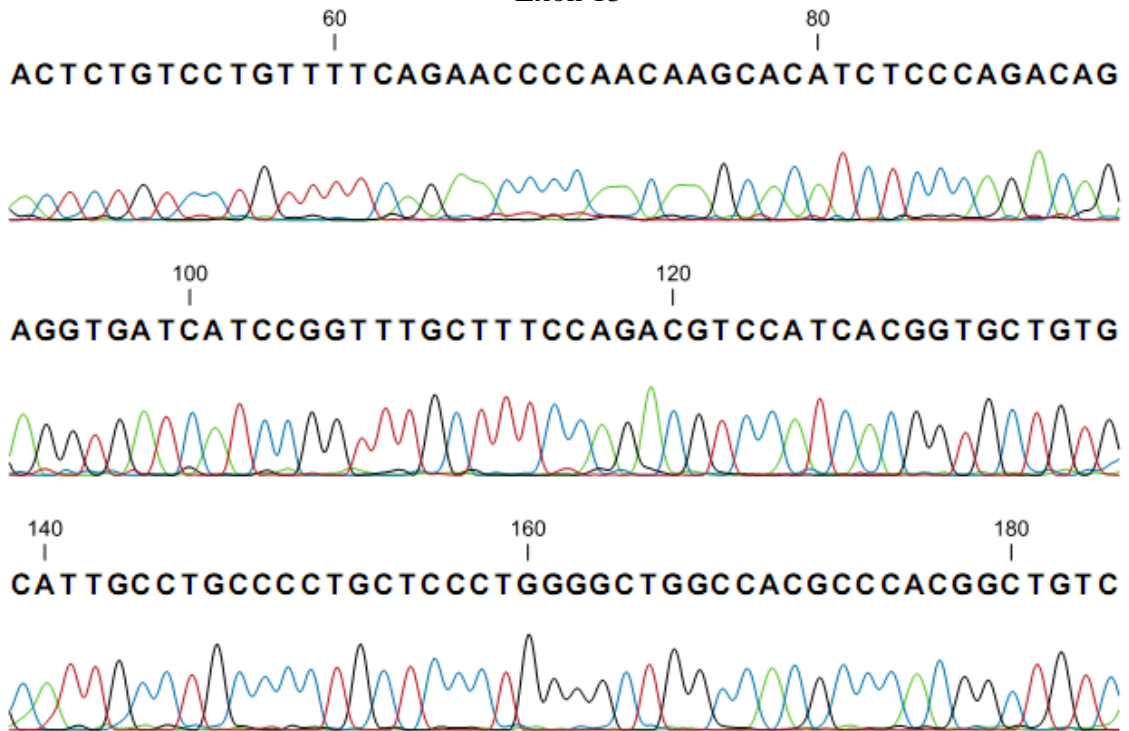
Exon 11



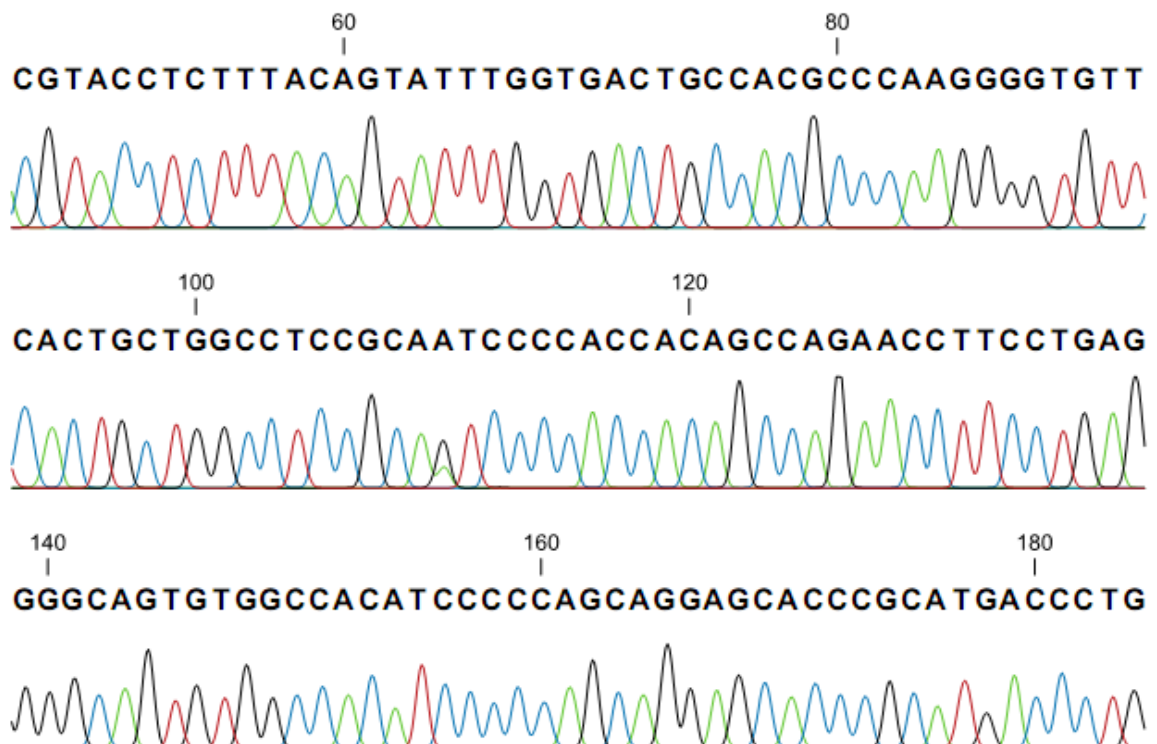
Exon 12



Exon 13

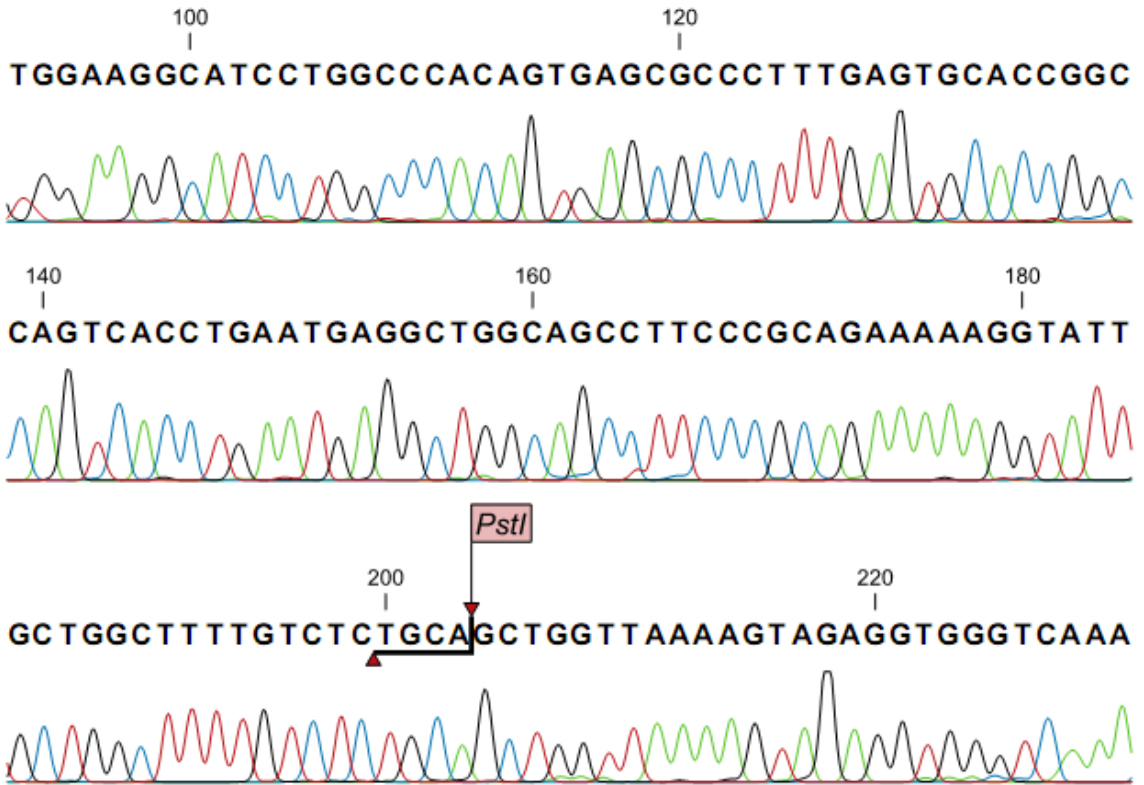


Exon 14

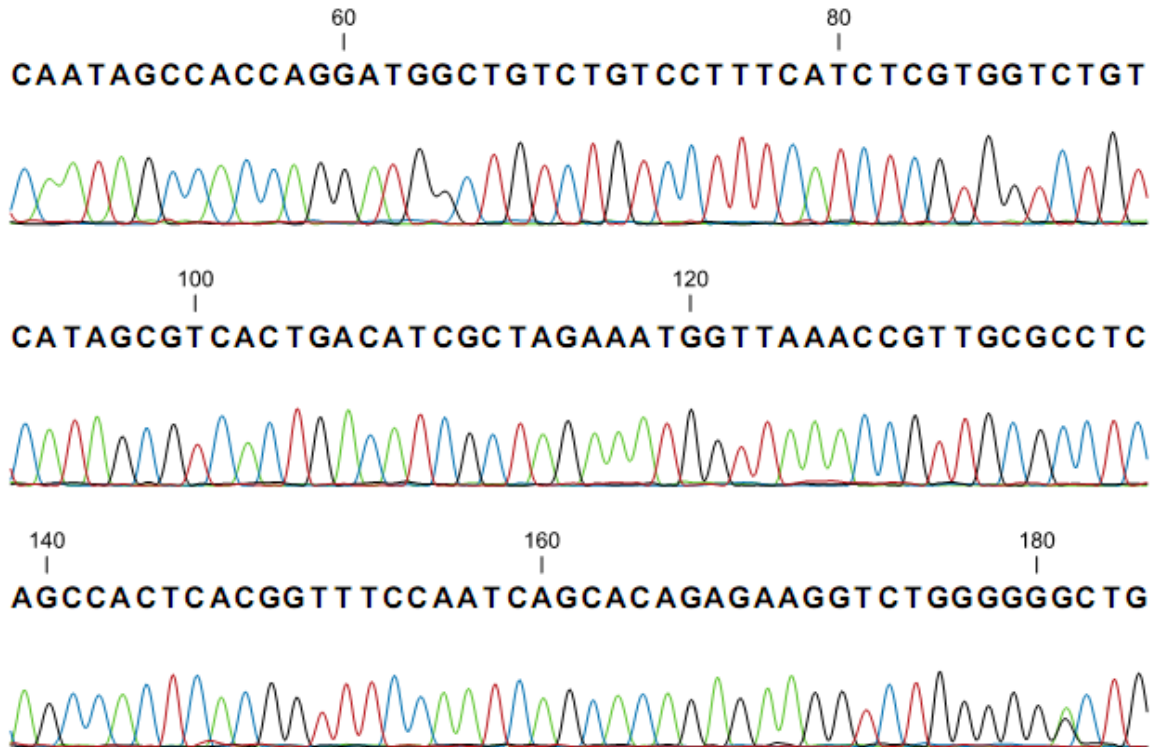




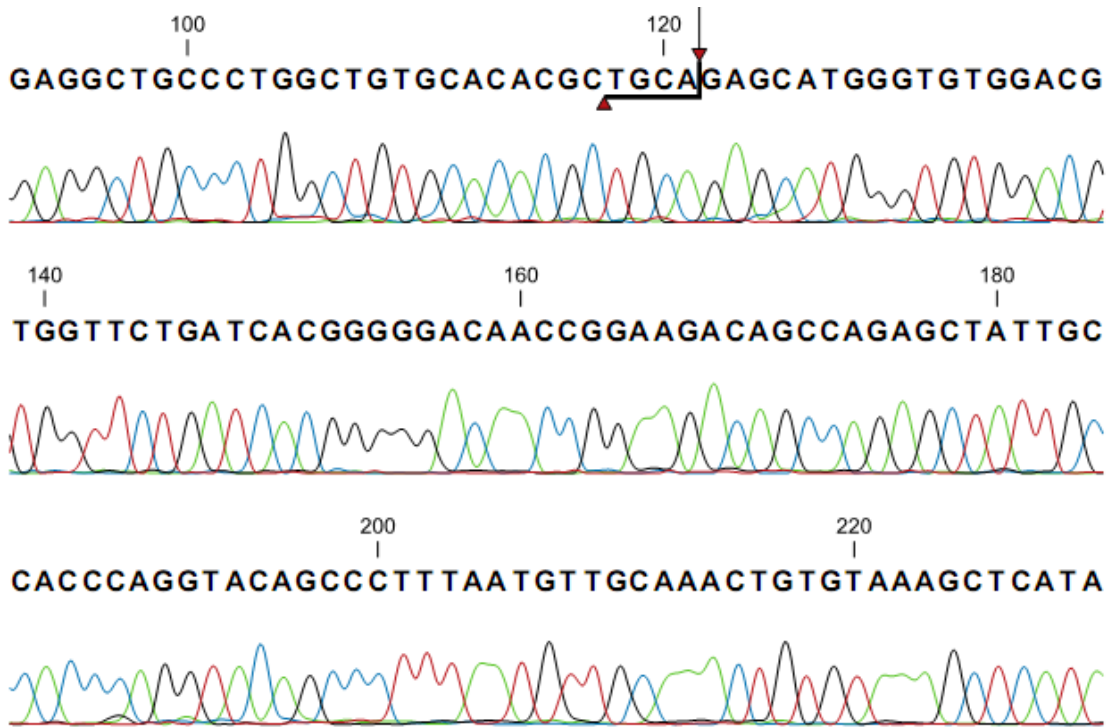
Exon 15



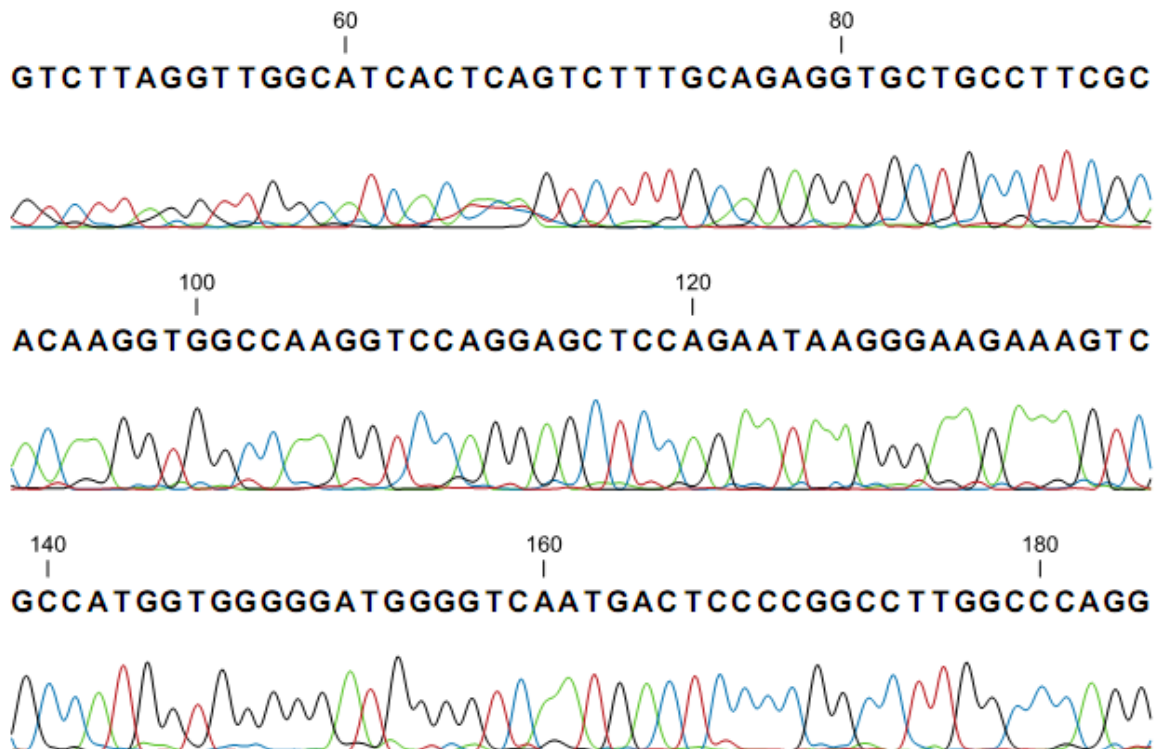
Exon 16



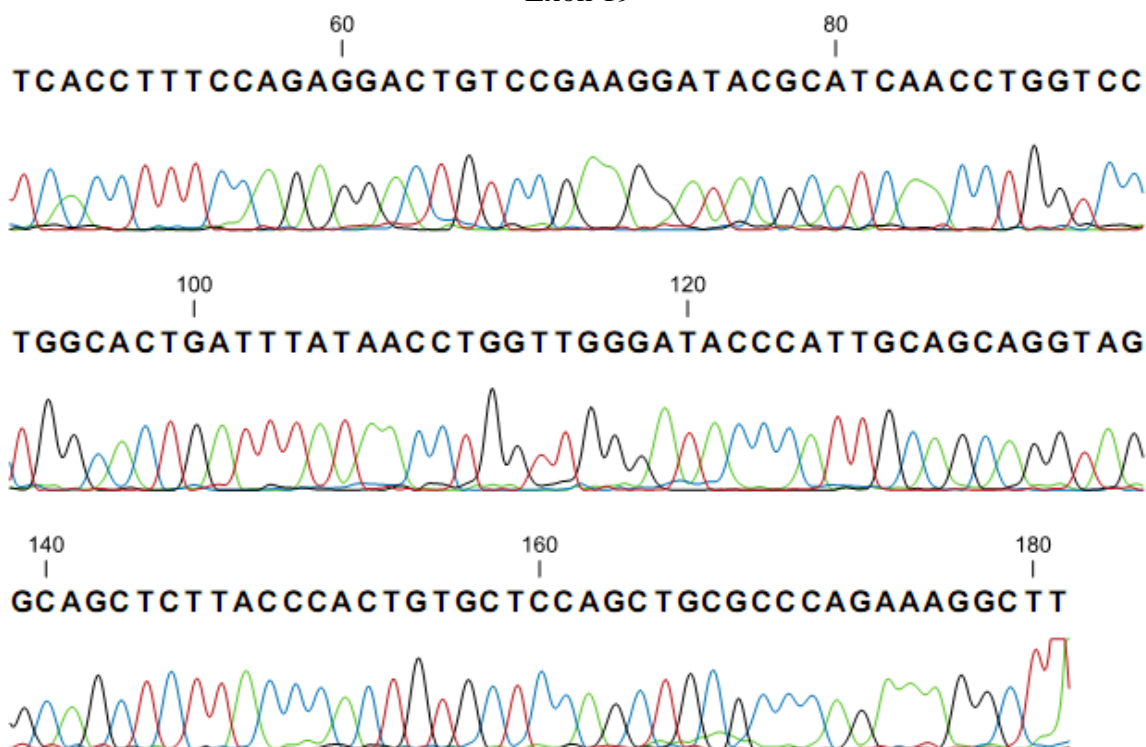
Exon 17



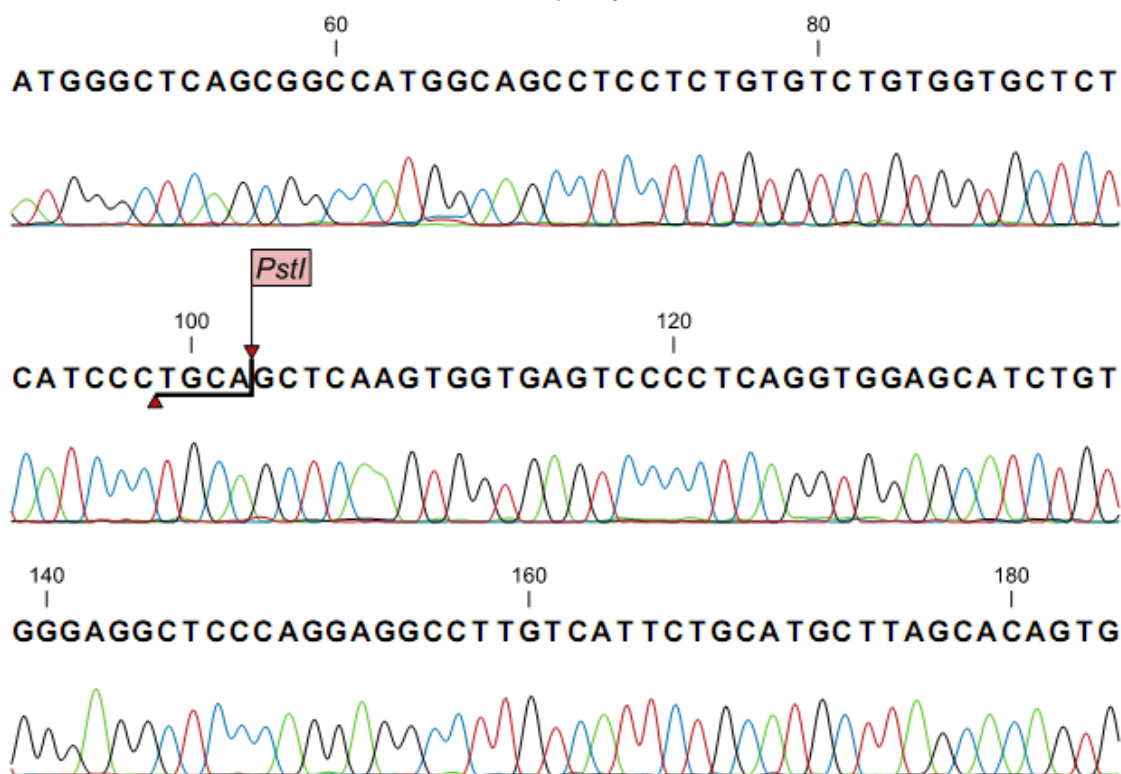
Exon 18



Exon 19

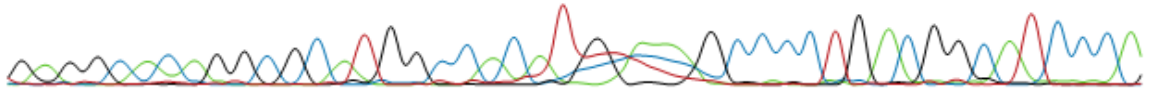


Exon 20

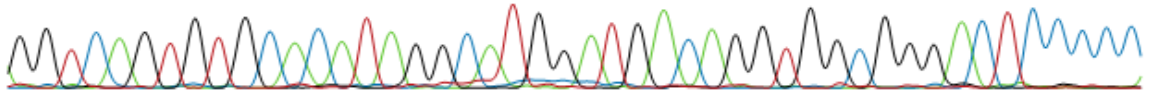


Exon 21

60 80  
| |  
**GAGGCACAGGCGCATGGCCACATGTAACGCCCTGACGGCATCCCA**



100 120  
| |  
**GGTCAGTGTGCACATAGGCATGGATGACAGGTGGCGGGACTCCCC**



140 160 180  
| | |  
**AGGGCCACACCATGGGACCAGGTCAGCTATGTCAGCCAGGTGTCGC**

