

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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Hà Nội - 2016

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
Trường Đại Học Y Hà Nội

Hướng dẫn khoa học:

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

Phản biện 1: GS. TS. Hoàng Văn Thuận

Phản biện 2: GS. TS. Phan Tuấn Nghĩa

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Phú Đạt

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường. Họp tại Trường đại học Y Hà Nội.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện quốc gia
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội
- Thư viện thông tin Y học Trung Ương.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Wilson là bệnh lý di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường với tỷ lệ mắc bệnh là 1/30.000 trẻ. 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. Ngày nay, chẩn đoán xác định bệnh bằng phát hiện đột biến trên gen *ATP7B* sẽ giúp chẩn đoán sớm, 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. Trong vài năm gần đây, một số nghiên cứu về phát hiện đột biến trên gen *ATP7B* đã bắt đầu được triển khai. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào về phân tích mối tương quan giữa kiểu gen *ATP7B* và kiểu hình của bệnh Wilson. 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.*

3. Ý nghĩa thực tiễn và những đóng góp mới của đề tài

Sử dụng kỹ thuật phát hiện đột biến gen *ATP7B* bằng giải trình tự 21 exon, nghiên cứu đã phát hiện mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh Wilson. Đây là một đóng góp mới trong lĩnh vực bệnh lý nội tiết di truyền, bệnh lý chuyên khoa thần kinh và tiêu hóa ở nước ta, đồng thời nghiên cứu vừa có tính khoa học, vừa có tính nhân văn. Xác định mối tương quan giữa đột biến gen *ATP7B* và kiểu hình của bệnh nhân Wilson sẽ giúp tư vấn di truyền, tạo cơ sở cho việc tiên lượng bệnh và đưa ra phác đồ điều trị chính xác, hiệu quả giúp tránh được biến chứng nặng và tử vong.

Kết quả: bệnh nhân có càng nhiều alen đột biến thì nồng độ ceruloplasmin huyết thanh càng thấp và đồng niệu 24 giờ càng cao. Bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung thường gặp thể lâm sàng nặng (thể hỗn hợp gan - thần kinh) hơn các thể lâm sàng khác. Bệnh nhân có 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh thấp hơn bệnh nhân có 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR. Bệnh nhân có 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có nồng độ đồng niệu 24 giờ cao hơn bệnh nhân có 1 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung và đột biến sai nghĩa/đột biến vùng 5'UTR. Không thấy mối tương quan giữa số alen đột biến và dạng đột biến với tuổi khởi phát.

4. Cấu trúc của luận án

Luận án bao gồm 120 trang, bao gồm: Đặt vấn đề: 2 trang; Chương 1 - Tổng quan vấn đề nghiên cứu, 45 trang; Chương 2 - Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 11 trang; Chương 3 - Kết quả nghiên cứu: 25 trang; Chương 4 - Bàn luận: 36 trang; Kết luận: 1 trang; Kiến nghị: 1 trang. Luận án có: 24 bảng, 37 hình, 105 tài liệu tham khảo (10 tiếng Việt, 95 tiếng Anh).

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. Sau đó bệnh 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 triệu chứng run gọi là bệnh "xơ cứng giả hiệu". 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. 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. 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 thế kỷ

mới cho các nghiên cứu phát hiện đột biến gen *ATP7B* ở các bệnh nhân Wilson. Ở Việt Nam: Năm 1969, Bùi Quốc Hương và cộng sự báo cáo 8 trường hợp bệnh nhân bị bệnh Wilson đầu tiên ở Việt Nam. 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 tại Bệnh viện Nhi Đồng 1. Năm 2015, Nguyễn Thị Mai Hương 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. Năm 2015, nghiên cứu của Phan Tôn Hoàng phát hiện 48/61 (78,6%) bệnh nhân Wilson có đột biến gen *ATP7B*.

1.1.3. 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. Lượng đồng dư thừa sẽ chuyển hóa thành ceruloplasmin không độc với cơ thể, phần còn lại đào thải ra ngoài qua đường mật, số ít qua nước tiểu và mồ hôi. Bệnh nhân bị bệnh Wilson, quá trình chuyển hóa đồng thành ceruloplasmin và đào thải qua đường mật bị suy giảm gây ứ đọng đồng trong gan, hủy hoại tế bào gan. Sau đó, tăng lưu thông đồng trong máu và lắng đọng ở các cơ quan khác gây ra các triệu chứng trên lâm sàng.

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 rất đa dạng với tổn thương nhiều cơ quan, 3 cơ quan bị tổn thương nhiều nhất: gan, não và mắt. *Triệu chứng tại gan:* Hơn 50% bệnh nhân Wilson có tổn thương gan với 3 dạng tổn thương chính: viêm gan mạn tính hoạt động, xơ gan và suy gan tối cấp (suy gan tối cấp thường rất nặng với tỷ lệ tử vong cao và có chỉ định ghép gan cấp cứu). *Triệu chứng thần kinh:* hầu hết các bệnh nhân có biểu hiện triệu chứng thần kinh có lắng đọng đồng ở các nhân xám của não khi đã bị xơ gan. Triệu chứng khởi phát: nói khó, nuốt khó, chảy nước dãi, run tay, bàn tay vụng về, viết chữ xấu, tăng nhẹ trương lực cơ kiểu ngoại tháp 2 chi trên. Triệu chứng toàn phát: tăng trương lực cơ đều tứ chi, có các cơn xoắn vặn toàn thân. *Triệu chứng ở mắt:* hay gặp nhất là vòng Kayser-Fleischer do lắng đọng đồng và sulfur ở mặt sau màng Descemet quanh giác mạc có màu vàng xanh hoặc nâu; ít gặp đục nhân mắt hình hoa hướng dương.

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); lượng đồng trong nước tiểu 24 giờ tăng trên 100 μ g (bình thường dưới 40 μ g); lượng đồng tăng trên 250 μ g/g trọng lượng gan khô (bình thường: 15-55 μ g/g). Chụp cắt lớp vi tính (CT) ổ bụng, 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. Tổn thương sọ não quan sát thấy trên phim chụp cắt lớp vi tính (CT): giảm tỷ trọng, khu trú các nhân nền đối xứng 2 bên. Các tổn thương thường gặp trên phim cộng hưởng từ (MRI) sọ não là giảm tín hiệu trên T1W, tăng tín hiệu trên T2W và Flair ở vùng nhân xám đối xứng 2 bên (phát hiện sớm hơn trên phim chụp CT). Tổn thương đặc hiệu của bệnh Wilson trên phim MRI sọ não được mô tả điển hình là " gương mặt gấu trúc khổng lồ". MRI sọ não có độ nhạy cao hơn CT, đặc biệt ở những bệnh nhân Wilson có tổn thương não ở giai đoạn sớm. 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, điều trị bệnh sớm và tư vấn di truyền.

1.1.6. Chẩn đoán

1.1.6.1. Chẩn đoán bệnh Wilson

- *Tiêu chuẩn 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. Chẩn đoán bệnh Wilson khi có ít nhất 2 tiêu chuẩn 1 và 2.

- *Tiêu chuẩn Ferenci 2003*: chẩn đoán chủ yếu dựa vào cho điểm với các biểu hiện các triệu chứng thần kinh, triệu chứng tại mắt, giảm nồng độ ceruloplasmin, nghiệm pháp coomb âm tính, tăng lượng đồng trong gan khô, tăng lượng đồng trong nước tiểu 24 giờ và phát hiện đột biến trên gen *ATP7B*. Chẩn đoán thể lâm sàng dựa vào cơ quan chính bị tổn thương: thể gan; thể thần kinh; thể hỗn hợp gan - thần kinh; thể khác.

1.1.7. Điều trị

Cho đến nay liệu pháp điều trị gen vẫn chưa được áp dụng, 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... Hạn chế ăn các thực phẩm có nồng độ đồng cao: sò, ốc, hến, các loại hạt khô, socola, nấm, rau cải và nội tạng động vật đặc biệt là gan; không uống nước có hàm lượng đồng cao, nước ngọt có gaz.

- *Thuốc D-penicillamine, trientine*: tạo phức bài tiết đồng vào nước tiểu và cũng có thể tạo ra metallothionein không độc với cơ thể. Liều duy trì thường ở người lớn là 750 đến 1000 mg/ngày, ở trẻ em là 20mg/kg/ngày uống chia 2 lần hoặc 3 lần, xa bữa ăn

- *Muối kẽm*: sử dụng cho các thể bệnh Wilson, thể tiền lâm sàng, liều dùng: người lớn 150mg/ngày, trẻ em 75mg/ngày, uống chia 3 lần (lúc đói) Các thuốc khác ít dùng hơn: dimercaprol, ammonium tetrathiomolybdate, curcumin.

- *Vitamin B6, vitamin E*: bổ sung cho các bệnh nhân Wilson.

- *Lọc huyết tương và ghép gan*: áp dụng với các bệnh nhân thể nặng, suy gan giai đoạn cuối, đặc biệt là suy gan bùng phát tối cấp.

- *Liệu pháp gen*: đang trong giai đoạn thử nghiệm, đã áp dụng thành công gen AAV trên chuột, hứa hẹn ứng dụng trên người vào năm 2022.

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. 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, 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.

1.2.2. Đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson

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. 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. Những người mang gen bệnh đều có khả năng truyền cho con cháu.

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. Bên cạnh đó, đột biến ở các vùng chức năng khác nhau có thể biểu hiện kiểu hình khác nhau với minh họa kiến trúc cực kỳ tinh tế và chính xác của gen *ATP7B*.

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 khởi phát trước 20 tuổi và mức độ nhẹ ở nhóm sau 20 tuổi. Những bệnh nhân mang đột biến p.R778L thường khởi phát bệnh sớm, nhóm mang đột biến p.H1069Q biểu hiện bệnh muộn hơn. Nhóm mang đột biến c.3207C>A, p.S932X và p.W779X khởi phát bệnh muộn và chẩn đoán muộn: tuổi khởi phát là 10 - 41 tuổi; tuổi chẩn đoán là 12 - 63 tuổi.

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 muộn và đột biến p.R778L biểu hiện tổn thương gan sớm; 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. Các đột biến vô nghĩa, lệch khung dịch mã thường khởi phát bệnh sớm với nồng độ ceruloplasmin huyết thanh thấp, nồng độ đồng niệu 24 giờ cao và biểu hiện thể lâm sàng nặng (viêm gan bùng phát tối cấp hoặc thể hỗn hợp gan - thần kinh). Một số nghiên cứu khác còn đề cập đến các yếu tố chủng tộc, môi trường và tác động của một số đột biến gen khác đến kiểu hình của bệnh Wilson. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu không tìm thấy mối tương quan giữa đột biến gen *ATP7B* và kiểu hình.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

60 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh Wilson thỏa mãn các tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân.

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân: Ferenci (bảng 2.1) với tổng điểm ≥ 4 :

Bảng 2.1. Thang điểm chẩn đoán bệnh Wilson theo Ferenci

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

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân không tự nguyện tham gia vào nghiên cứu

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, chạy kiểm chứng các đột biến mới phát hiện trên bệnh nhân.

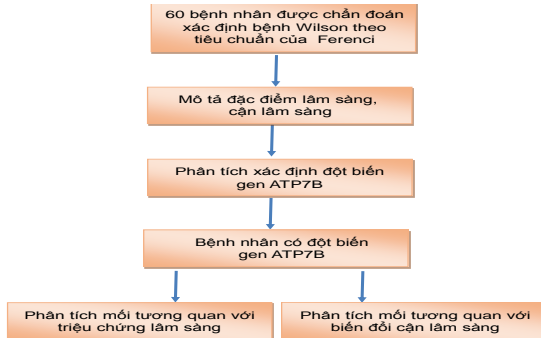
2.2. Địa điểm nghiên cứu: Thu thập bệnh án từ Bệnh viện Nhi Trung Ương, Bệnh viện Bạch Mai, Phân tích gen *ATP7B* tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein Trường Đại học Y Hà Nội.

2.3. Thời gian nghiên cứu: từ tháng 9 năm 2012 đến tháng 9 năm 2015.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

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

SƠ ĐỒ THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU



2.4.2. Cỡ mẫu nghiên cứu: lấy cỡ mẫu thuận tiện do bệnh Wilson là bệnh di truyền hiếm gặp.

2.5. Các bước tiến hành nghiên cứu

2.5.1. Hỏi bệnh và khám lâm sàng: theo một mẫu bệnh án thống nhất.

2.5.2. Xét nghiệm sinh hóa và chẩn đoán hình ảnh

- *Xét nghiệm sinh hóa:* công thức máu, đông máu cơ bản, test Coombs, đường, protid máu, albumin máu, ure, creatinin, AST, ALT, ceruloplasmin huyết thanh; định lượng đồng niệu 24 giờ;
- *Siêu âm ổ bụng, chụp cộng hưởng từ sọ não.*

2.5.3. Chẩn đoán

- *Chẩn đoán xác định:* nếu đạt ≥ 4 điểm theo thang điểm Ferenci (bảng 2.1)
- *Chẩn đoán thể lâm sàng:* dựa vào cơ quan chính bị tổn thương theo tiêu chuẩn Ferenci.

2.5.4. Quy trình phân tích đột biến gen ATP7B: (1) Lấy mẫu máu tĩnh mạch có chống đông EDTA; (2) Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi; (3) Kỹ thuật PCR khuếch đại 21 exon của gen ATP7B; (4) Giải trình tự gen; (5) Phân tích kết quả: So sánh kết quả với trình tự GeneBank của gen ATP7B (National Center for Biotechnology Information, NCBI) NG_008806 bằng phần mềm CLC và 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: bằng phần mềm SPSS 16.0.

2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu được tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học (đề tài đã được thông qua hội đồng y đức của Bộ Y tế). Các thành viên gia đình tự nguyện tham gia nghiên cứu và được lập hồ sơ theo dõi và tư vấn di truyền. Các thông tin của mỗi gia đình sẽ được đảm bảo bí mật.

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

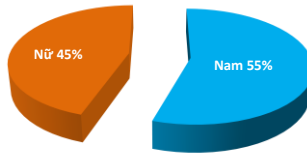
3.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng

3.1.1. Đặc điểm lâm sàng

3.1.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi khởi phát

Nghiên cứu 60 bệnh nhân: tuổi khởi phát hay gặp nhất từ 10 đến 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

Triệu chứng lâm sàng khởi phát thường gặp là: run tay, bàn tay vụng về, vàng da, tăng nhẹ trương lực cơ ở chi (run tay chiếm tỷ lệ cao nhất 65,0%).

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

Triệu chứng lâm sàng giai đoạn toàn phát thường gặp là: tăng trương lực cơ 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%).

3.1.2. Triệu chứng cận lâm sàng

3.1.2.1. Định lượng ceruloplasmin huyết thanh

Nồng độ ceruloplasmin huyết thanh giảm ở tất cả các bệnh nhân, nhóm 5,1-10mg/dl chiếm tỷ lệ cao nhất (61,7%).

3.1.2.2. Định lượng transaminase huyết thanh

Tất cả các bệnh nhân thể gan và thể hỗn hợp gan - thần kinh đều tăng transaminase huyết thanh (ALT và AST).

3.1.2.3. Định lượng đồng niệu 24 giờ

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

3.2. Kết quả phân tích gen *ATP7B*

Nghiên cứu phát hiện 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. Có 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 3.1).

Bảng 3.1. 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		c.1771G>A	p.G591S	DV	2	1,93	1
8	5	c.1810G>C	p.A604P	DV	4	3,85	2
9		c.2160delA	p.K720NfsX3	DV	1	0,96	1
10	8	c.2333G>T	p.R778L	DV	10	9,62	25
11	10	c.2549C>T	p.T850I	DV	2	1,93	1
12		c.2862T>C	p.L902P	DV	1	0,96	1
13	11	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		c.3097A>G	p.T1033I	DV	1	0,96	1
18	14	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		c.3818C>A	p.P1273Q	DV	3	2,88	3
25	18	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 3.2: 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

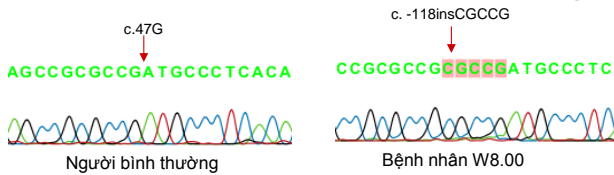
Mã số	Đột biến	Dạng đột biến	Thể đột biến	Số alen	Tuổi khởi phát (tuổi)	Ceruloplasmin huyết thanh (mg/dl)	Đồng niệu 24 giờ (µg)	Thể lâm sàng
W1.00	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	2	12	10	426	H
W3.00	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	2	18	7	473	H
W6.00	p.L1371P	Sai nghĩa	Dị hợp	2	21	17	198	N2
	p.T850I	Sai nghĩa	Dị hợp					
W8.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	2	20	17	312	H
	c.-118insCGCCG		Dị hợp					
W9.00	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	2	8	9	501	H
W10.00	p.A604P	Sai nghĩa	Đồng hợp	2	11	8,9	432	N2
W12.00	p.V536A	Sai nghĩa	Đồng hợp	2	16	14	347	N2
W13.00	c.-75C>A		Dị hợp	2	13	16	213	N2
	c.-118insCGCCG		Dị hợp					
W17.00	c.-75C>A		Đồng hợp	2	9	12	359	H
W18.00	c.-75C>A		Đồng hợp	3	20	11	549	N2
	p.G1099S	Sai nghĩa	Dị hợp					
W19.00	p.W939C	Sai nghĩa	Dị hợp	2	20	11	362	H
	p.C980S	Sai nghĩa	Dị hợp					
W21.00	p.T850I	Sai nghĩa	Dị hợp	3	9	17	527	H
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp					
W23.00	p.G943D	Sai nghĩa	Đồng hợp	3	17	9	527	H
	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp					
W24.00	c.-75C>A		Đồng hợp	3	7	11	1231	H
	p.P1273Q	Sai nghĩa	Dị hợp					
W25.00	p.A1065P	Sai nghĩa	Dị hợp	2	10	15	310	H
	c.-75C>A		Dị hợp					
W29.00	p.G591S	Sai nghĩa	Dị hợp	2	12	12	286	N2
	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp					
W30.00	c.-75C>A		Đồng hợp	4	11	2,5	987	N1
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp					
W31.00	p.G1213D	Sai nghĩa	Dị hợp	2	10	8,9	572	N1
	p.N1270fsX35	Lệch khung	Dị hợp					
W33.00	c.-75C>A		Dị hợp	3	15	9	1825	N2
	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp					
	p.V536A	Sai nghĩa	Dị hợp					
W37.00	p.P1273Q	Sai nghĩa	Dị hợp	2	12	16	189	N2
	p.E905X	Vô nghĩa	Dị hợp					
W38.00	p.P1273Q	Sai nghĩa	Dị hợp	2	19	13	270	N2
	p.G50S	Sai nghĩa	Dị hợp					
W40.00	c.-75C>A		Đồng hợp	4	7	3	1228	N2
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp					
W42.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	1	15	9	412	N1
	c.-75C>A		Đồng hợp					
W43.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	4	7	4	1231	N2
	p.G591S	Sai nghĩa	Dị hợp					
W44.00	c.-75C>A		Đồng hợp	2	4	9	765	N2

W47.00	p.K720NfsX3	Vô nghĩa	Dị hợp	1	13	10	402	N2
	c.-75C>A		Đồng hợp					
W48.00	p.P1133EfsX19	Lệch khung	Dị hợp	3	12	13	430	N2
	c.-75C>A		Đồng hợp					
W49.00	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	4	9	5	1879	N2
W50.00	p.P1052L	Sai nghĩa	Dị hợp	2	16	14	173	N2
	p.T1033I	Sai nghĩa	Dị hợp					
W51.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	2	14	16	231	N2
	p.V446G	Sai nghĩa	Dị hợp					
W52.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	2	25	14	157	N1
	p.L902P	Sai nghĩa	Dị hợp					
W53.00	c.-75C>A		Đồng hợp	4	15	8	886	N1
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp					
W54.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	2	40	15	271	N1
	p.V536A	Sai nghĩa	Dị hợp					
W55.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	1	7	12	379	H
W56.00	p.A604P	Sai nghĩa	Dị hợp	3	13	17	369	N2
	p.V536A	Sai nghĩa	Đồng hợp					
W57.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	1	16	10	315	H
W58.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	2	9	6,2	832	N1
	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp					
W59.00	p.A604P	Sai nghĩa	Dị hợp	2	22	10	406	H
	p.A1183T	Sai nghĩa	Dị hợp					
W60.00	c.-75C>A		Đồng hợp	4	7	5	1657	N1
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp					
W61.00	c.-75C>A		Đồng hợp	4	8	2,2	1513	N1
	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp					
W62.00	p.V536A	Sai nghĩa	Dị hợp	2	12	9	564	N1
	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp					
W64.00	p.S105X	Vô nghĩa	Dị hợp	1	42	12	313	N1
W65.00	p.S105X	Vô nghĩa	Đồng hợp	2	14	8	461	N2
W66.00	p.R778L	Sai nghĩa	Dị hợp	2	13	13	396	N2
	c.-75C>A		Dị hợp					

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

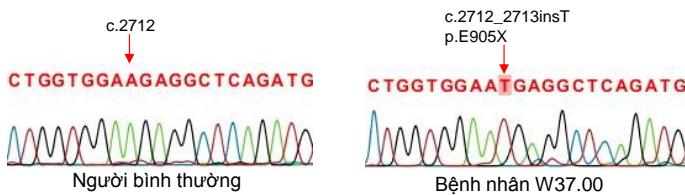
Bệnh chủ yếu khởi phát ở bệnh nhân dưới 20 tuổi. Tất cả bệnh nhân có nồng độ ceruloplasmin huyết thanh giảm dưới 20mg/dl và có nồng độ đồng niệu 24 giờ tăng trên 100 μ g. Các bệnh nhân thể gan và thể gan - thần kinh đều tăng transaminase huyết thanh (ALT và AST). Các bệnh nhân thể thần kinh hoặc thể gan-thần kinh đều có tổn thương trên phim MRI sọ não. Có 88,64% (39/44 bệnh nhân) có từ 2 đến 4 đột biến trên gen *ATP7B*; chỉ có 5/44 bệnh nhân (11,36%) 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).

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



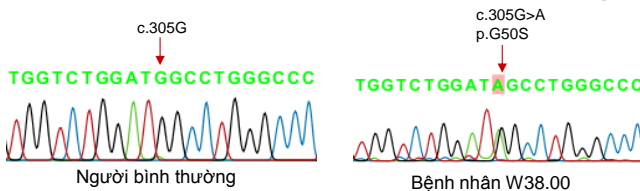
Hình 3.2. Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W8.00
(đột biến đồng hợp tử thêm 5 nucleotid CGCCG nằm ở vị trí -118 trước mã khởi đầu Methionine).

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



Hình 3.3. Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W37.00
(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 3.4. Hình giải trình tự gen của bệnh nhân mã W38.00
(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

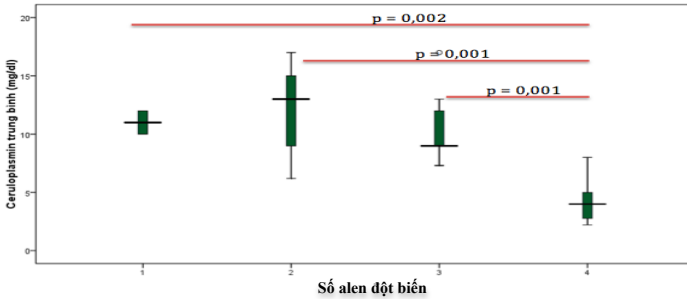
3.3.1. Mối tương quan giữa số alen đột biến và kiểu hình ở bệnh nhân Wilson

Có 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.

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

Tuổi khởi phát trung bình thấp ở nhóm mang nhiều alen đột biến và không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

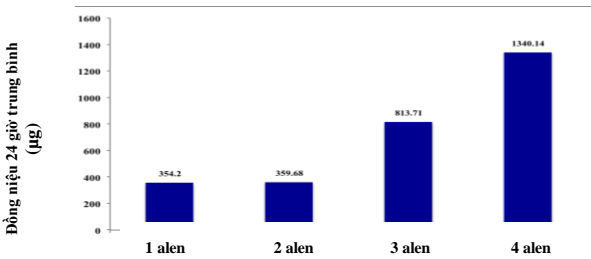
3.3.1.2. Mối tương quan giữa nồng độ ceruloplasmin và số alen đột biến



Hình 3.5. Phân bố nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và số alen đột biến

Nhóm bệnh nhân mang 4 alen đột biến có nồng độ ceruloplasmin trung bình thấp nhất khi so sánh với các nhóm khác ($p < 0,05$).

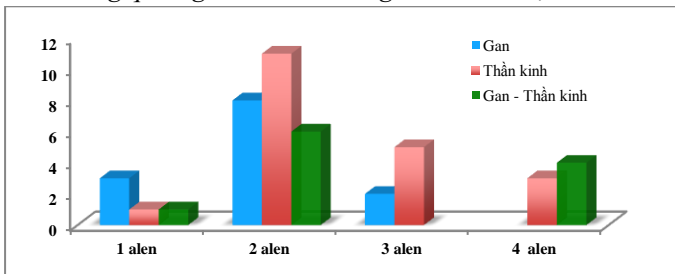
3.3.1.3. Mối tương quan giữa nồng độ đồng niệu 24 giờ và số alen đột biến



Hình 3.6. Phân bố nồng độ đồng niệu 24 giờ và số alen đột biến

Nhóm bệnh nhân mang 4 alen đột biến có hàm lượng đồng trong nước tiểu cao nhất, nhóm mang 1 alen có hàm lượng đồng thấp nhất (với $p < 0,05$).

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



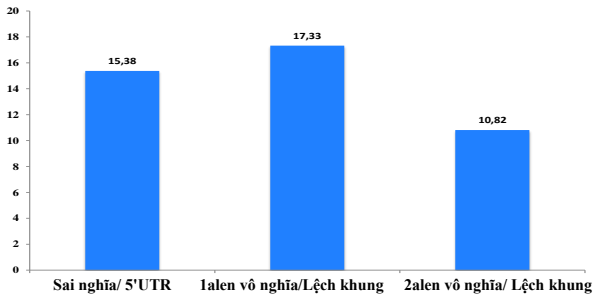
Hình 3.7. Phân bố thể lâm sàng và số alen đột biến

Thể hỗn hợp gan - thần kinh gặp ở nhóm bệnh nhân mang 1 alen, 2 alen và 4 alen đột biến: nhóm mang 4 alen đột biến có tỷ lệ bệnh nhân thể hỗn hợp cao nhất (mối tương quan yếu $r < 0,25$, không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$).

3.3.2. Mối tương quan giữa dạng đột biến và kiểu hình ở bệnh nhân Wilson

Nghiên cứu phát hiện 44/60 bệnh nhân mang đột biến, chia 3 nhóm: nhóm 1 có 23 bệnh nhân không mang alen đột biến vô nghĩa/lệch khung (chỉ mang đột biến sai nghĩa/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 3.2).

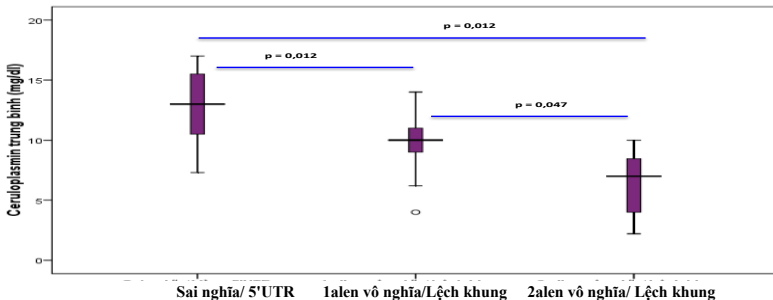
3.3.2.1. Mối tương quan giữa tuổi khởi phát và dạng đột biến



Hình 3.8. Phân bố tuổi khởi phát và dạng đột biến

Tuổi khởi phát trung bình nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung thấp hơn nhóm mang 1 alen và nhóm mang alen đột biến khác ($p > 0,05$).

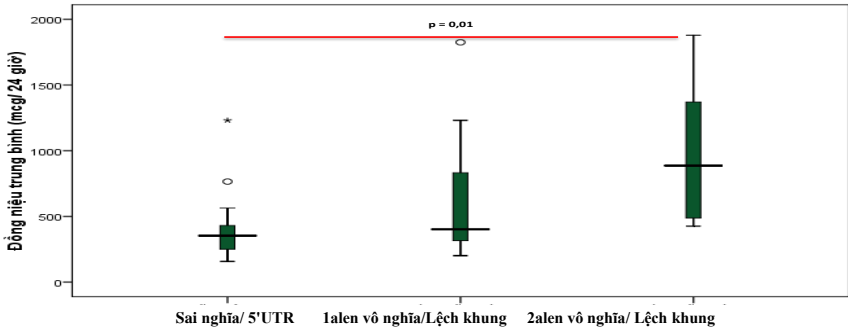
3.3.2.2. Mối tương quan giữa nồng độ ceruloplasmin và dạng đột biến



Hình 3.9. Phân bố nồng độ ceruloplasmin huyết thanh và dạng đột biến

Nồng độ ceruloplasmin 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/ vùng 5' UTR ($p < 0,05$).

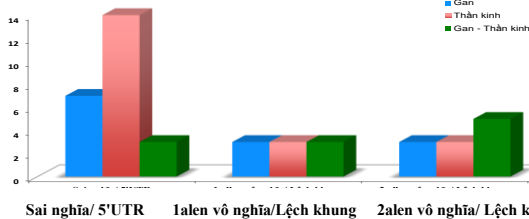
3.3.2.3. Mối tương quan giữa đồng trong nước tiểu 24 giờ và dạng đột biến



Hình 3.10. Phân bố đồng niệu 24 giờ và dạng đột biến

Lượng đồng trong nước tiểu 24 giờ ở nhóm mang alen đột biến vô nghĩa/lệch khung cao hơn nhóm mang các alen đột biến khác ($p = 0,01$).

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



Hình 3.11. Phân bố dạng đột biến và thể lâm sàng của bệnh Wilson

Nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có tỷ lệ thể hỗn hợp gan - thần kinh cao nhất. 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. Đặc điểm lâm sàng

4.1.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi khởi phát

Nghiên cứu của chúng tôi gồm 60 bệnh nhân, nhóm dưới 20 tuổi chiếm tỷ lệ cao (68,4%), trong đó nhóm 10 - 19 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất (51,7% tổng số bệnh nhân). Các nghiên cứu tại Đức, Ấn Độ và Trung Quốc cũng thấy rằng tuổi khởi phát bệnh Wilson thường gặp ở nhóm dưới 18 tuổi. Như vậy, bệnh Wilson là bệnh di truyền thường khởi bệnh ở trẻ em và người trẻ.

4.1.1.2. Phân bố bệnh nhân theo giới

Nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả: tỷ lệ nam/nữ là 1,23 (hình 3.1). Nghiên cứu của Lê Đức Hình, tỷ lệ nam/nữ là 1,3; nghiên cứu tại Ấn Độ 2,2; nghiên cứu tại Trung Quốc là 44/31. Như vậy, các nghiên cứu cho kết quả tương

đồng: bệnh nhân nam mắc bệnh nhiều hơn bệnh nhân nữ. Tuy nhiên không thấy sự khác biệt nhiều về giới vì gen đột biến nằm trên nhiễm sắc thể thường.

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

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. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng giống của Lê Đức Hình ở Việt Nam và nghiên cứu khác ở Bungary (2012). Như vậy, triệu chứng ở giai đoạn khởi phát thường biểu hiện kín đáo bằng run tay, nói khó nên dễ bị bỏ sót chẩn đoán và 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, nổi bật là rối loạn trương lực cơ và các động tác bất thường, bao gồm run, múa vờn, múa giật, các cơn co vắn, động tác định hình. 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 do tổn thương nhân xám ở não.

4.1.3.1. Tiền sử gia đình

Có 11/60 bệnh nhân 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. 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 gia đình bệnh nhân giúp điều trị sớm cho họ.

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

Định lượng ceruloplasmin huyết thanh: 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, là một chỉ số quan trọng trong tiêu chuẩn chẩn đoán xác định và theo dõi điều trị.

Định lượng transaminase huyết thanh (ALT và AST): tất cả các bệnh nhân thể gan đơn thuần và thể gan - thần kinh đều tăng transaminase huyết thanh (chiếm 51,7%). 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. 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: giúp chẩn đoán bệnh, sàng lọc và theo dõi điều trị cho các bệnh nhân Wilson. 100% bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu có đồng niệu 24giờ tăng trên 100 μ g (bình thường dưới 40 μ g). Điều đó chứng tỏ lượng đồng tự do tăng quá cao trong máu do không được bài tiết qua đường mật ở những bệnh nhân này được đào thải qua nước tiểu.

4.2. Kết quả phân tích gen *ATP7B*

Thống kê số alen từ bảng 3.1 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). 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 (<http://www.wilsondiseas.med.ualberta.ca>)

- *Đột biến c.-75A>C*: có 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), ngay trước vị trí bám của đồng (Cu⁺⁺ binding). Đột biến này đã được công bố gây bệnh ở Nhật và Trung Quốc (bảng 3.1).

- *Đột biến p.S105X (c.417C>A)*: 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 3.1). Đây là đột biến đã được công bố gây bệnh Wilson 3 lần (2 lần ở Đức và 1 lần ở Trung Quốc) (bảng 3.1). Đột biến nằm trên exon 2, thuộc vùng MBDS (Metal-Binding Domains)- là vị trí bám cho các nguyên tử đồng.

- *Đột biến p.R778L*: có 44 bệnh nhân đã phát hiện đột biến, có 9,62 % mang alen đột biến p.R778L (bảng 3.1), là 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. Đột biến này phổ biến nhất ở các nước châu Á với tỷ lệ phát hiện đột biến là > 30% và đã được công bố gây bệnh 25 lần trong các nghiên cứu quốc tế tại ngân hàng dữ liệu gen (bảng 3.1). Như vậy, 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

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

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy bệnh nhân càng nhiều alen đột biến thì khởi phát bệnh sớm (sự khác biệt 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: đột biến p.R778L biểu hiện tổn thương gan sớm, các đột biến c.3207 C>A, p.S932X hoặc p.W779X hay gặp ở nhóm khởi phát bệnh muộn. Do đó có thể vẫn nhìn thấy mối tương quan nghịch giữa tuổi khởi phát và số alen đột biến nhưng có thể bị ảnh hưởng của một số đột biến quan trọng trong từng nhóm bệnh nhân.

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

Kết quả từ hình 3.5 cho thấy nhóm bệnh nhân mang nhiều alen đột biến có nồng độ ceruloplasmin trong huyết thanh thấp hơn nhóm mang ít alen đột biến (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$). Nghiên cứu cho kết quả tương tự với 71 bệnh nhân Wilson Hàn Quốc. 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.

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, với $p < 0,05$ (hình 3.6). Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu của Hyung - Doo Park (2010): 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. Như vậy, bệnh nhân càng mang nhiều alen đột biến thì nồng độ đồng niệu trong nước tiểu 24 giờ càng cao.

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

Kết quả từ hình 3.7: 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). Không tìm thấy mối tương quan giữa số alen đột biến với các thể lâm sàng, với chỉ số $r < 0,25$. 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: 74% mang đột biến p.R778L có biểu hiện lâm sàng thể gan hoặc đột biến p.H1069Q hay gặp ở bệnh nhân thể thần kinh. 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

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

Kết quả ở hình 3.8 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, sự

khác biệt giữa các nhóm 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*. Hơn nữa có nhiều bệnh nhân mang ≥ 2 đột biến nên có thể có sự tác động cộng hưởng của nhiều gen lên tuổi khởi phát. Nghiên cứu khác thấy rằng: bệnh nhân mang đột biến vô nghĩa/lệch khung thường khởi phát bệnh sớm hơn các dạng đột biến khác. Như vậy, các đột biến vô nghĩa/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.

4.4.2. *Mối tương 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 cao hơn nhóm mang 1 alen và nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung (hình 3.9). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự nghiên cứu tại Hàn Quốc, Ý và Ba Lan, 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.

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 (hình 3.10). Mỗi tương quan có ý nghĩa thống kê với $p = 0,01$ giữa nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung với nhóm nhóm đột biến sai nghĩa/vùng 5'UTR. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu ở Ba Lan: nhóm bệnh nhân mang 2 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung có nồng độ đồng cao hơn nhóm mang 1 alen đột biến dạng vô nghĩa/lệch khung, nồng độ đồng thấp nhất ở nhóm mang alen đột biến sai nghĩa. Như vậy, bệnh nhân mang đột biến vô nghĩa/lệch khung tạo mã kết thúc sớm làm protein bị cắt ngắn sẽ ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng chuyển hóa đồng.

4.4.4. *Mối tương quan giữa thể lâm sàng và dạng đột biến*

Kết quả nghiên cứu ở hình 3.11 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. Nhóm mang 2 alen đột biến vô nghĩa/lệch khung có mối tương quan thuận với thể lâm sàng có ý nghĩa thống kê ($r = 0,73$, $p = 0,03$). Nghĩa là bệnh nhân mang 2 alen đột biến vô nghĩa thường biểu hiện thể lâm sàng nặng nhất. Tuy nhiên, kết quả ở hình 3.7 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. Các nghiên cứu tại Hàn Quốc, Ba Lan và Nhật cũng thấy rằng: bệnh nhân mang đột biến

vô nghĩa/lệch khung thường biểu hiện thể lâm sàng nặng hơn các dạng đột biến khác.

Kết quả từ bảng 3.2 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, yếu tố môi trường và sự tác động của một số gen khác: các gen *MTHFR*, *ATOX1*, *XIAP*, *COMMD1* đang trong giai đoạn thử nghiệm để chứng minh vai trò gây bệnh đối với các bệnh nhân bị bệnh Wilson. 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 gan nhẹ có đột biến sai nghĩa



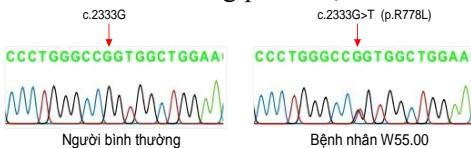
Hình 4.1. Hình ảnh bệnh nhân mã số W55.00

Bệnh nhân Chu Ngọc M.

Giới tính nữ, 7 tuổi

Mã số W55.00.

Bệnh nhân không có triệu chứng lâm sàng, tăng nhẹ transaminase huyết thanh (ALT: 49,9 U/l; AST: 104 U/l), ceruloplasmin là 5,36mg/dl; đồng niệu 24 giờ là 379 μ g và mang đột biến sai 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*).

Như vậy, đột biến p.R778L (c.2333G>T) trên exon 8, ở vùng xuyên màng Tm4 trên gen *ATP7B* là đột biến quan trọng đã được khẳng định gây bệnh (hay gặp thể gan) và là đột biến phổ biến ở châu Á. 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.

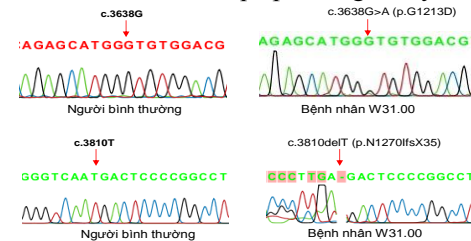
Minh họa trường hợp 2: bệnh nhân thể hỗn hợp gan - thần kinh với biểu hiện nặng, có đột biến sai nghĩa và đột biến mất nucleotid gây lệch khung dịch mã.

Bệnh nhân Nguyễn Đức Q., nam, 12 tuổi (mã W31.00). Bệnh tiến triển nặng tăng dần trong 1 tháng: run tay, nói khó, tăng trương lực cơ tứ chi, chảy nước dãi. Kết quả xét nghiệm: ALT 144,3U/l; AST: 119U/l; ceruloplasmin 3,9mg/dl; đồng niệu 24 giờ 3768 μ g. Siêu âm ổ bụng: hình ảnh xơ gan. MRI sọ não: hình ảnh tổn thương nhân bèo, nhân đuôi đối xứng 2 bên. Chẩn đoán bệnh Wilson thể hỗn hợp gan - thần kinh



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 bèo (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 theo đúng phác đồ, bệnh vẫn 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

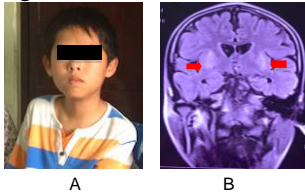
Đột biến sai nghĩa p.G1213D và đột biến lệch khung dịch mã p.N1270IfsX35 tạo mã kết thúc sớm ở vị trí acid amin thứ 35 tính từ vị trí đột biến.

Như vậy, bệnh nhân mã số W31.00 mang 2 đột biến: đột biến p.N1270IfsX35 gây lệch khung dịch mã, tạo 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, và đột biến dị hợp dạng sai nghĩa p.G1213D 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.

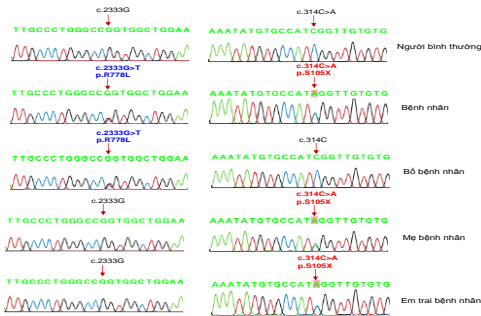
Minh họa trường hợp số 3: bệnh nhân thể hỗn hợp gan - thần kinh với biểu hiện trung bình, có đột biến sai nghĩa và đột biến tạo mã kết thúc sớm

Bệnh nhân Hoàng Phương P., 12 tuổi (mã số W58.00), 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).



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

Bệnh nhân có 2 đột biến dị hợp tử kết hợp là đột biến p.R778L trên exon 8 và đột biến p.S105X trên exon 2, 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.

Bệnh nhân này có biểu thể hỗn hợp gan - thần kinh nhưng triệu chứng không nặng và không tiến triển nhanh như bệnh nhân mang đột biến lệch khung dịch mã (bệnh nhân mã W31.00 ở hình 4.3), có thể do bệnh nhân này được phát hiện và điều trị sớm hơn bệnh nhân mã W31.00. Tuy nhiên, sau 3 năm điều trị triệu chứng thần kinh nặng dần 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 mắc 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 W58.00

Hình ảnh từ trái sang gồm: mẹ bệnh nhân, bệnh nhân (12 tuổi), em trai bệnh nhân (10tuổi) 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 là 10-19 tuổi (chiếm tỷ lệ 51,7%); triệu chứng hay gặp ở giai đoạn khởi phát: run tay (65%), bàn tay vụng về, viết chữ xấu (56,7%); triệu chứng hay gặp ở giai đoạn toàn phát: tăng trương lực cơ tứ chi (68,3%), nói khó (61,7%), nuốt khó (58,3%). Đặc điểm cận lâm sàng biểu hiện: nồng độ ceruloplasmin huyết thanh giảm, trong đó nhóm 5,1-10 mg/dl chiếm tỷ lệ cao nhất (61,7%); đồng niệu 24 giờ tăng, trung bình là 673 μ g, cao nhất là 2475 μ g.

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 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. 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 cho tất cả các bệnh nhân bị bệnh Wilson và các thành viên trong gia đình bệnh nhân để phát hiện sớm đột biến, có giải pháp điều trị thích hợp giúp 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 Văn 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 Văn Khánh (2015). Đột biến gen *ATP7B* ở bệnh nhân Wilson thể gan. *Tạp chí nghiên cứu Y học*. 95(3), 1-7.

Ministry of education & training

Ministry of health

Hanoi Medical University



DO THANH HUONG

**ANALYSIS OF *ATP7B* MUTATION - PHENOTYPE
CORRELATION IN VIETNAMESE PATIENTS WITH
WILSON'S DISEASE**

Major: Neurology

Code: 62.72.01.47

Summary of doctoral thesis

Hanoi - 2016

**Doctoral thesis is completed
at Hanoi Medical University**

Supervisors:

**Tran Van Khanh MD., PhD., Ass Prof.
Nguyen Van Lieu MD., PhD., Ass Prof.**

Reviewer 1: Hoang Van Thuan MD., PhD., Prof.

Reviewer 2: Phan Tuan Nghia PhD., Prof.

Reviewer 3: Nguyen Phu Dat MD., PhD., Ass Prof.

Doctoral thesis will be evaluated at thesis evaluation council at
Hanoi Medical University.

On ...a.m/ p.m// 2016

You can find the thesis at:

- The National Library
- Library of Hanoi Medical University
- Library of Central Medicine Information

1. Introduction

Wilson disease (WD) is an inherited disorder on autosomal chromosome caused by mutations in *ATP7B* gene. In the world, it is estimated that 1/30.000 children is caught this disease. WD is a disorder of copper metabolism, causing gradual accumulation of copper amount in the body and in the organs (liver, brain, eyes ...) with a variety of symptoms. In Viet Nam, few studies on WD have been conducted and mainly in the form of description about clinical features and biochemical modifications. In recent years, several studies on detecting mutation of *ATP7B* gene have begun to be implemented. However, there has not been any research on analysis of the correlation between *ATP7B* genotype and WD phenotype, creating background for accurate and efficient diagnoses and treatment.

Technique for mutation detection of *ATP7B* gene with sequence of 21 exons is used, and then the correlation between genotype and phenotype of WD is analyzed.

Stemming from the practical significance, we conduct the research topic: "*Analysis of ATP7B mutation-phenotype correlation in Vietnamese patients with Wilson's disease*".

2. Objectives of the study

- 1. Description about clinical features and biochemical modifications*
- 2. Analysis of correlation between genotype and phenotype of WD is analyzed*

3. Practical significance and contribution of the study

Technique for mutation detection of *ATP7B* gene with sequence of 21 exons is used, and then the correlation between genotype and phenotype of WD is analyzed.

Results: The more mutant alleles the patients have, the less serum ceruloplasmin concentration they have and the more urinary copper 24-hour they have neurological - hepatic type of presentation is more common in patients with 2 nonsense/frameshift mutant alleles than in others type of mutation. Patients with 2 nonsense/frameshift mutant alleles have lower serum ceruloplasmin concentration than the others with 1 nonsense/frameshift mutant alleles or missense/5'UTR regional mutant alleles. Patients with 2 nonsense/frameshift mutant alleles have higher urinary copper 24-hour concentration than the others with 1

nonsense/frameshift mutant alleles or missense/5'UTR regional mutant alleles. There is no correlation between the number of mutant alleles and type of mutations at the age of WD onset. The study plays an important and ethical role in creating for accurate and effective diagnoses and treatment to avoid serious sequelae and death.

The study results suggest: (1) Need to detect the gene for Wilson patients and their relatives to initially identify mutation aiming at providing appropriate treatment methods and limiting disease sequelae; (2). Need to analyze the *ATP7B* gene with a larger sample size to detect effects every mutation on possibility of WD pathogenic and impacts from other genes.

4. Structure of the thesis

The thesis has 120 pages. Apart from the introduction and conclusion, the thesis consists of four chapters: Introduction: 2 pages; Chapter 1 - Overview of the Research: 45 pages; Chapter 2 - Objectives and Methodology: 11 pages; Chapter 3 - Results of the research: 25 pages; Chapter 4 - Discussion: 36 pages; Conclusion: 1 page; Recommendation: 1 page. The thesis has 24 tables, 37 figures, 105 references (10 Vietnamese, 95 English).

Chapter 1

OVERVIEW

1.1. Characteristics of Wilson disease (WD)

1.1.1. The concept of WD

In 1912, Wilson first described WD as a familial disorder associated with neurologic symptoms and cirrhosis. After that, this disease is known as an inherited disorder of copper metabolism disorder with main clinical features in liver, brain and corneas.

1.1.2. The WS researching situation

Since the initial discovery of *ATP7B* (1993) and first characterization of its gene structure (1994), over 380 mutations in this gene have been identified in WD patients worldwide (see WD mutation database <http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp>). Most of the WD mutations result in a single base-pair substitution replacing an amino-acid (missense mutations). However, nonsense, insertion, deletion and splice site mutations, which more drastically affect transcript and protein structure, have also been reported. The best characterized H1069Q

mutation is a prevalent mutation in Caucasian population of European origin, including Lithuanian, Czech, Hungarian, German and other groups. In contrast, the R778L mutation is predominant among Korean, Chinese, and Japanese patients (1995).

In 1969, Bui Quoc Huong has researched and reported the first time about 8 Vietnamese patients with Wilson disease at American Neurologic Conference. In 2001, Do Thanh Huong kept initially researching about mutation *ATP7B* gene. In 2012, Le Hoang Phuc detected 8/16 WD with mutations in exons 8, 10, 12, 13, 15, 16, and 20 at Children 1 Hospital. In 2015, Nguyen Thị Mai Huong detected 10/16 WD with mutations in exons 2b, 8, 11, 12, and 13 at National Hospital of Pediatrics. In 2015, Phan Ton Hoang detected 78,6% patients with WD who have mutation in *ATP7B* gene.

1.1.3. Pathophysiological mechanisms

Copper is an essential metal that is an important cofactor for many proteins. The average diet provides substantial amounts of copper, typically 2-5 mg/day; the recommended intake is 0.9 mg/day. Most dietary copper ends up being excreted. Copper is absorbed by enterocytes mainly in the duodenum and proximal small intestine and transported in the portal circulation in association with albumin and the amino acid histidine to the liver, where it is avidly removed from the circulation. The liver utilizes some copper for metabolic needs, synthesizes and secretes the copper-containing protein ceruloplasmin, and excretes excess copper into bile. Processes that impair biliary copper excretion can lead to increases in hepatic copper content.

1.1.5 The clinical, biochemical of WD

1.1.5.1. The clinical, biochemical of WD

The clinical features are various that can present with 3 main organs: liver, brain and eyes. *In liver:* In 50% of individuals with Wilson's disease, hepatic dysfunction is the initial clinical manifestation with several forms: acute transient hepatitis, mimic autoimmune hepatitis, acute fulminant hepatitis and progressive cirrhosis. *In brain:* neurological dysfunction constitutes the initial clinical manifestation in 40–60% of individuals with Wilson's disease: tremor, dysarthria, dystonia, drooling, hypertonic. *In eyes:* Kayser-Fleischer rings are formed by deposition of copper within Descemet's membrane. The color of the rings can range from gold to brown to green. Sunflower cataracts are relatively rare in Wilson's disease patients. *Additional symptoms:* Hematuria, nephrocalcinosis, hemolytic

1.1.5.2. Diagnostic testing

Test for Wilson's disease: serum ceruloplasmin reduced less than 20mg/dl (normal range: 20-40mg/dl); 24-hour urinary copper exceed 100 mg/d (normal < 40 µg/d); hepatic copper determination elevations greater than 250 mg/g of dry tissue (normal: 15 to 55 mg/g). Brain magnetic resonance imaging (MRI) abnormalities in virtually 100% of Wilson's disease patients with neurological dysfunction: increased signal intensity in the basal ganglia on T2-weighted images is perhaps the most widely recognized, although generalized brain atrophy may be more common. Abnormalities such as the "face of the giant panda" in the midbrain is rare.

1.1.6. Sequencing ATP7B

Currently, more than 500 mutations of *ATP7B* have been identified by sequencing 21 exons to diagnosis, treat and consult early for patients and their families.

1.1.7. Diagnostic

- *Sternlieb criteria*: the classical diagnosis of WD rests on the Sternlieb criteria and includes at least two of the following: (a) typical neurological symptoms, (b) the presence of a Kayser–Fleisher (KF) ring, (c) low Cp, and (d) elevated hepatic Cu. However, the diagnosis is still being challenged, and the significance attributed to the different tests is under debate.

- *Ferenci criteria (2003)*: based on scores: symptoms of brain, eyes; low ceruloplasmin, Test Coombs negative, high copper in dry liver, high copper 24-hour urine and detect mutation of *ATP7B* gene.

1.1.8. Treatment

With the exception of liver transplantation, treatment of Wilson's disease is only palliative and intended to restore and maintain copper balance. It does not eliminate the underlying defect responsible for WD. Thus, a lifelong commitment to treatment is required. Limitation of dietary copper intake is generally ineffective, and pharmacological management is necessary.

- *Diet*: Foods with very high concentrations of copper (shellfish, nuts, chocolate, mushrooms, and organ meats) generally should be avoided,

at least in the first year of treatment. Diets deficient in copper may delay the onset of the disease and control disease progression, but dietary management is not recommended as sole therapy

- ***D-penicillamine, trientine:*** a metabolic byproduct of penicillin that avidly chelates copper, copper is rapidly mobilized from tissues and eliminated in the urine. The usual daily dose is 750 to 2000 mg, divided into three doses taken on an empty stomach (adults: 750 to 1000 mg/d; children 20mg/kg/d).

- **ZinC:** zinc reduces intestinal absorption of dietary copper via induction of metallothionein formation in intestinal enterocytes. Zinc has primarily been used as maintenance therapy following initial treatment or using zinc monotherapy as initial treatment. The usual dosage regimen for zinc is 50 mg of elemental zinc three times daily, given on an empty stomach (adults: 150mg/d; children 75mg/d).

- ***Others drugs:*** dimercaprol, ammonium tetrathiomolybdate, curcumin, antioxidants, vitamin B6, vitamin E...

- ***Liver transplantation:*** was indicated in one patient who developed chronic progressive liver failure after D-penicillamine treatment and Fulminant Wilsonian Hepatitis.

- ***Gene therapy for WD:*** The administration of AAV- *ATP7B* in Wilson disease mice: significantly reduces Cu accumulation in the liver and improves liver histology. In 2022, this therapy will applied for WD patients.

1.2. Molecular of WD

1.2.1. Location, structure, function of ATP7B

The *ATP7B* gene is located on the long (q) arm of chromosome 13 at position 14.3. More precisely, the *ATP7B* gene is located from base pair 51,891,085 to base pair 52,012,098 on chromosome 13 and encodes 1465 acid amins in 21 exons. *ATP7B* is copper transport protein in cells with functions: binding of the target ion, binding of ATP to the nucleotide-binding (N)-domain, ATP hydrolysis and phosphorylation of the phosphorylation (P)-domain, translocation of the target copper, and dephosphorylation of the P-domain by the actuator (A)-domain.

1.2.3. Genetic disease characteristics

WD follows the rules of Mendel, of which heterozygous carriers having normal phenotype, but when getting married and giving birth, can transmit a 25% chance of having the WD and a 50% chance of having mutation gene to their children. There is the equal rate between male and female.

1.2.4. Molecular pathogenesis of Wilson

Enzym P-ATPase is transporter to distribute of intracellular copper. In patients with WD, they have lack of *ATP7B* lead to disorder of copper metabolism with various symptoms because of copper accumulation in target organs. Combination of in vitro and in vivo assays also discriminates between the effects of mutations on protein folding and function. Protein stability in cells is not indicative of function because catalytically inactive mutants could be structurally stable, whereas partially active mutants can degrade rapidly, producing a complete loss of function phenotype.

1.3. Genotype-phenotype correlations

The milder of two mutations is ‘functionally dominant’ and determines the age of onset, we classified 25/27 mutations as either severe (age of onset < 20 years) or moderate (age of onset > 20 years) , Significant effort in examining genotype-phenotype correlations revealed some trends; for example, patients with protein truncating mutations have in general earlier onset of the disease, and the early onset and predominantly hepatic course was reported for R778L mutation. In contrast, the H1069Q substitution was suggested to be associated with a late onset and neurological presentation.

Homozygous p.Arg778Leu and nonsense mutation/ frameshift mutations were more often associated with primary hepatic manifestations ($p = 0.0286$ and $p = 0.0383$, respectively) and higher alanine transaminase levels at diagnosis ($p = 0.0361$ and $p = 0.0047$, respectively). Nonsense mutation/frameshift mutations were also associated with lower serum ceruloplasmin. Our results indicate that the H1069Q mutation is associated with a late and neurologic presentation. In contrast, nonsense and frameshift mutations may correlate with earlier onset of symptoms and more severe disturbance of copper metabolism. However, other studies comparing various mutations showed no correlations with a phenotype. Individuals with the same mutation, even homozygotic twins, may demonstrate wide variability in age of symptom onset and clinical presentation, which suggests that additional factors are also operative.

Chapter 2

SUBJECTS, MATERIAL AND METHODS

2.1. Subjects

60 individuals with confirmed diagnosis of WD based on the Ferenci criteria (score ≥ 4):

Table 2.1. A scoring system for the diagnosis of Wilson disease

	Score
<i>Kayser-Fleischer ring</i>	
• Present	2
• Absent	0
<i>Neuropsychiatric symptoms suggestive of WD (or typical brain MRI)</i>	
• Present	2
• Absent	0
<i>Serum ceruloplasmin</i>	
• Normal (>20mg/dl)	0
• 10-20mg/dl	1
• <10mg/dl	2
<i>Coombs negative hemolytic anemia</i>	
• Present	1
• Absent	0
<i>Hepatic parenchymal copper concentration</i>	
• Up to >5 ULN (>250 μ g/g)	2
• 50-250 μ g/g	1
• Normal (<50 μ g/g)	-1
• Rhodamine positive hepatocyte	1
<i>24-hour urinary copper</i>	
• Normal	0
• 1-2 x ULN	1
• >2 x ULN	2
Normal, but > 5 x ULN one day after challenge with 2 x 0.5g D-penicillamine	2
≥ 4: diagnosis of WD highly likely	
3: diagnosis of WD probable, do more investigations	
≤ 2: diagnosis of WD unlikely	

Control group: 40 healthy people to control experiment and check novel mutation of WD.

2.2. Location: Research at:

- National Hospital of Pediatric.
- Center for Gene and Protein Research - Hanoi Medical University.
- Bach Mai Hospital

2.3. Time: three years from September 2012 to September 2015.

2.4. Research Methodology

2.4.1. Design Research: cross-sectional descriptive.

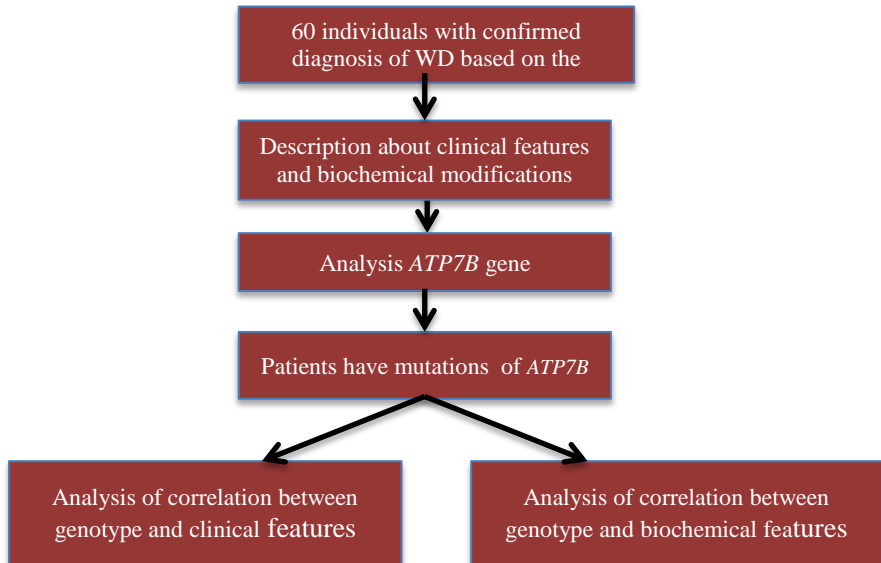


Figure 2.1. Researching diagram

2.4.2. Template: Utility, WD is rare inherited disorder.

2.5. Methods of clinical studies, amniocentesis and molecular genetic techniques

2.5.1. Clinical research methodology: data collected on medical records.

2.5.2. Biochemical blood test and imaging brain MRI

- Blood test: full blood count, coagulated blood test, test Coombs, serum glucose, serum protid, albumin, ure, creatinin, AST, ALT, serum ceruloplasmin;
- Urinary test: urinary copper 24-hour
- Brain MRI

2.5.3. Diagnosis

- Diagnosis of WD: score ≥ 4 based on Ferenci criteria (table 2.1)
- Phenotypic classification of WD: based on Ferenci criteria (Hepatic presentation, Neurologic presentation and Neurologic presentation associated with symptomatic liver disease).

2.5.4. Analysis ATP7B mutations by sequencing technique: (1) Genomic DNA was extracted from 5 to 10 ml of EDTA anticoagulated blood. (2)

PCR 21 exons of ATP7B; (3) Sequencing; (4) Analysis of mutations: this mutation was accessed by GeneBank of ATP7B by NG_008806 CLC software (Genebank NM_000053.3, software Blast of NCBI).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student unpaired 't' test and Kendall test. *P* value of <0.05 was considered significant. All the values are mean \pm SD. SPSS-statistical software (SPSS, version 16.0) was used for data analysis.

2.7. Ethical issues in researching

Research subject follows ethical rules. The family members voluntary participated in the research and are kept medical information for consulting. The information of each family will be guaranteed confidentiality.

Chapter 3 RESEARCHING RESULT

60 patients with WD were screened for mutations. Exons 1-21 were direct sequenced, provide following results:

3.1. Clinical and biochemical features of WD

3.1.1. Clinical features of WD

3.1.1.1. Age onset of WD

Among the 60 patients, age onset ranged from 3 to 53 years old, with an average of 16.3 years of age (the age most common: 10 - 19 years old: 51.9%).

3.1.1.2. Distribution gender of WD

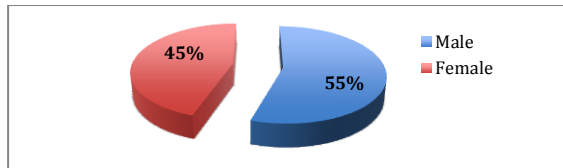


Figure 3.1. Gender of WD

Male patients have higher ratio in compare with female: male/female = 1.22.

3.1.1.3. Initial clinical manifestations of WD

Initial clinical symptoms of WD are: tremor, clumsiness with the hands, jaundice, mild spasticity (the most common: 65% tremor).

3.1.1.4. Late clinical manifestations with WD

Late clinical symptoms of WD are severe spasticity (68.3%), dysphasia (61.7%), dysphagia (53.8%), jaundice (51.7%) và 32/60 cases with Kayser-Fleischer rings (53.3%). There is rare emotional lability (8.3%), and cognitive abnormalities (6.7%).

3.1.2. Biochemical features

3.1.2.1. Serum ceruloplasmin of WD

Serum ceruloplasmin of WD is decreased, the most common in 5.1-10mg/dl group (61.7%).

3.1.2.2. Serum transaminase of WD

All of patients with neurological - hepatic type are increased serum transaminase (ALT and AST).

3.1.2.3. Urinary copper 24-hour of WD

Among the 47 patients with urinary test, urinary copper 24-hour excretion is greater than 100 µg/d (reference range, less than 40 µg/24h; Median: 673µg/24h; Max: 2457µg/24h).

3.2. Mutations of ATP7B gene

Our samples with 3 common mutations are detected nonsense c.314C>A (p.S105X) in exon 2; missense c.2333G>T (p.R778L) in exon 8; c.-75C>A at 5'UTR. There are 7 novel mutations: 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) (Table 3.1).

Table 3.1. Distribution mutations in ATP7B of WD

No.	Exon/ 5'UTR	Nucleotide change	Amino acid change	Note	No. allele	%	Reference
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		c.2862T>C	p.L902P	DV	1	0.96	1
13	11	c.2712_2713insT	p.E905X	new	1	0.96	0
14		c.2817G>C	p.W939C	DV	1	0.96	8
15	12	c.2982G>A	p.G943D	DV	2	1.93	1
16	13	c.2939G>C	p.C980S	new	1	0.96	0
17		c.3097A>G	p.T1033I	DV	1	0.96	1
18	14	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		c.3818C>A	p.P1273Q	DV	3	2.88	3
25	18	c.3810delT	p.N1270IfsX35	new	1	0.96	0
26	20	c.4112T>C	p.L1371P	DV	1	0.96	1

Note: DV: Disease Variant; No, Reference: see GeneBank (<http://www.wilsonsdisease.med.ualberta.ca/>). Of the 26 mutations detected in 44 patients with 104 alleles, the most common: c.-75C>A (26.92%); p.S105X (26.92%) và p.R778L (9.62%).

Table 3.2: Clinical and biochemical features of WD with mutation

Code	Mutation	Type		No. alleles	Age onset (year)	Serum ceruloplasmin (mg/dl)	Urine copper 24h(µg)	Phenotype
W1.00	p.S105X	Nonsense	Homozygous	2	12	10	426	H
W3.00	p.S105X	Missense	Homozygous	2	18	7	473	H
W6.00	p.L1371P	Missense	Heterozygous	2	21	17	198	N2
	p.T850I	Missense	Heterozygous					
W8.00	p.R778L	Missense	Heterozygous	2	20	17	312	H
	c.-118insCGCCG		Heterozygous					
W9.00	p.S105X	Nonsense	Homozygous	2	8	9	501	H
W10.00	p.A604P	Missense	Homozygous	2	11	8.9	432	N2
W12.00	p.V536A	Missense	Homozygous	2	16	14	347	N2
	c.-75C>A		Heterozygous					
W13.00	c.-118insCGCCG		Heterozygous	2	13	16	213	N2
	c.-75C>A		Homozygous					
W18.00	c.-75C>A		Homozygous	3	20	11	549	N2
	p.G1099S	Missense	Heterozygous					
W19.00	p.W939C	Missense	Heterozygous	2	20	11	362	H
	p.C980S	Missense	Heterozygous					
W21.00	p.T850I	Missense	Heterozygous	3	9	17	527	H
	p.S105X	Nonsense	Homozygous					
W23.00	p.G943D	Missense	Homozygous	3	17	9	527	H
	p.R778L	Missense	Heterozygous					
W24.00	c.-75C>A		Homozygous	3	7	11	1231	H
	p.P1273Q	Missense	Heterozygous					
W25.00	p.A1065P	Missense	Heterozygous	2	10	15	310	H
	c.-75C>A		Heterozygous					
W29.00	p.G591S	Missense	Heterozygous	2	12	12	286	N2
	p.R778L	Missense	Heterozygous					
W30.00	c.-75C>A		Homozygous	4	11	2.5	987	N1
	p.S105X	Nonsense	Homozygous					
W31.00	p.G1213D	Missense	Heterozygous	2	10	8.9	572	N1
	p.N1270IfsX35	Frameshift	Heterozygous					
W33.00	c.-75C>A		Heterozygous	3	15	9	1825	N2
	p.S105X	Nonsense	Heterozygous					
W37.00	p.V536A	Missense	Heterozygous	2	12	16	189	N2
	p.P1273Q	Missense	Heterozygous					
W38.00	p.E905X	Nonsense	Heterozygous	2	19	13	270	N2
	p.P1273Q	Missense	Heterozygous					
W40.00	p.G50S	Missense	Heterozygous	4	7	3	1228	N2
	c.-75C>A		Homozygous					
W42.00	p.S105X	Nonsense	Homozygous	1	15	9	412	N1
	c.-75C>A		Homozygous					
W43.00	p.S105X	Nonsense	Heterozygous	4	7	4	1231	N2
	p.G591S	Missense	Heterozygous					

W44.00	c.-75C>A		Homozygous	2	4	9	765	N2
W47.00	p.K720NfsX3	Frameshift	Heterozygous	1	13	10	402	N2
W48.00	c.-75C>A		Homozygous	3	12	13	430	N2
	p.P1133EfsX19	Frameshift	Heterozygous					
W49.00	c.-75C>A		Homozygous	4	9	5	1879	N2
	p.S105X	Nonsense	Homozygous					
W50.00	p.P1052L	Missense	Heterozygous	2	16	14	173	N2
	p.T1033I	Missense	Heterozygous					
W51.00	p.R778L	Missense	Heterozygous	2	14	16	231	N2
	p.V446G	Missense	Heterozygous					
W52.00	p.R778L	Missense	Heterozygous	2	25	14	157	N1
	p.L902P	Missense	Heterozygous					
W53.00	c.-75C>A		Homozygous	4	15	8	886	N1
	p.S105X	Nonsense	Homozygous					
W54.00	p.R778L	Missense	Heterozygous	2	40	15	271	N1
	p.V536A	Missense	Heterozygous					
W55.00	p.R778L	Missense	Heterozygous	1	7	12	379	H
W56.00	p.A604P	Missense	Heterozygous	3	13	17	369	N2
	p.V536A	Missense	Homozygous					
W57.00	p.S105X	Nonsense	Heterozygous	1	16	10	315	H
W58.00	p.S105X	Nonsense	Heterozygous	2	9	6.2	832	N1
	p.R778L	Missense	Heterozygous					
W59.00	p.A604P	Missense	Heterozygous	2	22	10	406	H
	p.A1183T	Missense	Heterozygous					
W60.00	c.-75C>A		Homozygous	4	7	5	1657	N1
	p.S105X	Nonsense	Homozygous					
W61.00	c.-75C>A		Homozygous	4	8	2.2	1513	N1
	p.S105X	Nonsense	Homozygous					
W62.00	p.V536A	Missense	Heterozygous	2	12	9	564	N1
	p.R778L	Missense	Heterozygous					
W64.00	p.S105X	Nonsense	Heterozygous	1	42	12	313	N1
W65.00	p.S105X	Nonsense	Homozygous	2	14	8	461	N2
W66.00	p.R778L	Missense	Heterozygous	2	13	13	396	N2
	c.-75C>A		Heterozygous					

Note: *DV: Disease Variant; H: Hepatic; N1: Neurological-Hepatic; N2: Neurologic. Patients with 1 heterozygous mutation has 1 allele; 1 homozygous with 2 alleles; 1 heterozygous and 1 homozygous with 3 alleles; 2 heterozygous with 2 alleles, and 2 homozygous with 4 alleles*

Most of patients with age of onset is younger than 20 years old. All of them have serum ceruloplasmin less than 20mg/dl, and urinary copper 24h more than 100µg. The patients with hepatic or neurologic associated hepatic phenotype increased serum transaminase (ALT và AST). There are 88.64% cases (39/44 cases) with 2 to 4 mutations of ATP7B; only 5/44 cases (11.36%) with 1 heterozygous mutation, 4 cases with nonsense (3 cases with p.S105X, 1 case with p.K720NfsX3), and 1 case with missense (p.R778L).

Photographic image of novel mutation at region 5'UTR

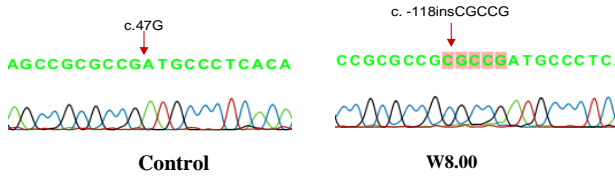


Photo 3.1. Mutation of W8.00

(mutation insert 5 nucleotid CGCCG at -118 before promoter Methionine).

Photographic image of novel mutation insert nucleotid

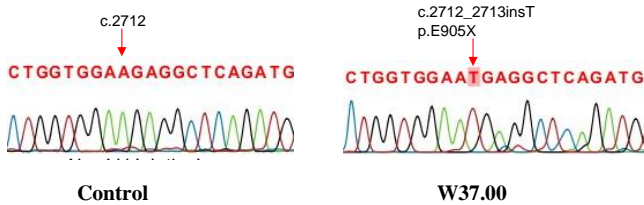


Photo 3.2. Mutation of W37.00

(Homozygous insert nucleotid T between 2712 and 2713, codon 905 GAG code Glutamate (E) to stop codon TGA (X).

Photographic image of novel mutation missense

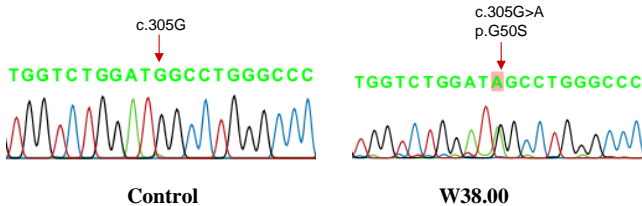


Photo 3.3. Mutation of W38.00

(Heterozygous changed G to A, codon 50 GGC code Glycine (G) to codon AGC code Serine (S)).

3.3. Correlation between genotype ATP7B and phenotype of WD

3.3.1. Correlation between the number of mutant alleles and phenotype of WD

Among 44 patients with mutations, divided 4 groups: 5 patients with 1 alleles; 25 patients with 2 alleles; 7 patients with 3 alleles and 7 patients with 4 alleles.

3.3.1.1. Correlation between the number of mutant alleles and age onset

Mean age onset is the lowest in the group with 4 mutant alleles, but not significantly ($p > 0.05$).

3.3.1.2. *Correlation between the number of mutant alleles and serum ceruloplasmin*

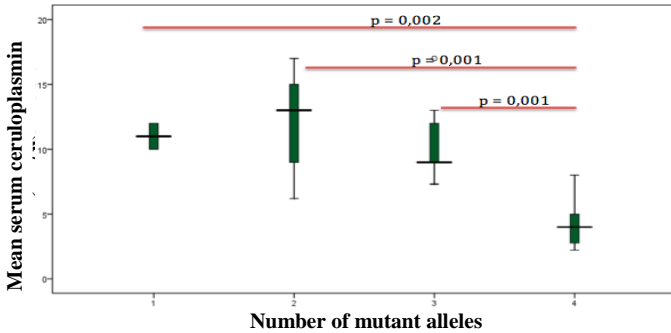


Figure 3.2. No. of mutant alleles and serum ceruloplasmin

Group patients with 4 mutant alleles has the lowest serum ceruloplasmin mean ($p < 0.05$).

3.3.1.3. *Correlation between the number of mutant alleles and urinary copper 24h*

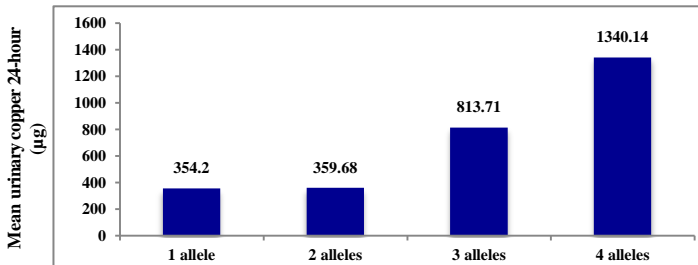


Figure 3.3. No. of mutant alleles and and urinary copper 24-hour

Group patients with 4 mutant alleles has the highest mean urinary copper 24-hour; Group patients with 1 mutant allele has the lowest one ($p < 0.05$).

3.3.1.4. *Correlation between the number of mutant alleles and phenotypic classification*

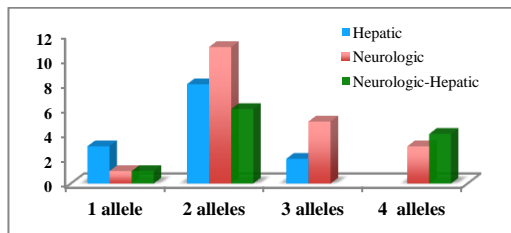


Figure 3.4. No. of mutant alleles and phenotypic classification

Neurological - hepatic type in group with 1 mutant allele, 2 alleles, and 4 alleles. Group with 4 mutant alleles has the highest percentage of neurological - hepatic type ($r < 0.25$, not significant difference $p > 0.05$).

3.3.2. Correlation between type of mutation and phenotypes of WD

We identified 44/60 patients with mutations, divided 3 group: 23 patients without frameshift/ nonsense mutant alleles (only with missense/ 5'UTR mutant alleles), 10 patients with 1 frameshift/ nonsense mutant allele, and 11 patients with 2 frameshift/ nonsense mutant alleles.

3.3.2.1. Correlation between type of mutation and age onset

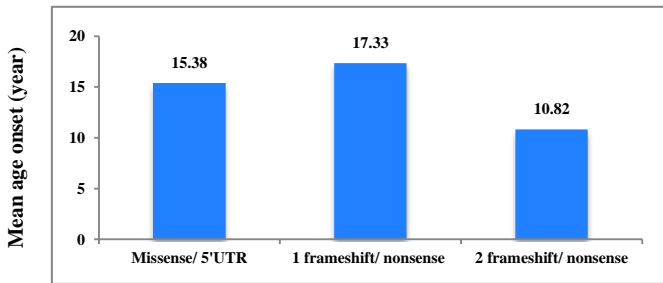


Figure 3.5. Type of mutation and age onset

Mean age onset in group with 2 frameshift/ nonsense mutant alleles is lower than those with 1 frameshift/ nonsense, and missense/ 5'UTR mutant alleles ($p > 0.05$).

3.3.2.2. Correlation between type of mutation and serum ceruloplasmin

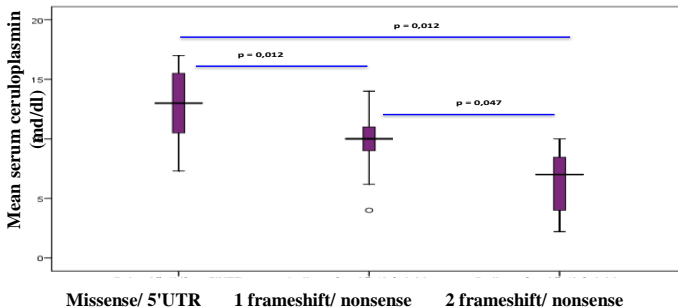


Figure 3.6. Type of mutation and serum ceruloplasmin

Mean 2 alleles serum ceruloplasmin in group with 2 frameshift/ nonsense mutant alleles is the lowest, follow in those with 1 frameshift/ nonsense, and in those with missense/ 5'UTR mutant alleles is the highest ($p < 0.05$).

3.3.2.3. Correlation between type of mutation and urinary copper 24-hour

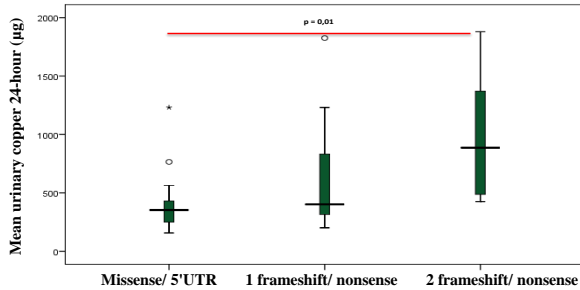


Figure 3.7. Type of mutation and urinary copper 24-hour

Mean urinary copper 24-hour in group with 2 frameshift/ nonsense mutant alleles is higher than in those with missense/ 5'UTR mutant alleles ($p = 0.01$).

3.3.2.4. Correlation between type of mutation and phenotypic classification

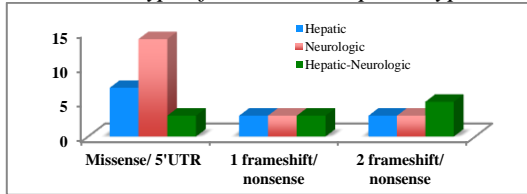


Figure 3.8. Type of mutation and phenotypic classification

Group with 2 frameshift/ nonsense mutant alleles has the highest percentage of neurological - hepatic presentation ($r = 0.73$ và $p = 0.03$).

Chapter 4 DISCUSSION

4.1. Clinical and biochemical features of WD

4.1.1. Clinical features of WD

4.1.1.1. Age onset of WD

Among the 60 patients, age onset ranged from 3 to 53 years old, with an average of 16.3 years of age (the age most common: 10 - 19 years old: 51.9%). Researches in Germany, India and China showed that age onset of Wilson is common younger than 18 years old. So, WD is an inherited metabolism with onset in children and younger adult.

4.1.1.2. Distribution gender of WD

In our research, male patients have higher ratio in compare with female: male/female = 1.22. (Figure 3.1). Le Duc Hinh detected the ratio male/ female = 1.3; Ratio in India is 2.2; Ratio in China is 44/31. All of researches have the result with male patients more than female ones. Not significant difference about gender is found because of mutation in autosomal chromosome.

4.1.1.3. Initial clinical manifestations of WD

Initial clinical symptoms of WD are: tremor, clumsiness with the hands, jaundice, mild spasticity.

The most common presenting neurologic feature is asymmetrical tremor (65%), occurring in approximately half of individuals with Wilson disease. The character of the tremor is variable and may be predominantly resting, postural, or kinetic. Frequent early symptoms include difficulty speaking, excessive salivation, ataxia, masklike facies, clumsiness with the hands, and personality changes. The results of our study are the same of Le Duc Hinh in Vietnam and other studies in Bulgaria. Thus, symptoms at onset usually discreet expression with trembling hands, difficulty speaking so easily missed diagnosis and proper treatment are not at this stage.

4.1.1.4. Late clinical manifestations with WD

Late clinical symptoms of WD are severe spasticity (68.3%), difficult speaking (61.7%), dysphagia (53.8%), jaundice (51.7%) và 32/60 cases with Kayser-Fleischer rings (53.3%). There is rare emotional lability (8.3%), and cognitive abnormalities (6.7%).

Late clinical neurological manifestations are varied, (now rare because of earlier diagnosis and treatment) include dystonia, spasticity, grand mal seizures, rigidity, chorea. The results of our study are similar to previous studies with late clinical neurological symptoms due to damage in the basal ganglia.

4.1.2. Biochemical features

4.1.2.1. Serum ceruloplasmin of WD

Serum ceruloplasmin of WD is decreased, the most common in 5.1-10mg/dl group (61.7%). Results of our study is similar to the Vietnamese and foreign authors with low levels of ceruloplasmin in most patients with WD. Serum ceruloplasmin is an important determining the diagnostic criteria and follow-up treatment.

4.1.2.2. Serum transaminase of WD

All of patients with hepatic or neurological - hepatic type have increased serum transaminase (serum ALT and AST). According to the literature, damaged liver is the earliest manifestation of WD. However, clinical symptoms are often unclear, only detected in serum transaminases increased based on biochemical blood tests. Therefore all patients with persistent increased serum transaminases of unknown cause, especially in young people, the need to do more tests for early diagnosis of Wilson's disease.

4.1.2.3. Urinary copper 24-hour of WD

Among the 47 patients with urinary test, urinary copper 24-hour excretion is greater than 100 µg/24h (reference range, < 40 µg /24h; Median: 673µg/24h; Max: 2457µg/24h).

Quantification of copper in the urine helps to diagnosis, screening and follow-up treatment for patients with Wilson disease. 100% of patients in our study had urinary copper 24-hour increased more than 100 μ g (normally less than 40 μ g). This demonstrates that the amount of serum free copper rised too high due to lack of biliary excretion in these patients was excreted in the urine.

4.2. Mutation of *ATP7B* gene

Our samples with 3 common mutations are detected: 26.92% mutant alleles nonsense c.314C>A (p.S105X) in exon 2; 26.92% mutant alleles c.-75C>A in region 5'UTR and 9.62% mutant alleles missense c.2333G>T (p.R778L) in exon 8 (no patient with mutation p.H1069Q in exon 14). These mutations are reported in many international journals with hight rate (<http://www.wilsondiseas.med.ualberta.ca>). There are also 7 novel mutations: 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) in our research (Table 3.1).

- *Mutant c.-75A>C*: 28/44 cases (26.92%) had mutant c.-75A>C (C change to A in region 5'UTR before primer code 75 bp), before Cu⁺⁺ binding site. This mutation is disease variant in Japan and China (Table 3.1).

- *Mutant p.S105X (c.417C>A)*: 26.92% mutant alleles nonsense c.314C>A (p.S105X): changed nucleotid 314C to A, codon 105 TCG code Serine to stop codon TAG (Table 3.1). This mutation is reported 3 times as disease variant of WD (twice in Germany, once in China) (Table 3.1). Mutation in exon 2 of region MBDs (Metal-Binding Domains) - Cu⁺⁺ binding site.

- *Mutant p.R778L*: 44 patients with mutations, 9.62% mutant alleles p.R778L (Table 3.1), change nucleotid 2333G to T, codon 778 CGG code Arginine to CTG code Leucine (p.R778L) in exon 8. This mutation is the most common in Asian with a frequency of more than 30% and reported 25 times as disease variant of WD in GeneBank (Table 3.1). So, three mutations c.-75C>A; p.S105X; p.R778L have been found to have the highest in our research in Viet Nam. They also have been found in many Asian countries, but p.R778L is the most common in Asia and is the third in Viet Nam. We didn't find mutation p.H1069Q (p.H1069Q is the most common mutation in European countries).

4.3. Correlation between the number of mutant alleles in *ATP7B* gene and phenotype of Wilson disease's patients

4.3.1. Correlation between the number of mutant alleles and age onset

The results of our study show that patients The more mutant alleles the patients have, the younger age of onset they are (the difference was not statistically significant with $p > 0.05$). In addition, there are several mutations which related to the age of onset were confirmed from previous studies:

sudden manifestation p.R778L early damage liver, the mutation c.3207 C>A, p.S932X or p.W779X in late onset group. So we can still detect a negative correlation between age of onset and the number of mutant allele may be affected by important mutations in each group.

4.3.2. Correlation between the number of mutant alleles and serum ceruloplasmin

Results Figure 3.2 shows that the more mutant alleles the patients have, the less serum ceruloplasmin they have (the difference was statistically significant with $p < 0.01$). Research shows similar results with 71 Korean WD patients. This is suitable for molecular biological characteristics: as much of the variation/ mutation in the *ATP7B* gene, the structure and properties of proteins as changed, affecting copper transport function.

4.3.3. Correlation between the number of mutant alleles and urinary copper 24h

Urinary copper 24-hour levels is on average proportional to the number of mutant alleles, with $p < 0.05$ (Figure 3.3). This result is similar study by Hyung - Doo Park (2010): patients with two mutant alleles has the highest concentration of urinary copper, then the group carrying one mutant allele and without mutant allele groups. Thus, the more mutant alleles the patients have, the more urinary copper 24-hour they have.

4.3.4. Correlation between the number of mutant alleles and phenotypes

Results Figure 3.4: the groups carrying 1 and 2 mutant alleles have ratio merely the highest liver patients; the group with 4 mutant alleles includes patients with neurologic and neurological - hepatic type (not hepatic type), and the most patients with neurological - hepatic type. There is no correlation between the number of mutant alleles and phenotypes of WD, with the index $r < 0.25$. This is an important result to show the influence of multi-variation/ mutation to phenotype. The patients carrying many mutations can have cumulative impacts on phenotypic diversity. The researchers found that mutations can characterize clinical type: 74% p.R778L mutation may have clinical manifestations of liver or p.H1069Q common mutation in patients with neurologic symptoms. But in Table 3.11, there are 10 patients with mutation p.R778L in 3 patients with hepatic type, 4 patients with neurologic type, and 4 patients with neurological - hepatic type. Which has only 1 patient with only mutation p.R778L (patient with code W55.00, hepatic type), and 9 patients have more than 2 mutations (the patients with code W8.00, W23.00, W29.00, W51.00, W52.00, W54.00, W58.00, W62.00 and W66.00). This confirms WD of metabolic disease group, the majority of genetic polymorphism/ mutation, so we have confirmed the importance of the overall analysis of the effects of multiple variation/ mutations in individual WD patients.

4.4. Correlation between type of mutation of ATP7B and phenotypes of WD

4.4.1. Correlation between type of mutation of ATP7B gene and age onset

The results in Figure 3.5 shows that the average age of onset in the group with 2 alleles mutant nonsense/ frameshift is lower than ones with 1 alleles mutant nonsense/ frameshift and ones with alleles missense/ 5'UTR region (the difference between the groups is not statistically significant with $p > 0.05$). That can be explained by the relatively small samples in each group of patients should not index p meaningful clinical and may also depend on the location of the mutation function on *ATP7B* gene. Moreover there are many patients with more than 2 mutations should be able to have the combined effect of many genes on age of onset. Another study found that patients with alleles mutant nonsense/ frameshift usually have age of onset earlier than other mutant types because of making stop codon and creating a truncated protein *ATP7B*.

4.4.2. Correlation between type of mutation of ATP7B gene and serum ceruloplasmin

The average of serum ceruloplasmin inversely proportional to the number of alleles mutant nonsense/ frameshift: group alleles mutant missense/ mutant at 5'UTR region is higher than ones with 1 alleles mutant nonsense/ frameshift and 2 alleles mutant nonsense/ frameshift (Figure 3.6). The difference was statistically significant with $p < 0.05$. Our results is also similar study in South Korea, Italy and Poland, this fits the molecular biological characteristics: mutant nonsense/ frameshift of *ATP7B* gene causes severe damage the copper transport function.

4.4.3. Correlation between type of mutation of ATP7B gene and urinary copper 24-hour

The average of urinary copper 24-hour is ascending in mutant missense/ mutant at 5'UTR region groups, 1 alleles mutant nonsense/ frameshift groups, and 2 alleles mutant nonsense/ frameshift groups (Figure 3.7). The difference was statistically significant with $p = 0.01$ between groups with 2 alleles mutant nonsense/ frameshift and mutant missense/ mutant at 5'UTR region groups. This result is similar to studies in Poland: 2 alleles mutant nonsense/ frameshift groups have urinary copper 24-hour higher than ones with 1 alleles mutant nonsense/ frameshift, the lowest urinary copper 24-hour in ones with alleles mutant missense/ mutant at 5'UTR region. Thus, mutant nonsense/ frameshift creates stop codon to make truncated protein and seriously affect copper metabolism functions.

4.4.4. Correlation between type of mutation of ATP7B gene and phenotypic classification

Research results in Figure 3.8 shows neurological-hepatic type of presentation is more common in patients with 2 mutant alleles

nonsense/frameshift than in others type of mutation. Group patients with mutant alleles nonsense/frameshift have directly proportion with clinical type. The difference was statistically significant with $p = 0.03$ and $r = 0.73$. It means that patients with 2 mutant alleles nonsense/frameshift usually have the most serious. However, the results in Figure 3.7 did not find a correlation between the number of mutant alleles and phenotypic classification

This proves that the important mutations can affect to phenotype more than the number of mutant alleles. Studies in South Korea, Poland and Japan also found that patients with mutant nonsense/frameshift can often severe clinical manifestations than the other mutations.

Results Table 3.2 shows that only 1 of 5 patients with heterozygous mutations, including 4 patients with stop codon (3 patients with p.S105X mutation, 1 patient with p.K720NfsX3 mutation) and 1 patient with nonsense mutation (p.R778L). The nonsense mutation has been demonstrated from previous studies that the mutants make truncated proteins - severe mutations with serious symptoms. The patients with this mutation may manifest clinical symptoms even if only one mutant allele. Mutation p.R778L were confirmed as important and common mutation in Asia, can usually cause hepatic present. Other studies have found that, WD phenotype depends on the epidemiological factors, race, environmental factors and the impact of a number of other genes: *MTHFR* genes, *ATOX1*, *XIAP*, *COMMD1* are *in vivo* phase to prove pathogenic role for patients with WD. Thus, the mutants making proteins truncated (mutant nonsense/frameshift) can cause severe clinical present. Phenotypic classification also can be affected by a number of other genes or environmental factors, race, important mutations and location of mutations on *ATP7B* gene.

Some typical clinical cases

The illustrated case 1: patients with mild hepatic present and mutant missense



Photo 4.1. Patient W55.00

Chu Ngoc M.

Female, 7 years old

Patient without clinical symptoms, a mild increased in serum transaminases (ALT: 49.9 U/ l; AST: 104 U/ l), serum ceruloplasmin is 5.36mg/ dl; urinary copper 24-hour is 379 μ g and heterozygous p.R778L mutation. Patients was treated D-Penicillamin, zinc acetate, vitamin B6 and vitamin E in accordance with the protocol, patients progressing well.

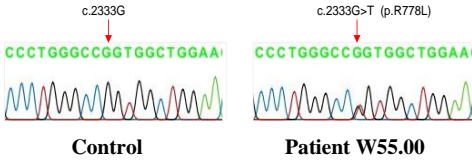


Photo 4.2. Figure sequencing *ATP7B* gene of patient W55.00.

(Mutations c.2333G> T (p.R778L) in exon 8 of the *ATP7B* gene).

Thus, mutations p.R778L (c.2333G> T) in exon 8 is transmembrane region TM4. It is an important region of *ATP7B* gene were confirmed disease (common hepatic type) and the most common mutation in Asia. Thus, mutations in the important functional region of *ATP7B* gene can cause clinical symptoms corresponding to whether carrying heterozygous mutation.

The illustrated case 2: patients with severe neurological - hepatic manifestations with missense and frameshift mutations.

Patient Nguyen Duc Q., male, 12 years old (code W31.00). He had symptoms onset 1 month ago before hospitalized (with symptoms onset: tremor, difficult to talk). After 1 month, he had severe symptoms gradually, hypertonic in limbs, dysphasia, drooling. Patients had tests: ALT 144.3U / l; AST: 119U/ l; serum ceruloplasmin 3.9mg/ dl; urinary copper 24-hour 3768 μ g; abdominal ultrasound: cirrhosis. Brain MRI: increased signal intensity in the basal ganglia on T2-weighted images

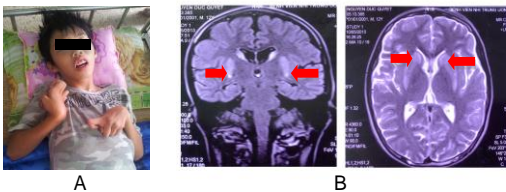


Photo 4.3. Patient W31.00 (A) and brain MRI image (B)

We detected mutant c.3638G> T (p.G1213D) in exon 17 announced a disease-causing mutations and new mutant c.3810delT (p.N1270IfsX35) in exon 18, is the binding site for ATP. Patients was treated in accordance with the protocol, still progressive disease with severe hypertonic.

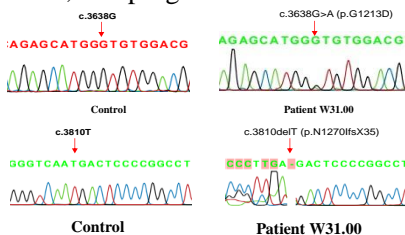


Photo 4.4. Sequencing *ATP7B* gene of patient W31.00

Missense mutant p.G1213D and nonsense mutant p.N1270IfsX35 with stop codon in amino acid 35 from the mutation region.

As indicated above, the mutation with loss nucleotide causing frameshift, creating stop codon with *ATP7B* truncated protein, is severe mutation. The patients with this mutation have sooner age onset, serious clinical symptoms, severe serum ceruloplasmin decreased even if only heterozygous mutation. However, this patient had more 1 missense heterozygous mutation was announced cause of WD on exon 17. The resonance effects of the allele heterozygous mutations also create polymorphisms of disease.

The illustrated case 3: moderate neurological - hepatic present, with missense and nonsense mutations.

Patient Hoang Phuon P., 12 years old (code W58.00). Detecting the onset of symptoms of liver damage: jaundice, increased serum transaminase 3 years ago. Patients was diagnosed neurological - hepatic present but he is not severe. However, patients treated intermittently copper chelator because he does not visit doctor as an appointment. After 3 years, he appeared neurologic symptoms: tremor, dysphagia and dysphasia. MRI brain lesions appear gray and thalamus's symmetrically.

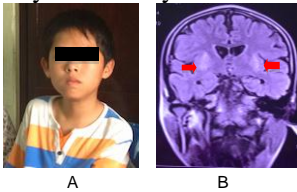


Photo 4.5. Patient W58.00 (A) and brain MRI image (B)

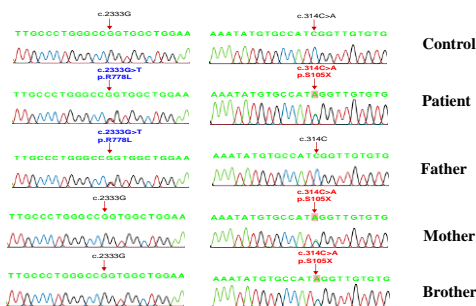


Photo 4.6. Sequencing *ATP7B* gene of patient W58.00 and his family

Patient with 2 heterozygous p.R778L of exon 8 and p.S105X of exon 2, his father with 1 heterozygous p.R778L, his mother with 1 heterozygous p.S105X and his younger brother with 1 heterozygous p.S105X.

This patient had neurological and hepatic symptoms but milder and progress lower than patients with frameshift mutation (patients W31.00 in Photo 4.3), this may be due to patients W58.00 detected and treated earlier than patients W31.00. However, after 3 years of treatment has evolved with the appearance of neurologic symptoms because of taking the drug intermittently. Patient's younger brother has only a heterozygous mutation p.S105X like mother, he also can suffer from WD because this mutant

nonsense manifest though only one allele. Patient's father with mutant heterozygous p.R778L (the same patient W55.00 above) is also likely to hepatic WD. Therefore, the parents and brother need to blood and urine test periodically for diagnosed and treated early, especially early treatment for mother and brother even if no expression clinically to prevent progression of the disease and serious complications. Besides, also need counseling for children before marriage to avoid having baby with WD. This suggests an important role of early diagnosis of WD and identify mutations can causing serious illness to appropriate treatments to prevent progression and reduce sequelas of the disease.



Photo 4.7. Patient's family W58.00
From left to right side: mother, patient (12 years old), brother (10 years old) and father.

CONCLUSION

In 3 years of researchs, 60 WD have analysis mutation in genes *ATP7B* and prenatal diagnosis for 12 pregnant women having heteozygous provide following results:

The more mutant allens the patients have, the less serum ceruloplasmin they have and the more 24-hour urinary copper they have neurologycal-liver type of presentation is more common in patients with 2 nonsense/frameshift mutant alleles than in others type of mutation. Patients with 2 nonsense/frameshift mutation alleles have lower serum ceruloplasmin than the others with 1 nonsense/frameshift mutant alleles or missense/5'UTR regional mutant alleles. Patients with 2 nonsense/frameshift mutant alleles have higher 24-hour urinary copper than the others with 1 nonsense/frameshift mutant alleles or missense/5'UTR regional mutant alleles. There is no correlation between the number of mutant alleles and type of mutations at the age of WD onset. The study plays an important and ethical role in creating for accurate and effective diagnoses and treatment to avoid serious sequelas and death.

RECOMMENDATION

(1) Need to detect the gene for Wilson patients and their relatives to initially identify mutation aiming at providing appropriate treatment methods and limiting disease complications.

(2). Need to analysis the *ATP7B* gene with a larger sample size to detect effects every mutation on possibility of WD pathogenic and impacts diagnosis will be conducted early to avoid fatality or sexual disability of the children.

LIST OF THE SCIENTIFIC ARTICLES HAVE POSTED RELATING TO THE THESIS

1. Do Thanh Huong, Ta Thanh Van, Nguyen Van Lieu, Ho Cam Tu, Tran Van Khanh (2013). Identification of ATP7B gene mutation features for Wilson's disease in Vietnam. *Vietnamese Neurological Journal*, 6, 164-170.
2. Do Thanh Huong, Tran Huy Thinh, Ninh Quoc Dat, Tran Van Khanh (2015). Identification of ATP7B gene mutation in patients with hepatic Wilson disease. *Journal of Medical Research*, 95(3), 1-7.