ĐỘT BIẾN GEN Ở BỆNH NHÂN BETA THALASSEMIA TẠI BỆNH VIỆN SẢN NHI QUẢNG NINH NĂM 2021

Khúc Thị Ngắm, Diệp Minh Quang, Trương Thị Hiền

Bệnh viện Sản nhi Quảng Ninh

Tác giả liên lạc: Khúc Thị Ngắm
Email: khucthingam@gmail.com
SĐT: 0903.226. 428

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định một số loại đột biến gen gây bệnh Beta Thalassemia trên bệnh nhi tại Bệnh viện Sản Nhi Quảng Ninh năm 2021.
Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang được thực hiện trên 39 đối tượng là các bệnh nhi (≤ 15 tuổi) mắc bệnh β-thalassemia.
Kết quả: Có 8 kiểu đột biến được phát hiện. 86,4% được tìm thấy thuộc 8 loại đột biến phổ biến ở miền Bắc Việt Nam. Có 4 đột biến phổ biến nhất, chiếm 86,4% các đột biến phát hiện là cd17 (AAG – TAG), cd41/42 (-TCTT), cd26 (GAG – AAG) và cd71/72 (+A). - Có kiểu gen phối hợp đột biến phổ biến nhất là cd41 – cd42; cd41/42 – cd17; cd17 – cd17; cd17-cd26. Phân loại kiểu gen phối hợp đột biến thành 4 kiểu gen lớn β0 β0, β+β+, β0β+, β0βE.
Kết luận: - Nghiên cứu áp dụng kỹ thuật phát hiện đột biến gen bằng phương pháp PCR có thể chưa phát hiện hết các đột biến hiếm ở bệnh nhân beta thalasemia. Nên phối hợp nhiều kĩ thuật sinh học phân tử khác nhau để tránh bỏ sót đột biến hiếm.
Từ khóa: Beta-thalassemia, bệnh nhi, Bệnh viện Sản Nhi Quảng Ninh.

Abstract

GENE MUTATIONS IN BETA THALASSEMIA PATIENTS AT QUANG NINH OBSTETRICS AND PEDIATRICS HOSPITAL.

Objectives: This study aimed to identify some frequent Beta - thalassemia mutations in Quang Ninh Obstetrics and Pediatrics hospital in 2021.

Methods: The cross-sectional descriptive study included 39 children with Beta - thalassemia at and under the age of 15 years old.

Results: Arcording to the results, 8 Beta-thalassemia mutations were detected. In total, 86.4% of the patients had one among 8 common Beta-thalassemia mutations in the North of Vietnam. There were 4 most frequent Beta-thalassemia mutations: cd17 (AAG-TAG), cd41/42 (-TCTT), cd26 (GAG-AGG) and cd71/72 (+A), which accouting for 86.4% detected mutations. In addition, 4 compound mutations were observed: cd41 – cd42, cd41/42

– cd17, cd17-cd17 , cd17 – cd26 which were classified into 4 main genotypes: β0 β0, β+ β+, β0 β+, β0 βE.

Conclusion: The study identified the genetic mutations by using PCR method which might not be able to detect some rare mutations in Beta-thalassemia patients. To avoid this, it is necessary to combined more molecular analysis techniques.

Keywords: children, Beta-thalassemia, Quang Ninh Obstetrics and Pediatrics hospital.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thalassemia là một nhóm bệnh thiếu máu tan máu bẩm sinh do đột biến gen globin gây nên thiếu hụt tổng hợp một hay nhiều mạch polypeptid trong globin của hemoglobin. Gen bệnh β-Thalassemia phân bố rất rộng trên thế giới, từ vùng bờ Địa Trung Hải, qua khu vực Trung Đông, tới Đông Nam Châu Á và Bắc Phi. Beta-Thalassemia là bệnh di truyền đơn gen phổ biến nhất trên thế giới. Tại Việt Nam, các công trình nghiên cứu cho tới nay đều thống nhất, bệnh hemoglobin phổ biến là α-Thalassemia, β-Thalassemia và hemoglobin E. Tổng hợp theo nhiều nghiên cứu có thể coi β-Thalassemia là bệnh di truyền phổ biến nhất ở Việt Nam [1][2].

Nghiên cứu về cơ sở di truyền bệnh β-Thalassemia là mấu chốt cho sự hiểu biết về đặc điểm lâm sàng, huyết học và là cơ sở khoa học cho việc điều trị, tiên lượng dự phòng, chẩn đoán trước sinh, tư vấn di truyền bệnh. Do đó nghiên cứu phát hiện đột biến gen β-globin (HBB) được nhiều nước có β-Thalassemia phổ biến rất chú ý. Cho đến nay đã có trên 200 loại đột biến gen β-thalassemia được Liên đoàn Thalassemia quốc tế công bố năm 2005 [3]. Tại Việt Nam hiện nay có khoảng hơn 20.000 bệnh nhân nặng cần điều trị và mỗi năm có gần 2.000 trẻ sinh ra bị bệnh. Ước tính chi phí điều trị 1 ca bệnh Thalassemia từ lúc sinh ra tới 30 tuổi là khoảng 3 tỷ đồng. Vì vậy Thalassemia là 1 gánh nặng với gia đình và xã hội. Do vậy năm 2021 chúng tôi thực hiện nghiên cứu nhằm mục tiêu:

- Xác định một số loại đột biến gen gây bệnh Beta Thalassemia trên bệnh nhi tại Bệnh viện Sản Nhi Quảng Ninh năm 2021.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Các bệnh nhân được chẩn đoán beta Thalassemia đang điều trị tại khoa Nội nhi bệnh viện Sản Nhi Quảng Ninh.

2.2 Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang

Nội dung nghiên cứu:

- Tỷ lệ các đột biến gen gây bệnh β-Thal trên bệnh nhân.
- Phân loại các thể bệnh β-Thal dựa trên các kiểu đột biến.

Các bước nghiên cứu

Các bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh β-Thal đồng ý tham gia nghiên cứu được lấy 2ml máu chống đông EDTA.

- Tiến hành kỹ thuật xét nghiệm: theo Quy trình xét nghiệm phát hiện đột biến gen bằng kỹ thuật Multiplex PCR
- Phương tiện: máy Eppendorf: Mastercycler X50s đời 2017

Các bước thực hiện:

Bước 1: Tách DNA tổng số

Bước 2. Đo nồng độ DNA bằng phương pháp đo độ hấp thu quang phổ ởbước sóng A260nm (sử dụng máy Nanodrop)

Bước 3: Thực hiện phản ứng PCR

Bước 4: Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Bước 5: Phân tích kết quả

Bảng 1. *Hướng dẫn phân tích kết quả đột biến beta thalassemia*

BETA THALASSEMIA		
1. Multiplex control, cd95, cd41/42, IVSI -5, cd17		
Sản phẩm	Kích thước bp	Nhận xét
Control	861	Nội kiểm cho phản ứng PCR
CD95	600	
CD41/42	443	
IVS-I -5	285	
cd17	240	
2.Multiphlex Control, IVS2 -654, IVS1 -1, CD8/9		
Sản phẩm	Kích thước (bp)	Nhận xét
Control	656	Nội kiểm cho phản ứng PCR
IVS II -654	829	
IVSI -1	281	
CD8/9	214	
3. Đột biến Control, -28, CD26, CD71/72		
Sản phẩm	Kích thước (bp)	Nhận xét
Control	861	Nội kiểm cho phản ứng PCR
-28	649	
CD26	502	
CD71/72	238	

- Tổng kết xác định tỷ lệ các kiểu đột biến dựa trên các đột biến.

III. KẾT QUẢ

Trong thời gian từ 1/10/2020 đến 30/09/2021 có 39 bệnh nhân đủ điều kiện tham gia vào nghiên cứu bao gồm 10 bệnh nhân HbE/ β-Thal và 29 bệnh nhân β-Thal.

Bảng 2. Tỷ lệ các kiểu đột biến gen β-Thal trên bệnh nhân

STT	**Đột biến**	**Thể**	**n**	**Tỷ lệ (%)**
1	cd 95	β°	1	1,5
2	ivs1.1	β°	4	6 ,1
3	cd 41/42	β°	18	27,3
4	cd 26 (Hb E)	β+	10	15,2
5	cd 17	β°	22	33,3

6	cd 71/72	β°	7	10,6
7	ivs1.5	β⁺	0	0
8	-28	β⁺	3	4,5
9	cd8/9	β°	0	0
10	ivs2-654	β⁺	1	1,5
Tông			**66**	**100**

Nhận xét: Đột biến cd17 chiếm tỷ lệ cao nhất (33,3 %), tiếp theo là cd 41/42 (27,3%), và cd26 (15,2 %).

Bảng 3. Phân bố đột biến gen theo kiểu gen ở bệnh nhân β-Thalassemia

Kiểu gen	**Kiểu gen phối hợp đột biến**	**Sô bệnh nhân**	**Tỷ lệ %**
β° β°	***Kiểu đông hợp tử***	***10***	***25,65***
	cd41/42 – cd41/42	6	
	cd17 – cd17	4	
	Dị hợp tử kép 2 đột biến:	***15***	***38,5***
	cd41/42 – cd17	6	
	cd17 – cd71/72	3	
	cd41/42 – cd71/72	3	
	cd17 – ivs1.1	3	
β° β+	***Dị hợp tử kép 2 đột biến***	***2***	***5,1***
	28 – cd17	1	
	cd71/72 – ivs2-654	1	
β° βe	***Dị hợp tử phối hợp HbE***	***10***	***25,65***
	cd17 – cd26	5	
	cd41/42 – cd26	3	
	ivs1 – 1 – cd26	1	
	cd95 – cd26	1	
β+	***- 28***	***2***	***5,1***
Tông		**39**	**100**

Nhận xét: Kiểu gen β° β° chiếm tỷ lệ cao nhất 64,15 %.

Bảng 4. Đối chiếu các đột biến gen với thể lâm sàng β-Thal và β-Thal/HbE

Đột biến	**Sô lượng**	**β-thalassemia**	**β-thalassemia/HbE**
cd 95	1	0	1
ivs1.1	4	3	1
cd 41/42	18	15	3
cd 26 (Hb E)	10	0	10
cd 17	22	17	5
cd 71/72	7	7	0
-28	3	3	0
IV-654	1	1	0
Cộng	**66**	**46**	**20**

Nhận xét:

- Hầu hết các dạng đột biến gặp ở cả hai thể lâm sàng, trừ cd26 chỉ liên quan đến HbE.

- Các đột biến cd41/42, cd17 và cd71/72 gặp nhiều cho thể bệnh β – thalassemia không phối hợp với HbE

Bảng 5. Đối chiếu giữa đột biến gen với thể bệnh theo mức nặng về lâm sàng

Đột biến	**Số lượng**	**Thế nặng**	**Thế trung gian**	**Thế nhẹ**
cd 95	1	0	0	1

ivs1 -1	4	3	1	0
cd 41/42	18	15	3	0
cd 26 (Hb E)	10	8	1	1
cd 17	22	22	0	0
cd 71/72	7	7	0	0
-28	3	0	3	0
ivs2-654	1	0	1	0
Cộng	**66**	**55**	**9**	**2**

Nhận xét: Các đột biến cd41/42, cd17, cd71/72 liên quan nhiều với thể lâm sàng nặng. Các đột biến này chỉ có ở thể nặng và trung gian, không thấy ở thể nhẹ**..** Đột biến cd26 chủ yếu ở thể nặng.

IV. BÀN LUẬN

Như đã trình bày, β-Thalassemia là bệnh di truyền với đặc điểm giảm tổng hợp mạch β-globin của HbA, do các đột biến ở gen β- globin gây ra. Cho tới nay đã có trên 200 đột biến gen HBB được phát hiện, phần lớn là đột biến điểm. Kết quả trình bày ở bảng 2, chúng tôi đã phát hiện 66 alen đột biến ở 39 bệnh nhân β-Thalassemia vào khoa Nội nhi, với 8 dạng đột biến khác nhau. Tỷ lệ phát hiện đột biến 100% bệnh nhân nghiên cứu, hầu hết các bệnh nhân đều có 2 đột biến kết hợp.

Kết quả trình bày ở bảng 2 đã phát hiện được 8 dạng đột biến, có 4 đột biến phổ biến nhất, chiếm 86,4% các đột biến phát hiện là cd17 (AAG – TAG), cd41/42 (-TCTT), cd26 (GAG – AAG) và cd71/72 (+A), với tỷ lệ lần lượt là 33,3%, 27,3%, 15,2%, và 10,6%. Tiếp theo có 4 dạng đột biến ít phổ biến là ivs 1-1 (G-T), -28 (A – G), cd95 (TAC – TAA), ivs 2-654, với tỷ lệ lần lượt là 6,1%, 4.5%, 1,5 % và 1,5 %.

Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Hoàng Nam và cộng sự tiến hành nghiên cứu trên 42 bệnh nhân beta Thalassemia điều trị tại bệnh viện Nhi TW năm 2017 đã phát hiện 83 đột biến, với 9 loại đột biến khác nhau. Ba dạng đột biến phổ biến nhất là cd17, cd41/42 và cd 26. [7]. Phạm Thị Ngọc Nga và cộng sự tiến hành nghiên cứu trên 92 bệnh nhân mắc beta Thalassemia đang điều trị tại BV Nhi đồng 1 năm 2016 cho thấy có 10 kiểu đột biến được phát hiện. 99 % các đột biến được tìm thấy thuộc 8 loại đột biến phổ biến ở miền bắc Việt Nam. Trong đó, 3 kiểu đột biến cd26, cd41/42, cd17 chiếm tỷ lệ cao nhất. [4].Bạch Thị Như Quỳnh và cộng sự tiến hành nghiên cứu trên 107 bệnh nhân beta Thalassemia tại Hải Phòng cho thấy có 7 đột biến beta Thalassemia được phát hiện, trong đó cd26, cd17, cd41/42 chiếm tỷ lệ cao nhất [5]. Đỗ Thị Thu Giang và cộng sự tiến hành nghiên cứu trên 30 trẻ mắc Thalassemia tại khoa Nhi BVĐK tỉnh Tuyên Quang năm 2016 cho thấy có 7 kiểu đột biến beta Thalasssemia và 4 kiểu đột biến alpha Thalassemia được phát hiện. Trong đó đột biến gen beta Thalassemia có 3 kiểu cd41/42, cd17, cd26 (HbE) gặp nhiều nhất. [6].

Kết quả ở bảng 4, trong 66 đột biến phát hiện được ở 39 bệnh nhân nghiên cứu này, đã phát hiện 13 kiểu gen phối hợp đột biến. Có 4 kiểu gen phối hợp đột biến phổ biến nhất là cd41 – cd42, cd41/42 – cd17, cd17 – cd17, cd17- cd26 với tỷ lệ 20,2 %, 19,2%, 14,4%, 8,7%, 7,7% theo thứ tự, còn lại là các kiểu gen phối hợp đột biến ít phổ biến với tỷ lệ 2,9%,

1,9% và 0,96%. Phân loại kiểu gen phối hợp đột biến thành 4 kiểu gen lớn β0 β0, β+β+, β0β+, β0βE .

Kết quả phân loại đột biến gen HBB gây β-Thalassemia trong nghiên cứu này khá phù hợp với các nghiên cứu gần đây. Phạm Thị Ngọc Nga và cs (2018) nghiên cứu 92 bệnh nhi dưới 15 tuổi mắc bệnh β- Thalassemia ở 13 tỉnh thành Đồng bằng Sông Cửu Long, miền Nam đã phát hiện 184 đột biến gen HBB với 10 loại đột biến phân ra 32 kiểu gen phối hợp 2 đột biến, kiểu gen β0 βE phổ biến nhất, sau đó đến kiểu gen β0 β0 và β0 β+ [5]. Bạch Thị Như Quỳnh và cs (2018) nghiên cứu 181 bệnh phẩm bệnh nhân β-Thalassemia tuổi từ 2 tháng đến 71 tuổi, đã phát hiện thấy 141 đột biến gen HBBvới 9 dạng đột biến, phân ra 18 kiểu gen phối hợp đột biến, kiểu gen β0 βE phổ biến nhất, sau đó đến kiểu gen β0 β0 và β0 β+ [6]. Nguyễn Hoàng Nam và cộng sự (2017) nghiên cứu 42 bệnh nhân, trong đó 27 bệnh nhân beta- Thalassemia, 15 là beta-Thalassemia/ HbE, đã phát hiện 83 đột biến, với 9 kiểu đột biến khác nhau, kiểu gen β0 β0 chiếm tỷ lệ cao nhất, sau đó là β0 βE [7].

Đối tượng nghiên cứu trong nghiên cứu này là những bệnh nhân β- Thalassemia cần vào viện để điều trị, bao gồm 29 bệnh nhi β-Thalassemia và 10 bệnh nhi β – thalassemia /HbE. Kết quả nghiên cứu đã phát hiện 66 đột biến gen β – globin với 8 dạng đột biến như đã trình bày ở trên. Phân bố các dạng đột biến cho hai thể bệnh nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.16 cho thấy tất cả các dạng đột biến phân bố cho cả hai thể lâm sàng. Các đột biến cd41/42, cd17, cd71/72 phân bố cho thể β – Thalassemia không phối hợp với HbE nhiều hơn β – Thalassemia/HbE. Các đột biến cd41/42, cd71/72, cd17 là các đột biến ở vị trí exon, thuộc đột biến dịch mã RNA, không tổng hợp được mạch β – globin, tạo ra kiểu hình β0 – Thalassemia, thường thấy ở thể bệnh nặng nhiều hơn.

Kết quả trình bày ở bảng 5 trong phần kết quả nghiên cứu cho thấy các đột biến phân bố cho cả 3 thể lâm sàng: nặng, trung gian và nhẹ. Các đột biến cd41/42, cd 17, cd71/72 liên quan nhiều đến thể lâm sàng nặng. Các đột biến này chỉ thấy ở thể nặng và trung gian, không thấy ở thể nhẹ. Còn kiểu phối hợp một đột biến với đột biến cd26 có thể liên quan với thể bệnh nặng, trung gian hay nhẹ. Điều này có thể giải thích vì các đột biến này là các đột biến thuộc gen β0-globin, nghĩa là không tổng hợp được mạch β-globin, như vừa bàn luận ở trên. Trong nghiên cứu của chúng tôi, đột biến cd26 liên quan chủ yếu đến thể lâm sàng nặng, có thể do cd26 kết hợp với các đột biến thuộc gen β0-globin là cd17, cd 41/42. Các đột biến khác không nhiều, song thấy ở cả thể nặng và trung gian.

Kết quả của chúng tối cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Hoàng Nam và cộng sự khi nghiên cứu 104 bệnh nhân beta Thalassemia vào điều trị tại Bv Nhi TW: trong 208 alen đột biến phát hiện, phần lớn liên quan với thể lâm sàng nặng (68,8%), một phần liên quan với thể trung gian (28,4%), chỉ 2,8% liên quan với thể nhẹ. Các đột biến cd41/42, cd17, cd71/72 liên quan nhiều với thể lâm sàng nặng, lần lượt 81%; 77,4% và 90%. Các đột biến này chỉ có ở thể nặng và trung gian, không thấy ở thể nhẹ. Đột biến cd26 phân bố đều cho thể nặng, trung gian (51%, và 44,9%), chỉ 4,1% trong thể nhẹ [8].

KẾT LUẬN

- Số lượng đột biến phát hiện là 66.
- Có 4 đột biến phổ biến nhất, chiếm 86,4% các đột biến phát hiện là cd17 (AAG – TAG), cd41/42 (-TCTT), cd26 (GAG – AAG) và cd71/72 (+A)
- Có kiểu gen phối hợp đột biến phổ biến nhất là cd41 – cd42; cd41/42 – cd17; cd17 – cd17; cd17- cd26 .
- Phân loại kiểu gen phối hợp đột biến thành 4 kiểu gen lớn β0 β0, β+β+, β0β+, β0βE

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Công Khanh (2008). Thalassemia-Huyết học lâm sàng Nhi khoa. Xuất bản lần 2. Nhà xuất bản Y học: 132-146.
2. Phạm Quang Vinh và Nguyễn Hà Thanh (2018). Bệnh Hemoglobin di truyền. Bài giảng sau đại học Huyết học- Truyền máu, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 204-233.
3. Hongeng S, Pakakasama S, Chuansumrit A, et al (2016). Outcomes of Transplantation with Related- and Unrelated-Donor Stem Cells in Children with Severe Thalassemia. Biology of Blood and MarrowTransplantation 12 683- 687.
4. Phạm Thị Ngọc Nga, Nguyễn Minh Tuấn, Nguyễn Trung Kiên (2018).Các kiểu đột biến gen gây β-thalassemia trên bệnh nhân đang điều trị tại Bệnh viện Nhi Đồng 1 năm 2016. Tạp chí Y học Việt Nam, 467: 427 – 434.
5. Bạch Thị Như Quỳnh, Lê Hồng Minh Thu, Nguyễn Thị Hồng và cs (2018). Nghiên cứu đặc điểm gen đột biến trên bệnh nhân thalassemia tại Hải Phòng và báo cáo trường hợp bệnh nhân nghi ngờ mang đột biến hiếm. Tạp chí Y học Việt Nam, 467: 417 – 436.
6. ĐỗThị Thu Giang, Nguyễn Thành Trung, Dương Quốc Chính và cộng sự (2017). Nghiên cứu đặc điểm gene đột biến trong nhóm bệnh nhân mắc bệnh Thalassemia tại khoa Nhi, Bệnh viện đa khoa tỉnh Tuyên Quang. Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh, phụ bản tập 21, số 66, 2017: 408-413.
7. Nguyễn Hoàng Nam, Lý Thị Thanh Hà, Dương Bá Trực và cộng sự (2017). Đột biến gen ở bệnh nhân beta Thalassemia tại bệnh viện Nhi Trung Ương. Tạp chí Nhi Khoa, tập 10 số 5, tháng 10, 2017: 46-51.
8. Nguyễn Hoàng Nam, Bùi Văn Viên, Dương Bá Trực (2019) : "Nghiên cứu kiểu hình và kiểu gen ở bệnh nhi β-Thalassmia". Luận án tiến sỹ Y học. Đại học Y Hà Nội.