

Áp dụng phương pháp sinh học phân tử trong phát hiện sớm người mắc bệnh Wilson chưa có triệu chứng lâm sàng và mang gen bệnh

Nguyễn Thị Mai Hương^{1*}, Nguyễn Phạm Anh Hoa², Nguyễn Thị Phương Mai¹, Ngô Mạnh Tiến¹, Tạ Thành Văn³, Phan Văn Chi⁴, Trần Văn Khánh³, Ngô Diễm Ngọc¹

¹Khoa Di truyền và sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương (NCH)

²Khoa Gan - mật, NCH

³Trung tâm Nghiên cứu gen - protein, Trường Đại học Y Hà Nội

⁴Phòng Nghiên cứu hóa sinh - protein, Viện Công nghệ sinh học (IBT), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

Ngày nhận bài 18/5/2018; ngày chuyển phân biện 22/5/2018; ngày nhận phân biện 21/6/2018; ngày chấp nhận đăng 27/6/2018

Tóm tắt:

Bệnh Wilson (WD) là bệnh di truyền lặn, do đột biến gen *ATP7B* nằm trên nhiễm sắc thể làm rối loạn quá trình chuyển hóa đồng. Đặc điểm lâm sàng của bệnh rất đa dạng và phức tạp nhưng thường gặp nhất là các bệnh gan và tâm thần, thần kinh. Nếu không được phát hiện và điều trị, bệnh nhân (BN) có thể bị tử vong. Nghiên cứu nhằm khảo sát đặc điểm đột biến gen *ATP7B* trên BN mắc WD ở miền Bắc Việt Nam và áp dụng phương pháp phân tích ADN để chẩn đoán sớm cho các thành viên trong gia đình BN. Trong nghiên cứu này, nhóm BN gồm 43 người mắc WD được giải trình tự trực tiếp 21 exon và vùng intron bao quanh các exon của gen *ATP7B* để phát hiện đột biến, sau đó các đột biến này sẽ được sàng lọc cho toàn bộ 67 anh, chị, em ruột của BN. Kết quả phát hiện được 18 đột biến khác nhau trên gen *ATP7B*, tỷ lệ đột biến là 91,9%. Đột biến S105X có tỷ lệ phát hiện cao nhất (34,9%). Các exon thường xảy ra đột biến nhất là exon 2 (40,7%), exon 16 (11,6%), exon 8 (9,3%), intron 14 (7%), exon 18 (5,9%). Trên nhóm anh, chị, em ruột của BN, 4/11 (36,4%) trường hợp được xác định bị đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép là người mắc WD chưa có triệu chứng lâm sàng và đã được điều trị sớm ngay sau khi được chẩn đoán xác định; 3/11 (27,3%) BN đã tử vong; 4/11 (36,4%) BN vẫn đang được theo dõi và điều trị ngoại trú. Kết quả nghiên cứu cho thấy, xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất để chẩn đoán xác định BN mắc WD chưa có triệu chứng và người bị đột biến gen dị hợp tử.

Từ khóa: Bệnh Wilson, chẩn đoán sớm, đột biến gen *ATP7B*, người bệnh chưa có triệu chứng.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

WD là bệnh di truyền chuyển hóa với tỷ lệ mắc vào khoảng 1/30.000. Bệnh biểu hiện triệu chứng ở hệ thần kinh, tâm thần và bệnh lý của gan [1, 2], bao gồm: Viêm gan, xơ gan hoặc các biểu hiện liên quan đến thần kinh, tâm thần như rối loạn hệ vận động, co cứng, mệt mỏi, lơ mơ, thiếu tập trung... WD do đột biến gen *ATP7B*, mã hóa protein vận chuyển đồng theo cơ chế vận chuyển xuyên màng, nhóm P (P-type ATPase) [1, 3, 4]. Gen *ATP7B* có 21 exon, kích thước gen khoảng 100 kb. Khung đọc mở dài 4,3 kb mã hóa cho sản phẩm protein gồm 1.465 amino acid (aa). Đến nay, khoảng hơn 800 đột biến khác nhau đã được phát hiện trên gen *ATP7B* [5, 6]. Đột biến gen *ATP7B* rất đa dạng, trong đó có một số đột biến đặc trưng cho từng chủng tộc [7, 8]. Theo đó, đột biến có tần suất bắt gặp cao nhất hiện nay ở người châu Á là R778L (14-49%) và trên người châu Âu, Địa Trung Hải là H1069Q (30-40%) [9, 10]. Ngoài đột biến sai nghĩa là phổ biến, các đột biến khác (mất đoạn, lặp đoạn, đột biến vô nghĩa và splice site) cũng có thể xảy ra trên gen *ATP7B* [1, 10]. Vì đột biến có thể xảy ra trên toàn bộ gen *ATP7B*, nên kiểu gen của WD rất đa dạng và chủ yếu gặp ở dạng dị hợp tử kép (có hai đột biến dị hợp tử được di truyền từ bố và mẹ) [2, 11].

WD là một trong những bệnh di truyền gây ra nhiều biến chứng phức tạp liên quan đến các bệnh về gan, tâm thần, thần kinh và thậm chí có thể gây tử vong, nhưng cũng là bệnh được điều trị nội khoa rất hiệu quả [1, 11]. Bởi vậy, chẩn đoán xác định WD có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong điều trị và tiên lượng bệnh [5, 12]. Vì các xét nghiệm sinh hóa trong chẩn đoán WD theo thang điểm Leipzig [5] có thể cho kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả, do đó sẽ làm cho tình hình bệnh tật trở nên nghiêm trọng hơn hoặc cũng có thể bị bỏ sót dẫn đến BN không có cơ hội được điều trị bệnh. Đặc biệt, với những trường hợp biểu hiện bệnh không đặc trưng hoặc chưa có triệu chứng lâm sàng của bệnh, việc chẩn đoán bệnh sẽ vô cùng khó khăn [5]. Do đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm chẩn đoán sớm cho các trường hợp mắc WD chưa biểu hiện lâm sàng và người mang gen bệnh thông qua sàng lọc đột biến cho các thành viên trong gia đình để làm cơ sở cho tư vấn tiền hôn nhân và chẩn đoán trước sinh.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

43 BN nghi ngờ mắc WD, từ 3 đến 26 tuổi, bao gồm 20 nữ và 23 nam. BN Wilson được chẩn đoán và điều trị tại Khoa Gan - mật, Bệnh viện Nhi Trung ương.

*Tác giả liên hệ: Email: nmaihuong@gmail.com

Applying molecular technique in early detection of Wilson asymptomatic patients and carriers

Thi Mai Huong Nguyen^{1*}, Pham Anh Hoa Nguyen²,
Thi Phuong Mai Nguyen¹, Manh Tien Ngo¹, Thanh Van Ta³,
Van Chi Phan⁴, Van Khanh Tran³, Diem Ngoc Ngo¹

¹Human Genetics Department, Vietnam National Children's Hospital (NCH)

²Hepatology Department, NCH

³Ha Noi Medical University

⁴Institute of Biotechnology (IBT), VAST

Received 18 May 2018; accepted 27 June 2018

Abstract:

Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive disorder of the copper metabolism, which is caused by a mutation in the copper-transporting P-type ATPase (*ATP7B*). The mechanism of this disease is the failure of hepatic excretion of copper to bile, which leads to copper deposits in the liver and other organs. This study aimed to identify Wilson asymptomatic patients and carriers in their families. Forty-three WD patients and their 67 siblings were identified as having *ATP7B* gene mutations. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples; 21 exons and exon-intron boundaries of the *ATP7B* gene were analysed by direct sequencing. We recognised 18 different mutations, accounting for 91.9 %. Mutation S105X was determined to have the highest rate (34.9%) in this study. The hotspot regions of *ATP7B* were found at exons 2 (40.7%), exon 16 (11.6%), exon 8 (9.3%), intron 14 (7%), and exon 18 (5.9%). Among 11 homozygote/compound heterozygote siblings of the patients with WD, 4 (6%) individuals were determined as asymptomatic by screening mutations of the probands. In conclusion, 18 different mutations were detected. Of this number, mutation S105X is the most prevalent and has been considered as a biomarker that can be used in a rapid detection assay for diagnosis of WD. Exons 2, 8, 16, and 18, and intron 14 should be screened initially for WD patients in Vietnam. Four asymptomatic Wilson patients were identified by screening mutations of proband would be treated soon and so far are healthy. Based on risk profile for WD, genetic testing is also useful for asymptomatic diagnosis and treatment.

Keywords: Asymptomatic patients, *ATP7B* gene mutation, early diagnosis, Wilson disease.

Classification number: 3.2

67 anh, chị, em của BN Wilson được tiến hành phân tích gen *ATP7B* dựa trên đột biến đã xác định được (đột biến đích) trên BN Wilson đã biểu hiện bệnh và được xác định kiểu gen trong gia đình (ca chi điểm).

Phương pháp

Tách chiết ADN từ máu ngoại vi:

- Mẫu bệnh phẩm: 2 ml máu ngoại vi chống đông EDTA.

- Tách ADN tổng số: ADN tổng số của BN và các thành viên trong gia đình được tách bằng Kit tách ADN (QIAamp DNA Blood Mini preparation kits, Qiagen, Đức).

Phân tích gen *ATP7B*: BN sẽ được giải trình tự trực tiếp toàn bộ 21 exon của gen *ATP7B* sử dụng 25 cặp mồi đặc hiệu (5 cặp mồi cho exon 2, mỗi một cặp mồi cho các exon còn lại) để phát hiện đột biến. Dựa trên kết quả phân tích gen của BN, các thành viên trong gia đình của BN sẽ được khuếch đại và giải trình tự trực tiếp vùng gen để sàng lọc đột biến.

- Phản ứng PCR: Phản ứng có tổng thể tích 25 μ l bao gồm 10X PCR buffer (Invitrogen, Mỹ), 20mM magnesium chloride, 10 μ M dNTPs, 10 μ M mồi xuôi và mồi ngược, 5U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Mỹ) và 50 ng ADN tổng số. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy ABI GeneAmp PCR system 9700. Chu trình nhiệt phản ứng PCR: 95°C - 5 giây, [95°C - 20 giây, 55°C - 20 giây, 72°C - 30 giây] x 35 chu kỳ, 72°C - 7 phút. Sản phẩm PCR sẽ được điện di trên agarose (1%) và được tinh sạch bằng Kit tinh sạch DNA purification Kit (Qiagen, Đức).

- Giải trình tự gen *ATP7B*: Sản phẩm tinh sạch tiếp tục được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự gen. Sau đó, sản phẩm giải trình tự gen tiếp tục được kết tủa bằng Kit Bigdye X terminator purification (Applied Biosystems, Mỹ). Giải trình tự gen sử dụng Kit Bigdye terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems, Mỹ) và được thực hiện trên máy ABI PRISM - 3130 Genetic Analyzer machine (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự gen được xử lý bằng phần mềm Sequencing Analysis Software v5.3, được phân tích bằng phần mềm Chromas, Seqscape 2.5 và so sánh với trình tự chuẩn được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế NT_024524.

Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ đạo đức nghiên cứu trong y học. BN và người nhà hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tiếp tục tham gia. Các thông tin của BN được đảm bảo bí mật.

Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Di truyền và sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 1/2015-12/2017.

Kết quả

Kết quả phân tích đột biến trên BN Wilson

Qua phân tích kết quả đã phát hiện tổng số 18 loại đột biến khác nhau (đột biến thay thế, n = 14; đột biến dịch khung, n = 2; đột biến vô nghĩa, n = 1; đột biến splice site, n = 1). Tỷ lệ phát hiện đột biến trong nghiên cứu là 91,9% (bảng 1).

Trong số 43 BN tham gia nghiên cứu, có 38 BN (14 BN có đột biến đồng hợp tử, 24 BN có đột biến dị hợp tử kép) được xác định

đột biến trên cả hai alen, 3 BN có đột biến duy nhất, không phát hiện đột biến trên alen còn lại, 2 BN không phát hiện đột biến trên toàn bộ 21 exon của gen *ATP7B*.

Đột biến thường xảy ra trên exon 2 (40,7%), exon 16 (11,6%), exon 8 (9,3%), intron 14 (7%) và exon 18 (5,9%). Đột biến S105X là có tỷ lệ phát hiện cao nhất, chiếm 34,9% (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm đột biến gen *ATP7B* phát hiện trên BN mắc WD.

Dạng đột biến	Đột biến	Thay đổi nucleotide	Exon	Tần suất alen bị đột biến (n) (%)
Nonsense	S105X	c.314C>A	2	30 (34,9)
Frameshift	V176SfsX28	c.525dupA	2	5 (5,8)
	M769HfsX26	c.204dupC	8	2 (2,3)
Missense	R778L	c.2333G>T	8	4 (4,7)
	R765G	c.2294A>G	8	2 (2,3)
	T850I	c.2549C>T	10	4 (4,7)
	P992L	c.2975C>T	13	3 (3,5)
	K1010T	c.3029 A>C	13	1 (1,2)
	L902P	c.2705T>C	11	1 (1,2)
	P1052L	c.3155C>T	14	1 (1,2)
	D1027H	c.3081 G>C	14	1 (1,2)
	I1148T	c.3443T>C	16	7 (8,1)
	E1173K	c.3517G>A	16	3 (3,5)
	P1273G	c.3818 C>A	18	1 (1,2)
	G1281D	c.3842 G>A	18	1 (1,2)
	P1273Q	c.3818C>A	18	3 (3,5)
	L1371P	c.4112T>C	20	4 (4,7)
Splice site	IVS14-2A>G	c.3244-2A>G	Int14	6 (7)
Tổng				79 (91,9)

Kết quả phân tích đột biến trên anh, chị, em ruột của BN Wilson

Đột biến đã được phát hiện trên BN (đột biến đích) sẽ tiếp tục được sàng lọc trên 67 anh, chị, em của BN.

Bảng 2. Kết quả phân tích gen *ATP7B* cho anh, chị, em ruột của BN Wilson.

Anh, chị, em ruột của BN	Đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép (n) (%)	Dị hợp tử (n) (%)	Không phát hiện đột biến (n) (%)
Đã có biểu hiện của bệnh	7 (10,5)	-	-
Chưa có triệu chứng	4 (6)	-	-
Không bị bệnh		41 (61,2)	15 (22,4)
Tổng	11 (16,4)	41 (61,2)	15 (22,4)

Qua phân tích kết quả đã phát hiện 11 (16,4%) trường hợp anh, chị, em có đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép, bao gồm 7 (10,5%) BN đã có biểu hiện lâm sàng của WD, trong đó 3 BN đã tử vong và 4 (6%) trường hợp còn lại chưa có bất kỳ biểu hiện lâm sàng của WD; 41 trường hợp có một đột biến dị hợp tử; 15 (22,4%) trường hợp không có đột biến (bảng 2).

Bảng 3. Xét nghiệm cận lâm sàng của 4 trường hợp mắc WD chưa có triệu chứng.

BN mắc WD chưa có triệu chứng	Giới hạn bình thường	1	2	3	4
Tuổi/giới		3/nam	7/nam	1/nam	12/nam
Bilirubin - Direct (umol/l)	0,5-6,8	0,75	0,21	3,4	0,43
Bilirubin - Total (umol/l)	3,4-17	2,87	4,01	4	5,46
AST (u/l)	<40	37,19	43,29	37,80	33,01
ALT (u/l)	<40	32,46	60,01	25,70	54,44
GGT (u/l)	<40	20,46	40,44	15,10	87,16
PT%	>70%	121,00	94,50	90	87,00
Albumin (g/l)	35-50	29,00	38,94	45	43,39
Total protein (g/l)	60-80	57,80	65,42		71,39
Test Coombs	-	-	-	-	-
Vòng K-F	-	-	-	-	-
Cp (mg/dl)	≥20	0,05	0,01	0,028	0,04
u-Cu/day (mg/24h)	<0,1	<0,25	0,13	Không có	0,21
s-Cu (umol/l)	12-28	2,7	2,26	Thấp	2,57
Kiểu gen		S105X/S105X	S105X/I1148T	L902P/P1273Q	P992L/P992L

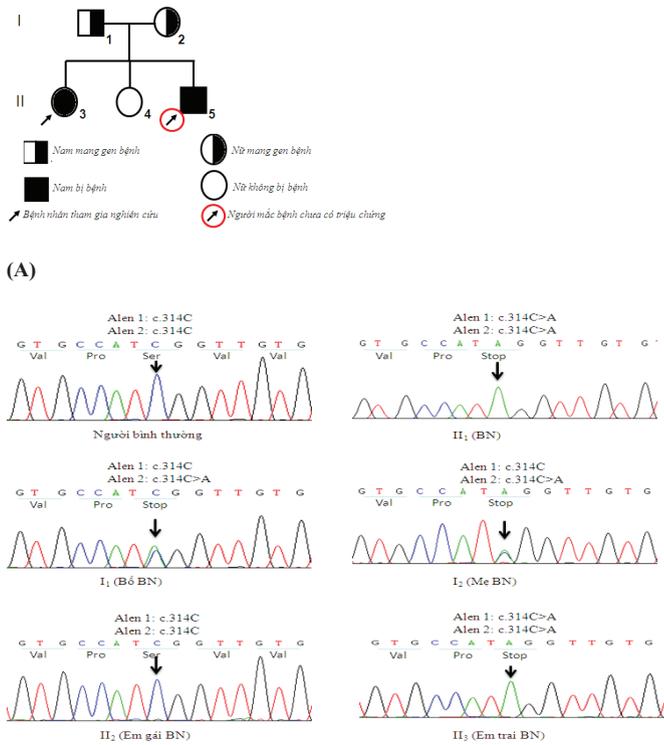
Ghi chú: AST (Aspartate Amino Transferase); ALT (Alanin Amino Transferase); GGT (Gamma Glutamyl Transferase); PT (Prothrombin); Cp (Ceruloplasmin); u-Cu (Urinary copper); s-Cu (Serum copper/day); KF (Kayser-Fleicher ring); (-): Âm tính.

Trong số 4 trường hợp được chẩn đoán sớm mắc WD nhưng chưa có biểu hiện lâm sàng đều có 2 đột biến dị hợp tử trên 2 alen của gen *ATP7B*. Kết quả xét nghiệm sinh hóa của cả 4 ca được phát hiện sớm cho thấy ceruloplasmin giảm mạnh, đồng niệu tăng cao và đồng máu có thay đổi nhẹ; 2 ca tăng men gan nhẹ (bảng 3).

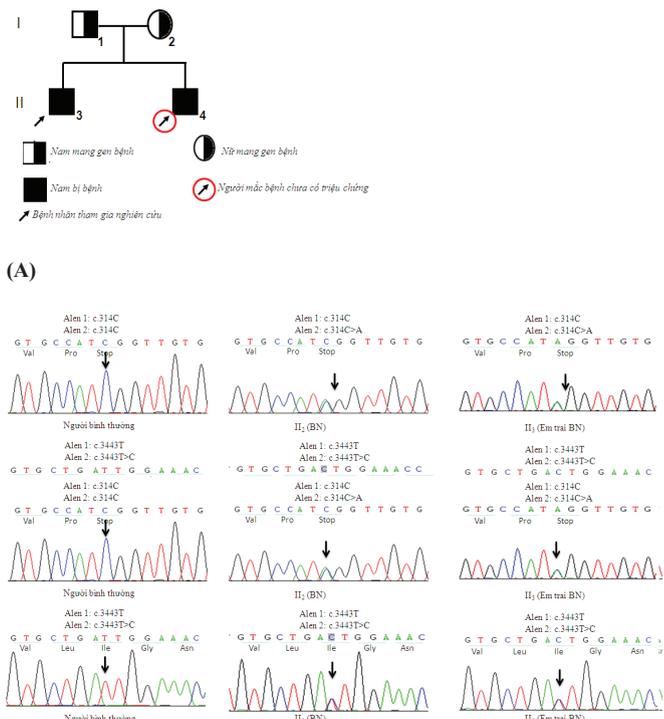
Gia đình BN thứ nhất: Gia đình BN có người con gái lớn (II₃) bị WD được phát hiện năm 9 tuổi. Người em trai của BN được phát hiện sớm mắc bệnh nhờ sàng lọc đột biến đích trên cả chi điểm, tại thời điểm đó người em trai của BN chưa có biểu hiện lâm sàng của WD.

BN (II₃) và em trai út (II₅) bị đột biến đồng hợp tử S105X. Kết quả phân tích gen *ATP7B* có thể thấy (hình 1), tại vị trí 314 xuất hiện duy nhất đỉnh A thay thế cho đỉnh C ở người bình thường. Em gái thứ 2 của BN (II₄) bị đột biến dị hợp tử. Trên hình ảnh phân tích trình tự gen của người em gái thứ 2 của BN nhận thấy trình tự gen tại vị trí 314 chỉ có 1 đỉnh C giống với trình tự gen chuẩn. Bố, mẹ BN (I_{1,2}) bị đột biến dị hợp tử. Theo đó, trên trình tự gen tại vị trí 314 sẽ có 2 tín hiệu của nucleotid C và A tại cùng một vị trí. Do đó, có thể khẳng định bố mẹ BN là người có gen bệnh.

Gia đình BN thứ hai: Gia đình BN có 2 anh em trai bị WD và có kiểu gen dị hợp tử kép S104X/I1148T. Tuy nhiên, người em (II₄) của BN (II₃) chưa có biểu hiện lâm sàng.



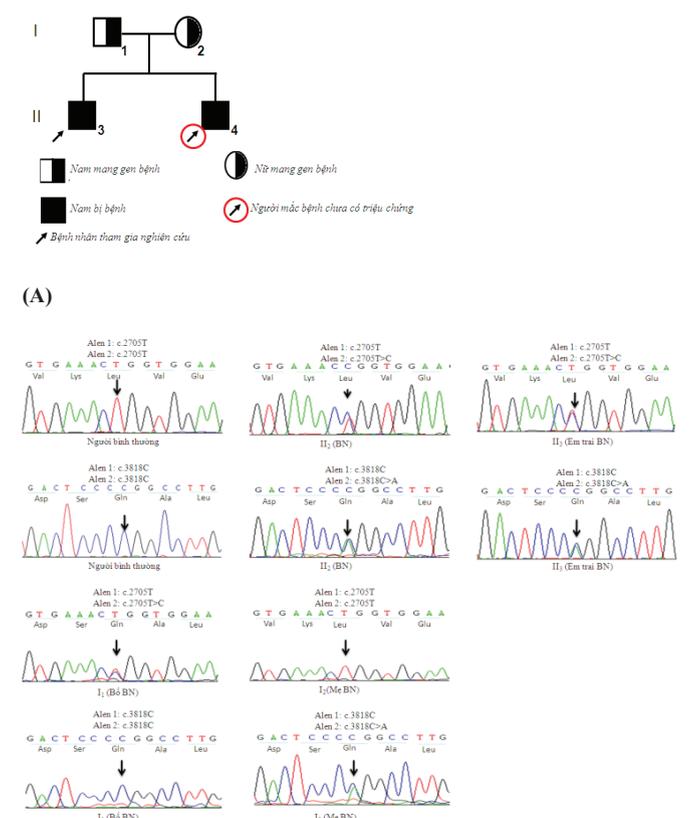
Hình 1. Sơ đồ phả hệ và một phần hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến S105X của gia đình BN số 1. (A) Phả hệ của gia đình; (B) Hình ảnh giải trình tự gen ATP7B.



Hình 2. Sơ đồ phả hệ và một phần hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến S105X và I148T của gia đình BN số 2. (A) Phả hệ của gia đình; (B) Hình ảnh giải trình tự gen ATP7B.

Kết quả phân tích trình tự gen của gia đình BN thứ hai (hình 2) cho thấy, tại vị trí 314 xuất hiện cả hai đỉnh A và C, trong khi ở người bình thường chỉ có một đỉnh C, ngoài ra tại vị trí 3443 có 2 đỉnh T và C, tại vị trí này ở người bình thường chỉ có một đỉnh T. Như vậy, BN có 2 đột biến dị hợp tử trên gen *ATP7B*, c.314C>A (S105X) và c.3443T>C (I1148T). Bố, mẹ BN (II_{1,2}) đều là người bình thường mang gen *ATP7B* bị đột biến dị hợp tử.

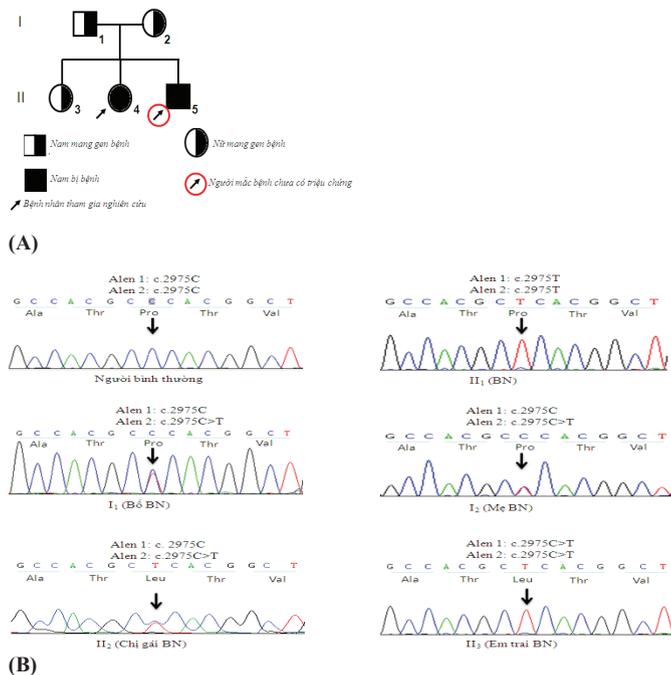
Gia đình BN thứ ba: Gia đình BN có người con trai lớn (III₃) được chẩn đoán mắc WD với biểu hiện lâm sàng là viêm gan mạn tính năm 4 tuổi. Em trai BN là người bệnh chưa có biểu hiện lâm sàng.



Hình 3. Sơ đồ phả hệ và một phần hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến L902P và P1273Q của gia đình BN số 3. (A) Phả hệ của gia đình; (B) Hình ảnh giải trình tự gen ATP7B.

Kết quả phân tích tự gen *ATP7B* (hình 3) cho thấy, tại vị trí 2705 xuất hiện cả 2 đỉnh T và C, trong khi ở người bình thường chỉ có duy nhất đỉnh T, ngoài ra tại vị trí 3818 cũng có 2 đỉnh C và A, trong khi ở người bình thường chỉ có một đỉnh C. Như vậy, cả 2 anh em BN đều bị 2 đột biến dị hợp tử trên gen *ATP7B*, c.2705T>C (L902P) và c.3818C>A (P1273Q). Em trai của BN là trường hợp nhỏ tuổi nhất (3 tháng) mắc WD. Bố, mẹ BN (III_{1,2}) đều là người bình thường mang gen *ATP7B* bị đột biến dị hợp tử.

Gia đình BN thứ tư: Gia đình BN có một người con gái thứ 2 (IV₄) bị WD và đã tử vong do suy gan cấp lúc 14 tuổi. Em trai BN là người bị bệnh chưa có triệu chứng lâm sàng.



Hình 4. Sơ đồ phả hệ và một phần hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến P992L của gia đình BN số 4. (A) Phả hệ của gia đình; (B) Hình ảnh giải trình tự gen *ATP7B*.

Phân tích trình tự gen mang đột biến đích được xác định trên BN đã phát hiện em trai BN có kiểu gen tương tự với BN. Kết quả phân tích trình tự gen *ATP7B* của BN (hình 4) đã chỉ rõ tại vị trí 2975 xuất hiện duy nhất đỉnh T thay thế cho đỉnh C ở người bình thường. Như vậy, BN bị đột biến đồng hợp tử (c.2975C>T, P992L). Chị gái của BN bị đột biến dị hợp tử. Kết quả giải trình tự gen *ATP7B* (hình 4) đã khẳng định BN (IV₅) bị đột biến đồng hợp tử P992L, chị gái BN (IV₄) có đột biến dị hợp tử, người em trai út của BN (IV₃) bị đột biến đồng hợp tử P992L. Bố, mẹ BN (IV_{1,2}) đều là người bình thường mang gen bệnh.

Bàn luận

Tỷ lệ phát hiện đột biến trong nghiên cứu là 91,9%, tương tự với tỷ lệ đột biến trong nghiên cứu của Trung Quốc (83,8-94,7%) và cao hơn so với tỷ lệ đột biến của Hàn Quốc (75%), Đài Loan (65,52%) [8, 13-15]. Trong số 43 BN mắc WD có 2 BN không phát hiện đột biến trên cả 2 alen của gen *ATP7B*. Hai trường hợp này có thể có đột biến ở vùng khác, nằm ngoài các exon và vùng tiếp nối giữa các exon và intron, chẳng hạn như vùng promoter hoặc các vùng intron nằm ở xa các exon của gen *ATP7B* [16]. Tuy nhiên, cỡ mẫu vẫn cần được thu thập nhiều hơn nữa để khái quát được đặc điểm đột biến, tỷ lệ đột biến chung của BN mắc WD ở Việt Nam.

Qua phân tích tỷ lệ 18 đột biến đã được phát hiện trong nghiên cứu, đột biến có tần suất cao nhất trong nghiên cứu là S105X, chiếm 34,9%. Đây không phải là một đột biến thường gặp ở châu Á. Theo đó, R778L là đột biến có tỷ lệ phát hiện cao nhất ở một số nước, vùng lãnh thổ trong khu vực châu Á như Trung Quốc (30-40%), Đài Loan (43,1%), Hàn Quốc (39,2%) [8, 17, 18]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu đột biến R778L có tỷ lệ phát hiện rất thấp,

chỉ chiếm 4,7%. Như vậy, đột biến gen *ATP7B* trên bệnh nhi mắc Wilson ở Việt Nam có thể có nhiều điểm khác biệt so với các y văn trên thế giới. Ngoài S105X, một số đột biến khác có tỷ lệ phát hiện cao bao gồm: I1148T (8,1%), IVS14-2A>G (7%), V176SfsX28 (5,8%), L1371P (4,7%) và R778L, T850I, P1273Q (3,5%),. Ngoài I1148T là một trong các đột biến có tỷ lệ phát hiện cao ở Trung Quốc [10, 16], các đột biến còn lại không phải là đột biến thường gặp ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Hồng Kông. Các đột biến thường gặp ở các quốc gia này là R778L (31,9-37,7%), P992L (11,2%), T935M (10%) (Trung Quốc) hoặc R778L (17,3%), P992L (13,4%), T1178A (8,7%) (Hồng Kông), R778L, A874V, L1083F, D1270S (tần suất của 4 loại đột biến là 55,4% (Hàn Quốc) [10, 14, 19] hay 2871delC (15,9%), c.1708-5T>G (11%), R778L (13,4%) (Nhật Bản) [20].

Vùng hot-spot (điểm nóng thường xảy ra đột biến) của gen *ATP7B* trong nghiên cứu cũng khác biệt so với các nước khác ở châu Á. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đột biến thường xảy ra trên exon 2 (40,7%), exon 16 (11,6%), exon 8 (9,3%), intron 14 (7%), exon 18 (5,9%). Trong khi đó ở Đài Loan, vùng hot-spot của gen *ATP7B* bao gồm các exon 8, 12, 13, 14, 16 và 18; ở Trung Quốc bao gồm các exon 8, 12, 13 và 16 [8, 13, 14]. Các exon trong vùng hot-spot nên được ưu tiên sàng lọc đột biến để chẩn đoán WD ở Việt Nam, giúp việc chẩn đoán WD được nhanh chóng, tiết kiệm hơn.

Tỷ lệ mắc WD được chẩn đoán sớm và chưa biểu hiện lâm sàng trong nghiên cứu là 6% (4/67). Các trường hợp này lần lượt có kiểu gen là S105X/S105X, S105X/I1148T, L902P/P1273Q, P992L/P992L. Kết quả xét nghiệm sinh hóa cho thấy, 4 trường hợp trên đều có ceruloplasmin giảm, đồng niệu/24 giờ tăng cao. Trong đó, 2 trường hợp tăng men gan nhưng vẫn chưa đủ tiêu chuẩn để chẩn đoán WD theo bảng điểm của Leipzig. Phân tích kết quả giải trình tự gen đã phát hiện đột biến trên cả 2 alen của gen *ATP7B*. Với mỗi đột biến, BN sẽ được 2 điểm và khi có 2 đột biến BN sẽ được 4 điểm theo bảng điểm Leipzig và hoàn toàn đủ tiêu chuẩn chẩn đoán xác định WD [5]. Wilson là bệnh có mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình [14], vì vậy xác định kiểu gen cho các trường hợp mắc bệnh chưa có biểu hiện lâm sàng có ý nghĩa quan trọng trong thực hành lâm sàng. Dựa trên những triệu chứng và biểu hiện trên các ca chỉ điểm giúp bác sỹ tiên lượng bệnh cho các ca sàng lọc. Trường hợp thứ nhất có kiểu gen S105X/S105X, thuộc nhóm SMs/SMs (BN có hai đột biến nghiêm trọng). S105X là đột biến vô nghĩa ảnh hưởng nghiêm trọng đến quá trình tổng hợp protein dẫn tới có thể không có sản phẩm dịch mã. Do đó, BN Wilson bị đột biến S105X thường có kiểu hình nặng và phát bệnh sớm. Trong nghiên cứu, kiểu gen S105X/S105X được phát hiện trên BN Wilson có biểu hiện tổn thương gan trên lâm sàng, hoặc có thể gặp ở một số trường hợp bệnh cảnh kết hợp giữa bệnh gan và thần kinh. Chị gái của trường hợp thứ nhất được phát hiện sớm mắc Wilson (kiểu gen S105X/S105X) có biểu hiện lâm sàng nặng, bao gồm cơ cứng cơ, vận động tứ chi khó khăn và cuối cùng bị liệt toàn thân, do vậy nếu không được phát hiện sớm, trường hợp này có thể sẽ có biểu hiện lâm sàng nặng nề giống chị gái ruột. Anh, chị của BN số 2, 3 (kiểu gen S105X/I1148T, L902P/P1273Q) bị viêm gan mạn tính, xơ gan và hiện vẫn tiếp tục được điều trị. Mặc dù P992L là đột biến sai nghĩa, ít nghiêm trọng hơn các đột biến

vô nghĩa và đột biến dịch khung, nhưng với BN số 4 được phát hiện sớm WD trong nghiên cứu (kiểu gen P992L/P992L) có một chỉ giá mắc WD và đã từ vong vì suy gan cấp (kiểu gen P992L/P992L) [14, 21]. Nếu không được phát hiện sớm bằng xét nghiệm di truyền, các trường hợp bị Wilson chưa có biểu hiện lâm sàng có thể gặp các biến chứng nghiêm trọng tương tự như anh, chị của mình. Do đó, việc phát hiện sớm người bị Wilson chưa biểu hiện triệu chứng có ý nghĩa vô cùng to lớn trong điều trị dự phòng sớm nhằm ngăn chặn các biểu hiện và các biến chứng nghiêm trọng có thể xảy ra của bệnh [2, 19].

Rõ ràng, xét nghiệm di truyền là phương pháp đơn lẻ duy nhất có thể chẩn đoán xác định WD nếu phát hiện 2 đột biến trên 2 alen của gen *ATP7B*. Xét nghiệm sinh hóa đặc trưng cho WD bao gồm xét nghiệm ceruloplasmin và đồng niệu/24 giờ không phải là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán bệnh bởi ceruloplasmin có thể giảm trong một số trường hợp như mất protein ở thận hoặc ruột (marked renal or enteric protein loss). Hội chứng giảm hấp thu hoặc bệnh gan giai đoạn cuối hay bị đột biến gen nằm trên nhiễm sắc thể số 3 nhưng trong trường hợp này, BN không bị tích tụ đồng. Đặc biệt, các xét nghiệm sinh hóa không thể phát hiện được người mắc bệnh chưa có triệu chứng lâm sàng cũng như người mang gen bệnh.

Trong tổng số ca bị Wilson ở trẻ em, trường hợp có ceruloplasmin bình thường chiếm 15-36%. Ngoài ra, người mang gen bị đột biến dị hợp tử cũng có ceruloplasmin giảm và số này chiếm đến 20% [5, 11]. Ceruloplasmin không phải là một tiêu chuẩn đặc hiệu trong chẩn đoán người bệnh và người mang gen. Nó có thể được áp dụng kết hợp với nhiều xét nghiệm sinh hóa và đánh giá biểu hiện lâm sàng, tuy nhiên lúc này BN đã có triệu chứng của bệnh [8, 12, 22, 23]. Do đó, xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất để chẩn đoán sớm, chẩn đoán xác định và phân biệt bệnh với nhiều bệnh lý khác liên quan đến gan và thần kinh. Phát hiện người mang gen bệnh chính là cơ sở của tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh, giúp hạn chế tỷ lệ sinh con mắc WD, qua đó nâng cao chất lượng sống cho BN và xã hội.

Nguy cơ mắc bệnh của anh, chị, em ruột của BN là 25%, nguy cơ đối với anh, em họ hàng là 12,5%, vì vậy sàng lọc cho các thành viên trong gia đình có tiền sử mắc WD là phương pháp chẩn đoán bệnh hiệu quả nhất, giúp cho các bác sỹ có thể tiên lượng và đưa ra phác đồ điều trị sớm, nhờ đó ngăn chặn các biến chứng nghiêm trọng có thể xảy ra, đồng thời tiết kiệm chi phí điều trị cho gia đình người bệnh [7, 23, 24]. Bởi trên thực tế ở Việt Nam hầu hết các BN Wilson đều đến viện khi đã có biểu hiện lâm sàng của bệnh, hoặc BN được phát hiện muộn do lâm sàng của bệnh rất phong phú, dễ gây nhầm lẫn hoặc bỏ sót trong chẩn đoán bệnh nếu không được khám đúng chuyên khoa [2]. Một số BN có biến chứng nặng như suy gan cấp và suy gan tối cấp. BN cần ghép gan cấp cứu để đảm bảo tính mạng [5, 6] nhưng quá trình ghép gan cần tìm người hiến tạng không bị bệnh hoặc không mang gen bệnh. Do đó, xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất được thực hiện nhằm xác định người cho gan phù hợp nhất [24].

Kết luận

Tỷ lệ đột biến trên 43 BN Wilson là 91,9% (79/86 alen bị đột biến). Đột biến S105X là đột biến thường gặp nhất trong nghiên cứu (34,9%), tiếp đến là các đột biến I1148T (8,1%), IVS14-2A>G

(7%), V176SfsX28 (5,8%) và R778L, T850I, P1273Q (4,7%). Vùng hot-spot trên gen *ATP7B* trong nghiên cứu bao gồm exon 2 (40,7%), exon 16 (11,6%), exon 8 (9,3%), intron 14 (7%), exon 18 (5,9%).

Nghiên cứu đã phát hiện 4 trường hợp bị WD nhưng chưa có biểu hiện lâm sàng. Các trường hợp này đã được điều trị sớm, tránh các biểu hiện lâm sàng và các biến chứng nguy hiểm có thể xảy ra của bệnh. Xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất trong chẩn đoán xác định WD, chẩn đoán sớm cho người mắc bệnh WD chưa có triệu chứng và người bị đột biến gen dị hợp tử.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Ala, et al. (2007), "Wilson's disease", *The Lancet*, **369(9559)**, pp.397-408.
- [2] D. Huster, et al. (2012), "Diverse functional properties of Wilson disease *ATP7B* variants", *Gastroenterology*, **142(4)**, pp.947-956.
- [3] E.A. Roberts, M.L. Schilsky (2003), "A practice guideline on Wilson disease", *Hepatology*, **37(6)**, pp.1475-1492.
- [4] S. Vrabelova, et al. (2005), "Mutation analysis of the *ATP7B* gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease", *Mol. Genet. Metab.*, **86(1-2)**, pp.277-285.
- [5] European Association for the Study of the Liver (2012), "EASL Clinical practice guidelines: Wilson's disease", *J. Hepatology*, **56(3)**, pp.671-685.
- [6] M. Patil, et al. (2013), "A Review and Current Perspective on Wilson Disease", *J. Clin. Exp. Hepatol.*, **3(4)**, pp.321-336.
- [7] J.K. Seo (2016), "Wilson disease: An update" (Article in Korean), *Korean J. Hepatol.*, **12(3)**, pp.333-363.
- [8] L. Wan, et al. (2006), "Mutation analysis of Taiwanese Wilson disease patients", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345(2)**, pp.734-738.
- [9] P. Ferenci (2006), "Regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing", *J. Hum. Genet.*, **120(2)**, pp.151-159.
- [10] Y. Zhang, et al. (2011), "Wilson's disease in Asia", *Neurology Asia*, **1(2)**, pp.103-109.
- [11] R.F. Pfeiffer (2007), "Wilson's disease", *Semin. in Neuro.*, **27(2)**, pp.123-132.
- [12] M.L. Schilsky (2009), "Wilson disease: Current status and the future", *Biochimie*, **91(10)**, pp.1278-1281.
- [13] Y.H. Gu, et al. (2003), "Mutation spectrum and polymorphisms in *ATP7B* identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease", *Clin. Genet.*, **64(6)**, pp.479-4684.
- [14] X.H. Li, et al. (2011), "Clinical and molecular characterization of Wilson's disease in China: identification 14 novel mutations", *BMC Med. Genet.*, **12(6)**, doi: 10.1186/1471-2350-12-6.
- [15] D. Kupkala, et al. (2009), "Wilson disease mutation in the American population: Identification of five novel mutations in *ATP7B*", *The open Hepatology Journal*, **1**, pp.1-4.
- [16] L.H. Wang, et al. (2011), "Mutation analysis of 73 southern Chinese Wilson's disease patients: identification of 10 novel mutations and its clinical correlation", *J. Hum. Genet.*, **59(9)**, pp.660-665.
- [17] S. Park, et al. (2007), "Identification of novel *ATP7B* gene mutation and their functional roles in Korean patients with Wilson disease", *Hum. Mutat.*, **28(11)**, pp.1108-1113.
- [18] Y. Fan, et al. (2000), "Identification of a mutation hotspot in exon 8 Wilson disease gene by cycle sequencing", *Chin. Med. J. (Engl.)*, **113(2)**, pp.172-174.
- [19] Y. Kusuda, et al. (2000), "Novel mutations of the *ATP7B* gene in Japanese patients with Wilson disease", *J. Hum. Genet.*, **45(2)**, pp.86-91.
- [20] T. Okada, et al. (2000), "Mutational analysis of *ATP7B* and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson disease", *Hum. Mutat.*, **15(5)**, pp.454-462.
- [21] L. Leggio, et al. (2007), "Analysis of the T1288R Mutation of the Wilson Disease *ATP7B* Gene in Four Generations of a Family: Possible Genotype-Phenotype Correlation with Hepatic Onset", *Dig. Dis. Sci.*, **52(10)**, pp.2570-2575.
- [22] I. Maleki, et al. (2013), "Novel mutation of *ATP7B* gene in Iranian patients with Wilson's disease", *Res. Mol. Med.*, **1(1)**, pp.44-47, 2013.
- [23] J. Manoochchri, et al. (2014), "Family screening for a novel *ATP7B* gene mutation, c.2335T>G, in the South of Iran", *Iran J. Ped. Hematol. Oncol.*, **4(1)**, pp.26-31.