

Research Paper

Application of Biotechnology in Detection *ATP7B* Gene Mutation in Vietnamese Children with Wilson Disease and Screening Target Mutation for Their Family Members

Nguyen Thi Mai Huong^{*}, Nguyen Pham Anh Hoa, Ngo Diem Ngoc

Vietnam National Children's Hospital, 18/879 La Thanh, Dong Da, Hanoi, Vietnam

Received 12 August 2020

Revised 22 August 2020; Accepted 28 August 2020

Abstract

Background/Purpose: 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, and leads to copper deposits in the liver and other organs. The ATP7B gene is located on the long arm of chromosome 13 (13q14.3). This study aimed to investigate the gene mutation in the Vietnamese patients with WD, and make a asymptomatic diagnosis for their familial members.

Methods: 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 analyzed by direct sequencing.

Results: A total of 27 different mutations were detected in this study, which accounted for 96.8%. Of which, S105* was the most prevalent mutation, accounting for 37.1%. Following was the five other mutations, including I1148T (7.3%), IVS14-2A>G (6.6%), L1371P (6.0%), T850I and V176SfsX28 (5.3%). Among 47 genotypes, ratio of compound heterozygote was 62.8%. Most of the mutations in the study occurred in exon 2 (43.0%), exon 16 (9.9%), exon 8 (8.6%), exon 14 and intron 14 (6.6%). A total of 13 affected siblings were identified by target mutation on ATP7B gene which was identified in the proband. Among them, 5 cases were asymptomatic that would be treated soon to prevent clinical feature. This study also discovered 65 carriers in their family members.

Conclusion: The findings' highest diagnostic importance for patients and their family members is in prognosis and the prevention of morbidity and mortality.

Keywords: ATP7B gene mutation, Genetic testings, Asymptomatic patients, Wilson disease.

^{*} Corresponding author.

E-mail address: nmaihuong@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/jprp.v4i5.227>

Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán bệnh Wilson và sàng lọc người mang gen bệnh

Nguyễn Thị Mai Hương*, Nguyễn Phạm Anh Hoa, Ngô Diễm Ngọc

Bệnh viện Nhi Trung ương, 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 12 tháng 8 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 8 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 8 năm 2020

Tóm tắt

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: Bệnh Wilson (WD) là bệnh di truyền lặn trên NST thường do đột biến gen ATP7B. Sự lắng đọng đồng trong gan, não và một số cơ quan khác của cơ thể do rối loạn cơ chế vận chuyển và bài tiết đồng do đột biến gen ATP7B là nguyên nhân của của nhiều bệnh lý phức tạp liên quan đến gan và não. Chẩn đoán xác định bệnh WD sẽ giúp trẻ được điều trị hiệu quả. Áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán xác định cho trẻ bị WD và sàng lọc người mang gen bệnh cho các thành viên trong gia đình BN.

Phương pháp: 78 bệnh nhân mắc WD sẽ 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 205 thành viên trong gia đình 78 bệnh nhân.

Kết quả: Trên nhóm bệnh nhân, tỷ lệ đột biến gen là 96,8%. Nghiên cứu đã phát hiện 27 đột biến khác nhau, trong đó S105* có tần số cao nhất, chiếm 37,1%. Tiếp đến là năm đột biến: I1148T (7.3%), IVS14-2A>G (6.6%), L1371P (6.0%), T850I và V176Sfs*28 (5.3%). Nghiên cứu đã xác định được 47 kiểu gen, kiểu gen dị hợp tử kép chiếm 62,8%. Vùng gen ATP7B thường xảy ra đột biến bao gồm: exon 2 (43.0%), exon 16 (9.9%), exon 8 (8.6%), exon 14 và intron 14 (6.6%). Trong nhóm các thành viên trong gia đình bệnh nhân, nghiên cứu đã phát hiện thêm 13 trường hợp bị bệnh Wilson, trong đó có 5 trường hợp chưa có biểu hiện lâm sàng và đã điều trị sớm. Nghiên cứu đã chẩn đoán xác định được 65 người mang gen bệnh cho các thành viên trong gia đình bệnh nhân Wilson.

Kết luận: Xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất để chẩn đoán xác định bệnh nhân mắc WD chưa có triệu chứng và người mang gen bệnh.

Từ khóa: Đột biến gen ATP7B, Chẩn đoán xác định, Xét nghiệm di truyền, Bệnh Wilson, Người mang gen bệnh.

1. Đặt vấn đề

Wilson là bệnh di truyền chuyển hóa do đột biến gen ATP7B, mã hóa protein vận chuyển đồng theo cơ chế vận chuyển xuyên màng, nhóm P (P-type ATPase). Rối loạn

quá trình vận chuyển đồng xuyên màng dẫn đến đồng tích lũy trong gan một lượng lớn, và có thể tích tụ ở não [1,5,9] Bệnh có tỷ lệ mắc vào khoảng 1/30000 trường hợp và thường biểu hiện triệu chứng ở hệ thần kinh, tâm thần và bệnh lý của gan [1,3]. Gen ATP7B gồm 21 exon, kích thước khoảng 100kb. Khung đọc mở dài 4,3 kb mã hóa cho sản phẩm protein gồm 1465 amino acid (aa) [4]. Đến nay, khoảng hơn

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: nmai.huong@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/jprp.v4i5.227>

800 đột biến khác nhau đã được phát hiện trên gen *ATP7B* [8,25]. Đột biến gen *ATP7B* rất đa dạng trong đó có một số đột biến đặc trưng cho từng chủng tộc [6,17]. Đột biến có tần suất 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%) [10, 24]. Vì đột biến có thể xảy ra trên toàn bộ gen *ATP7B*, do vậy 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) [2,3].

WD là một trong những bệnh di truyền gây ra nhiều biến chứng phức tạp, bao gồm các bệnh về gan, tâm thần, thần kinh và thậm chí có thể gây vong, nhưng cũng là bệnh được điều trị nội khoa rất hiệu quả [1,2]. Chẩn đoán xác định bệnh có ý nghĩa vô cùng quan trọng, giúp bệnh nhân được điều trị hiệu quả nhất và hạn chế những biến chứng nguy hiểm của bệnh [8,11]. Trong khi đó, người mang gen bệnh là những người chỉ mang một đột biến dị hợp tử và không thể phát hiện được bằng các xét nghiệm sinh hóa thông thường nên chẩn đoán bệnh Wilson và xác định người mang gen bệnh Wilson bằng kỹ thuật sinh học phân tử có vai trò quan trọng trong tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh bệnh Wilson.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- 78 bệnh nhân nghi ngờ mắc WD được, từ 3-26 tuổi.

- 208 thành viên thuộc 55 phả hệ của bệnh nhân bị đột biến trên 2 bản sao của gen *ATP7B* bao gồm: 49 người bố, 53 người mẹ, 83 anh chị em ruột và 23 thành viên khác trong họ (7 trường hợp là cô/dì/chú/cậu và 14 trường hợp là anh chị em họ, 2 trường hợp là con của bệnh nhân).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết DNA từ máu ngoại vi

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

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

2.2.2. Phân tích gen *ATP7B*: được tiến hành tại khoa Di truyền và Sinh học phân tử - Bệnh viện Nhi Trung ương.

- Bệnh nhân được chẩn đoán WD 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 bệnh nhân, các thành viên trong gia đình của bệnh nhân sẽ được khuếch đại và giải trình tự trực tiếp vùng gen để sàng lọc đột biến. Giải trình tự gen sử dụng kit BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (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 NG-008806.1.

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ chặt chẽ đạo đức nghiên cứu trong Y học, bệnh nhân 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 vào nghiên cứu. Các thông tin của họ sẽ được đảm bảo bí mật.

3. Kết quả

3.1. Kết quả phân tích đột biến trên bệnh nhân mắc WD

Qua phân tích kết quả phát hiện đột biến trên 21 exon trên gen *ATP7B* của 78 bệnh nhân Wilson, nghiên cứu đã phát hiện 26 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử, 49 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử kép, 1 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử và 2 bệnh nhân không có đột biến gen (Bảng 1).

3.2. Kết quả phân tích đột biến trên anh, chị, em ruột của bệnh nhân Wilson

Trong số 78 bệnh nhân, nghiên cứu đã phát hiện đột biến đích cho 208 thành viên trong 55 phả hệ của 58 bệnh nhân Wilson (Bảng 2). Trong đó, 49 người bố và 53 người mẹ và họ đều là người mang gen bệnh.

Bảng 1. Kiểu gen của 78 bệnh nhân Wilson

Kiểu gen (alen/alen)	Exon/Intron	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%) (n=78)
Đồng hợp tử		26	33,3
S105*/S105*	2/2	16	20,5
D765/D765	8/8	1	1,3
R778L/R778L	8/8	1	1,3
P992L/P992L	13/13	1	1,3
I1148T/I1148T	16/16	1	1,3
E1173K/E1173K	16/16	1	1,3
L1371P/L1371P	20/20	2	2,6
IVS14-2A>G/IVS14-2A>G	Intron14/Intron 14	3	3,8
Dị hợp tử kép		49	62,8
S105*/V176Sfs*28	2/2	2	2,6
S105*/H251Afs*19	2/2	1	1,3
S105*/P868Pfs*5	2/8	1	1,3
S105*/(R723S;H724Tfs*34)	2/8	1	1,3
S105*/R778L	2/8	1	1,3
S105*/T850I	2/10	3	3,8
S105*/L902P	2/11	1	1,3
S105*/P1052L	2/14	1	1,3
S105*/I1148T	1/16	6	7,7
S105*/E1173K	2/16	2	2,6

Kiểu gen (alen/alen)	Exon/Intron	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%) (n=78)
S105*/N1270S	2/18	1	1,3
S105*/P1245S	2/18	1	1,3
S105*/G1281D	2/18	1	1,3
S105*/IVS14-2A>G	2/Intron 14	1	1,3
S105*/IVS20+4A>G	2/Intron 20	1	1,3
V176Sfs*28/M769Hfs*26	2/8	1	1,3
V176Sfs*28/R778L	2/8	1	1,3
V176Sfs*28/P1052L	2/14	1	1,3
V176Sfs*28/I1148T	2/16	1	1,3
V176Sfs*28/P1273Q	2/18	1	1,3
V176Sfs*28/IVS6+3A>G	2/Intron 6	1	1,3
R778L/D1027H	8/14	1	1,3
R778L/L1371P	8/20	1	1,3
T850I/ M769Hfs*26	10/8	1	1,3
T850I/D1027H	10/14	2	2,6
T850I/L1371P	10/20	1	1,3
T850I/IVS14-2A>G	10/Intron 14	1	1,3
L902P/P1273Q	11/18	1	1,3
P992L/D1027H	13/14	1	1,3
P992L/L1371P	13/20	1	1,3
D1027H/IVS14-2A>G	14/Intron 14	1	1,3
K1010T/L1371P	13/20	1	1,3
F1026Y/IVS12-2A>G	14/Intron 12	1	1,3
V1042Cfs*79/IVS14-2A>G	14/Intron 14	1	1,3
P1052L/P1273Q	2/18	1	1,3
I1148T/P1245S	16/18	1	1,3
I1148T/P1273Q	16/18	1	1,3
P1273Q/L1371P	18/20	1	1,3
IVS6+3A>G/M769Hfs*26	Intron 6/8	1	1,3
Dị hợp tử		1	1,3
K1010T/-	13/-	1	1,3
Không có đột biến		2	2,6

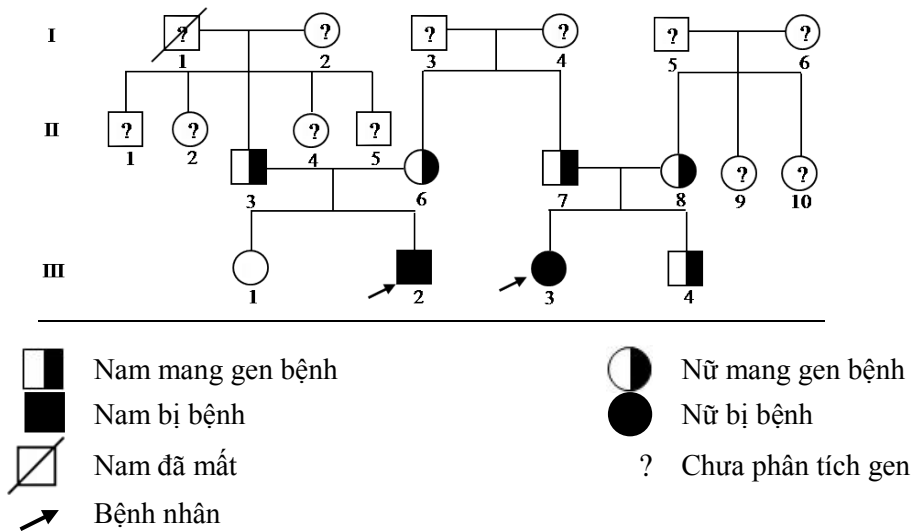
Chú thích: (-): Không có đột biến; * mã kết thúc

Bảng 2. Kết quả sàng lọc đột biến gen *ATP7B* cho các thành viên của 55 phả hệ

Kiểu gen	Bố bệnh nhân	Mẹ bệnh nhân	Anh/chị/em ruột	Các thành viên khác
Đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép	0	0	13	0
Đột biến dị hợp tử	49	53	53	12
Không bị đột biến	0	0	17	11
Tổng	49	53	83	23

Kết quả sàng lọc đột biến đích cho các thành viên đã phát hiện 13 trường hợp bị WD nhưng chưa được chẩn đoán bệnh, họ cũng bị đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép (Bảng 2) và 53 trường hợp là người

mang gen bệnh, 17 trường hợp không mang gen bệnh (không có đột biến gen *ATP7B*). Trong số các thành viên là họ hàng, nghiên cứu đã phát hiện 12 người mang gen bệnh và 11 người không có đột biến gen.



Hình 1. Phả hệ của gia đình bệnh nhân WBW160101 và WBW160602.

Bố của bệnh nhân mã số WBW160101 (III.3) và mẹ của bệnh nhân mã số WBW160602 (III.2) là chị em ruột. Phả hệ trên có 2 anh em họ (III.2, III.3) cùng bị bệnh Wilson, mã số bệnh nhân lần lượt là WBW160101 và WBW160602. Người em trai của bệnh nhân mã số WBW160101 mang gen bệnh và người chị gái của bệnh nhân mã số WBW160602 không có đột biến. Bố, mẹ của cả 2 bệnh nhân đều là

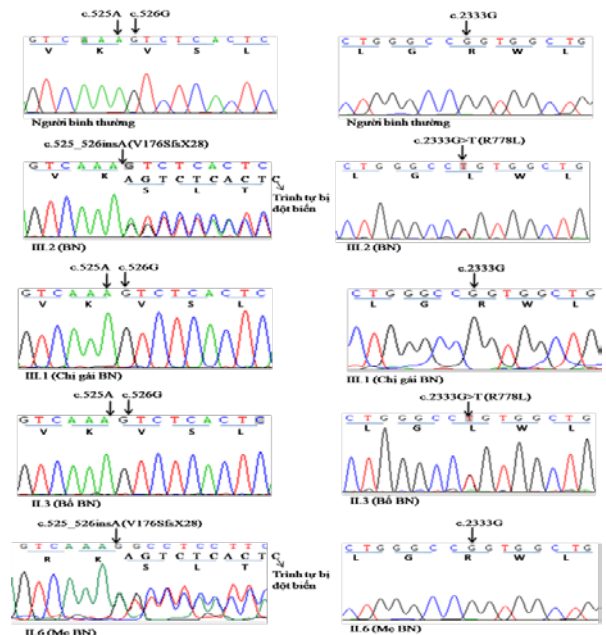
người mang gen bệnh (Hình 2). Bệnh nhân mã số WBW160101 có 2 đột biến dị hợp tử: (1) nucleotide A tại vị trí 1946+3 bị thay thế bằng nucleotide G (IVS6+3A>G); (2) thêm 1 nucleotide A vào giữa 2 nucleotide ở vị trí 525 và 526 trên cDNA của gen *ATP7B* làm cho bộ ba GTC mã hóa mã hóa Valin (V) thứ 176 chuyển thành bộ ba AGT mã hóa Serin (S), đồng thời tạo ra bộ ba kết thúc sớm (*) cách vị trí bị đột biến 28 amino

acid (V176Sfs*28); bố của bệnh nhân (II.7) bị đột biến dị hợp tử V176Sfs*28; mẹ (II.8) và em trai bệnh nhân (III.4) bị đột biến dị hợp tử IVS6+3A>G.

Bố, mẹ bệnh nhân mã số WBW160101 bị đột biến dị hợp tử V176Sfs*28 và IVS6+3A>G. Em trai bệnh nhân bị đột biến dị hợp tử IVS6+3A>G. Trong khi đó, bố, mẹ bệnh nhân mã số WBW160602 lần lượt bị đột biến dị hợp tử R778L và V176Sfs*28, chị gái bệnh nhân này không bị đột biến gen *ATP7B* (Hình 3).

Bệnh nhân (III.2) (mã số WBW160602) bị đột biến dị hợp tử kép V176Sfs*28/R778L. Đột biến R778L làm cho nucleotide G tại vị trí c.2333 chuyển thành T, khiến bộ ba CCG mã hóa Arginin (R) thứ 778 chuyển thành bộ ba CTG mã hóa Leucin (L). Kết quả sàng lọc đột biến đích như sau: bố bệnh nhân (II.3) bị đột biến dị hợp tử R778L, mẹ bệnh nhân (II.6) bị đột biến dị hợp tử V176Sfs*28. Chị gái bệnh nhân (III.1) không bị đột biến.

Hình 2. Trình tự gen của gia đình bệnh nhân mã số WBW160101.

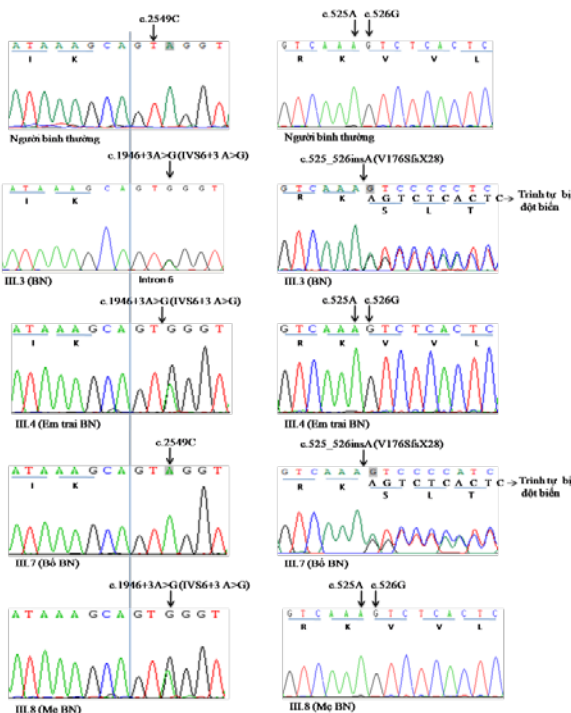


Hình 3. Trình tự gen của gia đình bệnh nhân mã số WBW160602.

Kết quả giải trình tự gen *ATP7B* cho thấy, 2 bệnh nhân Wilson trong phả hệ trên Hình 1 đều có chung một đột biến dị hợp tử V176Sfs*28 mặc dù kiểu gen 2 bệnh nhân khác nhau: người em (III.3) có kiểu gen V176Sfs*28/IVS6+3A>G và người anh họ (III.2) có kiểu gen V176Sfs*28/R778L (Hình 2 và 3).

4. Bàn luận

Toàn bộ kiểu gen của bệnh nhi mắc Wilson rất rải rác, không lặp lại và được dự đoán rằng kiểu hình của nhóm bệnh nhân cũng rất đa dạng. Kiểu gen dị hợp tử kép có tỷ lệ cao nhất, đa số là bệnh nhân có đột biến dị hợp tử S105* đi kèm với một đột biến dị hợp tử khác. Thê đột biến đồng hợp tử có tỷ lệ thấp hơn và thường có kiểu gen đồng hợp tử S105*/S105*. Kiểu gen đồng



hợp tử chiếm đa số trong nghiên cứu thực hiện trên 61 bệnh nhân Wilson ở miền Bắc [18]. Tỷ lệ kiểu gen của bệnh nhân Wilson trong nghiên cứu tương tự với các thông kê trên thế giới. Theo đó, trong số 90% đột biến phát hiện trên gen *ATP7B* có 60% ở thể đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép, 30% chỉ có một đột biến dị hợp tử [6,27]. Xác định kiểu gen cho bệnh nhân Wilson không chỉ là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán xác định bệnh mà còn là cơ sở di truyền cần thiết để sàng lọc đột biến cho các thành viên khác trong gia đình.

Nghiên cứu có tỷ lệ đột biến gen cao hơn nhiều so với tỷ lệ phát hiện đột biến gen *ATP7B* trong nghiên cứu của Trung Quốc (83,8-94,7%), Hàn Quốc (75%), Đài Loan (65,5%) [7,13,15,17]. *ATP7B* là một gen có kích thước lớn và đột biến thường xảy ra rải rác khắp toàn bộ gen nên việc phát hiện đột biến rất khó khăn, đặc biệt ở những vùng intron rất xa exon [17, 24]. Cho đến nay, khoảng 3% người có thể lâm sàng điển hình của bệnh Wilson nhưng không có đột biến gen *ATP7B* mặc dù đã được phân tích toàn bộ trình tự gen và vùng promoter [4]. Bệnh nhân có thể có các đột biến hiếm gặp như: mất đoạn toàn bộ exon, đột biến vùng promoter, 3 biến dị gây bệnh và rối loạn đơn nhân [6], hoặc các mất đoạn lớn không thể xác định được bằng kỹ thuật giải trình tự gen; đột biến có thể nằm sâu trong các vùng intron của gen *ATP7B* [10,20].

Đột biến có tần suất cao nhất trong nghiên cứu là S105*. Đây là điểm khác biệt so với các nghiên cứu khác trên thế giới và thậm chí khác biệt ngay cả với một số quốc gia lân cận trong khu vực Châu Á. Đột biến gen *ATP7B* có đặc trưng chủng tộc, do đó mỗi khu vực đều có đặc điểm riêng và mỗi quốc gia trong từng khu vực cũng có thể có đặc thù riêng [10, 14, 17]. Theo đó, đột biến phổ biến nhất ở khu Châu Âu là H1069Q trên exon 14 (khoảng 30%), trong khi ở

Châu Á là R778L trên exon 8, bao gồm Trung Quốc, Đài Loan, Hàn Quốc [14, 16, 17]. Qua phân tích kết quả của nghiên cứu cho thấy R778L chỉ chiếm 4,7%, thấp hơn nhiều so với tỷ lệ phát hiện của các đột biến khác. 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 ra trên exon 2, exon 16, exon 8, intron 14, exon 18. 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 [13,15,17]. Các exon trong vùng hot-spot nên được ưu tiên sàng lọc đột biến để chẩn đoán bệnh Wilson ở Việt Nam, giúp việc chẩn đoán bệnh Wilson được nhanh chóng, tiết kiệm hơn.

Đặc biệt nghiên cứu đã phát hiện được các ca mắc Wilson nhưng chưa có triệu chứng lâm sàng nhờ sàng lọc đột biến đích. Kết quả xét nghiệm sinh hóa cho thấy, tất cả các bệnh nhân đều có ceruloplasmin giảm, đồng niệu trong 24 giờ tăng cao nhưng chỉ có 2 bệnh nhân tăng men gan nhưng 2 bệnh nhân này chưa đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh theo dựa theo bảng điểm của Leipzig 2001 (bệnh nhân chỉ được 2 hoặc 3 điểm) nên việc chẩn đoán không thể đưa ra mà cần phải tìm đột biến gen *ATP7B*. Qua phân tích kết giải trình tự gen đã phát hiện đột biến trên cả 2 alen của gen *ATP7B*. Với mỗi đột biến bệnh nhân được 2 điểm, 2 đột biến bệnh nhân sẽ được 4 điểm theo bảng điểm Leipzig 2001 và đủ tiêu chuẩn chẩn đoán xác định WD [8]. Việc phát hiện đột biến trên cả 2 alen của gen *ATP7B*, bệnh nhân đã giúp họ được chẩn đoán xác định WD.

Đây là điều có ý nghĩa vô cùng to lớn trong việc điều trị dự phòng sớm nhằm ngăn chặn các biểu hiện và các biến chứng nghiêm trọng có thể xảy ra của bệnh [3,12].

Bệnh nhân Wilson thường có ceruloplasmin giảm, nhưng không phải là tiêu chuẩn vàng, đặc hiệu trong chẩn đoán WD 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 nghiêm trọng do bất kỳ nguyên nhân nào. Bệnh nhân bị thiếu máu cục bộ cũng thiếu hụt hoàn toàn ceruloplasmin do bị đột biến gen nằm trên NST số 3, nhưng những trường hợp này không có sự tích tụ đồng. Thậm chí trên trẻ em bị WD, 15-36% tổng số các ca có ceruloplasmin bình thường và 5-15% người mắc Wilson có ceruloplasmin bình thường hoặc giảm nhẹ. Trong khi đó, khoảng 20% trường hợp người mang gen dị hợp tử có ceruloplasmin giảm [2,8]. Vì thế, các thành viên trong gia đình có bệnh nhân Wilson nên được sàng lọc đột biến gen *ATP7B* đã được phát hiện trên ca chỉ điểm [7] Nguyên nhân quan trọng thứ hai là người mang gen bệnh có thể di truyền gen bị đột biến dị hợp tử cho các thế hệ tiếp theo [1], nguy cơ các con của họ ở thế hệ tiếp theo của các thành viên này có nguy cơ mắc bệnh là 5% và hơn hết là họ sẽ lại có khả năng sinh con mắc bệnh khi kết hôn với người mang gen bệnh Wilson. Vì vậy,

Các trường hợp mắc WD chưa có biểu hiện lâm sàng, chẩn đoán bệnh không thể dựa trên các xét nghiệm sinh hóa hoặc bất kỳ một xét nghiệm đơn lẻ nào. Hơn nữa, các xét nghiệm này cũng không thể phân biệt được người bình thường với người những người chưa có triệu chứng, hoặc bắt đầu bị ảnh hưởng của bệnh và đặc biệt không thể xác định được người mang đột biến gen dị hợp tử [11,17,20,24]. Việc xác định đột biến trên bệnh nhân cũng như anh, chị, em ruột có ý nghĩa quan trọng trong việc dự đoán và tiên lượng bệnh. Bởi một đột biến có thể có liên quan đến kiểu hình và độ tuổi

phát bệnh của bệnh nhân [15]. Trong nghiên cứu, 1 bệnh nhân có kiểu gen I1148T/I1148T, thuộc nhóm MM/MM (bệnh nhân có 2 đột biến sai nghĩa) nhưng lại có bệnh cảnh hết sức nghiêm trọng: bệnh nhân bị viêm gan, dẫn đến xơ gan, suy gan cấp và tử vong khi 26 tuổi, sau khoảng 4 tháng điều trị [24]. Trên các y văn được công bố, kiểu gen R778L/- thường được phát hiện trên bệnh nhân bị bệnh gan; A874V/A874V có trên bệnh nhân bị bệnh gan, thần kinh và phát bệnh muộn [11]. Tuy nhiên, nghiên cứu trên bệnh nhân Wilson ở Nhật Bản cho thấy đột biến c.2871delC và R778L không có liên quan đến kiểu hình của bệnh [23]. Tác giả Leggio và cs báo cáo một gia đình có người 3 con trai đều mắc WD. Người con trai thứ 2 được phát hiện mắc Wilson đầu tiên, bị xơ gan, có kiểu gen T1288R/T1288R. Qua sàng lọc đột biến cho gia đình, người anh và người em của bệnh nhân cũng có T1288R/T1288R, nhưng chỉ bị viêm gan mạn, không có xơ gan. Theo nghiên cứu, sự khác nhau về kiểu hình của 3 anh em họ có thể do ảnh hưởng của môi trường sống, bởi bệnh nhân mắc Wilson và hai người anh, em sống ở các vùng khác nhau của nước Ý [26]. Như vậy, mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình rất đa dạng, giai đoạn mắc bệnh, mức độ nặng hay nhẹ của bệnh không chỉ phụ thuộc vào loại đột biến, mà còn phụ thuộc vào từng chủng tộc, từng cá thể trong những điều kiện sống cụ thể [8,26]. Ngay cả cùng một kiểu gen bị đột biến, cũng có người phát bệnh trong khi người khác khỏe mạnh bình thường [26]. Trên thực tế, ở Việt Nam hầu hết các bệnh nhân Wilson đều đến viện khi đã có biểu hiện lâm sàng của bệnh, chẳng hạn như viêm gan, gan to, rối loạn vận động tứ chi, co cứng cơ... Do vậy, tình trạng bệnh tật có thể diễn biến phức tạp và nghiêm trọng nếu chỉ dựa vào đặc điểm lâm sàng và các xét nghiệm sinh hóa truyền thống. Hơn nữa, khi

đã có biểu hiện lâm sàng rõ ràng, việc chẩn đoán có thể nhầm với nhiều bệnh khác hoặc do không được thăm khám đúng chuyên khoa nên bị chẩn đoán nhầm, chẩn đoán bỏ sót [3,4]. Thậm chí, một số bệnh nhân nhập viện trong tình trạng có biến chứng nặng, dẫn đến suy gan cấp, đòi hỏi ghép gan cấp cứu [8,26]. Như vậy, xác định người mang gen bệnh có vai trò quan trọng trong thực hành lâm sàng, là cơ sở để đưa ra lời khuyên di truyền nhằm làm giảm tỷ lệ người mắc bệnh trong cộng đồng và nâng cao chất lượng cuộc sống [14,19].

5. Kết luận

Xét nghiệm di truyền là phương pháp duy nhất để chẩn đoán xác định WD, chẩn đoán sớm cho bệnh nhân chưa có triệu chứng và người bị đột biến gen dị hợp tử.

Tài liệu tham khảo

- [1] Ala A, Walker AP, Ashkan K et al. Wilson's disease. *Lancet* 2007;369(9559): 397-408. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60196-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60196-2).
- [2] Pfeiffer RF. Wilson's disease. *Semin Neuro* 2007;27(2):123-132. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971173>.
- [3] Huster D, Kühne A, Bhattacharjee A et al. Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants. *Gastroenterology* 2012;142(4):947-956. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.048>.
- [4] Kenney SM, Cox DW. Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat* 2007;28(12):1171-1177. <https://doi.org/10.1002/humu.20586>.
- [5] Roberts EA, Schilsky ML. A practice guideline on Wilson disease. *Hepatology* 2003;37(6): 1475-1492. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50252>.
- [6] Seo JK. Wilson disease: an update (Article in Korean). *Korean J Hepatol* 2016;12(3):333-363.
- [7] Chang IJ, Hahn SH. The genetics of Wilson disease. *Handb Clin Neurol* 2017;142:19-34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00003-3>.
- [8] Ferenci P, Czlonkowska A, Stremmel W et al. EASL Clinical practice guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 2012;56(3):671-85. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.00.007>.
- [9] Vrabelova S, Letocha O, Borsky M et al. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab* 2005;86(1-2):277-285.
- [10] Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet* 2006;120(2):151-159.
- [11] Schilsky LM. Wilson disease: Current status and the future. *Biochimie* 2009;91:1278-1281. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.07.012>.
- [12] Kusuda Y, Hamaguchi K, Mori T et al. Novel mutations of the ATP7B gene in Japanese patients with Wilson disease. *J Hum Genet* 2000;45(2):86-91. <https://doi.org/10.1007/s100380050017>.
- [13] Gu YH, Kodama H, Du SL, Gu QJ et al. 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* 2003;64(6):479-484. <https://doi.org/10.1046/j.13990004.2003.00179.x>.
- [14] Park S, Park JY, Kim GH et al. Identification of novel ATP7B gene mutation and their functional roles in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat* 2007;28(11):1108-1113. <https://doi.org/10.1002/humu.20574>.
- [15] Li XH, Lu Y, Ling Y, Fu QC et al. Clinical and molecular characterization of Wilson's

- disease in China: identification of 14 novel mutations. *BMC Med Genet* 2011;12:16.
- [16] Fan Y, Yu L, Jiang Y et al. Identification of a mutation hotspot in exon 8 Wilson disease gene by cycle sequencing. *Chin Med J (Engl)* 2000;113(2):172-174.
- [17] Wan L, Tsai CH, Tsai Y et al. Mutation analysis of Taiwanese Wilson disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(2):734-738. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.136>
- [18] Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F et al. Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. *Am J Med Genet* 2002;108(1):23-28.
- [19] Tuan PLA, Tue NT, Nga LHB et al. Genetic analysis of 55 northern Vietnamese patients with Wilson disease: seven novel mutations in ATP7B. *Journal of Genetics* 2017;96(6):933-939. <https://doi.org/10.1007/s12041-017-0857-9>
- [20] Maleki I, Zali MR, Abadi HN. Novel mutation of ATP7B gene in Iranian patients with Wilson's disease. *Res Mol Med* 2013;1(1):44-47.
- [21] Wang HL, Huang QY, Shang X et al. Mutation analysis of 73 southern Chinese Wilson's disease patients: identification of 10 novel mutations and its clinical correlation. *J Hum Genet* 2011;59(9):660-665. <https://doi.org/10.1038/0366-6999.159361>.
- [22] Luoma LM, Deeb TM, Macintyre G et al. Functional analysis of mutations in the ATP loop of the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat* 2010;31(5):569-577. <https://doi.org/10.1002/humu.21228>
- [23] Okada T, Shiono Y, Hayashi H et al. Mutational analysis of ATP7B and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Hum Mutat* 2000;15:454-462.
- [24] Zhang Y, Wu Z Y. Wilson's disease in Asia. *Neurology Asia* 2011;1(2):103-109.
- [25] Manoochehri J, Masoumi RD, Faraji H et al. Family screening for a novel ATP7B gene mutation, c.2335T>G, in the South of Iran. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2014;4(1):26-31.
- [26] Patil M, Sheth AK, Krishnamurthy CA, Devarbhavi H. A Review and Current Perspective on Wilson Disease. *J Clin Exp Hepatol* 2013;3(4):321-336.
- [27] Leggio L, Malandrino N, Loudianos G et al. 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* 2007;52:2570-2575.
- [28] Jang JH, Lee T, Bang S et al. Carrier frequency of Wilson's disease in the Korean population: a DNA-based approach. *J Hum Genet* 2007;62(9):815-818.