

Phân tích trình tự gen GLA trên bệnh nhân phì đại cơ tim chưa rõ nguyên nhân

Nguyễn Văn Hùng*, Nguyễn Thị Quỳnh Thơ*, Lê Hiền Giang*, Hoàng Thị Thanh Huyền*,
Nguyễn Thị Phương Thảo*, Dau-Ming Niu**, Gavin Huang**,
Phạm Quốc Khánh***, Nguyễn Thị Thu Hoài***

Trường Đại học Y Dược Hải Phòng*, Bệnh viện Đa khoa cựu chiến binh Đà Bắc, Đà Loan**,
Viện Tim mạch Việt Nam, Bệnh viện Bạch Mai Hà Nội***

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Bệnh Fabry là một bệnh di truyền liên quan đến gen GLA mã hóa enzyme lysosome α - galactosidase A (α - Gal A) trên nhiễm sắc thể X gây tích đọng các chất trong lysosome. Gần đây, một số các biến thể không điển hình của bệnh Fabry được tìm thấy với các biểu hiện phì đại cơ tim và các triệu chứng tương tự.

Mục tiêu: Phân tích trình tự gen GLA của một số mẫu có hoạt độ enzyme α - galactosidase A giảm mạnh.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Phân tích trình tự gen GLA bằng phương pháp PCR, điện di, giải trình tự gen của 26 mẫu có hoạt độ enzyme α - Gal A giảm mạnh, các mẫu này được sàng lọc từ 421 bệnh nhân phì đại cơ tim chưa rõ nguyên nhân.

Kết quả: Phát hiện 1 đột biến thay thế nucleotide c.[178 C>T] ; [0], p.P60S ở vùng mã hoá axit amin thuộc exon 1. Đây là đột biến mới chưa từng được công bố trong y văn.

Kết luận: Qua sàng lọc 421 bệnh nhân có phì đại cơ tim đã phát hiện 1 đột biến gen GLA gây Fabry. Fabry có thể là nguyên nhân gây phì đại cơ tim chưa rõ nguyên nhân.

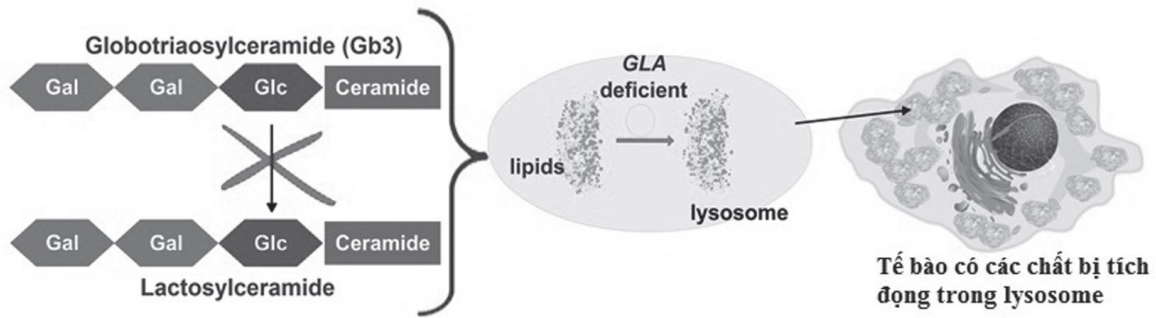
ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh phì đại cơ tim (*Hypertrophic cardiomyopathy* - HCM) là một căn bệnh trong đó cơ tim dày bất thường ở tâm thất trái, thất phải, mỏm tim hoặc toàn bộ cơ tim. Phần lớn các trường hợp đều bị phì đại vách liên thất, làm tắc nghẽn đường ra thất trái.

Trong số các bệnh nhân phì đại cơ tim, có đến 40% chưa tìm ra nguyên nhân gây bệnh.

Bệnh Fabry là một bệnh di truyền liên quan đến gen GLA mã hóa enzyme lysosome α - galactosidase A (α - Gal A) trên nhiễm sắc thể X gây tích đọng các chất trong lysosome.

Khi enzyme α - galactosidase A bị thiếu một phần hoặc hoàn toàn dẫn đến việc không chuyển hóa được các glycosphingolipid mà chủ yếu là globotriaosylceramide (Gb3 hoặc GL-3). Gb3 không được chuyển hóa sẽ tích đọng tại các tế bào mạch máu, gây tắc nghẽn quá trình vận chuyển máu. Gb3 cũng tích đọng ở các tế bào thần kinh, tế bào tim, và các loại khác nhau của tế bào thận. Sự rối loạn chức năng tế bào hoặc sự chết tế bào dẫn đến những đáp ứng chuyển hóa của các mô như phì đại, viêm, xơ và xơ cứng.



Hình 1. Khiếm khuyết gen GLA gây tích đọng Gb3 trong lysosome

(Nguồn <https://www.heart.org>)

Biến thể tim của bệnh Fabry không điển hình có thể chỉ là phì đại thất trái, loạn nhịp tim, hoặc bệnh cơ tim phì đại trong những thập kỷ thứ 5 thứ đến thứ 8 của cuộc sống. Điều này mở ra một hướng nghiên cứu mới về một trong những nguyên nhân gây bệnh phì đại cơ tim. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu là : *Phân tích trình tự gen GLA của một số mẫu có hoạt độ enzyme α -galactosidase A giảm mạnh.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng

Dựa trên khuyến cáo của các chuyên gia Đài Loan, nghiên cứu dự định sàng lọc trên 400 bệnh nhân nam có phì đại tâm thất vì bất cứ nguyên nhân nào. Kết quả 421 bệnh nhân là nam giới từ 40 tuổi trở lên vào khám tại Viện Tim mạch Bệnh viện Bạch Mai trong các tháng 9, 10 và 11 năm 2013, có biểu hiện bệnh phì đại cơ tim chưa xác định được nguyên nhân rõ ràng và có một trong các tiêu chuẩn sau: Bề dày thành sau thất trái thì tâm trương (LVPWd) > 12mm; khối lượng cơ thất trái (LVMI): Nam >134g/m², Nữ >110g/m².

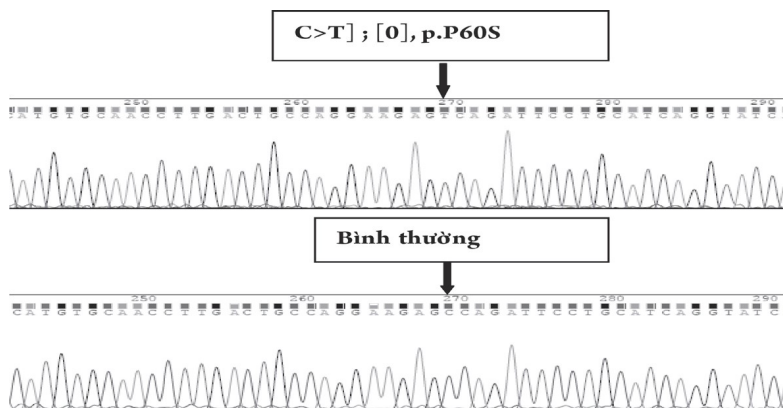
Phương pháp

Sau khi xin phép và được bệnh nhân đồng ý, lấy máu tĩnh mạch để có các giọt máu trên

giấy BDS, để khô ở nhiệt độ phòng, máu của các đối tượng nghiên cứu được lấy tại Phòng khám của Viện Tim mạch và chuyển đến Labo của Trường Đại học Y Dược Hải Phòng để sàng lọc và sau đó bảo quản để chuyển đến Labo của Bệnh viện cựu chiến binh Đài Bắc Đài loan để phân tích. 421 bệnh nhân được xác định hoạt độ enzyme α - Gal A, lựa chọn ra 26 mẫu có hoạt độ thấp nhất để phân tích trình tự gen GLA. ADN sẽ được phân lập từ máu toàn phần. Các phân đoạn của gen GLA sẽ được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) sử dụng các cặp mồi thích hợp. Sản phẩm phản ứng PCR sẽ được phân tích qua điện di trên gel agarose 1,5% sau đó tách ADN mong muốn ra khỏi gel bằng phương pháp thời gel. Trình tự gen GLA được xử lý bằng cách sử dụng kit giải trình tự chu kỳ BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) và máy giải trình tự ABI Prism 3730.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chúng tôi đã giải trình tự 26 mẫu và cho kết quả là 1 đột biến ở exon 1 và 5 dạng đột biến IVS (intervening sequence) ở intron và 5' UTR (untranslate region). Kết quả giải trình tự 26 mẫu được trình bày trong bảng 1.



Hình 2. Đoạn trình tự exon 1 đột biến c.[178 C>T]; [0], p.P60S

Bảng 1. Kết quả giải trình tự 26 mẫu

Kí hiệu mẫu	exon 1	Intron 1	exon 2	exon 3	exon 4	intron 4	exon 5	exon 6	Intron 6	exon 7
FB01	5'UTR-10 C>T	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB02	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB03	BT	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB04	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB05	5'UTR-10 C>T	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB06	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB07	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB08	BT	IVS1+17 A>G	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB09	5'UTR-10 C>T	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB10	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB26	5'UTR-12 G>A	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB44	5'UTR-10 C>T	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB64	c.[178 C>T]; [0], p.P60S	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB69	BT	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB70	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB74	BT	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB79	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB80	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB84	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB85	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB133	BT	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB331	BT	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT

FB334	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
FB345	BT	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB378	5'UTR -10 C>T	BT	BT	BT	BT	IVS4-16 A>G	BT	BT	IVS6-22 C>T	BT
FB414	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT

BÀN LUẬN

Trong số 26 mẫu được giải trình tự, chỉ có duy nhất một mẫu FB 64 có đột biến ở vùng mã hoá axit amin thuộc exon 1. Đó là đột biến điểm ở vị trí nucleotide 178 thay thế C bằng T dẫn tới sự thay đổi axit amin thứ 60 từ Proline thành Serine. Đây là đột biến mới chưa từng công bố trong y văn. Mẫu đột biến FB 64 là mẫu có hoạt độ enzyme α - Gal A bằng 0.17, thấp nhất trong số 26 mẫu được giải trình tự. Bệnh nhân FB 64 là bệnh nhân nam 56 tuổi. Kết quả siêu âm cho thấy các chỉ số LVMI bằng 205 g/m², LVPWd bằng 22.6 mm đều rất cao. Bệnh nhân này chỉ biểu hiện các đặc điểm của bệnh Fabry thể không điển hình như phì đại cơ tim với các triệu chứng khó thở, đau thắt ngực, tim đập nhanh đặc biệt là khi lao động hoặc vận động mạnh, ngoài ra không mang các đặc điểm khác của bệnh Fabry thể điển hình. Như vậy, tỉ lệ đột biến gen GLA gây bệnh Fabry ở nhóm bệnh nhân phì đại cơ tim trong nghiên cứu này là 1/421.

Trong nghiên cứu của Nakao và cộng sự năm 1995 trên 230 bệnh nhân nam phì đại cơ tim đã phát hiện 2 đột biến gen GLA ở vùng mã hoá axit amin thuộc exon 1 và exon 6, có 5 bệnh nhân không có đột biến ở vùng mã hoá axit amin nhưng có α - galactosidase mARN giảm rõ rệt so với bình thường. Cả 7 bệnh nhân này đều biểu hiện các đặc điểm của bệnh Fabry không điển hình [9]. Năm 2002, B Sachdev và cộng sự nghiên cứu trên 153 bệnh nhân nam phì đại cơ tim khởi phát muộn đã phát hiện ra 6 bệnh nhân bị đột biến gen GLA với 4 dạng đột biến khác nhau gồm 3 đột biến thay thế và 1

đột biến mất nucleotide [3]. Năm 2011, Albert A Hagege và cộng sự cũng sàng lọc trên 392 bệnh nhân phì đại cơ tim và phát hiện ra 4 đột biến gen GLA [1]. Năm 2010, Ole Havndrup đã nghiên cứu 90 đối tượng và người thân của họ, nhóm tác giả loại trừ 31 trường hợp có đột biến gen sarcomer, trong 59 trường hợp còn lại họ đã phát hiện được 3 đột biến gen GLA [10].

Như vậy tỉ lệ đột biến gen GLA khi sàng lọc các bệnh nhân phì đại cơ tim trong các nghiên cứu là rất khác nhau. Điều này có thể do sự khác nhau giữa các dân tộc, quốc gia, hoặc cũng có thể do số lượng mẫu đem sàng lọc chưa đủ lớn để đưa ra một tỷ lệ chung.

Ngoài một đột biến duy nhất ở vùng mã hoá axit amin của exon 1, bảng 1 cho thấy có 5 dạng đột biến IVS và 5'UTR xuất hiện với tần số khá cao. Có tới 13/26 mẫu mang ít nhất 1 trong 5 dạng đột biến này. Chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của các đột biến này đến sự biểu hiện của gen GLA, hoạt độ enzyme α - Gal A cũng như sự liên quan của các đột biến này đối với bệnh phì đại cơ tim. Cần có những công trình nghiên cứu sàng lọc trên số lượng lớn cá thể để có thể đưa ra được kết luận chính xác.

KẾT LUẬN

Kết quả phân tích gen GLA của 26 mẫu có hoạt độ enzyme α - Gal A suy giảm mạnh đã phát hiện ra 6 đột biến, trong đó có 1 đột biến thay thế nucleotide c.[178 C>T] ; [0], p.P60S ở vùng mã hoá axit amin thuộc exon 1. Đây là đột biến mới chưa từng được công bố trong y văn. Tỷ lệ đột

biến là 1/421 là rất cao so với y văn. Các đột biến còn lại là các đột biến ở vùng 5'UTR và intron bao gồm: 5'UTR -10 C>T; IVS4-16 A>G; IVS6-22 C>T; IVS1+17 A>G và 5'UTR -12 G>A.

SEQUENCE ANALYSIS OF GLA GENE IN PATIENTS WITH UNEXPLAINED HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

ABSTRACT

Background : Fabry disease (FD) is an X-chromosomal disorder caused by mutations in the GLA gene encoding the lysosomal enzyme α -galactosidase A. Recently, several cases of an atypical variant of Fabry's disease, with manifestations limited to the heart that mimicking hypertrophic cardiomyopathy (HCM) have been reported. Therefore, we assessed the GLA gene for Fabry's disease among patients with HCM.

Materials and method: We assessed the GLA gene sequence by PCR, electrophoresis, gene sequencing method on 26 samples with α -galactosidase A enzyme activity decreased, these samples were screened from 421 patients with unexplained HCM.

Results: Discovered one nucleotide mutation 1 c. [178 C> T]; [0], p.P60S in the encoded amino acids of exon 1. This is a new mutation has not been published medical literature.

Conclusion: One mutation was found among 421 patients with unexplained HCM. Fabry's disease should be considered as a cause of unexplained HCM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Albert A Hagege, Eric Caidron, Damy T, Roudaut R, Etchecopar - Chevreuil Caroline, Tran Thi Chien, Jabbour Firas, Boucly Catherine, Prognon Patrice, Charron Philippe, Dominique P Germain (2011), "Screening patients with hypertrophic cardiomyopathy for Fabry disease using a filter-paper test: the FOCUS study", *Heart*, 97(2), pp. 131 - 136.
2. Andreas Perrot, Karl Josef Osterziel, Michael Beck, Rainer Dietz, Christoph Kampmann (2002), "Fabry Disease: Focus on Cardiac Manifestations and Molecular Mechanisms", *Herz*, 27(7), pp. 699 - 702.
3. B. Sachdev, T. Takenaka, H. Teraguchi, C. Tei, P. Lee, W.J. McKenna and P.M (2002), "Prevalence of Anderson-Fabry Disease in Male Patients With Late Onset hypertrophic cardiomyopathy", *Circulation*, 105, pp. 1407 - 1411.
4. C. Filoni, A. Caciotti, L. Carraresi (2010), "Functional studies of new GLA gene mutations leading to conformational Fabry disease", *Biochimica Biophysica Acta*, 1802(2), pp. 247 - 252.
5. Christoph Kampmann, Christiane M. Wiethoff, Catharina Whybra, Frank A. Baehner, Eugen Mengel, Michael Beck (2007), "Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in children and adolescents", *Acta Paediatrica*, 97(4), pp. 463 - 469.
6. Christoph Kampmann, Frank Baehner, Markus Ries, Michael Beck (2002), "Cardiac Involvement in Anderson-Fabry Disease", *J Am Soc Nephrol*, 13, pp. 147 - 149.
7. Deborah Elstein, Gheona Altarescu, Michael Beck (2010), *Fabry disease*, Springer.
8. Linhart A, Lubanda J. C, Palecek T, Bultas J, Karetová D, Ledvinová J, Elleder M, Aschermann M (2001), "Cardiac manifestations in Fabry disease", *J Inherit Metab Dis*, 24(2), pp. 75-83.
9. Nakao Shoichiro, Takenaka Takennaka, Maeda Masato, Kodama Chihaya, Tanaka Akihiro, Tahara Minoru, Yoshida Aichi, Kuriyama Masaru, Hayashibe Hidemasa, Sakuraba Hitoshi, Tanaka Hiromitsu (1995) "An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy", *The new england journal of medicine*, 333(5), pp. 288-293.
10. Ole Havndrup, Michael Christiansen, Birgitte Stoevring, Jensen M, Hoffman - Bang J, Andersen PS, Hasholt L, Morremolle A, Feldt - Rasmussen U, Kober L, Henning Bundgaard (2010), "Fabry disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy: genetic screening needed for establishing the diagnosis in women", *European Journal of Heart Failure*, 12, pp. 535 - 540.
11. Perry Elliott, Robert Baker, Ferdinando Pasquale, Giovanni Quarta, Hatim Ebrahim, Atul B Mehta, Derralynn A Hughes, on behalf of the ACES study group (2011), "Prevalence of Anderson - Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the European Anderson Fabry Disease Survey", *Heart*, 97(23), pp. 1957-60.