

Đo hoạt độ enzyme α - galactosidase A bằng phương pháp khối phổ để sàng lọc bệnh nhân fabry ở Việt Nam

Nguyễn Văn Hùng*, Nguyễn Thị Quỳnh Thơ*, Lê Hiền Giang*, Hoàng Thị Thanh Huyền*,
Đau-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, Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội***

TÓM TẮT

Bệnh Fabry là một bệnh di truyền liên quan đến gen *GLA* mã hóa enzyme lysosome α -galactosidase A (α - Gal A) trên NST X gây tích đọng các chất trong lysosome. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đo lường và phân tích hoạt độ enzyme α - Gal A bằng phương pháp khối phổ song song.

Đối tượng nghiên cứu: Gồm 421 bệnh nhân phì đại cơ tim chưa rõ nguyên nhân.

Phương pháp nghiên cứu: Đục 3,2 mm mẫu máu trên tấm giấy thấm khô (dry blood spot - DBS) và ủ trong nội chuẩn, chất nền, đệm phản ứng trong vòng 20h. Hoạt độ enzyme được đo trên máy khối phổ song song (Mass spectrometry - MS/MS).

Kết quả: Khoảng hoạt độ enzyme α -Gal A của nhóm bệnh nhân phì đại cơ tim từ 0.17 - 9.18 $\mu\text{mol/h/L}$. Giá trị mean \pm SD của hoạt độ enzyme α - Gal A ở nhóm bệnh nhân này là 1,84 \pm 0.93 $\mu\text{mol/h/L}$. Chúng tôi đã tiến hành giải trình tự gen *GLA* cho 26 mẫu có hoạt độ thấp nhất và tìm ra 1 đột biến gen.

Kết luận: Phương pháp khối phổ song song là phương pháp hiệu quả để sàng lọc bệnh

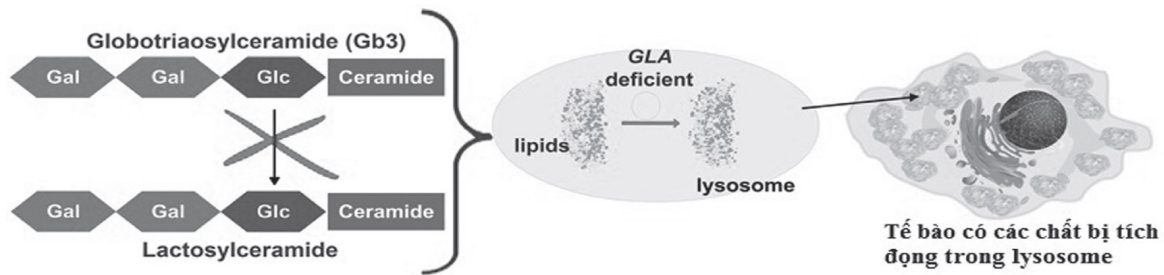
Fabry. Có thể mở rộng phương pháp để sàng lọc các bệnh tích đọng trong lysosome khác như Pompe, Gaucher, MPS.

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 NST 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.

Đã có nhiều phương pháp được sử dụng để sàng lọc và phát hiện bệnh Fabry, nhưng trong số các phương pháp thì khối phổ song song được cho là phương pháp tiện lợi, hiệu



Hình 1. Khiếm khuyết gen GLA gây tích đọng Gb3 trong lysosome (Nguồn <https://www.heart.org>)

quả và cho kết quả chính xác. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu nhằm đo lường và phân tích hoạt độ enzyme α -Gal A bằng phương pháp khối phổ song song.

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 tim to 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.

Mẫu

Mẫu máu của các bệnh nhân được lấy vào tube có EDTA, sau đó nhỏ vào giấy thấm DBS. Làm khô giấy 4-8h ở nhiệt độ phòng, bảo quản giấy trong túi nilon có khóa ở 4°C trong 1 tuần hoặc ở -20°C trong thời gian lâu hơn. Máu được lấy tại Phòng khám Tim mạch của Viện Tim mạch sau đó chuyển đến Labo của trường Đại học Y Dược Hải Phòng để kiểm tra sàng lọc sau đó được bảo quản và chuyển đến Labo của Bệnh viện cựu chiến binh Đài Bắc Đài Loan để xét nghiệm phân tích.

Phương pháp

Hóa chất và dung dịch đệm

Dung dịch kẽm clorua 0.1 M, N - Acetylgalactosamine (GALNAc) và acarbose, hóa chất phân tích đặc hiệu (ASR - analyte specific reagent) với mỗi phản ứng enzyme (gồm chất nền (S), nội chuẩn (IS) với tỷ lệ mol GLA-S / GLA-IS là 500:1), dung dịch dập tắt phản ứng: ethylacetat và methanol tỉ lệ 1:1), dung dịch rửa (trộn 190 ml ethylacetat với 10ml methanol). Pha động: 80% acetonitrile và 20% nước với 0,2% acid formic, dung dịch đệm tách chiết: 20 mmol natri phosphate, pH 7.1, dung dịch đệm GLA: citrate-phosphate cuối cùng là 0.147 M (pH 4.6).

Dung dịch rửa và ức chế

120 g/l natri taurocholate, 100 g/L 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 0.8 mM acarbose, 1.0 M N-Acetylgalactosamine (GALNAc),

Dung dịch cocktail phân ứng

Thêm 0.45 ml natri taurocholate trong nước vào 1 lọ GLA ASR, vortex. Thêm 14.67ml dung dịch đệm GLA và 2.88 ml N-acetylgalactosamin (GLANAc) 1 M trong nước vào lọ, vortex lại. Dung dịch cuối cùng gồm 3.33 mmol GLA-S, 6.67 μ M GLA-IS, 3.0 g/l natri taurocholate, 160mmol GLANAc và 0.142 M natri acetate, pH 4.6.

Phản ứng enzyme

Cho vào mỗi giếng (tám 96 giếng) 3,2 mm DBS, bổ sung 70 μ l dung dịch đệm tách

chiết, phủ tấm bằng miếng dán nilon, lắc 875 rpm/37°C/ 1h, ly tâm 2000 rpm/2 min. Cho vào mỗi giếng 15 µl dung dịch cocktail GLA, cho 10 µl dịch chiết xuất vào mỗi giếng đã chứa sẵn 15 µl dung dịch phản ứng (assay cocktail), bọc bằng tấm nhôm, mix nhẹ, ly tâm 2000 rpm/2min, lắc ở 250 rpm/ 37°C/20 h, ly tâm 2000 rpm/2 min.

Dập tắt phản ứng

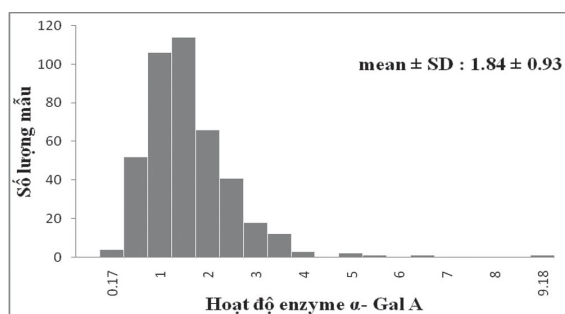
Dập tắt phản ứng enzyme bằng cách thêm vào mỗi giếng 100 µl EA: MeOH 1:1, mix, huyền toàn bộ dung dịch có trong các giếng từ tấm sang tấm 96 giếng sâu. Rửa bệnh phẩm bằng dung dịch rửa sau đó đo bằng máy khối phổ.

Đo khối phổ

Quá trình đo MS/MS được thực hiện trên máy đo phổ khối song song với khối thiết bị ba tứ cực Triple Quad LC/MS 6460 (Agilent). Trước khi đo khối phổ, mẫu được chạy sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao UPLC. Pha động gồm có dung môi A (H2O, 0.1% acid formic) và dung môi B (50% acetonitrile, 50% methanol, 0,1% acid formic), 30 µl mẫu được tiêm tự động, tốc độ dòng chảy là 200 µl/ phút với hệ thống UPLC Agilent 1290. Một cột C18 BEH (50 mm x 2,1 mm) với các hạt 1,7 µm. Nhiệt độ cột là 40°C.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hoạt độ enzyme α- Gal A



Biểu đồ 1. Hoạt độ enzyme α- Gal A của bệnh nhân phì đại cơ tim

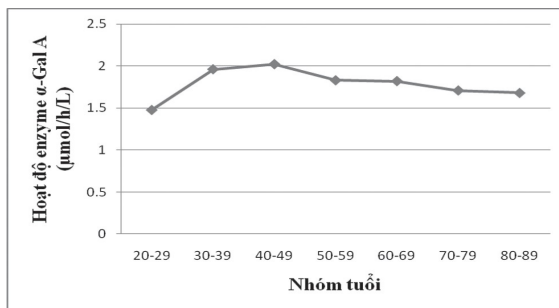
Chúng tôi tiến hành đo hoạt độ enzyme của 421 mẫu lấy từ các bệnh nhân phì đại cơ tim. Từ kết quả trên hình 1 cho thấy khoảng hoạt độ enzyme α - Gal A của nhóm bệnh nhân phì đại cơ tim từ 0,17 - 9,18 µmol/h/L. Hoạt độ đo được chủ yếu nằm trong khoảng từ 0,5 - 3,0 µmol/h/L. Trong số 421 mẫu, 4 mẫu có hoạt độ < 0,5 µmol/h/L, 226 mẫu (chiếm 54%) có hoạt độ enzyme từ 1,0 - 2,0 µmol/h/L. Chỉ có 7 mẫu có hoạt độ enzyme từ 4,0 - 7,0 µmol/h/L, và >7,0 chỉ có duy nhất một mẫu có hoạt độ bằng 9,18 µmol/h/L. Có tới 90% số mẫu có hoạt độ enzyme α - Gal A nhỏ hơn 2,93 µmol/h/L. Giá trị mean ± SD của hoạt độ enzyme α - Gal A ở nhóm bệnh nhân này là 1,84 ± 0,93 µmol/h/L.

BÀN LUẬN

Kết quả xác định hoạt độ của nhóm nghiên cứu có sự khác biệt so với một số nghiên cứu trước đó trên thế giới. Năm 1995, Nakao và cộng sự đã sàng lọc bệnh Fabry trên 230 bệnh nhân nam phì đại cơ thất trái, hoạt độ enzyme của nhóm bệnh nhân này từ 4,5 - 17,6 nmol/h/mL (mean ± SD bằng 8,5 ± 2,4) [10]. Năm 2002, B. Sachdev và cộng sự cũng đã sàng lọc bệnh Fabry dựa vào hoạt độ enzyme α - Gal A trên 147 bệnh nhân nam phì đại cơ tim khởi phát muộn, kết quả cho thấy hoạt độ enzyme của nhóm bệnh nhân này từ 2,3 - 25 nmol/h/mL (mean ± SD bằng 7,4 ± 2,7)[2]. Các kết quả này cao hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Điều này có thể do phương pháp xác định hoạt độ enzyme α - Gal A khác nhau, Nhóm nghiên cứu của Nakao và B. Sachdev đã sử dụng phương pháp đo huỳnh quang chuẩn với cơ chất là 4-methylumbelliferyla-D-galactopyranoside (Sigma) để xác định hoạt độ enzyme α-Gal A. Theo nghiên cứu của Liao và cộng sự năm 2014, phương pháp xác định hoạt độ một số enzyme trong đó có

enzyme α - Gal A bằng sắc ký lỏng kết hợp đo khối phổ song song (LC - MS/ MS) ưu việt và cho kết quả chính xác hơn phương pháp đo huỳnh quang [7]. Một số nghiên cứu khác trên thế giới cũng cho thấy tính hiệu quả của phương pháp sàng lọc bệnh Fabry bằng phương pháp khối phổ [1;4;9;14]. Để kiểm tra hiệu quả của phương pháp sàng lọc, chúng tôi đã giải trình tự 26/421 mẫu và cho kết quả là 1 đột biến ở exon 1 và 5 dạng đột biến ở vị trí cắt nối intron IVS (intervening sequence) và 5'UTR (untranslate region).

Chúng tôi chia bệnh nhân theo nhóm tuổi để xác định sự ảnh hưởng của độ tuổi với hoạt độ của enzyme α -Gal A (biểu đồ 2).



Biểu đồ 2. Hoạt độ enzyme α -Gal A theo nhóm tuổi

Biểu đồ 2 cho thấy hoạt độ enzyme α -Gal A theo nhóm tuổi chênh lệch không nhiều. Điều này cho thấy rằng độ tuổi có thể không ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme. Hoạt độ enzyme cao hay thấp tùy thuộc vào tình trạng từng bệnh nhân. Độ tuổi từ 20 - 30 tuổi có hoạt độ enzyme thấp có thể là do số lượng mẫu ít, không đủ điều kiện để khẳng định hoạt độ enzyme nhóm tuổi này suy giảm vì độ tuổi.

KẾT LUẬN

Phương pháp khối phổ song song là một phương pháp khả thi và hiệu quả để sàng lọc bệnh Fabry. Tuy nhiên, phương pháp này cũng có hạn chế là không đưa ra kết luận được kiểu gen của bệnh nhân cũng như không xác định được chính xác tình trạng có mắc bệnh hay không của bệnh nhân. Cần có sự hỗ trợ của các phương pháp khác như giải trình tự gen để có thể kết luận.

Measuring enzyme α - galactosidase a activity using tandem mass spectrometry to screening fabry disease in Viet Nam

Abstract

Background: Fabry disease (FD) is an X-chromosomal disorder caused by mutations in the GLA gene encoding the lysosomal enzyme α -galactosidase A.

Object of the research: 421 patients diagnosed as hypertrophic cardiomyopathy.

Method: One 3.2 mm punch from a dried blood spot sample (DBS) was incubated with substrate and internal standard in the reaction buffer for 20 h. The resulting product was quantified against internal standard using MS/MS

Results: The value of enzyme α -galactosidase A activity from 0.17 to 9.18 $\mu\text{mol/h/L}$. The mean \pm SD was $1.84 \pm 0.93 \mu\text{mol/h/L}$. We assessed the GLA gene sequence by sequencing method on 26 samples with α -galactosidase A enzyme activity decreased and found one nucleotide mutation.

Conclusion: The MS/MS method for Fabry disease newborn screening is robust and can be readily use for other lysosomal disorders such as Pompe, Gaucher, MPS.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Albert A Hagege, Eric Caidron, [...], 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. **Angéla Dajnoki, György Fekete, Joan Keutzer, [...], Olaf Bodamer (2010)**, “Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry”, *Clinica Chimica Acta*, 411(19-20), pp.1428-1431.
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. Ronald Scott, Susan Elliott, Norman Buroker, [...], Frantisek Turecek (2013)**, “Identification of Infants at Risk for Developing Fabry, Pompe, or Mucopolysaccharidosis-I from Newborn Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry”, *The Journal of Pediatrics*, 163(2), pp.498-503.
5. **Chang-Long Tai, Mei-Ying Liu, Hsiao-Chi Yu, [...], Dau-Ming Niu (2012)**, “The use of high resolution melting analysis to detect Fabry mutations in heterozygous females via dry bloodspots”, *Clinica Chimica Acta*, 413, pp. 422-427.
6. **Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH (2004)**, “Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening”, *Clinical Chemistry*, 50 (10), pp. 1785 -1796.
7. **Liao HC, Chiang CC, Niu DM, Wang CH, Kao SM, Tsai FJ, Huang YH, Liu HC, Huang CK, Gao HJ, Yang CF, Chan MJ, Lin WD, Chen YJ (2014)**, “Detecting multiple lysosomal storage diseases by tandem mass spectrometry--a national newborn screening program in Taiwan”, *Clinica Chimica Acta*, 431, pp. 80 - 86.
8. **Metz TF, Mechtler TP, Orsini JJ, Monica Martin, Shushan B, Herman JL, Ratschmann R, Item CB, Streubel B, Herkner KR, Kasper DC (2011)**, “Simplified newborn screening protocol for lysosomal storage disorders”, *Clinical Chemistry*, 57(9), pp. 1286 - 1294.
9. **Minje Han, Sun-Hee Jun, Sang Hoon Song, Kyoung Un Park, Jin Q Kim, Junghan Song (2011)**, “Use of Tandem Mass Spectrometry for Newborn Screening of 6 Lysosomal Storage Disorders in a Korean Population”, *Korean J Lab Med*, 31 (4), pp. 250 -256.
10. **Nakao, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, Yoshida A, Kuriyama M, Hayashibe H, Sakuraba H, et al (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.
11. **Pamela Lavoie, Michel Boutin, and Christiane Auray-Blais (2013)**, “Multiplex Analysis of Novel Urinary Lyso-Gb3-Related Biomarkers for Fabry Disease by Tandem Mass Spectrometry”, *Analytical chemistry*, 85, pp. 1743-1752.
12. **Scott CR, Elliott S, Buroker N, Thomas LI, Keutzer J, Glass M, Gelb MH, Turecek F (2013)**, “Identification of infants at risk for developing Fabry, Pompe, or mucopolysaccharidosis-I from newborn blood spots by tandem mass spectrometry”, *The Journal of Pediatrics*, 163 (2), pp. 498 - 503.
13. **Sheng-Hung Lee, Cheng-Fang Li, Hsiang-Yu Lin, Chien-Hsing Lin, Hao-Chuan Liu, Shih-Feng Tsai, Dau Ming Niu (2014)**, “High-throughput detection of common sequence variations of Fabry disease in Taiwan using DNA mass spectrometry”, *Molecular Genetics and Metabolism*, 111, pp.507-512.
14. **Trisha A. Duffey, Garland Bellamy, Susan Elliott, Angela C. Fox, Michael Glass, Frantisek Turecek, Michael H. Gelb, C. Ronald Scott (2010)**, “A Tandem Mass Spectrometry Triplex Assay for the Detection of Fabry, Pompe, and Mucopolysaccharidosis-I (Hurler)”, *Clinical Chemistry*, 56 (12), pp. 1854 - 1861.