

BỘ Y TẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI CẤP BỘ

**THIẾT KẾ VECTOR MANG GEN MÃ HÓA
TỔNG HỢP YẾU TỐ ĐÔNG MÁU VIII
TÁI TỔ HỢP**

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. TẠ THÀNH VĂN

7465
28/7/2009

HÀ NỘI – 2009

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hemophilia (còn gọi là bệnh ưa chảy máu) là một bệnh di truyền do thiếu hụt hay bất thường chức năng của các yếu tố đông máu như các yếu tố VIII, IX hay XI. Trong đó sự thiếu hụt yếu tố VIII là thường gặp nhất trong bệnh hemophilia. Mức độ biểu hiện bệnh trên lâm sàng liên quan trực tiếp đến nồng độ của yếu tố VIII trong huyết tương. Hemophilia thể nhẹ khi nồng độ yếu tố VIII trong huyết tương khoảng từ 6-30% so với người bình thường, ở thể này chảy máu thường xảy ra sau chấn thương hoặc sau phẫu thuật. Thể trung bình khi nồng độ của yếu tố VIII trong huyết tương từ 1-5%. Và thể bệnh nặng khi nồng độ của yếu tố VIII trong huyết tương dưới 1%. Ở thể nặng, chảy máu có thể xảy ra tự phát hoặc sau những sang chấn nhẹ, nhất là ở khớp và cơ, trung bình mỗi năm chảy máu 20-30 lần, nhưng cũng có thể nhiều hơn.

Việc chẩn đoán chính xác và điều trị sớm căn bệnh này có một ý nghĩa quan trọng nhằm hạn chế tối đa tình trạng chảy máu cũng như giảm thiểu khả năng trở thành tàn tật. Điều trị hemophilia bao gồm mấy nguyên tắc sau: điều trị chảy máu, điều trị dự phòng và phục hồi chức năng, trong đó việc sử dụng các chế phẩm thay thế đóng vai trò chủ chốt. Trong những năm vừa qua, mặc dù đã có nhiều tiến bộ trong điều trị bệnh như truyền máu toàn phần, huyết tương, huyết tương tươi đông lạnh, tủa lạnh yếu tố VIII, yếu tố cô đặc có độ tinh khiết từ mức độ thấp đến mức độ cao. Tuy nhiên, các sản phẩm có nguồn gốc từ máu thường có giá thành rất đắt, thời gian bán hủy ngắn nên phải tiêm tĩnh mạch đều đặn. Thêm vào đó, nguồn cung cấp các chế phẩm này cũng hạn hẹp trong khi nhu cầu điều trị ngày một gia tăng. Hơn nữa các sản phẩm có nguồn gốc từ máu không phải là tuyệt đối an toàn. Bệnh nhân sử dụng các phương pháp điều trị này vẫn có nguy cơ tiềm ẩn mắc các bệnh lây nhiễm qua đường truyền máu như HIV, HBV, HCV. Khoảng 60-70% bệnh nhân hemophilia nặng bị nhiễm HIV (Human Immunodeficiency Virus) và khoảng 80%

bệnh nhân hemophilia bị nhiễm virus viêm gan do điều trị các chế phẩm từ máu.

Với sự tiến bộ của kỹ thuật sinh học phân tử, các nhà khoa học đã phân tích DNA của bệnh nhân đã cho phép nhận biết những tổn thương gen gây ra hemophilia, cũng như kiểm soát bệnh tốt hơn nhờ phát hiện người mang gen bệnh và việc chẩn đoán trước sinh. Việc tạo thành công yếu tố VIII tái tổ hợp ứng dụng trong điều trị cho bệnh nhân hemophilia là một bước đột phá trong việc nghiên cứu điều trị căn bệnh này. Ưu điểm của sinh phẩm là hàm lượng yếu tố VIII cao, có hiệu quả rõ rệt, bảo quản dễ, không có các yếu tố nguy cơ gây các bệnh truyền nhiễm. Thêm vào đó, việc điều trị bệnh hemophilia bằng liệu pháp gen (gene therapy) đã được thử nghiệm thành công trên mô hình động vật ở chuột VIII^{-/-} đã đem lại những triển vọng đầy hứa hẹn đối với người bệnh hemophilia.

Ở Việt Nam, tỉ lệ người mắc hemophilia trong cộng đồng khá cao. Theo thống kê của Viện Huyết học và Truyền máu TW có khoảng 5.000 bệnh nhân hemophilia nhưng chỉ mới phát hiện và điều trị đặc hiệu khoảng 20% các trường hợp. Tuy nhiên phương pháp điều trị hiện nay ở nước ta là sử dụng yếu tố VIII trong máu toàn phần (truyền trực tiếp hoặc tách chiết) là rất tốn kém và hiệu quả không cao và đặc biệt có nguy cơ cao đối với các bệnh lây truyền qua đường máu. Chính vì vậy, việc nghiên cứu sản xuất yếu tố VIII là một vấn đề cấp thiết trong giai đoạn hiện nay ở Việt Nam, nó có ý nghĩa khoa học và thực tiễn rất lớn trong huyết học lâm sàng, vừa mang tính nhân đạo và đem lại hiệu quả kinh tế cao, giải quyết trực tiếp một vấn đề bức thiết đang đặt ra cho y học nước nhà. Do vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu giai đoạn một của đề tài với mục tiêu: “**Lựa chọn và thiết kế vector mang gen mã hoá yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp**”.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. BỆNH HEMOPHILIA

1.1.1. Lịch sử phát triển của bệnh

Hemophilia (bệnh máu khó đông) là một trong những bệnh di truyền đã được biết đến từ thời cổ đại, tuy nhiên không có tên gọi chính thức cho nó. Trong các văn thư cổ của người Do Thái từ thế kỷ thứ 2 trước công nguyên đã miêu tả những đứa trẻ bị chết do chảy máu không cầm sau khi cắt bao quy đầu (tục lệ của người Do Thái: trẻ em trai sinh ra đều cắt bao quy đầu). Vào thế kỷ 12 một bác sĩ người Arap-Albucasis cũng miêu tả những đứa trẻ bị chết do chảy máu từ những vết thương nhỏ. Hemophilia được cho là bệnh di truyền hàng trăm năm qua các thế hệ trong gia đình. Sự di truyền của bệnh hemophilia liên kết với giới tính được phát hiện từ những năm 80 của thế kỷ 19. Vào thời điểm này, các nhà khoa học nhận thấy chỉ có nam giới mắc bệnh và không có khả năng truyền bệnh cho con trai. Con gái bệnh nhân mang gen bệnh truyền cho con trai mình. Bệnh hemoliphia còn được biết đến như căn bệnh của Hoàng Gia vì nữ hoàng Anh Victoria 1838-1901 mang gen bệnh này và truyền nó cho nhiều thế hệ khác [1, 17-19].

Danh từ hemophilia lần đầu tiên được dùng để chỉ bệnh máu khó đông là vào năm 1828 ở trường đại học Zurich. Sau đó, năm 1820, Nasse viết bài báo đầu tiên về hemophilia. Năm 1893, Wright đã chứng minh được bằng chứng về sự thiếu hụt yếu tố đông máu. Tuy nhiên, yếu tố VIII chưa được biết đến cho đến năm 1937, khi Patek và Taylor tách được yếu tố đông máu, được gọi là yếu tố chống chảy máu (antihemophilia factor – AHF). Thử nghiệm sinh học về yếu tố VIII bắt đầu được nghiên cứu vào năm 1950. Mặc dù vào thời điểm đó, mối quan hệ chặt chẽ giữa yếu tố VIII và von Willebrand (vWF) vẫn chưa được biết và hiểu rõ. Đến năm 1953, sự suy giảm yếu tố VIII ở những bệnh nhân thiếu hụt vWF đã được mô tả. Nghiên cứu

sau này của Nilson và cộng sự đã chỉ ra mối tương quan giữa 2 yếu tố đông máu này [17-19].

Năm 1952, bệnh Christmas được biết đến và đặt tên theo họ của bệnh nhân đầu tiên mắc bệnh này. Bệnh này khác biệt với bệnh hemophilia vì khi trộn huyết tương của bệnh nhân hemophilia thực sự với huyết tương của bệnh nhân Christmas, và thấy có khả năng đông bình thường. Từ đó, người ta phát hiện có hai bệnh hemophilia A và hemophilia B khác biệt nhau.

Trước những năm 1960, bệnh hemophilia và một vài bệnh về máu khác được chữa trị bằng cách truyền bổ sung máu 100% hoặc plasma tươi. Tuy nhiên yếu tố làm đông máu VIII và IX có trong đó rất ít nên không làm cầm máu ở những người bị thể nặng và kết quả họ vẫn tử vong. Đa số các trường hợp tử vong do bị chảy máu vào trong các cơ quan quan trọng như não, thận, hoặc bị chảy máu ngoài do vết thương lớn. Những trường hợp may mắn sống sót cũng bị què quặt, tàn tật do bị chảy máu trong cơ khớp. Để giúp bệnh nhân hemophilia có cuộc sống đỡ khổ hơn là một trong những động lực mạnh mẽ giúp các bác sỹ tìm ra nguyên nhân cũng như chế tạo ra thuốc. Khoảng năm 1960, bác sỹ Judith Pool tìm ra Cryoprecipitate. Cryoprecipitate là một thành phần của máu chứa nhiều yếu tố đông máu VIII. Việc này mở đường cho khả năng kiểm soát chảy máu ở những bệnh nhân thể nặng hoặc bị vết thương lớn [18, 19].

Thập niên 1970, hỗn hợp máu chứa nhiều yếu tố đông máu VIII & IX được sản xuất hàng loạt. Sản phẩm yếu tố VIII cô đặc ở dạng đông khô giúp cho việc bảo quản và vận chuyển được dễ dàng, đã cải thiện được tình hình sức khỏe bệnh nhân và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phẫu thuật và chăm sóc sức khỏe cho bệnh nhân tại nhà. Đây thật sự là một cuộc cách mạng trong việc chăm sóc bệnh nhân máu khó đông. Cuộc sống họ giờ đây không còn gắn mình với bệnh viện. Họ có thể đi du lịch, làm việc, tham gia cuộc sống cộng đồng như người thường vì họ luôn mang theo thuốc đông máu để truyền khi cần [1, 3, 4, 6, 19].

Tuy nhiên vào thời điểm đó do chưa có hiểu biết nhiều về HIV cũng như các bệnh lây qua đường máu nên nhiều sản phẩm đông máu đã nhiễm loại virus chết người này và nhiều bệnh nhân hemophilia là nạn nhân. Những năm 1980, nguy cơ nhiễm virus gây bệnh từ những sản phẩm đông máu ngày càng tăng cao. Đến giữa những năm 1980, hầu hết bệnh nhân hemophilia nặng bị nhiễm virus viêm gan A, B, C và HIV [6, 9, 19].

Thập kỷ 1990, các sản phẩm đông máu được sử dụng các kỹ thuật bất hoạt virus trong khi sản xuất nhằm loại trừ sự truyền nhiễm virus gây bệnh. Thêm vào đó, các yếu tố đông máu thay thế tái tổ hợp, được sản xuất bằng công nghệ gen, sử dụng trong điều trị bệnh hemophilia gần như đã ngăn chặn được nguy cơ lây nhiễm các bệnh lây truyền qua đường máu và có hiệu quả điều trị cao hơn [1, 3, 9, 17, 20].

1.1.2. Tình hình mắc bệnh

Hemophilia là bệnh rối loạn đông máu di truyền hay gặp nhất. Theo thống kê của tổ chức hemophilia thế giới, hiện nay có khoảng 250.000 bệnh nhân mắc bệnh hemophilia và chỉ có khoảng 50.000 được điều trị đặc hiệu. Tại Việt Nam, theo những thống kê không đầy đủ hiện tại nước ta có khoảng 5000 bệnh nhân hemophilia. Theo số liệu điều tra từ năm 1994-1996 về tình hình bệnh hemophilia ở Miền Bắc Việt Nam cho thấy tỷ lệ bệnh hemophilia là 25-60/1.000.000 dân [7, 27]. Tỷ lệ mắc bệnh hemophilia gần giống nhau ở các vùng, các nước, các chủng tộc (Harold R.Roberts, 1995). Hay gặp bệnh hemophilia A hơn chiếm tới 85%, hemophilia B chỉ chiếm 14% [7, 27]. Tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương, cùng với sự ra đời của trung tâm điều trị hemophilia, số bệnh nhân đến khám và điều trị tăng lên đáng kể. Đến nay trung tâm đã quản lý khoảng 500 bệnh nhân hemophilia ở các địa phương khác nhau, trong đó hemophilia A chiếm 85%, 13,16% là hemophilia B và còn lại là các bệnh nhân bị các bệnh rối loạn đông máu khác [27].

1.1.3. Sinh lý bệnh học [19]

Yếu tố VIII là một globulin do gan, lách và cả lưới nội mô sản xuất. Yếu tố này quan trọng cho sự tạo thành thromboplastin nội sinh (yếu tố XI) trong quá trình đông máu. Vai trò của hệ thống đông máu là tạo ra khối fibrin bền vững tại vị trí tổn thương. Cơ chế đông máu gồm 2 con đường: nội sinh và ngoại sinh.

Con đường nội sinh: có thể được xảy ra bên trong hoặc bên ngoài cơ thể với bước đầu tiên là sự hoạt hóa yếu tố XII. Trong cơ thể, sự hoạt hóa yếu tố XII xảy ra khi tiếp xúc với collagen, fibrin, màng tiểu cầu trong quá trình kết tụ tiểu cầu. Yếu tố XII cũng có thể được hoạt hóa trong một số trạng thái như stress, lo lắng, sợ hãi... Ở bên ngoài cơ thể (trong ống nghiệm) yếu tố XII được hoạt hóa khi máu tiếp xúc với bề mặt lạ. Yếu tố XII hoạt hóa sẽ xúc tác cho sự hoạt hóa yếu tố XI. Với sự có mặt của ion calci, yếu tố XI hoạt hóa sẽ tiếp tục hoạt hóa yếu tố IX. Yếu tố IX hoạt hóa tương tác với yếu tố VIII hoạt hóa trên bề mặt của các hạt phospholipid của tiểu cầu, với sự có mặt của ion calci để tạo ra một phức hợp enzym có khả năng hoạt hóa yếu tố X. Yếu tố X hoạt hóa, với sự có mặt của ion calci sẽ tương tác với yếu tố V trên bề mặt các hạt phospholipid của tiểu cầu để tạo ra phức hợp prothrombinase như con đường ngoại sinh.

Trong hệ thống ngoại sinh: khi máu tiếp xúc với mô tổn thương, yếu tố III của mô được giải phóng sẽ tương tác với yếu tố VII có trong huyết tương và ion calci để tạo thành tác nhân hoạt hóa yếu tố X. Yếu tố X hoạt hóa với sự có mặt của ion calci sẽ tương tác với yếu tố V trên các hạt phospholipid của mô để tạo ra phức hợp protrombinase.

Prothrombin là một globulin có trong huyết tương, do gan sản xuất. Đây là tiền chất không hoạt động của một enzym tiêu protein rất mạnh là trombin. Với sự có mặt của ion calci, prothrombinase sẽ chuyển protrombin thành trombin. Lúc đầu, sự chuyển prothrombin xảy ra rất chậm để tạo thành một lượng trombin cần cho máu đông. Sau đó trombin sẽ làm tăng tốc độ của quá trình tạo ra bản thân nó bằng

cách hoạt hóa yếu tố V và yếu tố VIII. Yếu tố VIII hoạt hóa là thành phần của phức hợp enzym hoạt hóa yếu tố X. Yếu tố V hoạt hóa là thành phần của prothrombinase. Như vậy cả hai yếu tố này góp phần làm tăng quá trình chuyển prothrombin thành trombin. Trombin cũng hoạt hóa yếu tố XIII để ổn định mạng lưới fibrin. Fibrinogen là một protein hòa tan trong huyết tương do gan sản xuất. Trombin chuyển fibrinogen thành các sợi fibrin đơn phân. Sau đó các fibrin đơn phân tự trùng hợp thành mạng fibrin không hòa tan. Trombin cũng hoạt hóa yếu tố XIII. Yếu tố XIII hoạt hóa, với sự có mặt của ion calci sẽ làm mạng lưới fibrin trở nên ổn định hơn nhờ các dây nối đồng hóa trị giữa các sợi fibrin để tạo thành cục máu đông.

Yếu tố VIII và IX lưu thông trong máu ở dạng bất hoạt. Khi được hoạt hóa, hai yếu tố này phối hợp với nhau để phân cắt và hoạt hóa yếu tố X, một enzym quan trọng điều khiển sự chuyển hóa fibrinogen thành fibrin. Vì vậy, thiếu một trong các yếu tố này có thể làm thay đổi đáng kể quá trình đông máu, dẫn đến sự chảy máu lâm sàng.

1.1.4. Triệu chứng và mức độ nặng của bệnh [2, 5, 8, 17, 19]

1.1.4.1. Những người có khả năng mắc bệnh hemophilia

Hemophilia A và hemophilia B khá phổ biến. Tỷ lệ gặp khoảng 1/10.000 nam giới. Đây là bệnh di truyền lặn, liên quan đến nhiễm sắc thể giới tính X. Chủ yếu bệnh nhân là nam giới, 100 % con gái của người bệnh mang gen, cháu trai ngoại có biểu hiện bệnh. Ở khoảng 1/3 bệnh nhân, người ta không xác định được tiền sử gia đình. Nguyên nhân gây bệnh ở các bệnh nhân này được cho là do đột biến gen. Tỷ lệ hemophilia A/ hemophilia B từ 5 - 7 : 1.

Bệnh nhân hemophilia C hiếm gặp hơn và có biểu hiện lâm sàng nhẹ. Bệnh di truyền lặn, liên quan đến nhiễm sắc thể thường vì vậy cả nam và nữ đều có thể mắc bệnh.

1.1.4.2. Triệu chứng

Bệnh nhân hemophilia có thể bị chảy máu bất kì nơi nào trên cơ thể và chảy máu kéo dài, nhưng cơ khớp là hay bị chảy nhất, còn các vị trí còn lại ít xảy ra, nhưng thường rất nguy hiểm.

Chảy máu khớp

Chảy máu khớp thường gặp nhất ở bệnh nhân hemophilia. Đây là loại chảy máu nguy hiểm vì khi tái phát nhiều lần gây ra viêm khớp, biến dạng khớp. Chảy máu khớp có thể xuất hiện tự nhiên hoặc sau chấn thương. Nếu điều trị muộn sau 4 giờ thì cảm giác đau có thể tăng lên, khớp sẽ sưng và việc điều trị bị kéo dài tới vài ngày. Trẻ lớn có thể nhận biết được chảy máu khớp trước khi đau và sưng xảy ra với cảm giác gai châm hoặc kiến bò trong khớp. Điều trị sớm sẽ dự phòng được tình trạng đau mạn tính và biến dạng khớp.

Chảy máu trong cơ

Chảy máu trong cơ cũng thường gặp và xuất hiện tự nhiên hoặc sau chấn thương. Những cơ hay bị chảy máu là: cẳng chân, đùi, cánh tay. Chảy máu cơ gây ra sưng đau trong vài ngày. Một dấu hiệu quan trọng và kín đáo trong chảy máu cơ là cảm giác đau, nóng, ngứa ran hoặc tê bì. Nếu không được điều trị sớm cơ sẽ bị phá huỷ và có thể gây liệt.

Chảy máu não

Có thể xuất hiện tự nhiên hoặc sau chấn thương, ví dụ như ngã hoặc đập đầu vào vật cứng. Triệu chứng chảy máu não có thể xảy ra ngay hoặc vài ngày sau chấn thương bao gồm: dễ kích ứng, ngủ gà, đau đầu, lú lẫn, nôn, buồn nôn, nhìn đôi. Tất cả những sang chấn ở đầu đều nghiêm trọng và cần được điều trị sớm để tránh chảy máu não và các hậu quả của chúng.

Chảy máu trong cổ và ngực

Chảy máu ở mặt, cổ và ngực có thể được coi là nghiêm trọng vì sưng nề có thể gây chèn ép đường thở. Nhiễm trùng cũng có thể làm sưng cổ và đôi khi khó có

thể phân biệt hiện tượng sưng là do nhiễm trùng hay do chảy máu. Tất cả các trường hợp sưng cổ đều được coi là do chảy máu và phải được điều trị.

Chảy máu ở vị trí khác

Bệnh nhân hemophilia rất dễ bị chảy máu nhưng hiếm gặp xuất huyết dưới da. Chảy máu từ vết cắt sâu hoặc xước da có thể kéo dài và hồi phục sau vài ngày mà không cần điều trị. Chảy máu miệng, lợi và mũi cũng hay gặp. Có thể xuất huyết tiêu hoá và đại máu.

1.1.4.3. Xét nghiệm

- + Thời gian máu chảy kéo dài, thời gian đông máu kéo dài có thể hơn 1 giờ; chất lượng cục máu đông kém; thời gian Howel kéo dài...
- + Định lượng yếu tố VIII giảm hoặc không có.
- + Xét nghiệm DNA phát hiện đột biến gen.
- + Yếu tố von- Willebrand bình thường.
- + Số lượng tiểu cầu bình thường.

1.1.4.4. Phân loại thể bệnh hemophilia theo mức độ hoạt tính yếu tố VIII

Bình thường yếu tố VIII ở người bình thường dao động từ 50 đến 200 ng/ml. Trường hợp bị bệnh hoạt tính yếu tố VIII giảm dưới 30%. Hemophilia được chia làm ba thể: nặng, trung bình và nhẹ.

- + Thể nặng: Hoạt tính yếu tố VIII giảm dưới 1 %, những bệnh nhân này thường bị chảy máu vài lần trong tháng.
- + Thể trung bình: Hoạt tính yếu tố VIII từ 1-5%, những bệnh nhân này chỉ bị chảy máu sau những chấn thương nhẹ.
- + Thể nhẹ: Hoạt tính yếu tố VIII từ 5-25% so với mức bình thường, những người này chỉ bị chảy máu sau phẫu thuật hoặc những chấn thương nặng, sau những động tác mạnh khi chơi thể thao