

ỨNG DỤNG GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI ĐỂ PHÂN TÍCH ĐỘT BIẾN GEN TRONG HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH TỬY

Nguyễn Quang Hào^{2,*}, Trần Tuấn Anh¹, Nguyễn Lê Anh¹, Kiều Hà Trang²
Vũ Minh Phương^{2,**}, Vũ Đức Bình¹, Nguyễn Ngọc Dũng¹,
Dương Quốc Chính^{1,**}, Bạch Quốc Khánh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Ứng dụng giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS) để phân tích đột biến của 4 gen: SF3B1, TET2, ASXL1 và DNMT3A trên bệnh nhân hội chứng rối loạn sinh tủy (Myelodysplastic Syndrome - MDS). **Phương pháp:** 9 bệnh nhân MDS được chẩn đoán theo tiêu chuẩn của WHO 2016; đang theo dõi điều trị tại Khoa bệnh máu tổng hợp, Viện Huyết học - Truyền máu TW. Nghiên cứu mô tả cắt ngang; xây dựng quy trình giải trình tự gen SF3B1, TET2, ASXL1 và DNMT3A trên hệ thống NGS. **Kết quả:** Ứng dụng thành công quy trình giải trình tự NGS cho 4 gen: SF3B1, TET2, ASXL1 và DNMT3A trên 9 bệnh nhân MDS. Nghiên cứu này đã phát hiện được 3 đột biến dừng khung đọc trên gen TET2 (c.1720C>T, c.4393C>T, c.4824T>A), 1 đột biến dịch khung đọc trên gen ASXL1 (c.1681_1682insT), 1 đột biến sai nghĩa (c.1585G>A) và 2 đột biến dịch khung đọc trên gen DNMT3A (c.634_637delAGGG, c.1393_1394insG). Trong đó, 1 trong 3 đột biến gen TET2 (c.4824T>A), 1 đột biến gen ASXL1 (c.1681_1682insT) và cả 3 đột biến gen DNMT3A (c.1585G>A, c.634_637delAGGG, c.1393_1394insG) là những đột biến mới chưa từng được công bố trên các cơ sở dữ liệu. Ngoài ra, nghiên cứu cũng phát hiện được 2 biến đổi di truyền mới trên gen TET2 (c.4538A>G, c.4540C>A), 1 biến đổi di truyền mới trên gen ASXL1 (c.3221A>C) và 2 biến đổi di truyền mới trên gen DNMT3A (c.1390A>G, c.1069G>A). Những đột biến mới phát hiện có thể giúp các bác sĩ trong việc hỗ trợ chẩn đoán và đánh giá tiên lượng cho bệnh nhân MDS. **Kết luận:** Giải trình tự gen thế hệ mới là công cụ hữu ích để phân tích các biến đổi di truyền gây bệnh ở những gen đặc trưng đã biết; hỗ trợ bác sĩ trong chẩn đoán và xếp loại nguy cơ cho bệnh nhân rối loạn sinh tủy.

Từ khóa: MDS, NGS, SF3B1, TET2, ASXL1, DNMT3A

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng rối loạn sinh tủy (MDS) là nhóm bệnh không đồng nhất về mặt lâm sàng tác động đến tế bào gốc tạo máu. Bệnh đặc trưng bởi sinh máu không hiệu lực ở tủy xương dẫn đến giảm một hoặc nhiều dòng tế bào máu ngoại vi và nguy cơ cao tiến triển thành bạch cầu cấp dòng tủy (AML). Gần đây,

các nghiên cứu sử dụng NGS cho thấy >90% bệnh nhân MDS mang ít nhất một đột biến gen [2]. Trong đó có những bệnh nhân mang đồng thời nhiều đột biến và chúng có thể biến đổi trong quá trình điều trị bệnh. NGS đã làm biến đổi nhanh chóng thực hành lâm sàng cho những bệnh nhân MDS. Phương pháp này được ứng dụng rộng rãi trong: chẩn đoán sớm và chẩn đoán phân biệt những trường hợp giảm dòng tế bào không rõ ràng; hỗ trợ xếp loại bệnh theo tiêu chuẩn của WHO 2016; cải thiện giá trị tiên lượng bệnh; góp phần quyết định liệu pháp điều trị đích phù hợp.

Trên cơ sở đó, chúng tôi thực hiện đề tài nhằm mục tiêu ứng dụng giải trình tự thế hệ mới để phân tích đột biến gen trong hội chứng rối loạn sinh tủy.

¹ Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương

² Đại học Y Hà Nội

* Tác giả thực hiện chính:

Nguyễn Quang Hào

** Tác giả chịu trách nhiệm khoa học:

Vũ Minh Phương

Dương Quốc Chính

Ngày tiếp nhận: 9/11/2019

Ngày phản biện: 11/11/2019

Ngày chấp nhận đăng: 18/12/2019

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

9 bệnh nhân MDS được chẩn đoán theo tiêu chuẩn của WHO 2016; đang theo dõi điều trị tại Khoa bệnh máu tổng hợp, Viện Huyết học - Truyền máu TW. Thử nghiệm 2 ml dịch tủy xương của mỗi bệnh nhân chống đông bằng 7,5% K3 EDTA được sử dụng làm vật liệu cho giải trình tự NGS.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Thiết kế mẫu

Với mục đích nhân toàn bộ trình tự chứa thông tin di truyền, chúng tôi thiết kế nhiều cặp mồi gối nhau bao phủ toàn bộ chiều dài ARN thông tin của mỗi gen. Các cặp mồi được thiết kế trên phần mềm Primer3, kiểm tra khả năng bắt cặp không đặc hiệu trên Primer-BLAST và xem xét vùng bao phủ trên phần mềm CLC Genomic Workbench. Tùy thuộc vào thành phần GC cũng như chiều dài của mỗi gen mà các cặp mồi thiết kế có chiều dài từ ~1 kb đến ~2 kb. Thiết kế mồi cụ thể như sau: gen *SF3B1* gồm 27 exon được thiết kế 2 cặp mồi dựa trên trình tự tham chiếu NM_012433; gen *TET2* gồm 15 exon được thiết kế 4 cặp mồi dựa trên trình tự tham chiếu NM_001127208; gen *ASXL1* gồm 18 exon được thiết kế 3 cặp mồi dựa trên trình tự tham chiếu NM_015338; và gen *DNMT3A* gồm 34 exon được thiết kế 2 cặp mồi dựa trên trình tự tham chiếu NM_175629.

* Phân tích dữ liệu NGS

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các phần mềm tin sinh chuyên dụng cho NGS là Miseq Reporter và CLC GENOMIC Workbench. Miseq Reporter cho biết chất lượng của mẻ giải trình tự và phân tích dữ liệu NGS ở mức cơ bản. Trong khi CLC GENOMIC Workbench là công cụ tin sinh mạnh mẽ cho phép cắt xén và loại bỏ những đoạn trình tự ngắn không đảm bảo chất lượng, loại bỏ các adapter dư thừa. Phần dữ liệu sau cắt xén được ghép nối (alignment) theo trình tự tham chiếu của từng gen. Sau đó, những biến đổi đơn nucleotide (SNV), các

chèn đoạn, mất đoạn ngắn (indels) được nhận diện và chú giải. Với những biến đổi gây bệnh đã biết được tra cứu và đối chiếu trên cơ sở dữ liệu đột biến ở người là ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Những biến đổi mới được xác định theo tiêu chuẩn và hướng dẫn của ACMG [3] và phân tích khả năng gây bệnh bằng công cụ PolyPhen-2, cho phép phân tích những tác động đến chức năng protein của các biến đổi ADN ở người.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm của nhóm bệnh nhân nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu có đủ theo các phân nhóm tiên lượng IPSS (bảng 3.1).

3.2. Kết quả xây dựng quy trình PCR

Cả 4 gen đều được phân lập trọn vẹn vùng chứa thông tin di truyền (coding) cũng như vùng điều hòa dịch mã 5'UTR và 3'UTR. Hầu hết các đoạn được khuếch đại đặc hiệu, rõ nét. Trong đó có vùng tương đối khó khuếch đại là đoạn a1, a2 của gen *ASXL1* với trên 80% thành phần là GC (hình 3.1).

3.3. Kết quả giải trình tự gen NGS

Kết quả giải trình tự gen NGS được thể hiện trong hình 3.2. Kết quả điện di thư viện ADN: các đoạn ADN phân mảnh chủ yếu tập trung ở khoảng 462 bp, nằm trong vùng tiêu chuẩn cho thư viện ADN là từ 300 bp đến 500 bp (Hình 2a). Kết quả của mẻ giải trình tự NGS cho thấy chỉ số chất lượng đáp ứng các tiêu chí kỹ thuật với: độ tin cậy (Q30) 90,7%, mật độ cụm 1164 K/mm², tỷ lệ cụm đạt chuẩn 91,34% (Hình 2b).

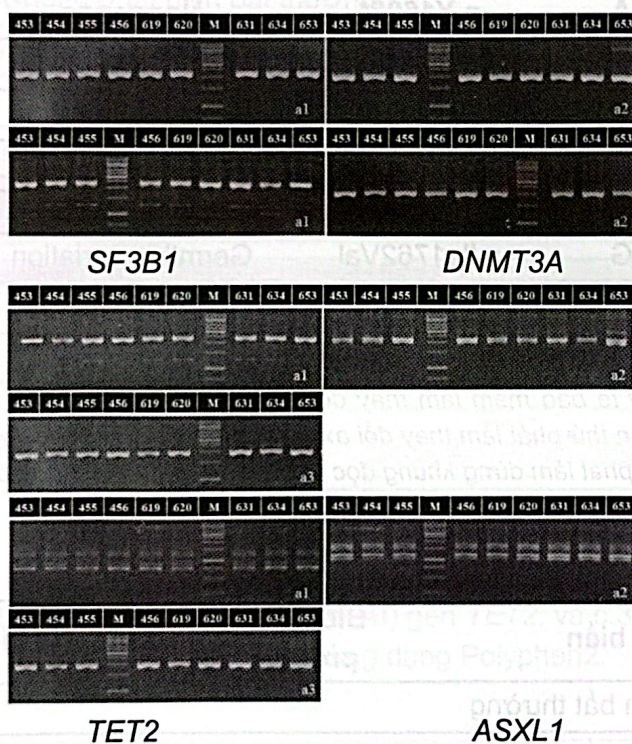
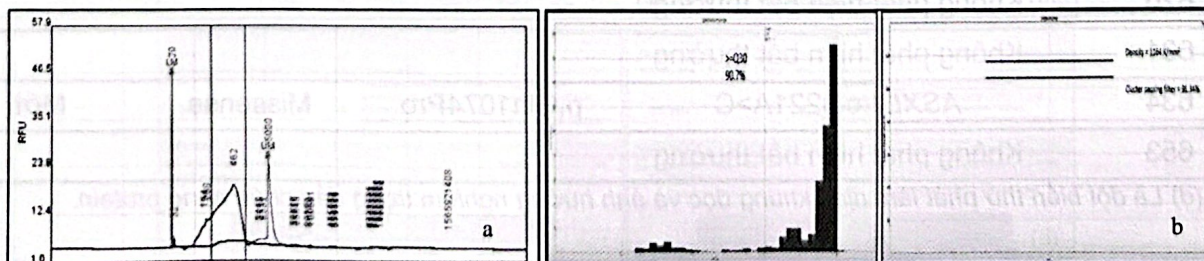
3.3. Kết quả phân tích đột biến gen

Trong số 9 bệnh nhân được giải trình tự gen *TET2* có 8 bệnh nhân có biến thể nguyên phát; 1 bệnh nhân có 2 biến đổi di truyền sai nghĩa; 2 bệnh nhân có đột biến dừng khung đọc được phát hiện. Có tất cả 8 biến đổi di truyền với 3 biến đổi nguyên phát, 2 biến đổi sai nghĩa và 3 đột biến làm dừng khung đọc. Trong đó có 3 biến đổi di truyền chưa được công bố trên các cơ sở dữ liệu (c.4538A>G, c.4540C>A, c.4824T>A) (bảng 3.2).

Bảng 3.1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

Mã bệnh nhân	453	454	455	456	619	620	631	634	653
Số tế bào blast*	19	0	0	1	4	1	3	2	13
Phân loại theo WHO 2016	MDS-EB-2	MDS-U	MDS-U	MDS-SLD	MDS-EB-1	MDS-SLD	del(5q)	MDS-SLD	MDS-EB-2
Tiền lượng theo IPSS	Cao	Thấp	Thấp	Thấp	Trung bình 2	Thấp	Trung bình 1	Trung bình 1	Cao
Chuyển AML	M3	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không

* tế bào non bất thường tủy xương

**Hình 3.1.** Hình ảnh phân lập gen *SF3B1*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1***Hình 3.2.** Kết quả giải trình tự NGS: (a) kiểm tra thư viện ADN trên hệ thống BiOptic; (b) đánh giá chất lượng mẻ giải trình tự NGS bằng Miseq Reporter.

Bảng 3.2. Kết quả phân tích đột biến gen *TET2*

Bệnh nhân	Tên đột biến	Biến đổi protein	Dạng đột biến	Báo cáo
453	<i>TET2</i> :c.86C>G	p.Pro29Arg	Germline variation ^(a)	Đã công bố
	<i>TET2</i> :c.4538A>G	p.Glu1513Gly	Missense ^(b)	Mới
454	<i>TET2</i> :c.4540C>A	p.Leu1514Ile	Missense	Mới
	<i>TET2</i> :c.5162T>G	p.Leu1721Trp	Germline variation	Đã công bố
455	<i>TET2</i> :c.4393C>T	p.R1465*	Nonsense ^(c)	Đã công bố
	<i>TET2</i> :c.5284A>G	p.Ile1762Val	Germline variation	Đã công bố
456	<i>TET2</i> :c.86C>G	p.Pro29Arg	Germline variation	Đã công bố
	<i>TET2</i> :c.1720C>T	p.Q574*	Nonsense	Đã công bố
619	<i>TET2</i> :c.4824T>A	p.Y1608*	Nonsense	Mới
	<i>TET2</i> :c.5162T>G	p.Leu1721Trp	Germline variation	Đã công bố
620	<i>TET2</i> :c.86C>G	p.Pro29Arg	Germline variation	Đã công bố
	<i>TET2</i> :c.5162T>G	p.Leu1721Trp	Germline variation	Đã công bố
631	<i>TET2</i> :c.86C>G	p.Pro29Arg	Germline variation	Đã công bố
	<i>TET2</i> :c.5284A>G	p.Ile1762Val	Germline variation	Đã công bố
634	<i>TET2</i> :c.86C>G	p.Pro29Arg	Germline variation	Đã công bố
653	Không phát hiện thấy bất thường			

(a) Là biến thể nguyên phát ở tế bào mầm làm thay đổi axit amin và không gây tổn thương chức năng protein. (b) Là biến đổi di truyền thứ phát làm thay đổi axit amin có/không ảnh hưởng đến chức năng protein. (c) Là biến đổi di truyền thứ phát làm dừng khung đọc và thường mất chức năng protein.

Bảng 3.3. Kết quả phân tích đột biến gen *ASXL1*

Bệnh nhân	Tên đột biến	Biến đổi protein	Dạng đột biến	Báo cáo
453	Không phát hiện bất thường			
454	Không phát hiện bất thường			
455	Không phát hiện bất thường			
456	Không phát hiện bất thường			
619	<i>ASXL1</i> :c.1681_1682insT		Frameshift ^(d)	Mới
620	Không phát hiện bất thường			
631	Không phát hiện bất thường			
634	<i>ASXL1</i> :c.3221A>C	p.Gln1074Pro	Missense	Mới
653	Không phát hiện bất thường			

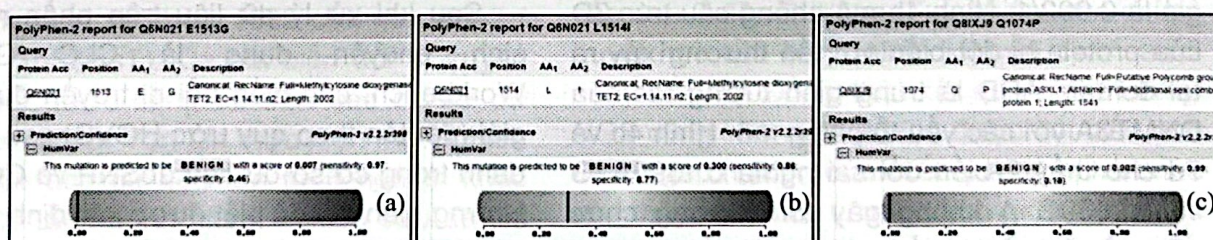
(d) Là đột biến thứ phát làm dịch khung đọc và ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng protein.

Kết quả phân tích gen *ASXL1* ở bảng 3.3 phát hiện được đột biến chèn 1 nucleotide vào vùng mã hóa của gen giữa vị trí 1681 và 1682 (*c.1681_1682insT*), và 1 biến đổi di

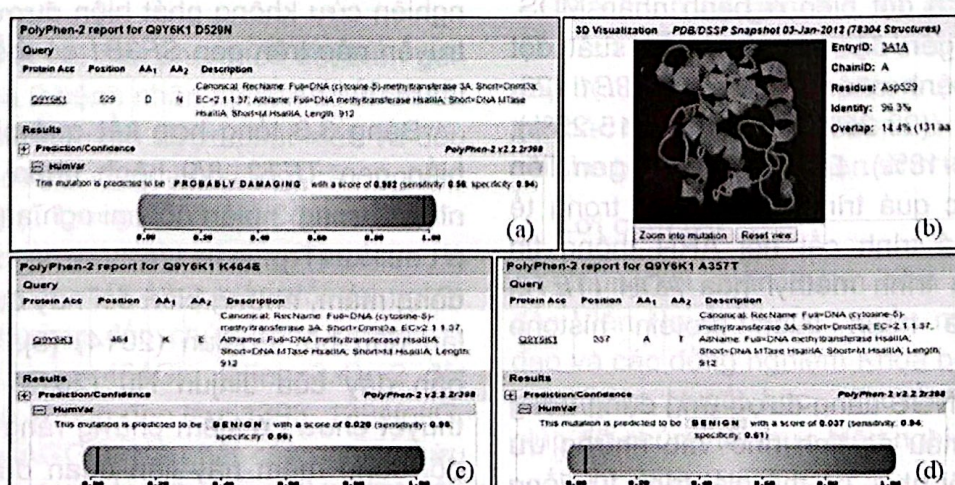
truyền sai nghĩa chưa được đánh giá mức độ tổn thương đến protein (*c.3221A>C*). Cả 2 biến đổi di truyền này chưa được công bố trong bất kỳ cơ sở dữ liệu nào.

Bảng 3.4. Kết quả phân tích đột biến gen *DNMT3A*

Bệnh nhân	Tên đột biến	Biến đổi protein	Dạng đột biến	Báo cáo
453	<i>DNMT3A</i> :c.1390A>G	p.Lys464Glu	Missense	Mới
	<i>DNMT3A</i> :c.1393_1394insG		Frameshift	Mới
	<i>DNMT3A</i> :c.1585G>A	p.Asp529Asn	Missense	Mới
454	<i>DNMT3A</i> :c.1069G>A	p.Ala357Thr	Missense	Mới
455	Không phát hiện bất thường			
456	Không phát hiện bất thường			
619	Không phát hiện bất thường			
620	Không phát hiện bất thường			
631	<i>DNMT3A</i> :c.634_637delAGGG		Frameshift	Mới
634	Không phát hiện bất thường			
653	Không phát hiện bất thường			



Hình 3.3. Đánh giá mức độ tổn thương đến chức năng protein của biến đổi sai nghĩa c.4538A>G (E1513G), c.4540C>A (L1514I) gen *TET2*; và c.3221A>C (Q1074P) gen *ASXL1* trên ứng dụng Polyphen2



Hình 3.4. Đánh giá mức độ tổn thương đến chức năng protein của biến đổi di truyền gen *DNMT3A*: c.1585G>A (D529N), c.1390A>G (K464E), c.1069G>A (A357T) trên ứng dụng Polyphen2

Kết quả giải trình tự gen *DNMT3A* ở bảng 3.4 có tất cả 5 biến đổi di truyền được phát hiện trên 3 bệnh nhân và đều chưa được công bố trên các cơ sở dữ liệu hay nghiên cứu trước đây. Trong đó, có 2 đột biến dịch khung đọc (c.1393_1394insG, c.634_637delAGGG) và 3 biến đổi sai nghĩa thay thế 1 axit amin (c.1390A>G, c.1585G>A, c.1069G>A).

Hình 3.3a, b và c cho thấy 3 biến đổi sai nghĩa: c.4538A>G, c.4540C>A gen *TET2* và c.3221A>C gen *ASXL1* không gây tổn thương chức năng protein với điểm đánh giá lần lượt là 0.007/1, 0.3/1 và 0.002/1.

Biến đổi sai nghĩa c.1585G>A trên hình 3.4 làm thay thế axit amin Aspartic thành Asparagine tại vị trí 529 trên phân tử protein. Hình 4a cho thấy đây là đột biến gây tổn thương đến chức năng protein với điểm đánh giá là 0.992/1; Hình 4b mô phỏng cấu trúc 3D của protein bị đột biến với tổn thương xảy ra tại domain ADD là trung gian tương tác của *DNMT3A* với các yếu tố phiên mã. Hình 4c và 7d cho thấy 2 biến đổi sai nghĩa c.1390A>G và c.1069G>A không gây tổn thương chức năng protein với điểm đánh giá lần lượt là 0.02/1 và 0.037/1.

4. BÀN LUẬN

Khuyến cáo của NCCN được tổng hợp dựa trên các công bố về việc ứng dụng NGS trong phân tích đột biến ở bệnh nhân MDS. Trong đó, 4 gen đặc trưng có tần suất đột biến cao ở bệnh nhân MDS là: *SF3B1* (20-30%), *TET2* (20-25%), *ASXL1* (15-25%), *DNMT3A* (12-18%). Đây là những gen liên quan đến các quá trình quan trọng trong tế bào như: quá trình cắt nối ARN thông tin (*SF3B1*), quá trình methyl hóa ADN (*TET2*, *DNMT3A*) và hoàn thiện protein histone (*ASXL1*) [4].

Hiện nay, NGS đang được ứng dụng trong nhiều bệnh máu ác tính nhờ vào những ưu điểm vượt trội như: có thể giải trình tự đồng thời nhiều gen đích, độ nhạy cao giúp phát hiện các đột biến theo dòng tế bào hay đột biến xuất hiện với tỷ lệ thấp ở giai đoạn sớm của bệnh. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có

công bố nào sử dụng NGS để phân tích đột biến cho bệnh nhân MDS. Vì 4 gen đích có kích thước tương đối lớn từ 52 kb (*SF3B1*) đến >140 kb (*TET2*), đối với những gen này thì việc giải trình tự toàn bộ gen là không khả thi vì việc phân lập tương đối phức tạp và dữ liệu giải trình tự lớn. Chính vì vậy, nghiên cứu này tập trung vào việc giải trình tự vùng chứa mã di truyền và vùng điều hòa dịch mã (5'UTR, 3'UTR). Kết quả phân lập 4 gen *SF3B1*, *TET2*, *ASXL1* và *DNMT3A* được thể hiện trong Hình 1. Tổng cộng có 10 đoạn sản phẩm phân lập của 4 gen, tất cả 10 đoạn sản phẩm của mỗi mẫu bệnh nhân được trộn chung và gắn cùng mã phân biệt khi chuẩn bị thư viện ADN. Kết quả đánh giá chất lượng thư viện ADN và chất lượng của mẻ giải trình tự NGS được mô tả trong Hình 3.2a và Hình 3.2b.

Sau khi xử lý dữ liệu trên phần mềm tin sinh chuyên dụng là CLC Genomic Workbench, các biến đổi di truyền được chú giải (đặt tên theo quy ước HGVS) sau đó định danh trong cơ sở dữ liệu dbSNP và COSMIC. Những biến đổi đã biết được xác định mối liên hệ với tình trạng bệnh thông qua ClinVar, những biến đổi mới được đánh giá khả năng tổn thương protein dựa trên công cụ Polyphen2. Kết quả phân tích đột biến trên các gen *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A* của 9 bệnh nhân được thể hiện trong Bảng 3.3 – 3.5; nghiên cứu không phát hiện được biến đổi di truyền nào trên gen *SF3B1* có thể do cỡ mẫu chưa đủ lớn.

Bảng 3.3 tổng hợp kết quả phân tích đột biến gen *TET2*, 8/9 bệnh nhân xuất hiện ít nhất 1 trong 3 biến đổi sai nghĩa (p.Pro29Arg, p.Leu1721Trp, p.Ile1762Val) là các biến đổi dòng mầm, những biến đổi này được báo cáo lần đầu bởi Bodian (2014) [5]. Nghiên cứu gần đây của Jinjun Hu (2019) đưa ra giả thuyết chưa có kiểm chứng rằng những biến đổi dòng mầm này liên quan đến tỷ lệ mắc MDS thấp hơn, tuy nhiên số liệu của nghiên cứu này lại cho thấy một tỷ lệ khá cao bệnh nhân MDS có các biến đổi dòng mầm [6]. Ngoài ra, nghiên cứu còn phát hiện được 2

biến đổi sai nghĩa thử phát mới (p.Glu1513Gly, p.Leu1514Ile) mà không gây tổn thương đến chức năng protein (Hình 3.3). Nghiên cứu cũng phát hiện được 3 đột biến làm dừng khung đọc là: p.Q574*, p.R1465*, p.Y1608*; trong đó đột biến p.Y1608* chưa được công bố trong bất kỳ nghiên cứu nào trước đây. Các đột biến làm dừng khung đọc trên gen *TET2* thường được quan sát trong giai đoạn sớm của bệnh MDS và được ghi nhận là có tiên lượng thuận lợi độc lập với đánh giá theo IPSS [7].

Bảng 3.4 tổng hợp kết quả phân tích đột biến gen *ASXL1*, 1 bệnh nhân phát hiện được biến đổi di truyền sai nghĩa và 1 bệnh nhân phát hiện được đột biến dịch khung đọc. Biến đổi sai nghĩa p.Gln1074Pro không gây tổn thương đến chức năng protein (Hình 3c) và đột biến dịch khung đọc chèn 1 nucleotide vào giữa vị trí 1681 và 1682 của gen *ASXL1* (c.1681_1682insT). Cả hai biến đổi di truyền này chưa được công bố trên các cơ sở dữ liệu. Năm 2016, Yun Lin thực hiện một nghiên cứu phân tích dữ liệu lớn từ 6 nghiên cứu khác nhau với 1689 bệnh nhân, nghiên cứu đã chỉ ra rằng những đột biến dịch khung đọc và dừng khung đọc liên quan đến tiên lượng xấu ở bệnh nhân MDS. Tác giả có đưa ra khuyến cáo là việc nghiên cứu đột biến gen *ASXL1* góp phần phân tầng nguy cơ và đưa ra bảng tính điểm tiên lượng mới thay thế cho IPSS [8], [9].

Bảng 3.5 là kết quả phân tích đột biến gen *DNMT3A* của 9 bệnh nhân nghiên cứu. Có tất cả 5 biến đổi di truyền được phát hiện và đều chưa từng được công bố trong các nghiên cứu trước đây. Trong đó, 1 biến đổi sai nghĩa làm tổn thương chức năng protein là p.Asp529Asn (Hình 3.4); 2 biến đổi sai nghĩa không ảnh hưởng đến chức năng protein là p.Ala357Thr, p.Lys464Glu (Hình 3.4); 2 đột biến làm dịch khung đọc là c.1393_1394insG, c.634_637delAGGG. Hầu hết các nghiên cứu đều ghi nhận đột biến trên gen *DNMT3A* liên quan đến hiệu quả điều trị kém trên bệnh nhân MDS và xuất hiện ở những bệnh nhân giai đoạn tiền lờ xê mi hay bệnh nhân MDS chuyển AML [9], [10].

Những năm gần đây, các nghiên cứu phân tích đột biến gen trong MDS đều hướng đến việc làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh và đưa ra một tiêu chí đánh giá tiên lượng dựa trên các chỉ thị phân tử để bổ sung hoặc thay thế IPSS. Trong nghiên cứu này, mối liên hệ giữa đột biến gen (Bảng 3.3 – 3.5) với giá trị tiên lượng (Bảng 3.2) của bệnh nhân cũng có điểm chưa tương đồng. Một trong 2 bệnh nhân nguy cơ cao (453) phát hiện được 1 đột biến dịch khung đọc, đây là bệnh nhân điều trị không hiệu quả và chuyển cấp thể M3 sau 2 tháng. Kết quả này tương thích với nghiên cứu của Thol (2011) là các đột biến dịch khung đọc gen *ASXL1* liên quan đến thời gian sống ngắn, chuyển AML và có thể sử dụng như một yếu tố tiên lượng độc lập [9]. Bệnh nhân nguy cơ cao thứ 2 (653) thuộc nhóm MDS-EB-2, đây là nhóm bệnh thường chuyển cấp sau 3 đến 6 tháng. Tuy nhiên, các chỉ số huyết học của bệnh nhân khá ổn định sau 2 năm điều trị. Đồng thời kết quả giải trình tự NGS cũng không phát hiện được đột biến nào trên 4 gen nghiên cứu. Kết quả này phần nào cho thấy sự chưa tương thích giữa đặc điểm của bệnh nhân với những tiêu chuẩn tiên lượng hiện hành và việc cần mở rộng phân tích các gen khác nằm ngoài phạm vi của nghiên cứu này.

5. KẾT LUẬN

Giải trình tự gen thế hệ mới là công cụ hữu ích để phân tích các biến đổi di truyền gây bệnh ở những gen đặc trưng đã biết; hỗ trợ bác sĩ trong chẩn đoán và xếp loại nguy cơ cho bệnh nhân rối loạn sinh tủy.

Lời cảm ơn

Chúng tôi chân thành cảm ơn Ban giám đốc Viện Huyết học - Truyền máu TW, Lãnh đạo và các đồng nghiệp Khoa bệnh máu tổng hợp (Viện Huyết học - Truyền máu TW) đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bonadies N, Feller A, Rovo A, Ruefer A, Blum S, Gerber B, Arndt V. et al (2017), Trends of classification,

- incidence, mortality, and survival of MDS patients in Switzerland between 2001 and 2012. *Cancer Epidemiology*, 46: 85–92.
2. **Abdel-Wahab O, Figueroa ME (2012)**, Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *ASH Education Program Book*, (1):56–64.
 3. **Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Rehm HL et al (2015)**, Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5):405–423.
 4. **Greenberg PL, Gaensler K, Maness LJ (2017)**, NCCN Guidelines Index Table of Contents Discussion. *Myelodysplastic Syndromes*, 83.
 5. **Bodian DL, McCutcheon JN, Kothiyal P, Huddleston KC, Iyer RK, Vockley JG, Niederhuber JE (2014)**, Germline variation in cancer-susceptibility genes in a healthy, ancestrally diverse cohort: implications for individual genome sequencing. *PloS One*, 9(4):e94554.
 6. **Hu J, Xu J, Tian T, Xie J, Fan L, Zhu G, Xu Z et al (2019)**, TET2 rs2454206, TET2 rs12498609 and ASXL1 rs3746609 single nucleotide polymorphisms in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 74:44–50.
 7. **Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, des Myélodysplasies GF (2009)**, TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*, 114(15), 3285–3291.
 8. **Lin Y, Zheng Y, Wang ZC, Wang SY (2016)**, Prognostic significance of ASXL1 mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia: A meta-analysis. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 21(8):454–461.
 9. **Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, Ganser A (2011)**, Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(18):2499–2506.
 10. **Lin ME, Hou HA, Kuo YY, Chou WC, Lee MC, Chen CY, Tien HF (2012)**, DNMT3A mutations in De Novo Myelodysplastic Syndrome: Distinct Clinico-Biological Features and Prognostic Relevance. *Blood*, 120(21):3799–3799.

SUMMARY**APPLICATION OF NEXT GENERATION SEQUENCING FOR MUTATION DETECTION IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES**

Nguyen Quang Hao², Tran Tuan Anh¹, Nguyen Le Anh¹, Kieu Ha Trang², Vu Minh Phuong², Vu Duc Binh¹, Nguyen Ngoc Dung¹, Duong Quoc Chinh¹, Bach Quoc Khanh¹

¹ National Hematology and Tranfusion Hospital

² Hanoi Medical University

Objectives: Identification of the causative mutation using next-generation sequencing in myelodysplastic syndromes patients. **Methods:** 9 MDS patients have been diagnosed and treated in National Institute of Hematology and Blood Transfusion. In this study, we performed next-generation sequencing for detection of mutations in genes related to MDS. **Results:** In this report four known MDS related genes were screened by next-generation sequencing in nine patients. Three nonsense mutations in TET2 (c.1720C>T, c.4393C>T and c.4824T>A); one frameshift mutation in ASXL1 (c.1681_1682insT); one missense mutation (c.1585G>A) and two frameshift mutations (c.634_637delAGGG and c.1393_1394insG) in DNMT3A were in nine MDS patients. One of the three mutations in TET2 (c.4824T>A), one mutation in ASXL1 (c.1681_1682insT), all of the three mutations in DNMT3A (c.1585G>A, c.634_637delAGGG, c.1393_1394insG) were novel mutations. In addition, we identified two novel variants in TET2 (c.4538A>G, c.4540C>A), one novel variant in ASXL1 (c.3221A>C) and two novel variants in DNMT3A (c.1390A>G, c.1069G>A). Mutations reported here could help clinicians and geneticists in MDS diagnosis. **Conclusion:** The next-generation sequencing of known MDS genes is useful for finding pathological variants for the diagnosis, follow-up, and risk stratification of MDS patients.

Key words: MDS, NGS, SF3B1, TET2, ASXL1, DNMT3A