

XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN ĐẢO ĐOẠN INTRON 22 TRÊN BỆNH NHÂN HEMOPHILLIA A BẰNG KỸ THUẬT INVERSION PCR

Lưu Vũ Dũng¹, Trần Văn Khánh¹, Nguyễn Trọng Tuệ¹,
Nguyễn Việt Tiến², Tạ Thành Văn¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội, ²Bệnh viện Phụ sản Trung ương

Bệnh Hemophilia A là bệnh rối loạn đông máu, di truyền lặn trên nhiễm sắc thể giới tính X, tần suất mắc bệnh là 1/5000 trẻ trai. Ở bệnh nhân Hemophilia A thể nặng, nồng độ protein yếu tố VIII trong máu rất thấp, chỉ $\leq 1\%$ so với người bình thường, gây nên các biến chứng chảy máu nặng nề trong ổ khớp, cơ hay cơ quan nội tạng. Đột biến đảo đoạn intron 22 chiếm 45 - 50% bệnh nhân Hemophilia A thể nặng do hiện tượng tái tổ hợp một trong hai bản sao tương đồng nằm ngoài gen F8. Nghiên cứu bước đầu xác định đột biến đảo đoạn intron 22 trên bệnh nhân Hemophilia A và người lành mang gen bệnh bằng phương pháp Inversion PCR (I - PCR). Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 5 bệnh nhân Hemophilia A thể nặng đã được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu. Sử dụng kỹ thuật I - PCR để xác định đột biến đảo đoạn intron 22. Kết quả cho thấy 1/5 bệnh nhân được xác định là có đột biến đảo đoạn intron 22. Bước đầu đã xác định được đột biến đảo đoạn intron 22 trên bệnh nhân Hemophilia A. Viết Nam bằng kỹ thuật I - PCR.

Từ khóa: Hemophilia A, đảo đoạn intron 22, inversion - PCR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hemophilia A là bệnh rối loạn đông máu di truyền hay gặp nhất với tần suất mắc 1/5000 trẻ trai. Bệnh gây nên do thiếu hoặc không có yếu tố VIII, là một trong những yếu tố tham gia quá trình đông máu. Độ nặng của bệnh Hemophilia A phụ thuộc vào nồng độ protein yếu tố VIII trong máu. Ở bệnh nhân thể nặng, nồng độ protein yếu tố VIII trong máu rất thấp, $\leq 1\%$ so với người bình thường, các triệu chứng lâm sàng như chảy máu trong cơ, khớp hoặc các bộ phận khác thường xảy ra tự nhiên hoặc sau các chấn thương nhỏ và xuất hiện rất sớm. Về lâu dài, bệnh nhân bị xuất huyết tái phát đặc biệt tại các khớp và gây cứng khớp [1]. Cấu trúc gen mã hóa yếu tố VIII (gen F8) và cơ chế bệnh học phân tử của bệnh

hemophilia A đã được nghiên cứu đầy đủ và đã công bố năm 1984. Gen F8 là một trong những gen lớn nhất cơ thể, nằm trên nhánh dài của NST giới tính X (Xq28), kích thước 186 kb gồm 26 exon có chiều dài từ 69 đến 3106 cặp bp và 6 intron có kích thước hơn 14 kb. Intron 1, 6, 13, 14, 22, 25, trong đó intron 22 có kích thước lớn nhất 32,8 kb [5].

Gen F8 có nhiều dạng đột biến đã được công bố. Các nghiên cứu khẳng định dạng đột biến khác nhau trên gen F8 gây những kiểu hình đặc trưng khác nhau của bệnh hemophilia A. Bệnh nhân Hemophilia A thể nặng thường gặp dạng đột biến đảo đoạn intron 22 (chiếm 45 - 50%)

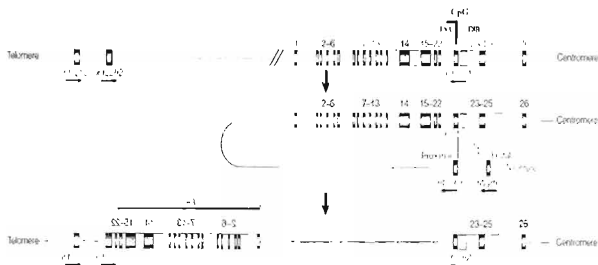
Lakich và cộng sự năm 1993 [3] đã phát hiện ra một đoạn CpG nằm ở vị trí cách đầu 3' của exon 22 khoảng 10 kb hoạt động như một promoter hai chiều cho hai gen phiên mã, gọi là gen F8A và F8B; trong đó, gen F8A phiên mã ngược chiều với gen F8 và chính đoạn F8A tái tổ hợp với 1 trong 2 bản sao tương đồng nằm ngoài gen F8 gây nên hiện tượng đột biến đảo đoạn.

Địa chỉ liên hệ: Tạ Thành Văn, Trung tâm Gen - Protein,
Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tathanhvan@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 19/4/2013

Ngày được chấp thuận: 20/6/2013



Hình 1. Cơ chế gây đột biến đảo đoạn intron 22 của yếu tố VIII

Do đoạn trình tự int22h - 1 của intron 22 có độ tương đồng rất cao với hai vùng int22h - 2 và int22h - 3 nằm ngoài gen F8 nên hiện tượng tái tổ hợp tương đồng diễn ra ngay trên nhiễm sắc thể X tại vị trí gen F8, phân cắt gen F8 thành 2 đoạn exon 1-22 và 23 - 26 cách nhau khoảng 400bp. Nghiên cứu nhằm bước đầu xác định đột biến đảo đoạn intron22 trên bệnh nhân Hemophilia A và người lành mang gen bệnh bằng phương pháp Inversion PCR (I - PCR)

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

- Nhóm chứng 3 người nam bình thường khỏe mạnh
- Nhóm nghiên cứu
 - + 05 bệnh nhân Hemophilia A thể nặng đã được chẩn đoán trên lâm sàng dựa vào các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng điển hình
 - + Người mẹ của bệnh nhân để xác định người lành mang gen bệnh

2. Phương pháp

2.1. Kỹ thuật tách chiết DNA

- + DNA được tách chiết từ bạch cầu máu ngoại vi của bệnh nhân, người mẹ bệnh nhân và người bình thường theo phương pháp phenol/chloroform
- + Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của

DNA được tách chiết bằng phương pháp đo quang trên máy NanoDrop nồng độ DNA 300-380ng/ml, đánh giá độ tinh sạch bằng tỷ lệ $A_{260nm}/A_{280nm} = 1,8 \pm 2,0$

2.2. Kỹ thuật Inversion – PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 22 của gen F8

Quy trình gồm 3 bước

- + Cắt bằng enzym *BclI* Thành phần phản ứng gồm 1,5 µg DNA, H₂O 25,5 µl, buffer 10X 3µl, enzym *BclI* 1,5 µl (Promega). Ủ 37°C/4 giờ; Tinh sạch bằng phenol cloroform và chloroform - isoamlic alcohol (24 1). Rửa và cô định DNA bằng alcol, pha loãng DNA thu được trong 20 µl H₂O
- + Nối bằng *T4 ligase* Thành phần phản ứng gồm 20 µl DNA, buffer 10X 20µl, enzym *T4 ligase* 1,0 µl (Promega) Ủ 41 µl hỗn hợp trên ở 16°C qua đêm. Tinh sạch sản phẩm thu được bằng cột GFX™ theo quy trình của hãng

Amersham Pha loãng sản phẩm DNA đóng vòng trong 20 μ l H₂O

+ Kỹ thuật I - PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 22:

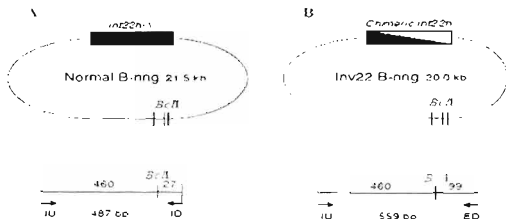
Phản ứng multiplex I - PCR với trình tự ba môi được thiết kế dựa vào trình tự hệ gen người và vị trí của enzym cắt giới hạn *Bcl*I đã được chứng minh bằng phương pháp Southern Blot PCR

Thành phần phản ứng PCR tổng thể tích 20 μ l gồm H₂O 12,0 μ l, buffer 10 X 2 μ l,

dNTPs 1,0 μ l, DNA 3 μ l, Extaq 0,5 μ l, mỗi IU 0,5 μ l, ID 0,5 μ l, ED 0,5 μ l.

Chu kỳ nhiệt phản ứng multiplex - PCR 94°C/2 phút, 194°C/12 giây, 62°C/30 giây, 68°C/7 phút x 35 chu kỳ, 72°C/5 phút

Các môi IU, ID được thiết kế có chứa trình tự enzym cắt giới hạn *Bcl*I nằm ở hai đầu của int22h - 1 (hình 2 A). Khi 2 đầu DNA được nối lại bằng enzym T4 ligase sẽ cho 2 sản phẩm DNA vòng có kích thước 21,5 và 20 kb



Hình 2 Các đoạn DNA đóng vòng sau khi nối bằng T4 ligated

Đoạn DNA đóng vòng có kích thước là 21,5kb, chứa đoạn int22h-1 ở vùng BX842559 trên gen Bank, có vị trí của enzym cắt giới hạn *Bcl*I, base 36204 trên mỗi IU và base 14595 trên mỗi ID. Ở người bình thường mỗi IU và ID bắt cặp với nhau tạo ra 1 đoạn DNA có kích thước 487bp

Khi hiện tượng đảo đoạn xảy ra, đoạn int22h - 1 nằm trong gen F8 được thay thế bằng đoạn int22h - 2 hoặc int22h - 3 nằm ngoài gen F8 cách đầu telomere 500kb, do đó DNA vòng có kích thước là 20kb (hình 2 B). Mỗi IU sẽ bắt cặp với mỗi ED (mỗi ED được thiết kế nằm cạnh int22h - 2 và intron, 22h - 3 có chứa trình tự enzym cắt giới hạn *Bcl*I). So sánh trình tự mỗi ED trên Genbank ở vùng BX

276110 thấy vị trí *Bcl*I trên int22h-3 là base 14703 và vùng BX 683327 có vị trí *Bcl*I trên int22h-2 là base 15265. Đột biến đảo đoạn sẽ khuếch đại đoạn DNA có kích thước 559bp

Sản phẩm sau khi khuếch đại được điện di trên gel agarose 1.5% với Marker ~100bp và nhuộm bởi ethidium bromid để kiểm tra đột biến đảo đoạn

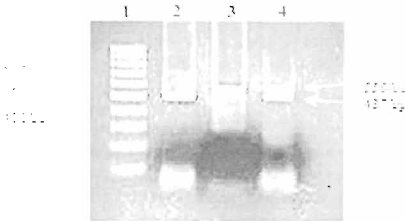
III. KẾT QUẢ

1. Kết quả của phản ứng Inversion - PCR (I - PCR)

Tiến hành khuếch đại sản phẩm nối bởi enzym ligase. Kết quả cho thấy 1/5 bệnh nhân được phát hiện có đột biến đảo đoạn intron 22.

Để xác định xem mẹ của bệnh nhân có phải là người lành mang gen bệnh truyền cho con trai, quy trình tương tự cũng được tiến

hành trên mẫu DNA của người mẹ. Kết quả cho thấy mẹ bệnh nhân là người lành mang gen bệnh truyền cho con trai.



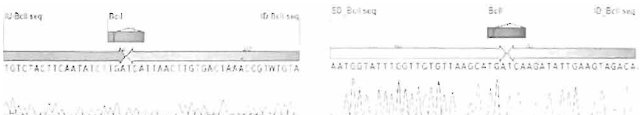
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| 1. Marker kích thước 100bp | 2. Người bình thường |
| 3. Bệnh nhân đột biến đảo đoạn int22 | 4. Người mẹ mang gen bệnh |

Người bình thường (giếng số 2) có 1 băng kích thước tương ứng 487 bp, giếng số 3 là sản phẩm khuếch đại của bệnh nhân Hemophilia A thể nặng có 1 băng kích thước tương ứng 559 bp, như vậy bệnh nhân bị đột biến đảo đoạn intron 22. Giếng số 4 là sản phẩm khuếch đại của người mẹ có 2 vạch DNA kích thước tương ứng là 487 và 559bp, như vậy người mẹ là người mang gen bệnh.

2. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp giải trình tự

Để đảm bảo chính xác các vạch DNA trên đúng là đoạn DNA cần tìm, gel có chứa đoạn DNA kích thước 559 bp ở mẫu bệnh nhân và đoạn DNA kích thước 487 bp ở người mẹ được cắt để tinh sạch rồi giải trình tự kiểm tra trình tự nucleotid của đoạn DNA trên so với trình tự gen Bank. Kết quả như sau:



Hình 4. Hình ảnh giải trình tự 2 đoạn DNA kích thước 487bp (mỗi IU - ID) và đoạn 559bp (mỗi IU - ED)

Giải trình tự đoạn DNA có kích thước 487 bp và so sánh với trình tự GenBank BX 842559 thấy có vị trí mỗi IU từ nucleotid 35744 đến nucleotid 35763, mỗi ID nằm ở vị trí từ nucleotid 14622 đến nucleotid 14602. Ở vị trí cách mỗi ID 27 nucleotid và mỗi IU 460 nucleotid có 1 trình tự enzym cắt *BclI* là T/GATCA.

Giải trình tự đoạn DNA kích thước 559 bp và so sánh với trình tự gen Bank BX 842559 thấy có vị trí mỗi IU từ nucleotid 35744 đến nucleotid 35763, mỗi ED từ vị trí nucleotid 15364 đến nucleotid 15347 trên gen Bank BX 682237. Ở vị trí cách mỗi ED 99 nucleotid và mỗi IU 460 nucleotid có 1 trình tự enzym cắt *Bcl* II là T/GATCA.

IV. BÀN LUẬN

Bệnh Hemophilia A di truyền qua các thế hệ và liên quan đến NST giới tính X, nên việc xác định chính xác đang và vị trí đột biến trên gen F8 ở bệnh nhân là bước đầu tiên rất quan trọng. Kết quả đột biến gen F8 của bệnh nhân là cơ sở khoa học cho những phân tích phát hiện đột biến gen đối với các thành viên trong gia đình bệnh nhân và phát hiện người lành mang gen bệnh.

Bệnh nhân hemophilia A thể nặng chiếm tỷ lệ cao và nguyên nhân do đột biến đảo đoạn intron 22 chiếm 45%. Việc xác định đảo đoạn intron 22 đòi hỏi những kỹ thuật khá phức tạp. Do đó, việc tìm ra một phương pháp xác định đột biến đảo đoạn intron 22 có kết quả nhanh, chính xác và thuận tiện là rất quan trọng.

Ba kỹ thuật chính được sử dụng để phát hiện đột biến đảo đoạn intron 22 gồm:

Kỹ thuật Southern blot xác định đột biến đảo đoạn intron 22

Phương pháp Southern Blot được miêu tả bởi Lakich và cộng sự năm 1993. Thủy phân DNA bằng enzym *Bcl* II, sử dụng mẫu dò đánh dấu phóng xạ P32 để xác định đột biến. Ở người bình thường, enzym sẽ cắt DNA làm 3 đoạn có kích thước 21,5kb, 16kb và 14kb. Nếu kết quả có kích thước 20kb, 17,5kb, 14kb hay 20kb, 16kb, 15,5kb tương ứng với: đột biến đảo đoạn intron 22 týp 1 (inv 22 - 1) và týp 2 (inv 22 - 2) [3].

Kỹ thuật này phức tạp, tốn công sức và

phải mất 8 - 10 ngày mới có kết quả. Bên cạnh đó, sử dụng chất phóng xạ gây nguy hiểm cho người thực hiện kỹ thuật, sử dụng chất màu huỳnh quang ít nguy hiểm hơn nhưng lại có độ nhạy thấp hơn.

Kỹ thuật LD - PCR xác định đột biến đảo đoạn intron 22

Phương pháp LD - PCR được miêu tả bởi Liu, Q và cộng sự 1998. Liu Q và cộng sự đã thiết kế phản ứng PCR đặc biệt để có thể khuếch đại một đoạn gen F8 rất dài ≥ 10 kb và đặt tên là phản ứng Long Distance PCR (LD - PCR). Sử dụng cặp mồi PQ được thiết kế bám đặc hiệu với vùng intron 22 và cặp mồi AB được thiết kế đặc hiệu cho 2 vùng intron 22h2 và intron 22h3. Hình ảnh điện di trên gel agarose 0.6% trong 6 - 8 giờ, sản phẩm khuếch đại LD - PCR với mẫu DNA người bình thường cho 2 băng có kích thước 10 kb và 12 kb, với người bị đột biến đảo đoạn intron 22 cho 2 băng kích thước 10 và 11kb, với người lành mang gen cho 3 băng kích thước 10, 11 và 12 kb [6].

Kỹ thuật LD - PCR có ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện, cho kết quả nhanh chóng và giá thành rẻ hơn so với kỹ thuật Southern Blot, do vậy rất nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới đã sử dụng kỹ thuật này. Tuy nhiên kỹ thuật LD - PCR có nhược điểm không xác định được đảo đoạn intron týp 1 hay týp 2 và khuếch đại đoạn DNA khá dài (10 - 12kb), chứa những đảo GC nên gặp không ít khó khăn khi thực hiện kỹ thuật.

Kỹ thuật I - PCR

Phương pháp I - PCR được miêu tả bởi Rosetti và cộng sự 2005 [4]. Hình 3 cho thấy bệnh nhân bị đột biến đảo đoạn intron 22, ứng với kiểu hình trên lâm sàng, bệnh nhân mắc bệnh hemophilia A thể nặng và người mẹ bệnh nhân ở trạng thái dị hợp tử (người lành mang gen bệnh).

Kết quả trên được khẳng định bằng hình ảnh giải trình tự các đoạn DNA 487 và 559 bp (hình 4) các đoạn gen có đầy đủ trình tự vị trí bám của mỗi, trình tự của enzyme *BclI* và các vị trí này tương ứng với các vị trí đã được Rossetti và cộng sự công bố [4]

Phương pháp I - PCR có ưu điểm là dễ tiến hành Enzym *BclI* tác dụng rất đặc hiệu nên sản phẩm cắt enzyme có tính đặc hiệu cao Sản phẩm PCR được khuếch đại dễ dàng trong thời gian khoảng 30 phút do các đoạn DNA có kích thước ngắn (487 và 559 bp) Như vậy xét nghiệm phân tích gen được tiến hành nhanh chóng, kết quả thu được có độ tin cậy cao, là cơ sở để tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh sớm cho những người mẹ dị hợp tử mang thai

Mặc dù nghiên cứu được tiến hành với số lượng bệnh nhân hạn chế, tỷ lệ đột biến đảo đoạn thấp hơn so với các nghiên cứu trước đây (1/5 bệnh nhân), nhưng đây mới chỉ là nghiên cứu bước đầu Việc xác định đột biến đảo đoạn thành công bởi một kỹ thuật khó sẽ góp phần quan trọng trong việc xây dựng một bức tranh hoàn chỉnh về các dạng đột biến gen F8 trên bệnh nhân Hemophilia A Việt Nam, đồng thời là tiền đề quan trọng trong phát hiện người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh, tư vấn di truyền nhằm giảm tỷ lệ mắc bệnh

V. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp I - PCR, nghiên cứu đã phát hiện được đột biến đảo đoạn gen F8 ở bệnh nhân hemophilia A thể nặng và xác định người mẹ bệnh nhân ở trạng thái dị hợp tử

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Ngọc Minh (2007). Bệnh Hemophilia Bài giảng huyết học truyền máu (Sau đại học) Nhà xuất bản Y học. 539 - 548
2. Anne Goodeve (2008). Molecular Genetic testing of Hemophilia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 34 (6), 491 - 501
3. Lakich D., Kazazian H.Jr, Antonarakis S.E., Gitchier J., (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe Hemophilia A *Nature publishing group* 5, 236 - 241
4. Rossetti L.C., Radic C. F., Larripa I.B., De Brasi C.D (2005). Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot by Use of Inverse PCR *Hemostasis and Thrombosis*, 154 - 158.
5. Rossetti L.C., Radic C.P., Abelleiro M.M et al (2011). Eighteen Years of Molecular Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot From Southern Blot to Inverse Shifting-PCR *International Journal of Molecular Sciences* 12, 7271 - 7285
6. Liu, Q., Nozari G., Sommer S.S., (1998). Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood* 92, 1458 -1459

Summary

IDENTIFICATION OF INTRON 22 INVERSION IN HEMOPHILIA A PATIENT BY INVERSION – PCR

Hemophilia A is an inherited recessive X-linked disease caused the abnormal blood coagulation, with an incidence of about 1 out of 5 000 males In severe Hemophilia A patient, low blood concentration of protein factors VIII ($\leq 1\%$ when compared to normal), triggers severe bleeding in the joints, muscles, or other internal organs Inversion intron 22 accounted for 45 - 50% of severe Hemophilia A patients due to recombination of homologous copies outside the F8 gene Objectives of the study were to identify intron 22 inversion in severe Hemophilia A patients by

inversion - PCR Five severe Hemophilia A patients were selected for this study; we use Inversion - PCR to analyse intron 22 inversion in F8 gene 1/5 patients were found to have intron 22 inversion In conclusion, intron 22 inversion was successfully identified in Vietnamese severe Hemophilia A patients by I - PCR technique

Keywords: Hemophilia A, inversion intron 22, inversion - PCR

BẢO QUẢN TẾ BÀO GỐC TÙY RĂNG CHUỘT

Tó Minh Quân¹, Lê Thị Ngọc Hương¹, Hoàng Đạo Bảo Trâm²

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Y - Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tế bào gốc tủy răng chuột nhắt trắng *Mus musculus var albinus* được bảo quản trong môi trường DMEM/F12 bổ sung DMSO 10%, FBS 20% theo 2 quy trình giảm nhiệt (1) để trong điều kiện 4°C/20 phút, -20°C/30 phút, sau đó chuyển sang bảo quản ở -80°C; (2) để trong điều kiện -20°C/30 phút và bảo quản ở -80°C. Tế bào đông lạnh được giải đông trong môi trường nuôi cấy DMEM/F12 bổ sung FBS 20% ở 37°C. Các tế bào được tiếp tục nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12, bổ sung FBS 10%, Peniciline 100UI/ml, Streptomycine 100µg/ml, ở điều kiện 37°C, CO₂ 5%. Tỷ lệ tế bào sống sau quá trình bảo quản đông lạnh ở thời điểm 1 ngày, 2 tuần, 4 tuần và 8 tuần được đánh giá bằng phương pháp nhuộm Trypan Blue. Sự biểu hiện các marker bề mặt tế bào được kiểm tra bằng phương pháp Flow Cytometry. Thử nghiệm cho thấy tế bào tủy răng chuột được bảo tồn trong thời gian 4 tuần theo quy trình đông lạnh -20°C/20 phút và bảo quản ở -80°C. Sau khi giải đông, các tế bào có khả năng bám, tăng trưởng và biểu hiện các marker của tế bào gốc trung mô CD73, CD90, CD105 và không biểu hiện các marker của tế bào máu CD19, CD34, CD45.

Từ khóa: tế bào gốc tủy răng, bảo quản tế bào, nuôi cấy tế bào

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc là những tế bào chưa biệt hóa trong mô sống, có khả năng trở thành các tế bào chuyên biệt với các chức năng đặc trưng [1]. Trong điều kiện *in vivo* hoặc *in vitro*, mỗi tế bào gốc có thể tự làm mới với các tính năng riêng biệt mới. Ngày nay, tế bào gốc được tách và thu nhận từ rất nhiều nguồn (phôi giai đoạn tiền lam tổ, thai, cơ thể trưởng thành, ...) Tủy răng là vùng tế bào giúp răng sống và duy

trì chức năng. Tương tự như tủy xương, tủy răng chứa các tế bào gốc trung mô. Ngoài ra, tủy răng còn chứa tế bào tiền nguyên bào ngà, tế bào tạo máu. Tế bào tủy răng là nguyên liệu quan trọng cho những nghiên cứu trong lĩnh vực tái tạo răng. Sau thành công của Gronthos năm 2000 trong việc phân lập và nuôi cấy tế bào gốc tủy răng người [2], trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu tiếp tục phát triển theo hướng này. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu đã cho kết quả nuôi cấy thành công tế bào từ mảnh mô tủy răng người [3, 4].

Song song với việc phân lập tế bào gốc, kỹ thuật bảo quản tế bào gốc đông vật cũng phát triển và mở ra một kỷ nguyên mới trong công nghệ tế bào đông vật. Với mục tiêu xuyên suốt

Địa chỉ liên hệ: Hoàng Đạo Bảo Trâm, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 217 Hồng Bàng, Quận 5, TP HCM
email: hoangdaobaotram@gmail.com

Ngày nhận: 13/03/2013

Ngày được chấp thuận: 20/6/2013