

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Dương Thu Trang

**XÁC ĐỊNH ĐỘ BIẾN GEN GÂY BỆNH DỊCH KÍNH-VỠNG
MẠC XUẤT TIẾT DO DI TRUYỀN Ở TRẺ EM VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ
Sinh học thực nghiệm

Hà Nội – 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Dương Thu Trang

**XÁC ĐỊNH ĐỘ BIẾN GEN GÂY BỆNH DỊCH KÍNH-VỖNG MẠC
XUẤT TIẾT DO DI TRUYỀN Ở TRẺ EM VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
PGS.TS. Nguyễn Hải Hà

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan kết quả trình bày trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi và các cộng sự tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn Lâm Khoa Học Việt Nam. Các số liệu và kết quả trong luận văn là trung thực và chưa từng được công bố trong các công trình nghiên cứu trước đây. Nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Dương Thu Trang

Lời cảm ơn

Sau những ngày tháng miệt mài nghiên cứu, tôi đã hoàn thành nội dung luận văn “Xác định đột biến gen gây bệnh dịch kính-võng mạc xuất tiết do di truyền ở trẻ em Việt Nam”. Tôi luôn biết ơn những sự ủng hộ, hỗ trợ cùng những đóng góp nhiệt tình của những người bên cạnh mình. Nhân đây tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn sâu sắc đến họ.

Lời đầu tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Hải Hà – Phó Trưởng Phòng Phân tích hệ gen, Viện nghiên cứu hệ gen, người đã hướng dẫn, tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ, chia sẻ những khó khăn cùng tôi trong suốt quá trình làm việc và hoàn thành luận văn. Xin cảm ơn cô đã truyền đạt kiến thức, định hướng và chỉ bảo cho tôi trong suốt thời gian qua.

Tiếp theo, tôi xin gửi lời cảm ơn đặc biệt đến PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn – Trưởng Phòng Phân tích hệ gen, TS. Vũ Phương Nhung, Ths. Ma Thị Huyền Thương và Ths. Trần Thị Bích Ngọc đã luôn giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn. Qua đây tôi cũng xin cảm ơn tất cả các cô chú, anh chị và bạn bè trong Viện Nghiên cứu hệ gen đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong suốt thời gian tôi thực tập tại đây.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo và các cán bộ Học viện Khoa học và Công nghệ và khoa Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các thầy cô giáo ở khoa Công nghệ sinh học - Học viện Khoa học và Công nghệ đã tận tình truyền đạt cho tôi những kiến thức quý báu trong suốt 2 năm học qua.

Lời sau cùng, tôi xin gửi lời tri ân tới bố mẹ, những người thân trong gia đình và bạn bè đã luôn ủng hộ, khích lệ và động viên tinh thần tôi trong suốt thời gian học tập và hoàn thành luận văn thạc sĩ của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 05 tháng 06 năm 2023

Học viên

Dương Thu Trang

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ BỆNH FEVR	3
1.1.1. Đặc điểm lâm sàng của bệnh FEVR.....	3
1.1.2. Cơ chế và các nguyên nhân di truyền gây bệnh	9
1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN FEVR.....	11
1.2.1. Chẩn đoán lâm sàng.....	11
1.2.2. Chẩn đoán di truyền.....	12
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở VIỆT NAM	12
1.4. SỰ CẦN THIẾT PHẢI TRIỂN KHAI VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	12
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	14
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	14
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	14
2.2.1. Tách chiết DNA tổng số	14
2.2.2. Định tính và định lượng DNA tổng số	15
2.2.3. MLPA	16
2.2.4. Giải trình tự vùng mã hóa.....	18
2.2.5. Xác định biến thể, chú thích và dự đoán	19
2.2.6. Khuếch đại các đoạn gen bằng phản ứng chuỗi polymerase	19
2.2.7. Giải trình tự Sanger	21
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	23
3.1. KẾT QUẢ	23
3.1.1. Dữ liệu lâm sàng của các bệnh nhân người Việt Nam được chẩn đoán mắc FEVR.....	23
3.1.2. Kết quả tách chiết DNA tổng số.....	29
3.1.2. Đột biến gen phát hiện bằng giải trình tự gen	29
3.1.3. Đột biến gen phát hiện bằng MLPA.....	32
3.1.4. Phổ đột biến và mối tương quan của đột biến với kiểu hình lâm sàng	38
3.2. THẢO LUẬN	45

3.2.1. So sánh tỷ lệ phát hiện và sự phân bố đột biến của nghiên cứu này với các nghiên cứu khác	45
3.2.2. Sự đa dạng trong kiểu hình.....	46
3.2.3. Sự đa dạng kiểu hình giữa các thành viên gia đình	48
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	50
KẾT LUẬN.....	50
KIẾN NGHỊ.....	50
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	51
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	52

DANH MỤC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

<i>CTNNB1</i>	Cadherin-associated protein, beta	
DNA	Deoxyribonucleic acid	Acid deoxyribonucleic
FEVR	Familial exudative vitreoretinopathy	Bệnh dịch kính-võng mạc xuất tiết do di truyền
<i>FZD4</i>	Frizzled-4	
<i>KIF11</i>	Kinesin family member 11	
<i>LRP5</i>	Low-density lipoprotein receptor related protein-5	
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification	Khuếch đại đa đầu dò phụ thuộc vào ghép nối
<i>NDP</i>	Norrie disease pseudoglioma	
NST	Nhiễm sắc thể	
<i>TSPAN12</i>	Tetraspanin-12	
WES	Whole Exome Sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa
<i>ZNF408</i>	Zinc finger protein-408	

DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Các giai đoạn lâm sàng của bệnh FEVR.	7
Bảng 2.1. Danh sách môi sử dụng cho giải trình tự.	20
Bảng 3.1. Thông tin lâm sàng của bệnh nhi được chẩn đoán mắc FEVR ở Việt Nam.	25
Bảng 3.2. Tóm tắt thông tin lâm sàng của bệnh nhân FEVR-20.	28
Bảng 3.3. Nồng độ DNA tổng số.	25
Bảng 3.4. Đột biến gen tìm thấy ở bệnh nhi được chẩn đoán mắc FEVR.	33
Bảng 3.5. Mối tương quan kiểu gen-kiểu hình.	43
Bảng 3.6. Các đột biến chưa rõ chức năng.	47

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

	Trang
Hình 1.1. Co kéo mạch máu võng mạc trong bệnh FEVR.	4
Hình 1.2. Đặc điểm lâm sàng các giai đoạn bệnh của FEVR.	5
Hình 1.3. Nếp gấp võng mạc cùng với co kéo đĩa thị.	6
Hình 1.4. Đặc điểm bất đối xứng giữa 2 mắt của bệnh nhân FEVR.	6
Hình 1.5. Hình minh họa con đường tín hiệu Norrin/ β -catenin.	10
Hình 3.1. Hình ảnh lâm sàng và ảnh chụp đáy mắt của bệnh nhân FEVR-20.	24
Hình 3.2. Ảnh minh họa điện di sản phẩm DNA tổng số.	25
Hình 3.3. Tính bảo thủ (A) và dự đoán chức năng bằng Polyphen 2 (B) của biến thể mới c.G169C, p.(G57R) trên gen <i>FZD4</i> .	31
Hình 3.4. Sơ đồ phả hệ và các đột biến được tìm thấy trong gen <i>FZD4</i> .	35
Hình 3.5. Sơ đồ phả hệ và các đột biến được tìm thấy trong gen <i>NDP</i> .	36
Hình 3.6. Sơ đồ phả hệ và các đột biến được tìm thấy trong gen <i>KIF11</i> .	37
Hình 3.7. Sơ đồ phả hệ và các đột biến được tìm thấy trong gen <i>ATOH7</i> .	38
Hình 3.8. Đột biến mất đoạn NDP exon 2 ở bệnh nhân FEVR-20	40
Hình 3.9. Kết quả MLPA dạng biểu đồ sóng của bệnh nhân FEVR-20 và thành viên gia đình.	42
Hình 3.10. Phổ đột biến ở các gen gây bệnh FEVR trên bệnh nhi Việt Nam.	39

Hình 3.11. Đặc điểm đầu và mặt của bệnh nhân FEVR-08 (A) mang đột biến *KIF11* c.388-1G>C và bệnh nhân FEVR-11 (B) mang đột biến *KIF11* c.2511_2515del.

MỞ ĐẦU

Bệnh dịch kính-võng mạc xuất tiết do di truyền (familial exudative vitreoretinopathy - FEVR) là một rối loạn di truyền hiếm gặp, đặc trưng bởi sự phát triển bất thường của mạch máu võng mạc. Đặc điểm điển hình của mắt bị bệnh là vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, tùy vào mức độ nghiêm trọng có thể dẫn đến các biến chứng đe dọa thị lực. Những tổn thương nhãn cầu của bệnh FEVR tương tự như bệnh võng mạc do sinh non, tuy nhiên hầu hết bệnh nhân FEVR đều sinh đủ tháng.

Cho đến nay, nhiều gen đã được xác định có liên quan đến bệnh FEVR, với các kiểu di truyền bao gồm: di truyền gen trội/lặn trên nhiễm sắc thể (NST) thường và di truyền gen lặn liên kết NST X. Những khiếm khuyết trong con đường tín hiệu Norrin/Frizzled4 được cho là có liên quan đến bệnh FEVR. Chụp mạch huỳnh quang là một khám nghiệm quan trọng trong việc chẩn đoán FEVR, giúp phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm và ở những thành viên gia đình không có triệu chứng.

Để xác định đột biến gen gây bệnh FEVR, các phương pháp bao gồm giải trình tự của một gen đơn lẻ bằng giải trình tự Sanger, giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa hoặc bảng gen mục tiêu (gene panel) thường được áp dụng như những phương pháp phân tích phân tử chính. Bên cạnh đó, để phát hiện các biến đổi lớn, các phương pháp xét nghiệm di truyền phân tích biến thể số bản sao bao gồm PCR, MLPA hoặc lai array-CGH thường được áp dụng.

Tại Việt Nam, trong những năm gần đây các bác sĩ tại Bệnh viện Mắt Trung ương đã ghi nhận các trường hợp suy giảm thị lực nghi mắc dịch kính-võng mạc xuất tiết do di truyền hoặc các bệnh võng mạc liên quan khác như Norrie, OPPG, Coats, tăng sinh xơ dịch kính, bệnh lý võng mạc do sinh non. Tuy nhiên, ở khía cạnh phân loại phân tử, vẫn chưa có nghiên cứu nào xác định nguyên nhân di truyền của nhóm bệnh này. Điều này dẫn đến một số hạn chế trong việc phân loại bệnh do đặc điểm lâm sàng của FEVR và một số bệnh võng mạc khác có nhiều biểu hiện giống nhau.

Do vậy, đề tài “**Xác định đột biến gen gây bệnh dịch kính-võng mạc xuất tiết do di truyền ở trẻ em Việt Nam**” được tiến hành với mục tiêu nhằm phát hiện các biến thể gây bệnh/có khả năng gây bệnh ở các bệnh nhi người

Việt Nam được chẩn đoán mắc FEVR và thành viên gia đình của họ. Việc chẩn đoán FEVR sớm góp phần giúp bệnh nhân có thể tiếp cận đầy đủ các phương pháp điều trị phù hợp và mới nhất, từ đó giúp bảo vệ thị lực của bệnh nhân.

Các nội dung nghiên cứu chính bao gồm: Thu thập mẫu máu và dữ liệu lâm sàng của bệnh nhân và các thành viên gia đình (nếu có); Tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu; Xác định biến thể số bản sao (copy number variants - CNVs) bằng phương pháp khuếch đại đa đầu dò phụ thuộc vào ghép nối (Multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA); Phát hiện biến thể gen gây bệnh/có khả năng gây bệnh ở các mẫu bệnh nhân bằng phương pháp giải trình tự hệ gen mã hóa (Whole Exome Sequencing - WES); Kiểm tra biến thể gen đã phát hiện ở bệnh nhân và các thành viên gia đình bệnh nhân bằng phương pháp giải trình tự Sanger; Phân tích mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình ở bệnh nhân FEVR.

Kết quả của nghiên cứu này cung cấp bộ số liệu có giá trị về các biến thể gen gây bệnh FEVR ở người Việt Nam, làm cơ sở cho việc phát triển các phương pháp chẩn đoán nhanh hiệu quả trong tương lai. Đồng thời, kết quả nghiên cứu còn cung cấp các thông tin có giá trị trong việc chẩn đoán, điều trị bệnh và tư vấn di truyền.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ BỆNH FEVR

1.1.1. Đặc điểm lâm sàng của bệnh FEVR

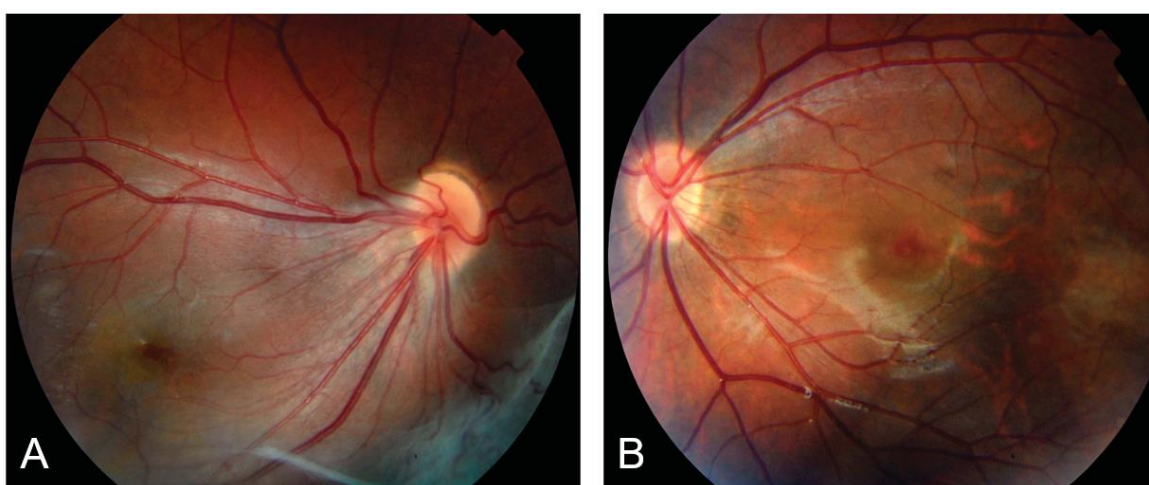
Bệnh dịch kính-võng mạc xuất tiết do di truyền (FEVR) là một rối loạn di truyền hiếm gặp về sự phát triển bất thường của mạch máu võng mạc, dẫn đến sự hình thành mạch máu võng mạc chu biên không hoàn chỉnh và kém biệt hóa [1]. Bệnh có thể dẫn đến suy giảm thị lực và đôi khi mù hoàn toàn một hoặc cả hai mắt. Được mô tả lần đầu tiên bởi Criswick và Schepens vào năm 1969, FEVR đặc trưng bởi sự kết hợp của nhiều đặc điểm khác nhau bao gồm lệch vị trí hoàng điểm, nếp gấp võng mạc hướng tâm, tân mạch võng mạc, xuất huyết, bong võng mạc do co kéo và xuất tiết võng mạc [2].

Cho đến thời điểm này, tỷ lệ mắc của bệnh FEVR vẫn chưa được báo cáo. Mặc dù hầu hết bệnh nhân FEVR đều có vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, biểu hiện lâm sàng của FEVR khác nhau đáng kể giữa hai mắt của cùng một bệnh nhân (bất đối xứng) và giữa các bệnh nhân mang cùng một đột biến gen gây bệnh. Tùy vào mức độ nghiêm trọng của chứng thiếu máu võng mạc, có thể xuất hiện tân mạch và từ đó dẫn đến tình trạng xơ hóa, co kéo, bong võng mạc, nếp gấp võng mạc, hoặc thậm chí loạn sản võng mạc ở những trường hợp bệnh nặng [1].

FEVR thường được biểu hiện nhiều nhất vào thời thơ ấu, nhưng vẫn có thể tiến triển ở bất cứ độ tuổi nào với những biến chứng đe dọa đến thị lực. Khi được báo cáo lần đầu vào năm 1969, FEVR được mô tả là một bệnh tiến triển với các biến chứng nặng ở mắt ở trẻ em [2]. Tuy nhiên, đến năm 1980, Ober và nhóm nghiên cứu của ông đã báo cáo về các trường hợp có đặc điểm khác với phát hiện trên và họ đã kết luận rằng bệnh FEVR có thể không có triệu chứng và không tiến triển [3]. Họ đã báo cáo rằng những thay đổi ở đáy mắt và biến chứng đe dọa thị lực rất hiếm khi xảy ra sau thời thơ ấu và thanh thiếu niên. Điều đó là bởi trong nhóm đối tượng nghiên cứu của họ, những bệnh nhân lớn tuổi không bị tiến triển nặng khi so sánh với những bệnh nhân trẻ tuổi, và bởi không có bệnh nhân nào sau 20 tuổi bị mất thị lực. Mặc dù FEVR thường tiến triển nhanh nhất ở giai đoạn thơ ấu và thanh thiếu niên bệnh nhân khởi phát muộn có tiên lượng tốt hơn, bệnh vẫn có thể tiến triển muộn với biến chứng tiềm ẩn ở mọi lứa tuổi như là tân mạch, xuất huyết dịch kính và bong võng mạc

[4]. Thêm vào đó, theo khảo sát của Tauqueer và cộng sự, bệnh nhân FEVR có thể bị tái phát bệnh và mất thị lực vào cuối độ tuổi 40 [4].

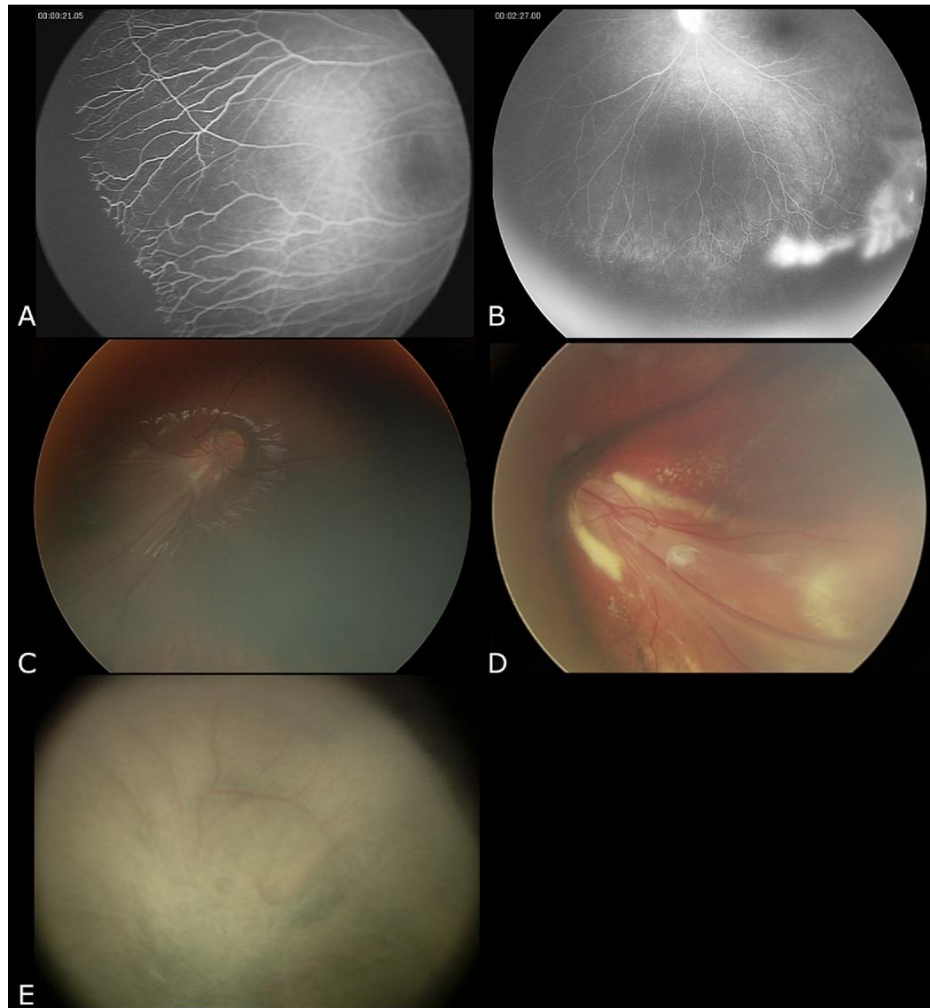
Một đặc điểm quan trọng của FEVR là bệnh nhân không bị sinh non, mặc dù các đặc điểm dịch kính-võng mạc ở bệnh võng mạc do sinh non tương đồng với bệnh FEVR. Cũng vì những đặc điểm tương đồng đó, Tanenbaum và cộng sự đã báo cáo một trường hợp bé trai 10 tháng tuổi, sinh non ở tuổi thai 34 tuần, ban đầu được xác nhận nhầm và điều trị với liệu pháp dành cho bệnh võng mạc do sinh non, do đó dẫn đến tình trạng bệnh thêm nặng [5]. Sau đó khi kiểm tra lại, bệnh nhi này đã được xác nhận lại là mắc bệnh FEVR.



Hình 1.1. Co kéo mạch máu võng mạc trong bệnh FEVR [1]. Hình ảnh đáy mắt của một bé gái 13 tuổi mắc FEVR dạng nhẹ và không có tiền sử gia đình. (A) Mắt phải có sự co kéo vừa phải ở vùng đĩa thị và hoàng điểm. (B) Mắt trái có thị lực bình thường và chỉ bị co kéo mạch nhẹ.

Đặc trưng của của bệnh FEVR là hầu hết các mắt bị bệnh đều có vùng võng mạc vô mạch ở võng mạc chu biên và thường có hình dạng như chữ V. Ở những trường hợp bệnh nhẹ, vùng vô mạch nhỏ có thể không gây ra triệu chứng nào. Ở những trường hợp bệnh mức độ trung bình đến nặng, xuất hiện tân mạch võng mạc và gờ xơ ở phần tiếp giáp giữa vùng có mạch và vùng vô mạch. Điều này sẽ gây ra tình trạng co kéo ở vùng hoàng điểm và mạch máu võng mạc, từ đó dẫn đến những mức độ nghiêm trọng khác nhau của tình trạng lệch vị trí hoàng điểm, bong võng mạc do co kéo và mất thị lực. Ở những trường hợp bệnh nhẹ, sự co kéo có thể không gây ra hoặc gây ra ít tổn thương (Hình 1.1).

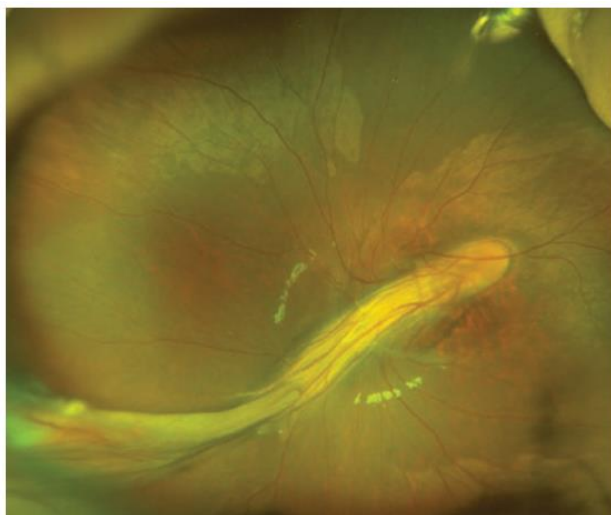
Ở những trường hợp nặng, sự co kéo có thể dẫn đến các nếp gấp võng mạc và bong võng mạc hoàn toàn (Hình 1.2 và 1.3).



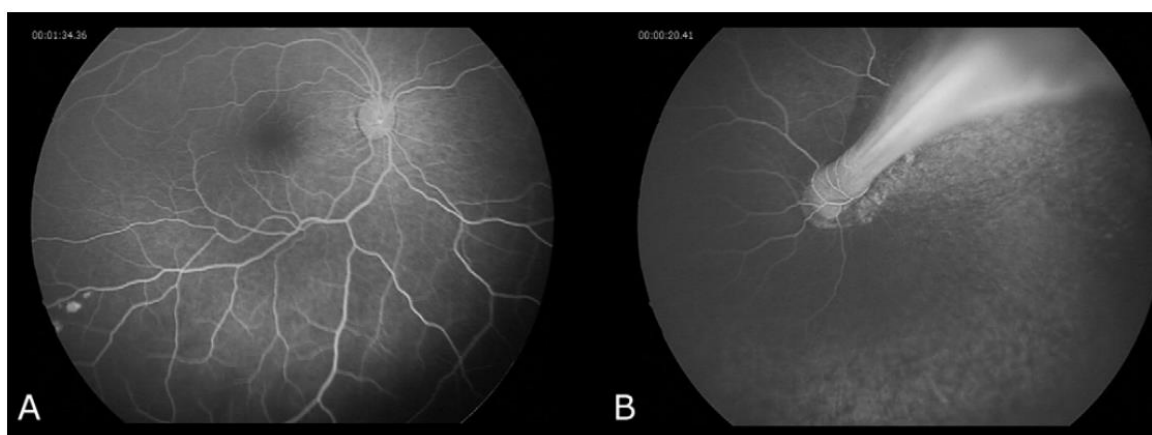
Hình 1.2. Đặc điểm lâm sàng các giai đoạn bệnh của FEVR [6]. (A) Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên ở giai đoạn 1. **(B)** Rò rỉ mạch máu võng mạc ở giai đoạn 2, thường ở vùng gờ giữa vùng võng mạc có mạch máu và vùng vô mạch. **(C)** Bong võng mạc ngoài vùng hoàng điểm ở giai đoạn 3, thường xuất hiện cùng với co kéo võng mạc. **(D)** Bong võng mạc vùng hoàng điểm ở giai đoạn 4 xuất hiện do xuất tiết hoặc co kéo, hoặc cả hai, và có thể xuất hiện cùng với các nếp gấp võng mạc hướng tâm. **(E)** Bong võng mạc hoàn toàn ở giai đoạn 5.

Khảo sát của tác giả Gilmour và cộng sự đã cho thấy một tỷ lệ từ 21% đến 64% tổng số bệnh nhân được phát hiện bị bong võng mạc [1]. Đây là một trong những biến chứng phổ biến nhất ở bệnh nhân FEVR. Các loại bong võng mạc bao gồm bong võng mạc có vết rách, bong võng mạc co kéo và bong thanh dịch võng mạc. Bong võng mạc do co kéo có thể tiến triển dẫn đến các nếp gấp

võng mạc hướng tâm. Đây cũng chính là đặc điểm thường thấy ở trường hợp mắc bệnh nặng và cũng xuất hiện ở những bệnh ảnh hưởng đến võng mạc khác như Norrie và OPPG. Sự tiến triển của tình trạng co kéo gây ra bong võng mạc và xuất huyết được cho là mối đe dọa chính đối với thị lực của bệnh nhân FEVR [4].



Hình 1.3. Nếp gấp võng mạc cùng với co kéo đĩa thị [7].



Hình 1.4. Đặc điểm bất đối xứng giữa 2 mắt của bệnh nhân FEVR [6].
(A) Một mắt có thể hoàn toàn bình thường khi khám lâm sàng nhưng vẫn cho thấy các tổn thương mạch máu ngoại vi khi chụp mạch huỳnh quang. **(B)** Một mắt bị nặng hơn với những tổn thương nghiêm trọng bao gồm các nếp gấp võng mạc xuyên tâm.

Một đặc điểm phổ biến khác của FEVR là sự bất cân xứng về tổn thương giữa hai mắt của bệnh nhân (Hình 1.4). Bệnh nhân FEVR có thể có một mắt không có hoặc có biểu hiện rất nhẹ, trong khi một mắt bị ảnh hưởng với các biến chứng rất nặng (Hình 1.2). Ví dụ điển hình của sự bất đối xứng này là một số bệnh nhân bị bong võng mạc ở một mắt và không có dấu hiệu bệnh nào ở mắt còn lại. Những phát hiện này có thể cho thấy sự khác biệt giữa hai mắt trong quá trình phát triển của mắt hoặc có thể là một đột biến soma ở một mắt có ảnh hưởng đến quá trình hình thành mạch máu võng mạc [1].

Các đặc điểm tổn thương mắt khác có thể xuất hiện như là xuất tiết võng mạc, hình thành màng trước võng mạc thứ phát, xuất huyết dịch kính, tách lớp võng mạc ở chu biên, tăng nhãn áp thứ phát, viêm màng bồ đào, u mao mạch võng mạc và tồn lưu mạch máu, v.v [1]. Đối với FEVR, có thể có các biểu hiện và mức độ nặng nhẹ khác nhau giữa các bệnh nhân và giữa các thành viên gia đình. Người thân của bệnh nhân bị FEVR nặng thường mắc bệnh nhẹ không triệu chứng hoặc có triệu chứng rất nhẹ mặc dù có cùng đột biến gen gây bệnh [8]. Cho đến nay, các nhà khoa học đã đưa ra một số hệ thống phân loại khác nhau để xác định các giai đoạn của bệnh FEVR [9, 10] (Bảng 1.1). Đặc điểm lâm sàng của từng giai đoạn được minh họa trong hình 1.2.

Bảng 1.1. Các giai đoạn lâm sàng của bệnh FEVR [11].

Biểu hiện lâm sàng của bệnh		
Giai đoạn	Đề xuất năm 1998 [9]	Sửa đổi năm 2014 [10]
1	Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, không có sự hình thành mạch ngoài võng mạc	Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên hoặc các tổn thương mạch máu võng mạc
1A		Không có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
1B		Có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang

Biểu hiện lâm sàng của bệnh

Giai đoạn	Đề xuất năm 1998 [9]	Sửa đổi năm 2014 [10]
2	Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, có sự hình thành mạch ngoài võng mạc	Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, có sự hình thành mạch ngoài võng mạc
2A	Không có xuất tiết	Không có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
2B	Có xuất tiết	Có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
3	Bong võng mạc ngoài vùng hoàng điểm	Bong võng mạc ngoài vùng hoàng điểm
3A	Chủ yếu xuất tiết	Không có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
3B	Chủ yếu co kéo	Có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
4	Bong một phần võng mạc có liên quan vùng hoàng điểm	Bong một phần võng mạc có liên quan vùng hoàng điểm
4A	Chủ yếu xuất tiết	Không có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
4B	Chủ yếu co kéo	Có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
5	Bong võng mạc hoàn toàn	Bong võng mạc hoàn toàn
5A	Bong võng mạc dạng phễu mở	Bong võng mạc dạng phễu mở
5B	Bong võng mạc dạng phễu đóng	Bong võng mạc dạng phễu đóng

1.1.2. Cơ chế và các nguyên nhân di truyền gây bệnh

Theo cơ sở dữ liệu Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), đột biến trong sáu gen khác nhau, bao gồm *FDZA* (11q14), *LRP5* (11q13.4), *NDP* (Xp11), *TSPAN12* (7q31), *ZNF408* (11p11) và *CTNNB1* (3p22) là nguyên nhân chủ yếu gây nên bệnh FEVR (loại 1, 2, 4, 5, 6 và 7). Ngoài ra, vùng nhiễm sắc thể 11p13-p12 cũng có liên quan đến FEVR (loại 3) mặc dù gen cụ thể gây bệnh vẫn chưa được xác định. Theo khảo sát, đột biến trên các gen *FZD4*, *NDP*, *LRP5*, *TSPAN12* và *ZNF408* là nguyên nhân gây bệnh chiếm khoảng 50% tổng số ca mắc FEVR [1].

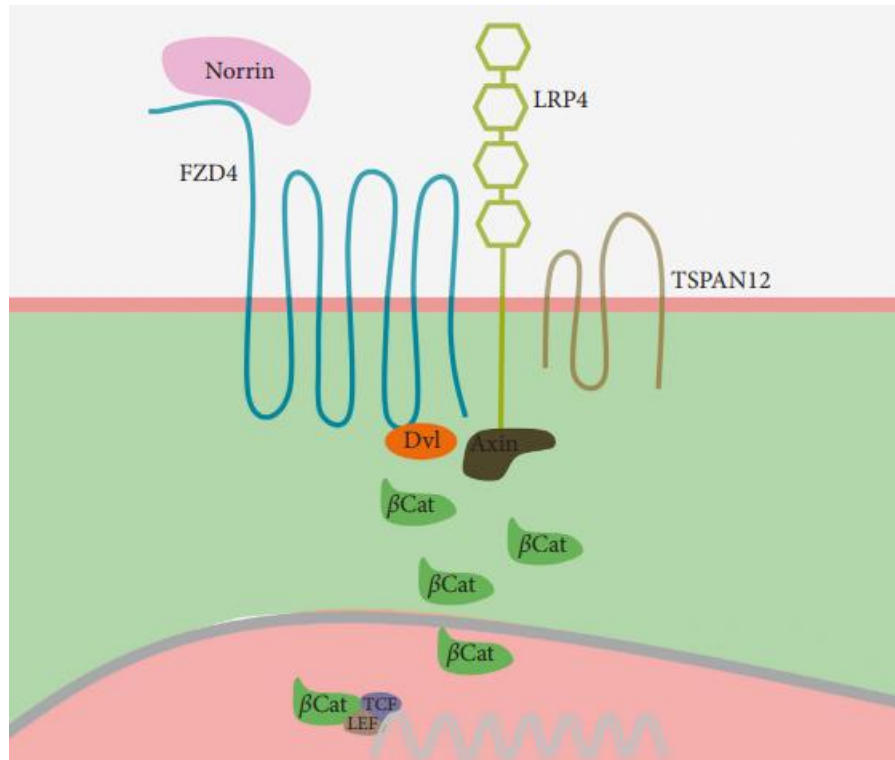
Ngoài các gen gây bệnh FEVR kể trên, các bệnh nhân mang các đột biến trên gen *KIF11*, *ATOH7*, *JAG1*, *DOCK6*, *ARHGAP31* và *RCBTB1* cũng có kiểu hình trùng lặp với kiểu hình của FEVR [12-16]. Bên cạnh đó, đột biến gen *NDP* cũng có thể gây ra bệnh Norrie, một bệnh võng mạc nặng hiếm gặp. Bệnh Norrie đặc trưng bởi tình trạng mất thị lực khởi phát sớm và có nhiều biểu hiện ở mắt khác tương tự với biểu hiện ở FEVR [17].

Có 3 kiểu di truyền của FEVR bao gồm di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể (NST) X, di truyền trội trên NST thường và di truyền lặn trên NST thường. Ngoài ra, bệnh cũng có thể xảy ra ở những bệnh nhân không có tiền sử gia đình (*de novo*).

Bốn trong số những gen liên quan đến FEVR bao gồm *FZD4*, *NDP*, *LRP5* và *TSPAN12* có vai trò mã hóa các protein tham gia vào con đường tín hiệu Norrin/Frizzled4 (Norrin/ β -catenin). Con đường này là một trong những con đường tín hiệu Wnt tâm trong sự phát triển mạch máu võng mạc và có vai trò then chốt trong sự phát triển của mạch máu võng mạc [18].

Trong con đường tín hiệu Norrin/ β -catenin, phối tử Norrin, một protein được mã hóa bởi gen *NDP*, có thực hiện vai trò liên kết với thụ thể Frizzled-4 (FZD4), và low-density lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP5) hoạt động như một đồng thụ thể (Hình 1.5). Khi protein Norrin gắn với thụ thể FZD4 và đồng thụ thể LRP5, một phức hợp protein sẽ được hình thành. Sau khi kết hợp với tetraspanin-12 (TSPAN12), phức hợp này sẽ kích hoạt tín hiệu β -catenin trong tế bào. Dishevelled (Dvl) bao quanh protein FZD4 và các phân tử LRP5 đã phosphoryl hóa sẽ thu hút Axin vào màng sinh chất, từ đó giúp ngăn

chặn quá trình phosphoryl hóa và phân hủy β -catenin. Nhờ quá trình này, lượng β -catenin trong tế bào chất sẽ tăng lên. Sau đó, β -catenin sẽ di chuyển vào trong nhân và tương tác với các yếu tố phiên mã tại đây để kích hoạt quá trình phiên mã.



Hình 1.5. Hình minh họa con đường tín hiệu Norrin/ β -catenin [19]. Khi Norrin liên kết với phức hợp FZD4/LRP5/TSPAN12, tín hiệu β -catenin sẽ được kích hoạt. Sau đó, β -catenin sẽ được bảo vệ khỏi phức hợp phân giải và sẽ đi vào trong nhân để kích hoạt quá trình phiên mã với các yếu tố phiên mã Tcf/Lef.

Đột biến *KIF11* lần đầu tiên được xác định ở bệnh nhân mắc FEVR trong nghiên cứu của Robitaille và cộng sự năm 2014 [20]. Gen *KIF11* đóng một vai trò trong sự phát triển của mạch máu võng mạc và các đột biến trong gen này có thể gây ra những đặc điểm lâm sàng trùng lặp với FEVR. Robitaille cho rằng các trường hợp nghi mắc FEVR nên được kiểm tra cẩn thận để phát hiện tật đầu nhỏ như một dấu hiệu của bệnh liên quan đến *KIF11*, điều này sẽ nâng cao tính chính xác của tiên lượng bệnh và tư vấn di truyền. Sau đó vào năm 2016, Hu và cộng sự đã báo cáo đột biến gen *KIF11* là nguyên nhân phổ biến của FEVR khi họ phát hiện được đột biến *KIF11* trên 8,3% tổng số bệnh nhân trong nghiên cứu [21]. Những bệnh nhân sở hữu có đột biến *KIF11* cho thấy các dấu

hiệu điển hình của FEVR, và có thể có hoặc không kèm theo tật đầu nhỏ, phù bạch huyết và chậm phát triển trí tuệ.

1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN FEVR

1.2.1. Chẩn đoán lâm sàng

Việc khám và kiểm tra tiền sử lâm sàng có tầm quan trọng then chốt để xác định khả năng mắc các bệnh mắt. Trong trường hợp nghi ngờ bệnh mắt do di truyền, các phát hiện lâm sàng sẽ giúp xác định các xét nghiệm phân tử hay xét nghiệm di truyền nào là phù hợp nhất để xác định nguyên nhân. Do đó, các đặc điểm của bệnh, sự khởi phát, tiến triển và mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng đối với tất cả các thành viên trong gia đình bị ảnh hưởng, tiền sử mang thai và sinh nở, tiền sử gia đình và tình trạng bệnh chính là những khía cạnh quan trọng cần được phân tích. Tiền sử gia đình có thể giúp xác định kiểu di truyền Mendel như trội trên NST thường, gen lặn trên NST thường, liên kết X hoặc ty thể. Việc kiểm tra nên bao gồm đánh giá toàn bộ mắt và toàn thân.

Những phương pháp thường dùng để chẩn đoán FEVR trên lâm sàng bao gồm: soi đáy mắt bằng máy soi đáy mắt gián tiếp dưới gây mê toàn thân, siêu âm B nhãn cầu, chụp mạch huỳnh quang (Fluorescein Angiography) và khai thác tiền sử gia đình [11]. Trong số các phương pháp này, chụp mạch huỳnh quang là một phương pháp rất quan trọng để chẩn đoán, phân giai đoạn và quản lý bệnh. Sự rò rỉ huỳnh quang mà không có dịch tiết lâm sàng được cho là dấu hiệu báo trước cho giai đoạn tiết dịch của bệnh. Vì dịch tiết ra có thể làm cho việc điều trị bằng quang đông bằng laser trở nên phức tạp nên việc kiểm tra và phát hiện rò rỉ bằng chụp mạch huỳnh quang đóng một vai trò rất quan trọng trong việc điều trị kịp thời [10].

Ngoài ra, khai thác tiền sử gia đình bệnh nhân cũng có thể giúp cung cấp thêm bằng chứng cho việc chẩn đoán. Tuy nhiên, thông tin tiền sử gia đình có thể sẽ không mang lại hiệu quả chẩn đoán vì thành viên gia đình có thể không có biểu hiện bệnh, hoặc bệnh nhân mang đột biến *de novo*. Theo khảo sát của Tauqeer và cộng sự, kết quả âm tính với tiền sử gia không giúp kết luận được gì nhiều, vì tiền sử gia đình dương tính với FEVR có thể chỉ xuất hiện trong ít hơn 10% một số nghiên cứu đoàn hệ và ~50% các nghiên cứu khác [4]. Họ cũng nhấn mạnh rằng việc kiểm tra võng mạc bằng phương pháp chụp mạch

huỳnh quang trên các thành viên trong gia đình sẽ rất hữu ích hơn trong chẩn đoán.

1.2.2. Chẩn đoán di truyền

Trên thế giới, cứ 1000 người thì có khoảng một người bị ảnh hưởng bởi bệnh di truyền về mắt, mà nguyên nhân di truyền gây bệnh phần lớn vẫn chưa được biết [22]. Việc xác định biến thể gen gây bệnh cho phép hiểu rõ hơn về cơ chế gây bệnh và tính chất di truyền của nó. Việc chẩn đoán di truyền có vai trò rất quan trọng trong việc giúp bệnh nhân có thể tiếp cận đầy đủ các phương pháp điều trị mới nhất. Sàng lọc di truyền dần trở thành xu hướng quan trọng trong tất cả các chuyên ngành nhãn khoa để giúp ngăn ngừa bệnh và gợi ý các phương pháp điều trị chính xác.

Đối với hầu hết các bệnh di truyền về mắt, giải trình tự của một gen đơn lẻ bằng giải trình tự Sanger, giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa hoặc bảng gen mục tiêu (gene panel) thường được khuyến nghị làm phương pháp phân tích phân tử chính. Bên cạnh đó, để phát hiện các biến đổi lớn, các phương pháp xét nghiệm di truyền phân tích biến thể số bản sao bao gồm PCR, MLPA hoặc lai array-CGH thường được áp dụng.

1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở VIỆT NAM

Theo ghi nhận của các bác sĩ tại Bệnh viện Mắt trung ương, các trường hợp suy giảm thị lực nghi mắc bệnh dịch kính-võng mạc xuất tiết do di truyền hoặc các bệnh võng mạc liên quan khác như Norrie, osteoporosis-pseudoglioma (loãng xương và mất thị lực), Coats, tăng sinh xơ dịch kính, bệnh lý võng mạc do sinh non liên tục được phát hiện trong những năm gần đây. Mặc dù một số nghiên cứu đã được tiến hành nhằm cải tiến và ứng dụng các kỹ thuật can thiệp lâm sàng tiên tiến cho bệnh nhân, nhưng việc nghiên cứu xác định nguyên nhân di truyền của nhóm bệnh này hoàn toàn chưa được thực hiện. Điều này dẫn đến một số hạn chế trong việc phân loại bệnh do biểu hiện lâm sàng của FEVR và các bệnh võng mạc liên quan có nhiều đặc điểm rất giống nhau.

1.4. SỰ CẦN THIẾT PHẢI TRIỂN KHAI VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về nguyên nhân di truyền cũng như các cơ chế gây ra một số bệnh về mắt mới bắt đầu được quan tâm gần đây. Trong số

các bệnh mắt, chưa có công bố nào về di truyền phân tử của FEVR. Do đó, cần tiến hành các nghiên cứu làm cơ sở cho việc phân loại bệnh ở mức độ phân tử.

Việc chẩn đoán FEVR và điều trị bệnh sớm là rất cần thiết cho trẻ mắc bệnh. Bên cạnh đó, các thành viên trong gia đình của bệnh nhân FEVR cũng cần được khuyến khích khám sàng lọc bệnh. Nghiên cứu của Kashani và cộng sự đã cho thấy tỷ lệ đáng chú ý những thành viên gia đình của bệnh nhân FEVR không có triệu chứng có thể mắc bệnh ở một mức độ nào đó [23]. Đặc biệt là đối với những thành viên đang trong độ tuổi sinh đẻ, việc sàng lọc còn giúp ích cho việc tư vấn di truyền, để những đứa trẻ sinh ra tránh được nguy cơ mắc bệnh. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu của đề tài cũng sẽ đóng góp vào cơ sở dữ liệu về các biến thể gen gây FEVR ở Việt Nam, làm cơ sở cho việc phát triển các phương pháp chẩn đoán nhanh hiệu quả trong tương lai.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tuyển chọn các bệnh nhi được chẩn đoán mắc FEVR tại Bệnh viện Mắt Trung ương ở Hà Nội và các thành viên trong gia đình của họ. Tất cả bệnh nhân đều được khám lâm sàng mắt, bao gồm soi đáy mắt hoặc chụp mạch huỳnh quang. Đối với trẻ dưới 1 tuổi, việc phát hiện bất thường mạch máu võng mạc chỉ được thực hiện với phương pháp soi đáy mắt.

Bệnh nhân được chẩn đoán mắc FEVR khi họ đáp ứng các tiêu chuẩn lâm sàng, bao gồm ba tiêu chuẩn: có những bất thường trong mạch máu và sự biệt hóa mạch máu ở võng mạc ngoại vi ở một mắt hoặc cả hai mắt phát hiện được bằng soi đáy mắt hoặc chụp mạch huỳnh quang; sinh đủ tháng hoặc sinh non và tiến triển bệnh không liên quan đến bệnh lý võng mạc do sinh non; và cuối cùng là các đặc điểm mắt như co kéo dịch kính, nếp gấp võng mạc, xuất tiết, tân mạch và bong võng mạc.

Nghiên cứu này đã được sự đồng ý của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Cha mẹ hoặc người giám hộ của bệnh nhân đã đồng ý tham gia xét nghiệm gen. Các mẫu máu ngoại vi (2 ml) của bệnh nhân và các thành viên gia đình được thu thập vào các ống chứa EDTA và bảo quản ở -20°C .

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách từ mẫu máu ngoại vi bằng bộ kit Exgene Blood SV mini Kit (Geneall Biotechnology Co. LTD, Seoul, Korea). Các bước tách chiết DNA tổng số từ máu ngoại vi như sau:

- Thêm 20 μl protease K (20 mg/ml) vào ống Eppendorf 1,5 ml.
- Thêm 200 μl mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân vào ống. Nếu thể tích mẫu máu nhỏ hơn 200 μl , điều chỉnh thể tích thành 200 μl với PBS 1X.
- Thêm 20 μl dung dịch RNase (20 mg/ml) vào mỗi ống, trộn đều bằng pipet và ủ 2 phút ở nhiệt độ phòng.
- Thêm 200 μl BL buffer vào mỗi ống, trộn đều và ủ ở điều kiện 300 rpm/10 phút/ 56°C .

- Sau khi ủ, thêm 200 µl ethanol 100% và trộn đều. Nếu thể tích mẫu lớn hơn 200 µl, tăng thể tích ethanol theo tỷ lệ.
- Chuyển hỗn hợp sang cột tinh sạch. Ly tâm 9000 rpm/1 phút/25°C, sau đó loại bỏ dịch.
- Thêm 600 µl BW Buffer. Ly tâm 9000 rpm/1 phút/25°C, sau đó loại bỏ dịch.
- Thêm 700 µl TW Buffer. Ly tâm 9000 rpm/1 phút/25°C, sau đó loại bỏ dịch.
- Ly tâm 9000 rpm/1 phút/25°C để loại bỏ hoàn toàn buffer còn lại trên màng.
- Chuyển cột tinh sạch sang ống Eppendorf 1,5 ml mới. Sau đó thêm 40 µl TE buffer vào mỗi ống. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Ly tâm 12000 rpm/1 phút/25°C. Lặp lại bước trên 2 lần. Như vậy, tổng thể tích DNA tổng số thu được là 80 µl. Bảo quản DNA tổng số ở -20°C.

2.2.2. Định tính và định lượng DNA tổng số

Phương pháp định tính DNA tổng số:

Chất lượng của mẫu DNA được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%. Các bước tiến hành như sau:

- Chuẩn bị gel agarose 0,8%: Cân 0,8 g agarose hoà tan trong 100 ml Tris-acetate-EDTA (TAE 1X). Sử dụng lò vi sóng để làm agarose tan hết trong dung dịch đệm, sau khi agarose tan hết để nguội 55-60°C thì đổ ra bản đựng gel đã giải sẵn lược để tạo các giếng điện di. Sau khoảng 30 phút, gel sẽ đông lại.
- Điện di:
 - Đưa gel agarose vào máy điện di, cho TAE ngập gel. Tra lần lượt 4 µl mẫu đã trộn với 0,7 µl loading dye 6X vào giếng.
 - Sử dụng thiết bị điện di tự động 2100 Bioanalyzer (Đức), điện di ở hiệu điện thế 80-150V khoảng 30 phút.
 - Sau đó, gel được ngâm vào ethidium bromide 5 phút, rửa qua nước cất và đưa vào soi dưới đèn UV, chụp ảnh dưới ánh sáng tia tử ngoại (UV).

Phương pháp định lượng DNA tổng số:

Sản phẩm DNA sau khi tách chiết được xác định nồng độ bằng bộ kit Qubit Fluorometer Broad-range DNA Kit, sau đó được đo quang phổ ở bước sóng 260 và 280 nm (BioSpectrometer Basic; Eppendorf, Hamburg, Germany). Các bước tiến hành như sau:

- Chuẩn bị các ống 0,5 ml cho mẫu và mẫu standards. Kit Qubit® dsDNA BR Assay yêu cầu 2 standards.
- Chuẩn bị dung dịch Qubit® working bao gồm Qubit® dsDNA BR Reagent và Qubit® dsDNA BR Buffer với tỷ lệ 1:200. Không trộn đều dung dịch working bằng các dụng cụ thủy tinh. Chú ý tổng thể tích dung dịch working yêu cầu là 200 µl.
- Bổ sung 190 µl dung dịch Qubit® working vào mỗi ống standards và 10 µl mỗi loại Qubit® standard sau đó trộn đều trong 2-3 giây.
- Thêm dung dịch làm việc Qubit® vào các ống mẫu để thể tích cuối cùng trong mỗi ống sau khi thêm mẫu là 200 µl. Lượng mẫu thêm vào có thể từ 1-20 µl. Sau đó trộn đều trong 2-3 giây
- Ủ tối ở nhiệt độ phòng trong 2 phút.
- Đo lần lượt các standard 1 và 2, sau đó đến các mẫu cần xác định nồng độ.

2.2.3. MLPA

MLPA được thực hiện sử dụng bộ kit SALSA MLPA P285-LRP5 (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands). Phương pháp này có thể phát hiện sự mất đoạn/lặp đoạn trong các gen *FZD4*, *LRP5*, *NDP* và *DKK1*.

Các bước thực hiện phản ứng MLPA như sau:

- Ngày thứ nhất

Biến tính DNA

- 5 µl DNA (10 ng/ul) được biến tính bằng máy PCR trong 5 phút ở 98°C, sau đó được làm lạnh xuống 25°.

Phản ứng lai

- Vortex MLPA buffer và MLPA probemic trước khi sử dụng.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng lai, bao gồm 1,5 µl MLPA buffer và 1.5 µl probe mix đối với mỗi phản ứng.

- Thêm 3 μl hỗn hợp phản ứng lai vào mỗi mẫu DNA đã được biến tính trước đó, trộn đều bằng pipetting.

- Ủ hỗn hợp trong 1 phút ở 95°C , sau đó trong 16-20 tiếng ở 60°C .

▪ Ngày thứ hai

Phản ứng gắn kết

- Vortex 2 buffer ligase

- Chuẩn bị hỗn hợp Ligase 65, bao gồm 25 μl nước, 3 μl buffer ligase A, 3 μl buffer ligase B đối với mỗi phản ứng. Sau đó thêm 1 μl Ligase 65 enzyme và trộn đều hỗn hợp bằng pipet.

- Hạ nhiệt độ từ 60° xuống 54° , sau đó cho ống mẫu vào và thêm 32 μl hỗn hợp ligase 65 enzyme vào mỗi ống mẫu, trộn đều bằng pipet.

- Tiếp tục chu trình nhiệt bằng cách ủ 15 phút ở 54°C (gắn kết hai phần của đầu dò), sau đó ủ 5 phút ở 98°C (bất hoạt enzyme ligase 65) và hạ về 20°C .

Phản ứng PCR

- Vortex Salsa PCR primer mix. Làm ấm polymerase trong tay 10 giây để giảm độ nhớt.

- Chuẩn bị hỗn hợp polymerase với tổng thể tích là 10 μl , bao gồm 7,5 μl nước, 2 μl primer và 0,5 μl Salsa polymerase enzyme đối với mỗi phản ứng. Trộn đều bằng pipet và giữ hỗn hợp này trên đá.

- Khi các ống mẫu ở nhiệt độ phòng, thêm 10 μl hỗn hợp polymerase trên vào mỗi ống mẫu. Trộn đều bằng pipetting.

- Cho mẫu vào máy và tiếp tục chu trình nhiệt như sau: (95°C - 30 giây, 60°C - 30 giây, 72°C - 60 giây)*35 chu kỳ; 72°C : 10 phút; 15°C -pause.

Điện di mao quản phân tách đoạn

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng, bao gồm 1,5 μl sản phẩm PCR + 0,2 μl size standard (LizGS500) và 7,2 μl HiDi.

- Biến tính hỗn hợp trong 3 phút ở 86°C , sau đó làm lạnh xuống 4°C trong 2 phút. Sau đó, chuyển mẫu sang điện di mao quản bằng máy ABI genetic analyzer 3500.

Dữ liệu sau khi thực hiện MLPA được phân tích bằng phần mềm Coffalyzer.net. Giá trị tín hiệu huỳnh quang của mỗi đầu dò sẽ được chuẩn hóa trong mỗi mẫu. Sau đó, các mẫu khác nhau sẽ được so sánh với nhau để xác định mẫu nào có số bản sao thay đổi bất thường. Quá trình chuẩn hóa của MLPA bao gồm 2 bước, gồm chuẩn hóa trong 1 mẫu và chuẩn hóa giữa các mẫu. Những mẫu không có sự thay đổi nào về bản sao của gen quan tâm sẽ cho hình ảnh các đỉnh tín hiệu của các đầu dò giống với hình ảnh kết quả của mẫu đối chứng khỏe mạnh. Tỷ lệ của các đầu dò sau bước chuẩn hóa thứ 2 sẽ là ~ 1 . Đối với trường hợp mất đoạn dị hợp tử, tỷ lệ này sẽ là ~ 0.5 . Tỷ lệ cuối cùng này còn được gọi là Dosage Quotient (DQ). Phần mềm Coffalyzer.net sẽ tính toán DQ cho từng đầu dò và đưa ra kết quả cuối cùng.

Kết quả phân tích được hiển thị dưới dạng bảng số liệu và biểu đồ sóng. Mỗi đỉnh tín hiệu là sản phẩm khuếch đại của một probe. Kích thước mỗi peak được so sánh với thang kích thước chuẩn (LIZ-GS 500) và so sánh với mẫu đối chứng (mẫu của người khỏe mạnh), từ đó tính được tỷ lệ DQ (Dosage quotients). Chiều cao của peak thay đổi cho thấy sự thay đổi số bản sao của đoạn DNA có trình tự bổ sung với probe tương ứng. Bên cạnh đó, kết quả phân tích là đáng tin cậy khi độ lệch chuẩn của mỗi đầu dò của mẫu đối chứng $< 10\%$, các đầu dò cho tín hiệu đồng thời tăng hoặc giảm tại các exon liên tiếp nhau (thể hiện mất/lặp đoạn nhiều exon liên tiếp). Ngược lại, kết quả phân tích không đáng tin cậy khi các đầu dò bổ sung với các exon không liên tiếp cho tín hiệu tăng hoặc trong cùng một mẫu mà một hay nhiều đầu dò chuẩn cho kết quả số bản copy bất thường.

2.2.4. Giải trình tự vùng mã hóa

Thư viện DNA được chuẩn bị bằng cách sử dụng Sure Select V6-Post (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Việc định lượng thư viện được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit Qubit™ dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Máy Bioanalyzer sử dụng chip DNA có độ nhạy cao (Agilent Technologies) đã được sử dụng để kiểm tra sự phân bố kích thước thư viện, với phạm vi kích thước dự kiến từ 200 bp đến 400 bp. Việc giải trình tự được thực hiện trên máy Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA) với số cặp đọc là 150 bp.

2.2.5. Xác định biến thể, chú thích và dự đoán

Việc đọc biến thể được đối chiếu với bộ gen tham chiếu của người hg19/GRCh37 bằng công cụ Burrows–Wheeler Aligner (BWA.v0.7.12). Picard được sử dụng để đánh dấu các bản sao. Các biến thể nucleotide đơn (SNV) và các indels ngắn được phát hiện bằng GATK và Samtools. Các biến thể với depth reads thấp hơn 10X sẽ bị xóa bỏ để loại trừ kết quả dương tính giả. Các indels ngắn trong vùng lặp lại và trong phạm vi 10 bp từ đầu và cuối điểm đọc cũng bị xóa bỏ. Sau đó, những biến thể còn lại được lọc qua các cơ sở dữ liệu gồm 1000 Genome database (1000G) và Exome Aggregation Consortium (ExAC). Các biến thể được chú thích bằng chương trình ANNOVAR.

Để xác định các biến thể có khả năng gây bệnh, trước tiên chúng tôi thực hiện sàng lọc các biến thể hiếm và mới (novel) trong 6 gen gây bệnh *FEVR* đã biết (*FDZA*, *LRP5*, *NDP*, *TSPAN12*, *ZNF408* và *CTNNB1*) và tiếp theo sàng lọc 231 gen liên quan đến các bệnh võng mạc khác. Các biến thể sai nghĩa mới hoặc hiếm chưa được báo cáo trước đây sẽ được phân tích bằng các công cụ in silico như Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT), PolyPhen-2, và Mutation Taster để dự đoán ảnh hưởng lên protein. Sự bảo toàn axit amin đã được kiểm tra với multiz alignment (UCSC). Các đột biến gây bệnh được xác định theo hướng dẫn của Cơ sở dữ liệu đột biến gen người (AHGM). Sự hiện diện của biến thể gây bệnh được kiểm tra trong Cơ sở dữ liệu đột biến gen người (Human Gene Mutation Database - HGMD), cơ sở dữ liệu LOVD, cơ sở dữ liệu tổng hợp bộ gen (gnomAD) và cơ sở dữ liệu WES của 535 người Việt Nam không có đặc điểm nào liên quan đến *FEVR* (VN WES DB).

2.2.6. Khuếch đại các đoạn gen bằng phản ứng chuỗi polymerase

DNA tổng số được làm khuôn cho phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại các vùng mã hóa của gen quan tâm. Các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự tham chiếu chuẩn của gen quan tâm trên ngân hàng quốc tế GenBank và được cung cấp bởi công ty PHUSA Biochem (Cần Thơ, Việt Nam) (Bảng 2.1).

Tổng thể tích trong mỗi phản ứng PCR là 20 μ l, bao gồm 10 μ l Tag 2X Master Mix (New England Biolab), 1,5 μ l mồi bao gồm mồi xuôi và mồi ngược

(10 pmol/ μ l), 1 μ l DNA (10 ng/ μ l) và 7,5 μ l nước cất. Quá trình khuếch đại được thực hiện trong các điều kiện sau đây: đầu tiên là giai đoạn biến tính ban đầu được thực hiện ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; tiếp đến là 40 chu kỳ, trong đó có giai đoạn ủ mồi với 95°C trong 30 giây, giai đoạn gắn mồi với nhiệt độ đặc hiệu tương ứng mỗi mồi trong 30 giây và giai đoạn kéo dài với nhiệt độ 68°C trong 30 giây; cuối cùng là giai đoạn hoàn thiện với 72°C trong 2 phút.

Bảng 2.1. Danh sách mồi sử dụng cho giải trình tự.

Đoạn gen	Mồi xuôi (5' to 3')	Mồi ngược (5' to 3')	Độ dài đoạn khuếch đại (bp)
1 ATOH7_exon 1	TAGAACAGAAGGC CGAGTCC	GCTCAGGGCCATC TGCAGGGTC	444
2 FZD4_exon 1	GTGCAAACACTGGGG GTGTCT	CTCCTTCGGGCTA GGATGAT	453
3 FZD4_exon 2	ATTGCCTGGAAGC ATTCAAC	GTTGTGGTCGTTC TGTGGTG	277
4 KIF11_exon 5	CCCATGTATTTTAA CTGCCACA	TTACGGGGATCAT CAAACATC	249
5 KIF11_exon 16	ATTGACAGTGGCC GATAAGG	TTCTGCATGGGGT TCTAGATG	473
6 KIF11_exon 18	CCAGACTGTCCACG TTCAGA	CATTTGTTTTGAA ATCTATTCTTAGC C	482
7 NDP_exon 2	GGATCCTAGGAGG TGAAGCC	CTCCATCCCCTGA CAAAGAA	337

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1.2%, có nhuộm ethidium bromide và được quan sát dưới ánh sáng UV. Các sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng đĩa tinh sạch 96 giếng (Merck-Millipore, Burlington, MA) bằng các bước được thực hiện như sau:

- Thêm 40 μ l nước cất vào từng mẫu (17-25 μ l) và mix đều.

- Ly tâm với điều kiện 3000 rpm trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Thêm 20 μl nước cất vào từng mẫu và chuyển sang đĩa bảo quản để chuẩn bị cho phản ứng tiếp theo.

2.2.7. Giải trình tự Sanger

Sản phẩm tinh sạch của phản ứng PCR sau đó được làm khuôn cho giải trình tự hai chiều bằng cách sử dụng bộ kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Version 3.1 (Applied BioSystem, Waltham, MA).

Mỗi phản ứng PCR cho giải trình tự gen bao gồm: 0.8 μl BigDye sequencing Buffer 5X, 0.8 μl Master Mix, 1 μl mỗi xuôi hoặc mỗi ngược (2 pmol/ μl), 3-4 μl DNA đã được tinh sạch, và nước cất được thêm vào sao cho tổng thể tích là 8 μl . Kỹ thuật PCR cho giải trình tự gen được tiến hành trên máy luân nhiệt với chu trình nhiệt như sau: giai đoạn biến tính với điều kiện 96°C trong vòng 45 giây; tiếp theo là 28 chu kỳ, trong mỗi chu kỳ gồm có giai đoạn ủ mồi ở 96°C trong 10 giây, giai đoạn gắn mồi ở 50°C trong 5 giây và giai đoạn kéo dài ở 60°C trong 2 phút; sau đó giảm nhiệt nhanh đến 4°C và giữ cho đến khi sử dụng.

Sau khi hoàn thành PCR cho giải trình tự, sản phẩm được tinh sạch với các bước như sau:

- Cho 60 μl EtOH 100% và 2 μl EDTA 125 μM vào mỗi mẫu, vortex nhẹ rồi ly tâm với điều kiện 4000 rpm ở 4°C trong 30 phút.
- Loại bỏ dịch bằng cách úp đĩa lên giấy thấm đồng thời spin với 900 rpm.
- Cho 60 μl EtOH 70% vào mỗi mẫu, sau đó ly tâm với điều kiện 4000 rpm ở 4°C trong 30 phút.
- Loại bỏ dịch tương tự như trên bằng cách úp đĩa lên giấy thấm đồng thời spin với 900 rpm.
- Bước làm khô được thực hiện bằng máy Speedvax trong 12 phút.
- Cho 6 μl Hidi vào mỗi mẫu.
- Biến tính mẫu bằng máy PCR với điều kiện 98°C trong 2 phút, sau đó mẫu được làm lạnh nhanh bằng đá.

Sau đó, trình tự của các đoạn DNA được xác định trên máy giải trình tự tự động ABI genetic analyzer 3500. Các nucleotide trên đoạn gen sẽ được biểu hiện bằng các đỉnh (peak) với 4 màu tương đương với 4 loại nucleotide bao

gồm nucleotide A, T, G, C. Sau đó, phần mềm BioEdit được sử dụng để tiến hành đánh giá chất lượng giải trình tự cũng như phân tích dữ liệu và phát hiện các điểm đa hình đột biến có trong các gen này. Các kết quả giải trình tự của mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự gen chuẩn trên ngân hàng gen và giữa các cá thể với nhau để phát hiện các điểm biến đổi. Trình tự tham khảo của các gen *FZD4*, *NDP*, *KIF11* và *ATOH7* trên ngân hàng lần lượt là *FZD4* (NM_012193), *NDP* (NM_000266), *KIF11* (NM_004523) và *ATOH7* (NM_145178).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ

3.1.1. Dữ liệu lâm sàng của các bệnh nhân người Việt Nam được chẩn đoán mắc FEVR

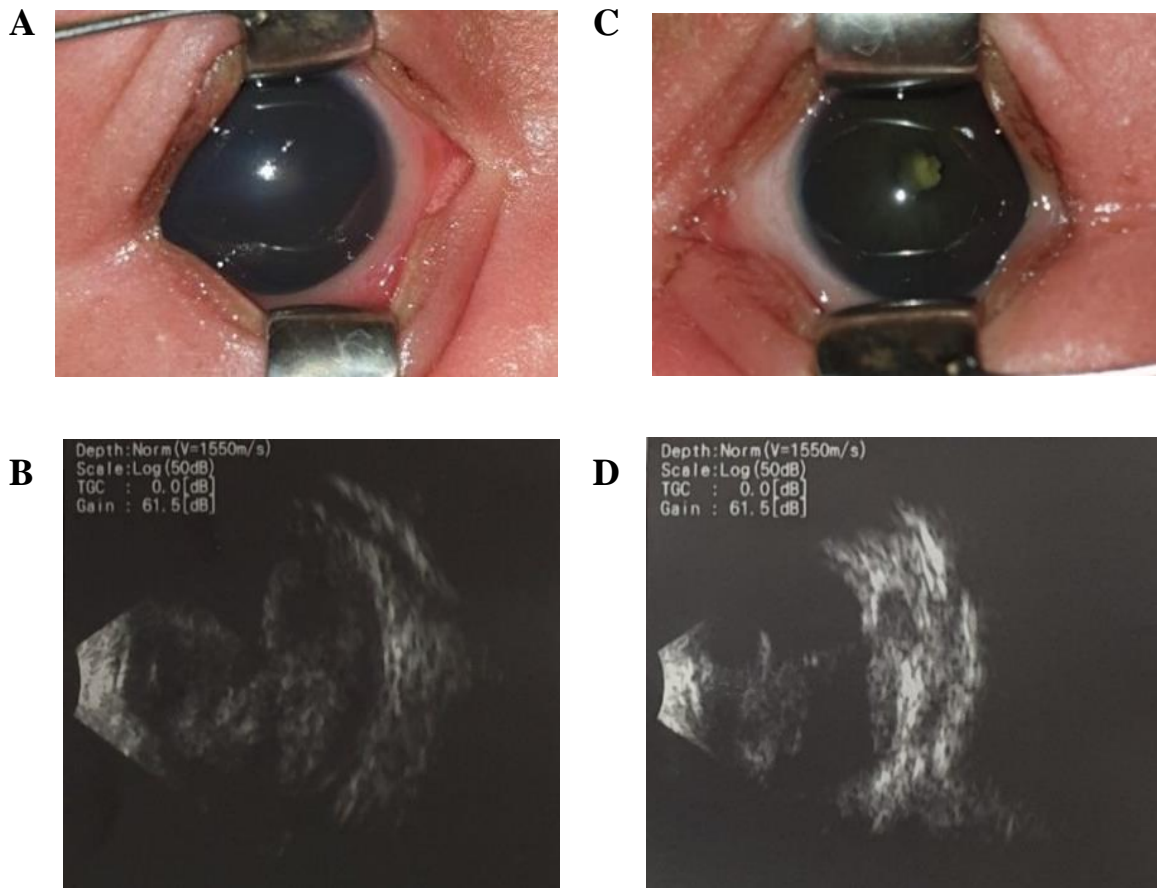
Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập được thông tin lâm sàng và mẫu máu của tổng số 20 bệnh nhi từ các gia đình khác nhau (Bảng 3.1). Tuổi trung bình của bệnh nhi khi được chẩn đoán là 4 tháng (từ 14 ngày tuổi đến 11 tháng tuổi), và tỷ lệ giữa nam và nữ là 15:5. Tất cả trẻ đều sinh đủ tháng và không có tiền sử điều trị bằng liệu pháp oxy.

Xét nghiệm chụp mạch huỳnh quang hoặc soi đáy mắt đã phát hiện các tổn thương mạch máu võng mạc ở 100% bệnh nhân, trong khi đó 95% bệnh nhân bị lác (19/20). Bên cạnh đó, các đặc điểm bong võng mạc, xuất tiết, rung giật nhãn cầu và bất đối xứng lần lượt được tìm thấy ở 35%, 30%, 15% và 20% bệnh nhân. Các đặc điểm khác của mắt như đục thủy tinh thể, teo nhãn cầu, thoái hóa giác mạc dải băng, đục giác mạc, dính đồng tử và giác mạc to đã được phát hiện ở một số bệnh nhân. Đáng chú ý, bốn bệnh nhân có dấu hiệu đầu nhỏ và một người bị não úng thủy.

Bốn trong số 20 bệnh nhân có tiền sử gia đình, trong đó ít nhất một thành viên trong gia đình có vấn đề về thị giác. Bệnh nhân FEVR-06 có một người anh trai có tình trạng mắt rất giống đặc điểm của FEVR. Trong gia đình bệnh nhân FEVR-08, ông ngoại của bệnh nhân mắc bệnh tăng nhãn áp giai đoạn đầu và cậu ruột bị cận thị. Trong gia đình FEVR-15, ông ngoại của bệnh nhân bị rung giật nhãn cầu.

Trong gia đình F20, 11 nam giới trong 4 thế hệ thuộc họ ngoại của bệnh nhân bị mất thị lực nghiêm trọng. Ở bệnh nhân FEVR-20, cả hai mắt đều có đặc điểm dính đồng tử và đục thủy tinh thể toàn bộ. Các giá trị IOP là 19 mm Hg ở mắt phải và 13 mmHg ở mắt trái, do đó sự chênh lệch nhãn áp giữa hai mắt là 6 mm Hg. Hơn nữa, mắt phải bị giác mạc to và đục giác mạc. Siêu âm mắt phải cho thấy gần toàn bộ dịch kính là đám tổ chức liên kết dày đặc và khó phân biệt được các lớp màng phía sau. Trong khi đó, siêu âm mắt trái cho thấy có đám màng tổ chức liên kết dày bám võng mạc gai thị và bong võng mạc toàn

bộ giai đoạn cuối. Do kiểu hình mắt nặng và có tiền sử gia đình, bệnh nhân FEVR-20 bị nghi ngờ mắc bệnh Norrie (Bảng 3.2 và Hình 3.1).



Hình 3.1. Hình ảnh lâm sàng và ảnh chụp đáy mắt của bệnh nhân FEVR-20. B: Đoạn trước của mắt phải bị đục thủy tinh thể, đục giác mạc và dính đồng tử. **C:** Đoạn trước của mắt trái bị đục thủy tinh thể và dính đồng tử. **D:** Siêu âm đáy mắt phải cho thấy các đám đục dịch kính phân bố gần như khắp thể thủy tinh. **E:** Siêu âm đáy mắt trái cho thấy một màng dày dính vào đĩa thị và bong vồng mạc hình phễu. **mm:** millimet; **mm Hg:** millimet thủy ngân.

Bảng 3.1. Thông tin lâm sàng của bệnh nhi được chẩn đoán mắc FEVR ở Việt Nam.

Gia đình	Bệnh nhân	Giới tính/Tuổi khởi phát	Tiền sử gia đình	Đặc điểm mắt	Đặc điểm khác
F1	FEVR-01	Nam/4 tháng	Không	Tổn thương mạch máu võng mạc, lác.	Không
F2	FEVR-02	Nam/-	-	Tổn thương mạch máu võng mạc, xuất tiết, bất đối xứng, lác.	Không
F3	FEVR-03	Nam/-	-	Tổn thương mạch máu võng mạc, lác.	Không
F4	FEVR-04	Nam/-	Không	Tổn thương mạch máu võng mạc, bong võng mạc, lác.	Không
F5	FEVR-05	Nam/3 tháng	Không	Tổn thương mạch máu võng mạc, lác.	Không
F6	FEVR-06	Nữ/-	Có	Tổn thương mạch máu võng mạc, lác.	Không
F7	FEVR-07	Nam/5 tháng	-	Tổn thương mạch máu võng mạc, lác.	Dấu hiệu đầu nhỏ

F8	FEVR-08	Nam/-	Có	Tổn thương mạch máu võng mạc, bong võng mạc, lác.	Dấu hiệu đầu nhỏ
F9	FEVR-09	Nữ/-	-	Tổn thương mạch máu võng mạc, xuất tiết, bong võng mạc, lác.	Không
F10	FEVR-10	Nam/14d	Không	Tổn thương mạch máu võng mạc, xuất tiết, bất đối xứng, lác.	Không
F11	FEVR-11	Nam/6m	-	Tổn thương mạch máu võng mạc, teo nhãn cầu, lác.	Dấu hiệu đầu nhỏ (HC = 42 cm)
F12	FEVR-12	Nam/-	Không	Tổn thương mạch máu võng mạc, xuất tiết, lác.	Não úng thủy
F13	FEVR-13	Nữ/1tháng	Có	Tổn thương mạch máu võng mạc, bong võng mạc, bất đối xứng, lác, rung giật nhãn cầu.	Dấu hiệu đầu nhỏ (HC = 36 cm)
F14	FEVR-14	Nữ/11 tháng	Không	Tổn thương mạch máu võng mạc, lác, rung giật nhãn cầu, đục thủy tinh thể.	Không

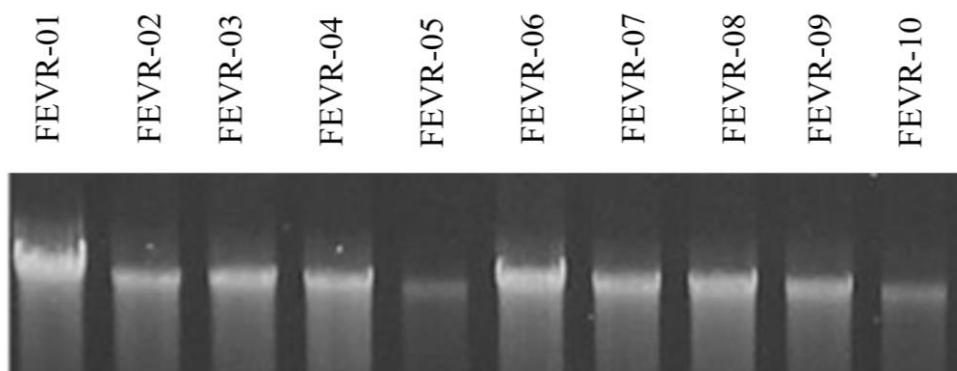
F15	FEVR-15	Nam/2 tháng	Có	Tổn thương mạch máu võng mạc, bong võng mạc, thoái hóa giác mạc dải băng, bất đối xứng, teo nhãn cầu.	Không
F16	FEVR-16	Nữ/3 tháng	-	Tổn thương mạch máu võng mạc, lác.	Không
F17	FEVR-17	Nam/-	Không	Tổn thương mạch máu võng mạc, bong võng mạc, xuất tiết, lác, rung giật nhãn cầu.	Không
F18	FEVR-18	Nam/5 tháng	Không	Tổn thương mạch máu võng mạc, xuất tiết, lác.	Không
F19	FEVR-19	Nam/7 tháng	Có	Tổn thương mạch máu võng mạc, lác.	Không
F20	FEVR-20	Nam/23 ngày	Có	Tổn thương mạch máu võng mạc, bong võng mạc, đục giác mạc, đục thủy tinh thể, dính đồng tử, lác, giác mạc to	Không

Bảng 3.2. Tóm tắt thông tin lâm sàng của bệnh nhân FEVR-20.

Thăm khám lần đầu	23 ngày tuổi	Giới tính	Nam
Tuổi hiện tại	20 tháng	Dấu hiệu ban đầu	Mắt không có di chuyển theo đuôi
Kết quả kiểm tra			
		Mắt phải	Mắt trái
Thị lực		Có cảm nhận ánh sáng	Có cảm nhận ánh sáng
Kiểm tra đèn khe	Đục giác mạc	Có	Không
	Đường kính giác mạc	13 mm	12,5 mm
	Tiền phòng nông	Có	Có
	Đồng tử	Dính đồng tử	Dính đồng tử
	Đục thủy tinh thể	Có	Có
Nhãn áp (IOP)		19 (I-care) mm Hg	13 (I-care) mm Hg
Đáy mắt		Không quan sát được	Không quan sát được
Siêu âm đáy mắt	Chiều dài trục nhãn cầu	20,7 mm	14,8 mm
	Võng mạc-dịch kính	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Toàn bộ dịch kính là đám tổ chức liên kết dày đặc ▪ Khó phân biệt được các lớp màng phía sau 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Đám màng tổ chức liên kết dày bám võng mạc gai thị ▪ Bong võng mạc toàn bộ giai đoạn cuối
Chụp điện tử		Không kiểm tra được	Không kiểm tra được

3.1.2. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Kết quả điện di sản phẩm DNA tổng số tách chiết được cho thấy các dải băng rõ ràng và sáng tập trung ở khu vực có kích thước DNA khoảng 20 kb trên bản gel. Điều này cho thấy sản phẩm DNA tổng số thu được không bị đứt gãy nhiều và có độ tinh khiết cao (Hình 3.2). Nồng độ DNA tổng số của các mẫu bệnh nhi nằm trong khoảng từ 20,8 đến 63,7 ng/ μ l (Bảng 3.3). Như vậy, chất lượng DNA tổng số đạt yêu cầu để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.2. Ảnh minh họa điện di sản phẩm DNA tổng số.

Bảng 3.3. Nồng độ DNA tổng số.

Mẫu	Nồng độ DNA (ng/ μ l)	Mẫu	Nồng độ DNA (ng/ μ l)
FEVR-01	63,7	FEVR-11	34,1
FEVR-02	32,1	FEVR-12	35,3
FEVR-03	33,6	FEVR-13	36,6
FEVR-04	32,5	FEVR-14	39,1
FEVR-05	20,8	FEVR-15	37,2
FEVR-06	34,1	FEVR-16	35,8
FEVR-07	38,8	FEVR-17	36,4
FEVR-08	35,9	FEVR-18	45,0
FEVR-09	34,3	FEVR-19	36,8
FEVR-10	26,7	FEVR-20	34,2

3.1.2. Đột biến gen phát hiện bằng giải trình tự gen

Sau khi DNA của 20 bệnh nhi được sử dụng để giải trình tự, các biến thể mới và hiếm được tìm thấy trong các gen liên quan đến FEVR sẽ được đánh giá khả năng gây bệnh. Kết quả là 11 bệnh nhi được xác định có mang đột biến gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh, chiếm 55% tổng số bệnh nhi (Bảng 3.4). Có tổng cộng 9 đột biến được tìm thấy trên 4 gen gây bệnh FEVR, cụ thể là 3 đột biến dị hợp tử ở gen *FZD4* (3 bệnh nhân), 3 đột biến bán dị hợp tử ở gen *NDP* (3 bệnh nhân), 3 đột biến dị hợp tử ở gen *KIF11* (3 bệnh nhân) và 1 biến thể đồng hợp tử ở gen *ATOH7* (2 bệnh nhân). Các dạng đột biến bao gồm 2 đột biến dịch khung, 3 đột biến vô nghĩa, 4 đột biến sai nghĩa và 2 đột biến splicing. Đặc biệt, 4 trong số 11 đột biến là đột biến mới và không được tìm thấy trong nhóm đối chứng của cơ sở dữ liệu 500 người Việt Nam.

Đối với gen *FZD4* (Hình 3.4), hai biến thể gây bệnh đã biết là c.1282_1285del, p.(D428Sfs*2) và c.313A>G, p.(M105V) đã được tìm thấy ở bệnh nhân FEVR-05 và FEVR-14. Một đột biến mới c.169G>C, dẫn đến sự thay thế axit amin p.(G57R), được xác định ở bệnh nhân FEVR-18. Biến thể này nằm trong vùng protein FZD4 có tính bảo thủ cao và được dự đoán là một biến thể gây hại nhờ các công cụ dự đoán Shift và Polyphen 2 (Hình 3.3). Bên cạnh đó, đây là một đột biến *de novo* do không được tìm thấy trong cha mẹ của bệnh nhi. Theo AHGM, đây có khả năng là một đột biến gây bệnh.

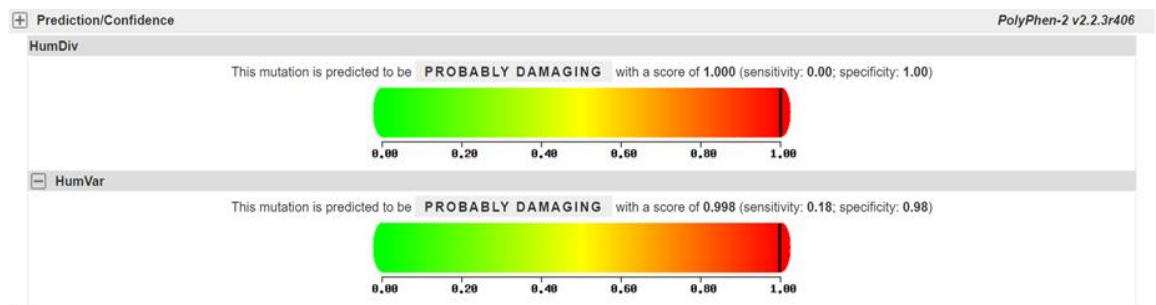
Đối với gen *NDP* nằm trên nhiễm sắc thể X (Hình 3.5), chúng tôi phát hiện 3 đột biến ở trạng thái bán dị hợp tử trên 3 bệnh nhi giới tính nam. Hai biến thể sai nghĩa c.112C>T, p.(R38C) trong bệnh nhi FEVR-10 và c.131A>G, p.(Y44C) trong bệnh nhi FEVR-15 đã được báo cáo trước đây là các đột biến gây bệnh. Đột biến mới c.175-3A>G trong bệnh nhi FEVR-19 được dự đoán là gây ra sự thay đổi vị trí mối nối. Người mẹ khỏe mạnh của bệnh nhân FEVR-19 cũng mang đột biến c.175-3A>G ở dạng dị hợp tử.

Đối với gen *KIF11* (Hình 3.6), một đột biến splicing c.388-1G>C đã được báo cáo trước đây được tìm thấy ở bệnh nhân FEVR-08. Hai đột biến mới c.2146C>T, p.(Q716*) và c.2511_2515del, p.(N838Kfs*17) lần lượt được xác định ở bệnh nhân FEVR-07 và FEVR-11. Cả hai đều là đột biến *de novo* và là đột biến vô nghĩa và có thể được phân loại là các đột biến gây bệnh.

A

	p.G57R	
NP_036325.2	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>H.sapiens</i>
XP_025275150.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>C.lupus dingo</i>
XP_032212986.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>M.erminea</i>
XP_002925226.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>A.melanoleuca</i>
XP_002822378.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>P.abelii</i>
XP_025750055.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>C.ursinus</i>
XP_001175326.2	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>P.troglodytes</i>
XP_017898819.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKVNI	<i>C.hircus</i>
XP_004683332.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>C.cristata</i>
XP_045413127.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>L.catta</i>
XP_007944467.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>O.afer afer</i>
XP_043732311.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKVNI	<i>C.elaphus</i>
XP_032496992.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKVNI	<i>P.sinus</i>
XP_045872465.1	CQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDDELQLTTFPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINI	<i>M.meles</i>

B



Hình 3.3. Tính bảo thủ (A) và dự đoán chức năng bằng Polyphen 2 (B) của biến thể mới c.G169C, p.(G57R) trên gen FZD4. Axit amin p.G57R có tính bảo thủ cao được đánh dấu trong hộp màu đỏ. Trình tự chuẩn cho protein FZD4: *H.sapiens* (NP_036325.2), *C.lupus dingo* (XP_025275150.1), *M.erminea* (XP_032212986.1), *A.melanoleuca* (XP_002925226.1), *P.abelii* (XP_002822378.1), *C.ursinus* (XP_025750055.1), *P.troglodytes* (XP_001175326.2), *C.hircus* (XP_017898819.1), *C.cristata* (XP_004683332.1), *L.catta* (XP_045413127.1), *O.afer afer* (XP_007944467.1), *C.elaphus* (XP_043732311.1), *P.sinus* (XP_032496992.1), *M.meles* (XP_045872465.1).

Đối với gen *ATOH7* (Hình 3.7), một đột biến gây bệnh c.145G>T, p.(E49*) đã được phát hiện ở hai bệnh nhân FEVR-06 và FEVR-16 ở trạng thái đồng hợp tử. Theo cơ sở dữ liệu OMIM, đột biến gen *ATOH7* là nguyên nhân gây ra tồn lưu dịch kính nguyên thủy tăng sinh theo mô hình lặn trên NST thường. Giải trình tự Sanger đã xác định được đột biến dị hợp tử c.145G>T, p.(E49*) ở cả bố và mẹ của bệnh nhân FEVR-06. Tuy nhiên, các mẫu DNA

của cha mẹ bệnh nhân FEVR-16 không có sẵn để kiểm tra sự có mặt của đột biến này.

3.1.3. Đột biến gen phát hiện bằng MLPA

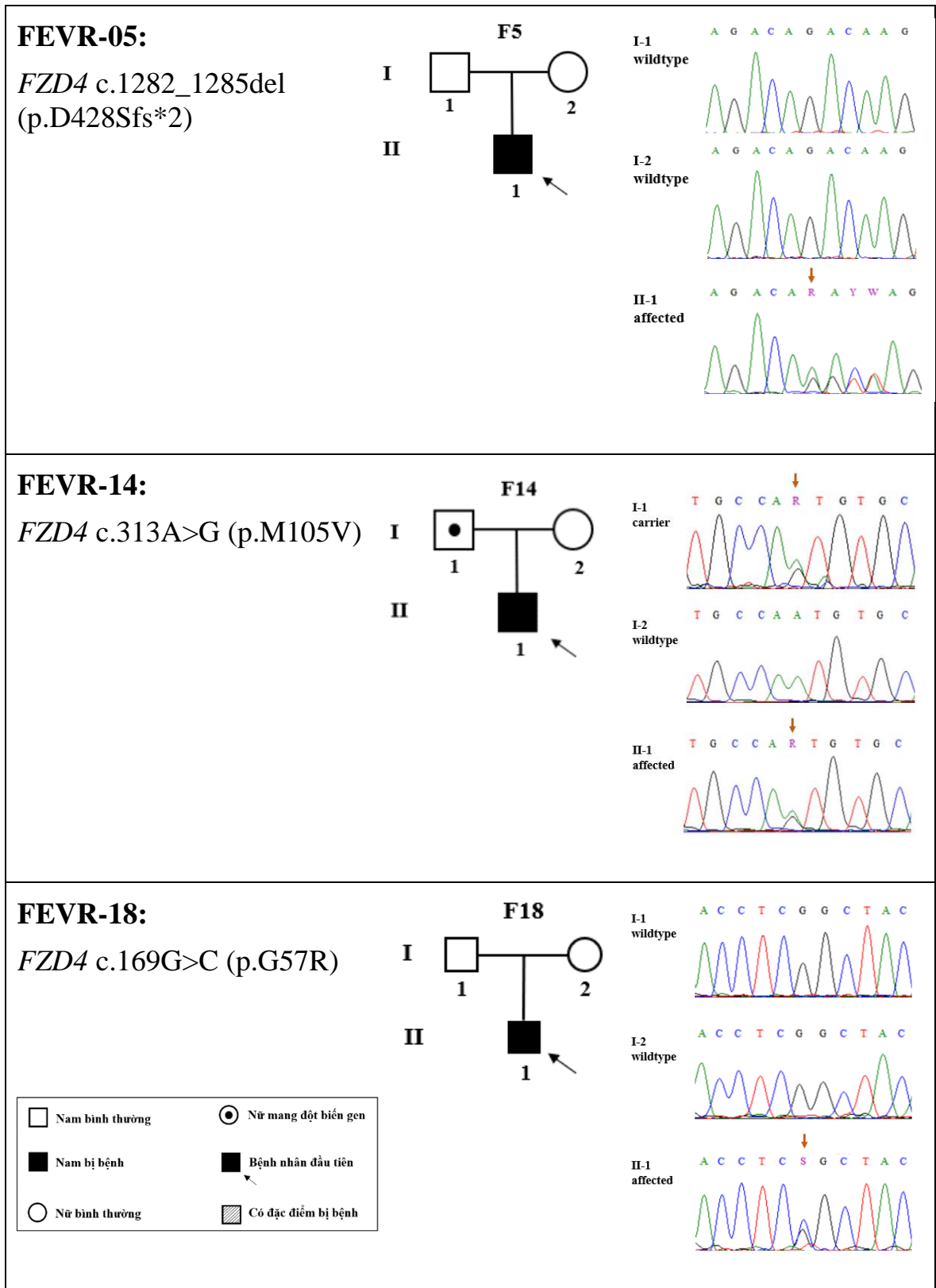
Các mẫu DNA của 9 trong số 20 bệnh nhân không phát hiện được đột biến gây bệnh bằng phương pháp giải trình tự đã được sử dụng cho phân tích MLPA để xác định xem họ có đột biến mất/lặp đoạn hay không. Kết quả cho thấy chỉ có bệnh nhân FEVR-20 bị mất exon 2 của gen *NDP* ở dạng bán dị hợp tử (Hình 3.8 và 3.9). Sau đó, kết quả kiểm tra MLPA trên các thành viên trong gia đình bệnh nhân cho thấy người anh trai có triệu chứng lâm sàng cũng bị mất đoạn *NDP* exon 2 ở dạng bán dị hợp tử, trong khi đó người mẹ và chị gái khỏe mạnh đều mang kiểu gen dị hợp tử. Việc kiểm tra đột biến này bằng phương pháp PCR cũng đã cho thấy biến thể mất đoạn *NDP* exon 2 trên mẫu bệnh nhi FEVR-20 và người anh trai (Hình 3.8C).

Bảng 3.4. Đột biến gen tìm thấy ở bệnh nhi được chẩn đoán mắc FEVR.

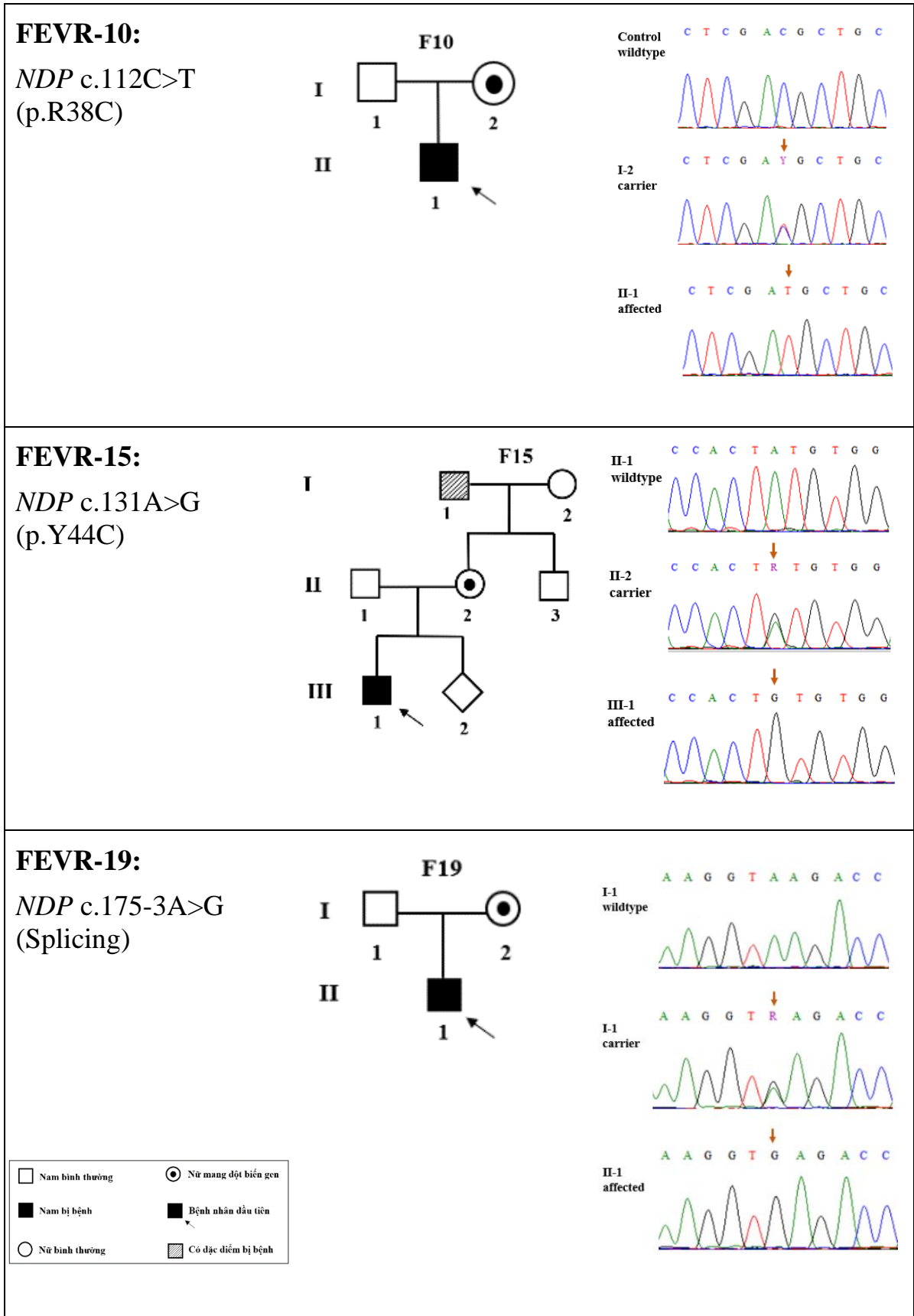
Mã bệnh nhân	Gen	Vị trí trên cDNA	Thay đổi amino axit	Trạng thái	Ảnh hưởng	TLTK	Thừa hưởng	Phân loại
FEVR-05	<i>FZD4</i>	c.1282_1285del	p.(D428Sfs*1)	Het	Dịch khung	rs80358295	<i>De novo</i>	Gây bệnh ^{a b}
FEVR-14	<i>FZD4</i>	c.313A>G	p.(M105V)	Het	Sai nghĩa	rs80358284	Bố	Gây bệnh ^{a b}
FEVR-18	<i>FZD4</i>	c.169G>C	p.(G57R)	Het	Sai nghĩa	Mới	<i>De novo</i>	Có khả năng gây bệnh ^c
FEVR-10	<i>NDP</i>	c.112C>T	p.(R38C)	Hemi	Sai nghĩa	rs758550101	Mẹ	Gây bệnh ^{a b}
FEVR-15	<i>NDP</i>	c.131A>G	p.(Y44C)	Hemi	Sai nghĩa	rs104894870	Mẹ	Gây bệnh ^c
FEVR-19	<i>NDP</i>	c.175-3A>G	Splicing	Hemi	Splicing	Mới	Mẹ	Có khả năng gây bệnh ^c
FEVR-20	<i>NDP</i>	Exon 2 deletion		Hemi	Mất đoạn	Đã được báo cáo	Mẹ	Gây bệnh
FEVR-07	<i>KIF11</i>	c.2146C>T	p.(Q716*)	Het	Vô nghĩa	Mới	<i>De novo</i>	Có khả năng gây bệnh ^c

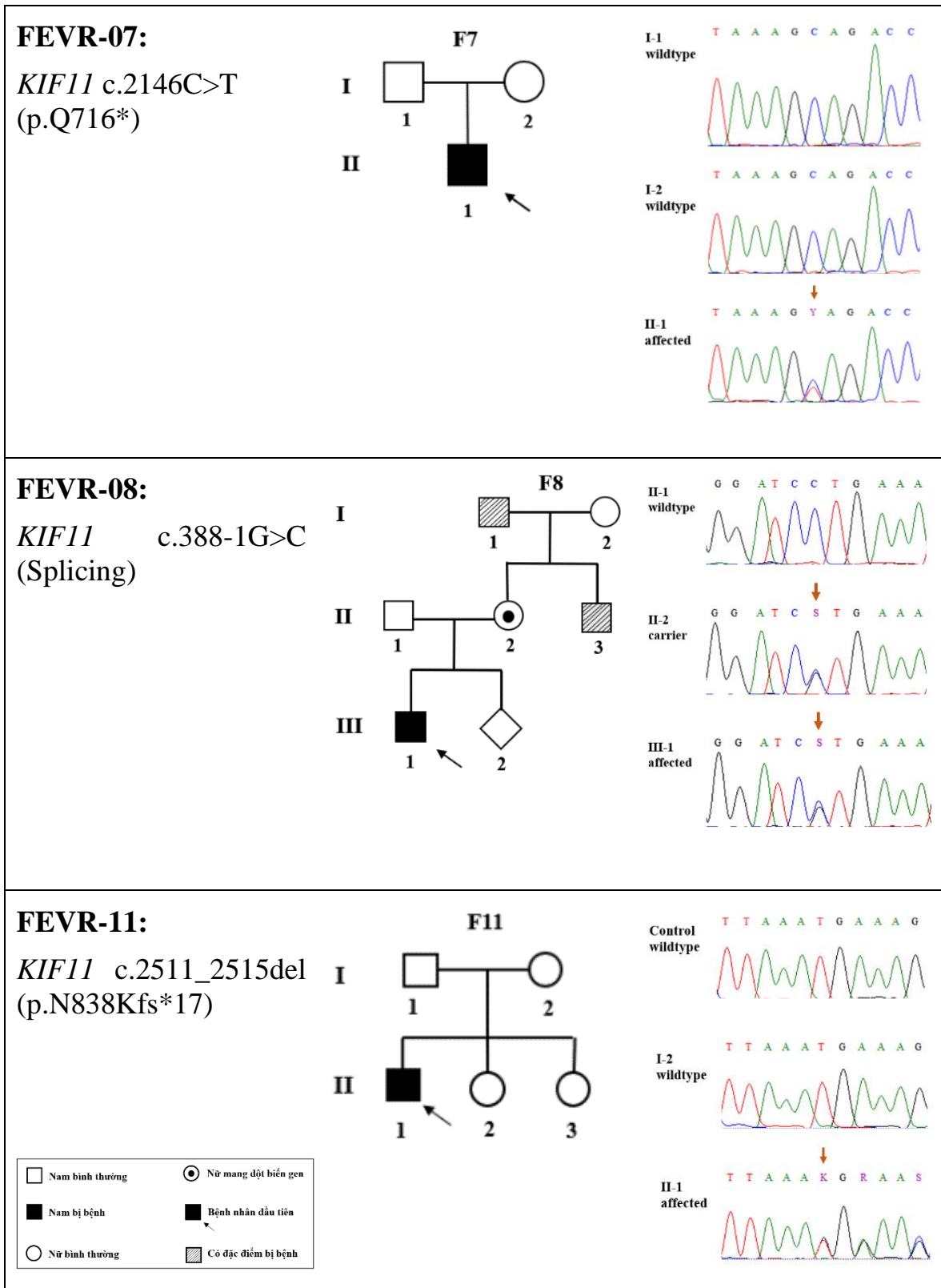
FEVR-08	<i>KIF11</i>	c.388-1G>C	Splicing	Het	Splicing	rs18444462368	Mẹ	Có khả năng gây bệnh ^b
FEVR-11	<i>KIF11</i>	c.2511_2515del	p.(N838Kfs*17)	Het	Dịch khung	Mới	<i>De novo</i>	Có khả năng gây bệnh ^c
FEVR-06	<i>ATOH7</i>	c.145G>T	p.(E49*)	Hom	Vô nghĩa	rs560230254	Bố & Mẹ	Có khả năng gây bệnh ^c
FEVR-16	<i>ATOH7</i>	c.145G>T	p.(E49*)	Hom	Vô nghĩa	rs560230254	<i>De novo</i>	Có khả năng gây bệnh ^c

Het: heterozygosity (Dị hợp tử); hemi: hemizygoty (Bán dị hợp tử); hom: homozygosity (Đồng hợp tử). Trình tự tham chiếu: *ATOH7* (NM_145178), *FZD4* (NM_012193), *KIF11* (NM_004523), *LRP5* (NM_002335), *NDP* (NM_000266). ^a: Phân loại lâm sàng dựa vào LOVD; ^b: Phân loại lâm sàng dựa vào ClinVar (NCBI); ^c: Phân loại lâm sàng dựa vào hướng dẫn của ACMG/AMP.

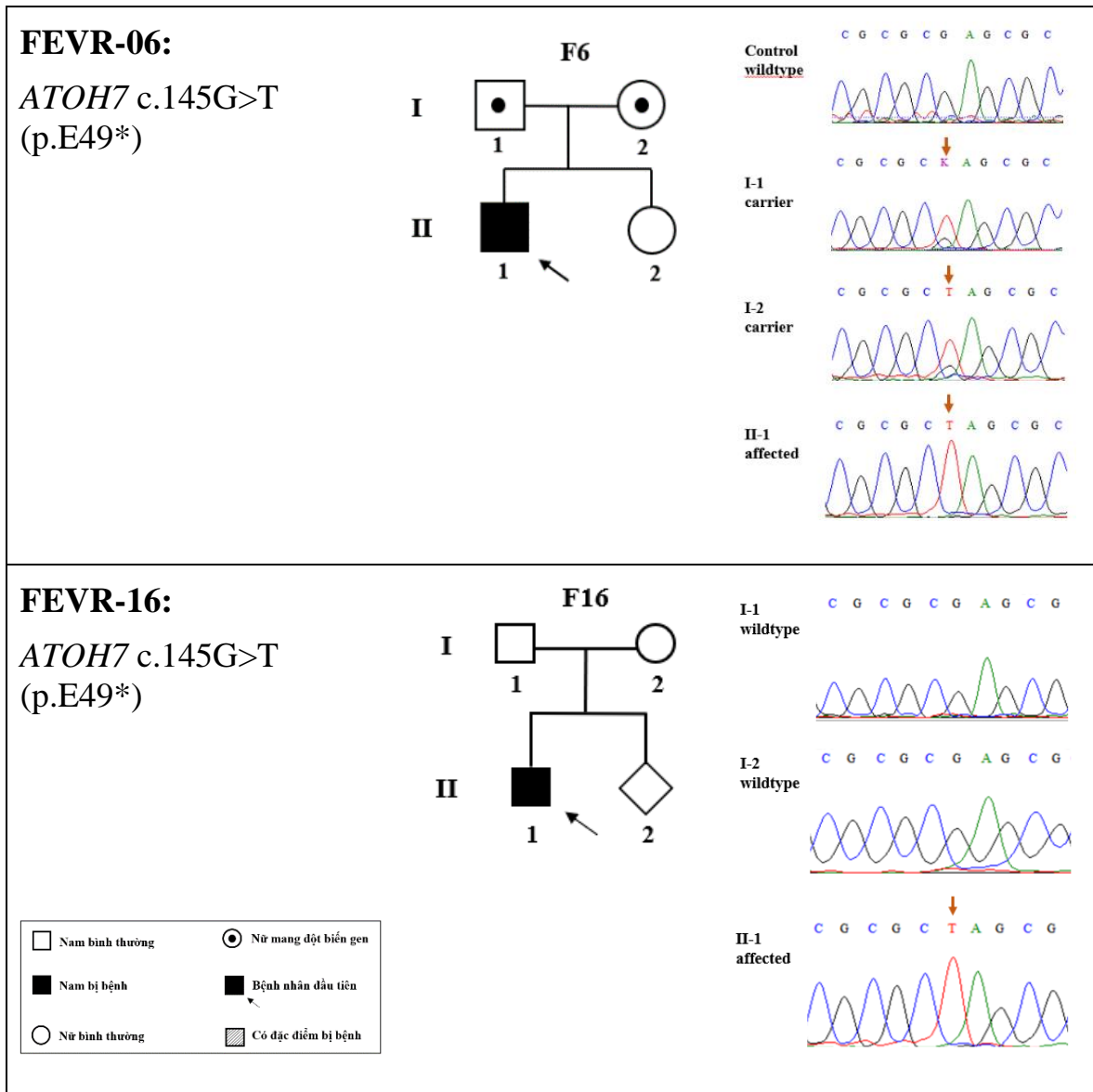


Hình 3.4. Sơ đồ phả hệ và các đột biến được tìm thấy trong gen *FZD4*. Trình tự tham chiếu: *FZD4* (NM_012193).





Hình 3.6. Sơ đồ phả hệ và các đột biến được tìm thấy trong gen *KIF11*.
 Trình tự tham chiếu: *KIF11* (NM_004523).

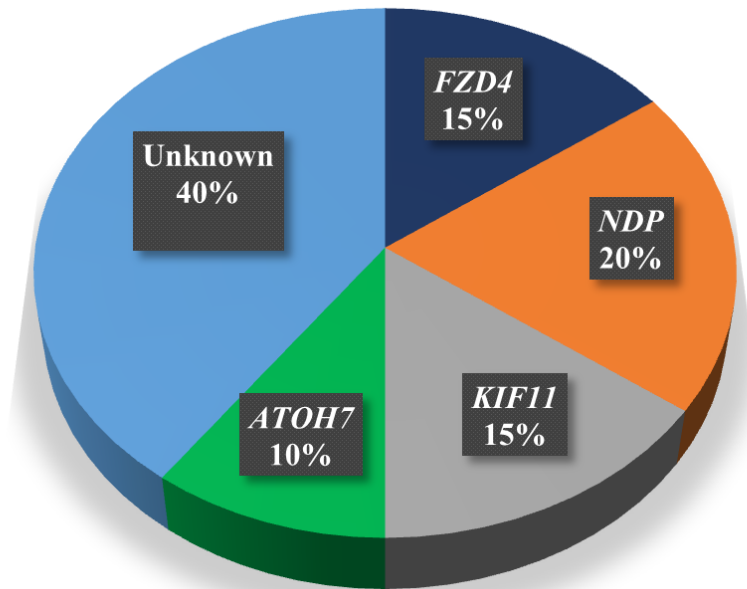


Hình 3.7. Sơ đồ phả hệ và các đột biến được tìm thấy trong gen *ATOH7*.
 Trình tự tham chiếu: *ATOH7* (NM_145178).

3.1.4. Phổ đột biến và mối tương quan của đột biến với kiểu hình lâm sàng

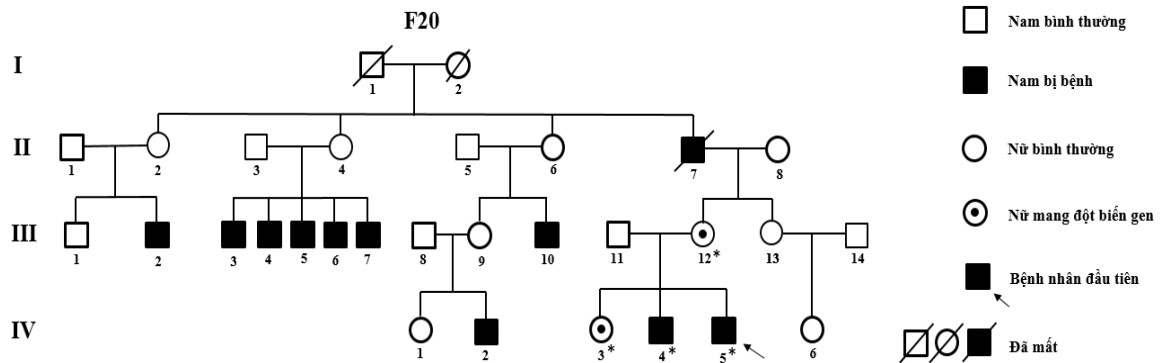
Trong nghiên cứu hiện tại, tổng số 12 đột biến gây bệnh đã được xác định trong 4 gen bao gồm *FZD4*, *NDP*, *KIF11* và *ATOH7*. Trong đó, đột biến *NDP* chiếm tỷ lệ lớn nhất (20%), theo sau là *FZD4* (15%), *KIF11* (15%) và *ATOH7* (10%) (Hình 3.10). Không có đột biến gây bệnh nào được phát hiện trong các gen gây bệnh FEVR còn lại (*LRP5*, *TSPAN12*, *ZNF408* và *CTNNB1*). Bên cạnh đó, vẫn còn 8 bệnh nhi chưa phát hiện ra nguyên nhân gây bệnh.

Tất cả 12 bệnh nhân được xác định có đột biến đều có dị thường mạch máu võng mạc, và 11 bệnh nhân bị lác (Bảng 3.5). Khoảng 33% (1/3) bệnh nhân có đột biến *FZD4*, 25% (1/4) bệnh nhân với đột biến *NDP* và 50% (1/2) bệnh nhân với đột biến *ATOH7* bị xuất tiết. Bong võng mạc được phát hiện ở khoảng 33% (1/3) bệnh nhân có đột biến *FZD4*, 50% (2/4) với đột biến *NDP*, 33% (1/3) bệnh nhân với *KIF11* và 50% (1/2) với *ATOH7*. Rung giật nhãn cầu và đục thủy tinh thể không xuất hiện trong các bệnh nhân có đột biến gen *ATOH7*. Đặc điểm bất đối xứng chỉ được tìm thấy ở những bệnh nhân có đột biến gen *NDP*, với 2/3 trong số họ có đặc điểm này. Cả ba bệnh nhân mang đột biến gen *KIF11* đều có dấu hiệu đầu nhỏ, và một bệnh nhân còn bị teo nhãn cầu ở mắt trái (Hình 3.11).

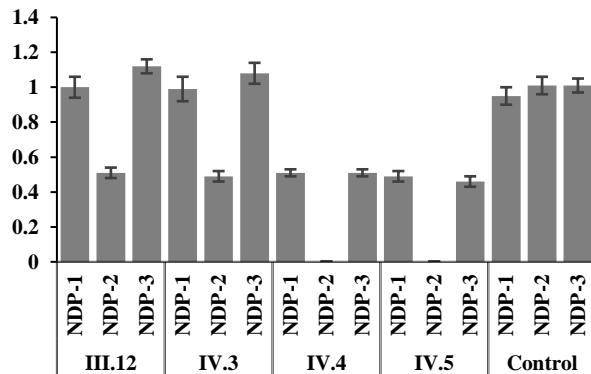


Hình 3.10. Phổ đột biến ở các gen gây bệnh FEVR trên bệnh nhi Việt Nam.

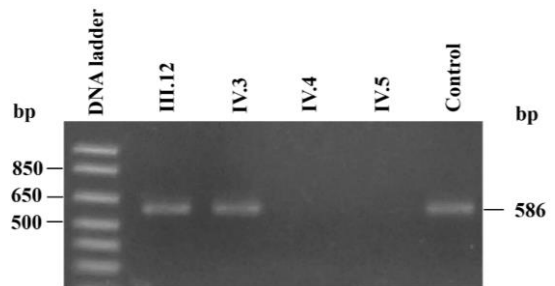
A



B

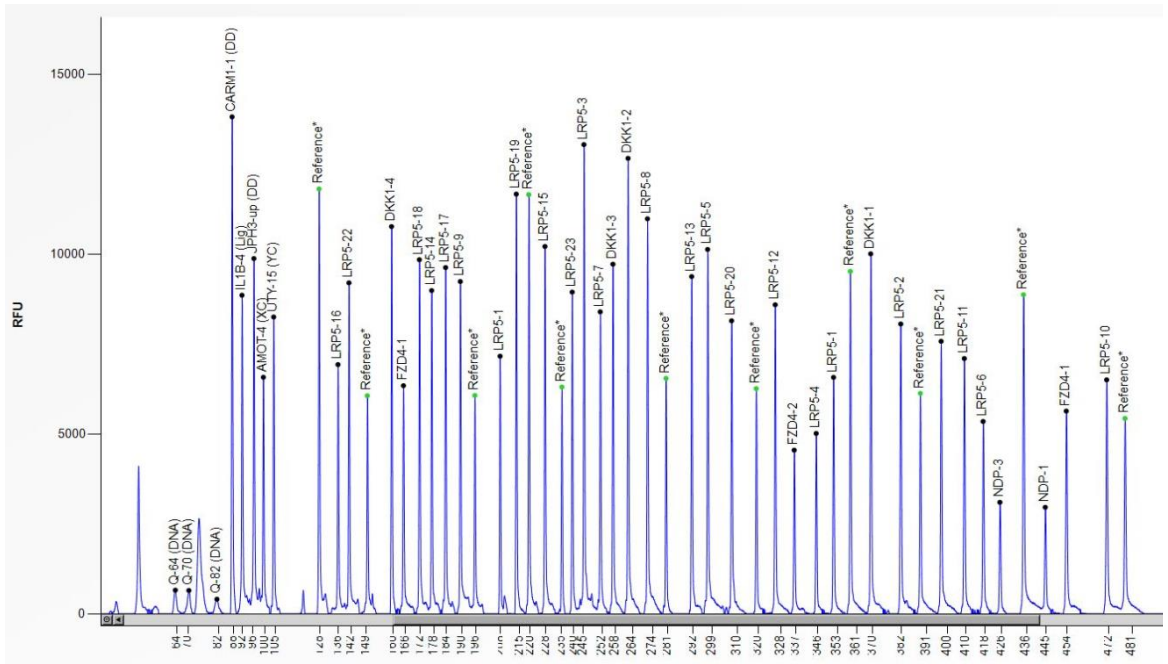


C

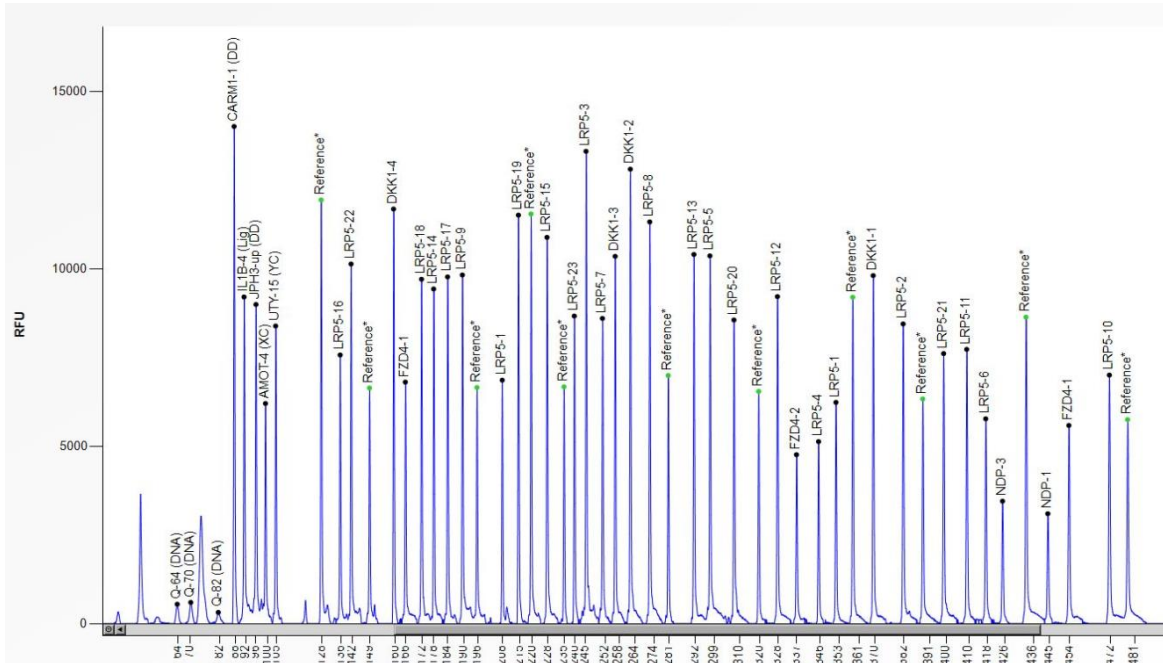


Hình 3.8. Đột biến mất đoạn *NDP* exon 2 ở bệnh nhân FEVR-20. **A:** Sơ đồ phả hệ của gia đình FEVR-20 cho thấy 11 trong số 19 nam giới có triệu chứng bệnh. **B:** Kết quả phân tích MLPA của bệnh nhân (IV.5), người mẹ khỏe mạnh (III.12), người chị gái khỏe mạnh (IV.3) và người anh trai có triệu chứng (IV.4). Mất đoạn exon trên gen *NDP* được phát hiện trên bệnh nhân và người anh trai. **C:** Sản phẩm PCR của *NDP* exon 2 trên gel agarose. Kết quả cho thấy *NDP* exon 2 đã được khuếch đại thành công ở mẫu người mẹ (III.12), người chị gái (IV.3) và mẫu đối chứng khỏe mạnh, tuy nhiên, không thể khuếch đại ở bệnh nhân (IV.5) và người anh trai (IV.4). *: những bệnh nhân được xét nghiệm gen.

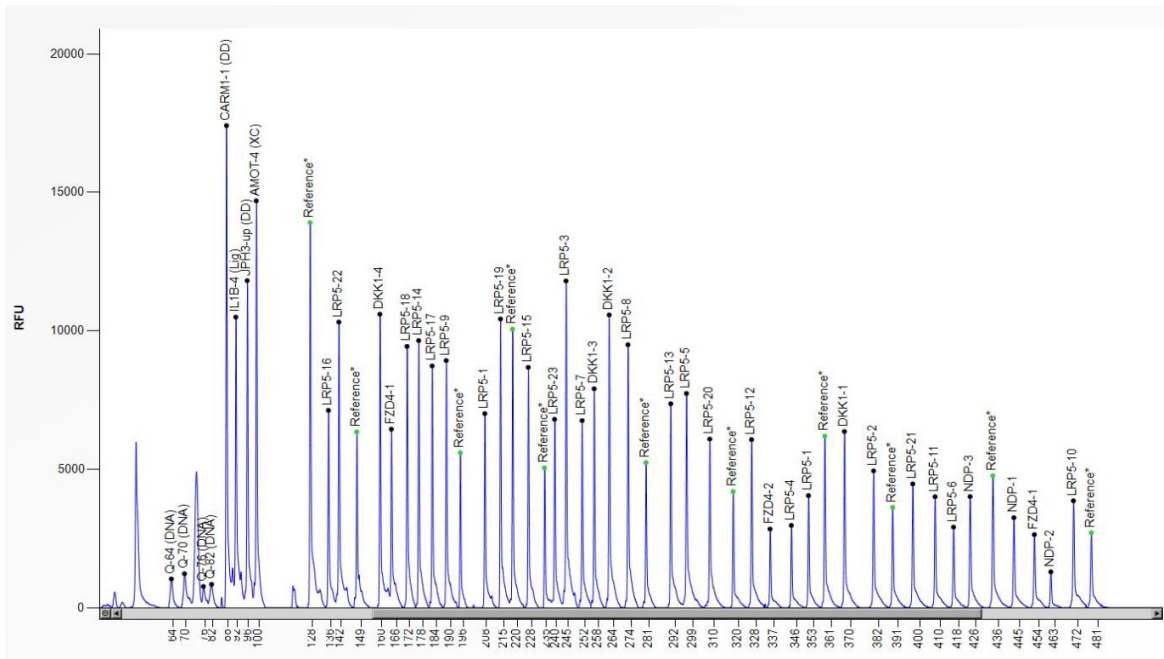
Bệnh nhân FEVR-20



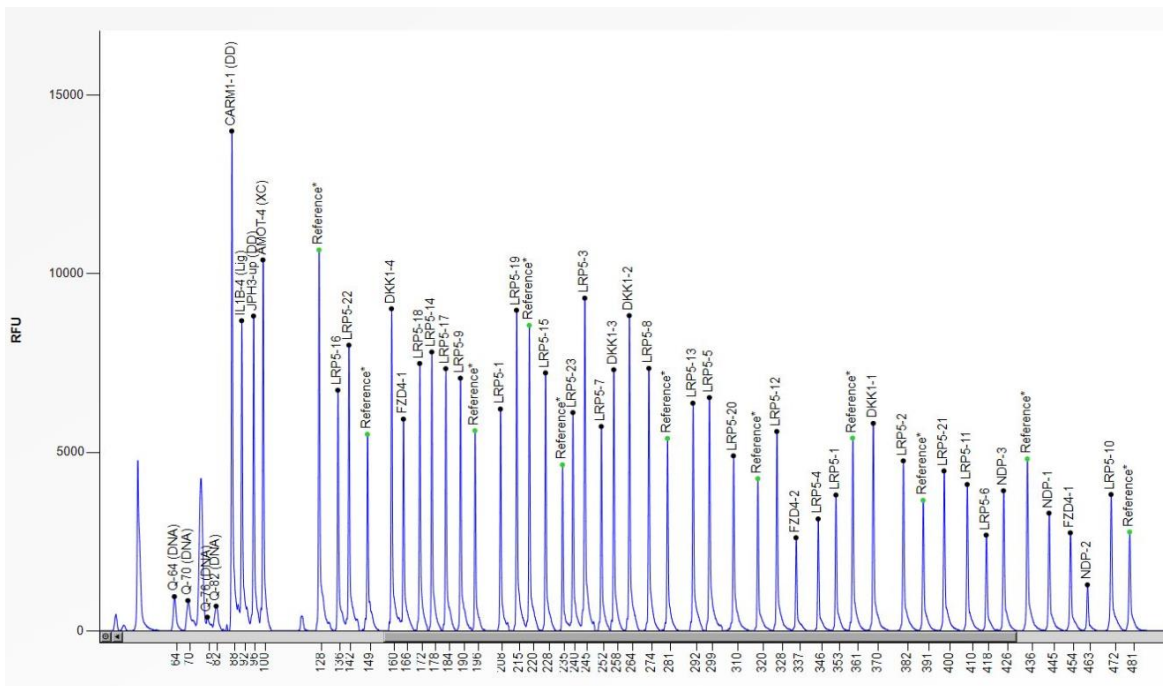
Anh trai của bệnh nhân FEVR-20



Mẹ của bệnh nhân FEVR-20



Chị gái của bệnh nhân FEVR-20



Hình 3.9. Kết quả MLPA dạng biểu đồ sóng của bệnh nhân FEVR-20 và thành viên gia đình.

Bảng 3.5. Mối tương quan kiểu gen-kiểu hình.

Mã bệnh nhân	Gene	Đột biến		Đặc điểm lâm sàng								
		Vị trí trên cDNA	Thay đổi amino axit	Tổn thương mạch máu võng mạc	Lác	Xuất tiết	Bong võng mạc	Rung giật nhãn cầu	Đục thủy tinh thể	Bất đối xứng	Đặc điểm khác	
FEVR-05	<i>FZD4</i>	c.1282_1285del	p.(D428Sfs*1)	+	+	-	+	+	-	-	-	
FEVR-14	<i>FZD4</i>	c.313A>G	p.(M105V)	+	+	-	-	+	+	-	-	
FEVR-18	<i>FZD4</i>	c.169G>C	p.(G57R)	+	+	+	-	-	-	-	-	
FEVR-10	<i>NDP</i>	c.112C>T	p.(R38C)	+	+	+	-	-	-	+	-	
FEVR-15	<i>NDP</i>	c.131A>G	p.(Y44C)	+	-	-	+	+	-	+	Thoái hóa giác mạc dài băng, teo nhãn cầu (mắt trái)	
FEVR-19	<i>NDP</i>	c.175-3A>G	Splicing	+	+	-	-	-	-	-	-	
FEVR-20	<i>NDP</i>	Mất đoạn exon 2		+	+	-	+		+	+	-	

FEVR-07	<i>KIF11</i>	c.2146C>T	p.(Q716*)	+	+	-	-	+	-	-	Xơ vông mạc
FEVR-08	<i>KIF11</i>	c.388-1G>C	Splicing	+	+	-	+	-	+	-	-
FEVR-11	<i>KIF11</i>	c.2511_2515del	p.(N838Kfs*17)	+	+	-	-	-	+	-	Teo nhãn cầu
FEVR-06	<i>ATOH7</i>	c.145G>T	p.(E49*)	+	+	+	-	-	-	-	-
FEVR-16	<i>ATOH7</i>	c.145G>T	p.(E49*)	+	+	-	+	-	-	-	-

3.2. THẢO LUẬN

3.2.1. So sánh tỷ lệ phát hiện và sự phân bố đột biến của nghiên cứu này với các nghiên cứu khác

Gần đây, các nghiên cứu về di truyền học về các bệnh mắt khác nhau đã được thực hiện thành công ở Việt Nam [24, 25]. Kết quả nghiên cứu này là báo cáo đầu tiên về đột biến gen ở trẻ em Việt Nam mắc FEVR. Do tính không đồng nhất về di truyền của FEVR, chúng tôi đã sử dụng nhiều phương pháp như giải trình tự Sanger, MLPA, WES và PCR và đã phát hiện các đột biến gây bệnh ở 12 trong tổng số 20 bệnh nhân, do đó tỷ lệ phát hiện là 60%. So với các nghiên cứu gần đây, tỷ lệ phát hiện của chúng tôi khá giống với nhóm người Trung Quốc (65%) và tương đối cao hơn so với nhóm Hàn Quốc (35,3%) và Mỹ (48,9%) [26-28].

Trong số các gen liên quan đến FEVR được báo cáo trước đây, nghiên cứu của chúng tôi đã xác định các biến thể gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh chủ yếu ở các gen *FZD4*, *NDP* và *KIF11*, điều này cho thấy rằng đột biến trong các gen này có thể là nguyên nhân phổ biến gây bệnh FEVR ở bệnh nhân người Việt Nam. Đáng chú ý là các đột biến được tìm thấy trong gen *NDP* chiếm tỷ lệ cao nhất (20%), trong khi số đó số lượng đột biến của cả hai gen *FZD4* và *KIF11* chiếm một tỷ lệ bằng nhau (15%). Tỷ lệ đột biến gen *FZD4* trong nghiên cứu của chúng tôi khá giống với các nghiên cứu khác trên bệnh nhân Trung Quốc (6,45-21,35%), Mỹ (15%) và Canada (18%) [26, 28, 29]. Ngược lại, tỷ lệ gen *NDP* và *KIF11* lại cao hơn đáng kể so với con số của nhóm Trung Quốc (4,11-9,68% và 1,61-6,74% tương ứng) và Mỹ (7% đối với *NDP*) [26, 28]. Từ những khác biệt này, có thể thấy các đột biến *NDP* và *KIF11* xuất hiện nhiều ở người Việt Nam hơn là các quần thể khác.

Không có đột biến gen gây bệnh nào được tìm thấy trên gen *LRP5* trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, gen *LRP5* lại là một trong những gen có nhiều đột biến gây bệnh nhất trong các nghiên cứu trước đây, bao gồm các nhóm bệnh nhân người Trung Quốc, Hàn Quốc và Mỹ [26-28]. Trong nghiên cứu này, số lượng bệnh nhân tương đối ít, và hầu hết bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn muộn với kiểu hình nặng. Điều này có thể lý giải cho sự khác biệt về tỷ lệ gen

gây bệnh của nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu này so với các nghiên cứu khác.

Không có đột biến nào được xác định ở 42% (8/20) tổng số bệnh nhân, do đó các nghiên cứu mở rộng khác cần được thực hiện để tìm đột biến gây bệnh trên các gen liên quan đến bệnh võng mạc khác. Bên cạnh đó, các phân tích khác để phát hiện các biến thể số bản sao của gen liên quan đến FEVR hoặc locus 11p13-p12 nên được thực hiện trong các nghiên cứu sâu hơn. Ngoài ra, có ba đột biến chưa rõ chức năng được tìm thấy trong nghiên cứu này (Bảng 3.6). Vì vậy, chức năng của chúng cần được chứng minh trong những nghiên cứu sau này.

3.2.2. Sự đa dạng trong kiểu hình

Ngoài những đặc điểm về mắt, Hu và cộng sự đã nhận mạnh mối tương quan cụ thể giữa kiểu gen và kiểu hình ngoài mắt đối với gen *KIF11*, cụ thể là những bệnh nhân có đột biến gen *KIF11* có khả năng mắc tật đầu nhỏ, phù bạch huyết và chậm phát triển trí tuệ cao hơn đáng kể [21]. Tương tự như vậy, chúng tôi nhận thấy rằng cả ba bệnh nhân mang đột biến gen *KIF11* trong nghiên cứu này đều có biểu hiện của tật đầu nhỏ, điều này cho thấy đặc điểm này có thể là một đặc trưng của nhóm bệnh nhân có đột biến gen *KIF11* (Hình 3.11).

Đối với bệnh nhân mắc bệnh Norrie, đáng chú ý là 11 trong số 19 nam giới trong gia đình bệnh nhân có biểu hiện ở mắt. Đây là lần đầu tiên chúng tôi tìm thấy số lượng bệnh nhân lớn như vậy trong một gia đình Việt Nam mắc bệnh Norrie. Đáng chú ý, phân tích số lượng bản sao và giải trình tự trực tiếp gen *NDP* có thể mang lại hiệu quả cao trong việc xác định nhanh chóng nguyên nhân di truyền của các bệnh võng mạc liên quan đến gen *NDP*, đặc biệt là bệnh Norrie.

Bảng 3.6. Các đột biến chưa rõ chức năng.

Bệnh nhân	Gen	Vị trí trên cDNA	Thay đổi amino axit	Trạng thái	Ảnh hưởng	TLTK	Tần số	SIFT	Polyphen-2	Mutation Taster
EVR-01	<i>VCAN</i>	c.G9560A	p.R3187Q	het	Sai nghĩa	rs373863261	-	Gây hại	Gây hại	Gây hại
	<i>RPGRIP1L</i>	c.G3512A	p.R1171Q	het	Sai nghĩa	rs141808948	0.0002	Lành tính	Lành tính	Lành tính
EVR-13	<i>LIG4</i>	c.1271_1275 del	p.K424Rfs *20	Het	Dịch khung	rs772226399	-	-	-	-

Het: heterozygosity (Dị hợp tử); hemi: hemizygoty (Bán dị hợp tử); hom: homozygosity (Đồng hợp tử). Trình tự tham chiếu: *LIG4* (NM_002312); *RPGRIP1L* (NM_015272); *VCAN* (NM_004385).

Mặc dù đột biến mất đoạn *NDP* exon 2 đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây, nhưng kiểu hình lâm sàng rất đa dạng [30, 31]. Bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nhiều bất thường về mắt bao gồm giác mạc to, đục giác mạc ở mắt phải, đục thủy tinh thể toàn bộ, dính đồng tử và bong võng mạc toàn bộ khi mới 23 ngày tuổi vào thời điểm phát hiện. Đáng chú ý là những bệnh nhân mắc bệnh Norrie trong các nghiên cứu trước đây thường bị teo nhãn cầu [32, 33].

A



B



Hình 3.11. Đặc điểm đầu và mặt của bệnh nhân FEVR-08 (A) mang đột biến *KIF11* c.388-1G>C và bệnh nhân FEVR-11 (B) mang đột biến *KIF11* c.2511_2515del. Cả hai bệnh nhân đều có dấu hiệu của tật đầu nhỏ. Bệnh nhân FEVR-11 bị teo nhãn cầu ở mắt trái.

3.2.3. Sự đa dạng kiểu hình giữa các thành viên gia đình

Bằng chứng rõ ràng về sự đa dạng kiểu hình trong cùng một gia đình và độ thâm không hoàn toàn đã được chỉ ra trong nghiên cứu này. Một ví dụ là gia đình F8 với đột biến gen *KIF11*. Mặc dù mang kiểu gen dị hợp tử với cùng một biến thể *KIF11* c.388-1G> C, bệnh nhân FEVR-08 có biểu hiện kiểu hình bị bong võng mạc nhưng mẹ của bệnh nhân lại không có bất kỳ triệu chứng nào. Đáng chú ý, chú và ông nội của bệnh nhân cũng mắc một số bệnh về mắt, tuy nhiên mẫu DNA của họ không có sẵn để xét nghiệm di truyền. Một trường hợp đáng chú ý khác là gia đình F14 với biến thể gây bệnh *FZD4* c.313A>G,

p.(M105V) ở dạng dị hợp tử. Trong đó, bệnh nhi có một loạt các rối loạn về mắt bao gồm tổn thương mạch máu võng mạc, lác, rung giật nhãn cầu và đục thủy tinh thể, tuy nhiên người bố cũng mang đột biến lại có mắt hoàn toàn bình thường. Mô hình này hoàn toàn khác với các quan sát trước đây, trong đó tất cả các thành viên trong gia đình mang đột biến này đều bị tổn thương ở mắt [34, 35].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Bệnh dịch kính-võng mạc xuất tiết do di truyền là một rối loạn di truyền hiếm gặp liên quan đến sự phát triển bất thường của mạch máu võng mạc. Tùy vào mức độ nghiêm trọng, bệnh có thể dẫn đến các biến chứng đe dọa đến thị lực người bệnh. Những gen được xác định có liên quan đến FEVR bao gồm *FDZ4*, *LRP5*, *NDP*, *TSPAN12*, *ZNF408* và *CTNNB1*. Bên cạnh đó, đột biến trên những gen khác cũng được báo cáo là gây ra kiểu hình trùng lặp với kiểu hình của FEVR như là *KIF11*, *ATOH7*, v.v. Nghiên cứu này đã thu được bộ mẫu gồm 20 bệnh nhân thuộc 20 gia đình khác nhau và các thành viên gia đình, và đã áp dụng thành công phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa và phương pháp MLPA để phát hiện nguyên nhân di truyền gây bệnh. Kết quả đã xác định được tổng số 12 đột biến gây bệnh/ có khả năng gây bệnh trên những gen gây ra kiểu hình FEVR bao gồm gen *FZD4*, *NDP*, *KIF11* và *ATOH7* ở bệnh nhân Việt Nam. Trong đó có 4 đột biến mới chưa có trong cơ sở dữ liệu đột biến gây bệnh. Những phát hiện của chúng tôi sẽ cung cấp thông tin hữu ích cho việc quản lý lâm sàng và tư vấn di truyền của các bệnh nhi này, đặc biệt là trong các trường hợp không có triệu chứng, đồng thời đóng góp vào quá trình tư vấn di truyền cho những gia đình có đột biến gây bệnh.

KIẾN NGHỊ

Kiến nghị cho tiếp tục nghiên cứu trên bộ mẫu lớn hơn, và sử dụng thêm các phương pháp khác để phát hiện đột biến gây bệnh ở những bệnh nhân chưa phát hiện được nguyên nhân gây bệnh.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

- Duong Thu Trang, Nguyen Minh Phu, Do Manh Hung, Vu Phuong Nhung, Nguyen Ngan Ha, Ma Thi Huyen Thuong, Tran Thi Bich Ngoc, Nguyen Dang Ton, Nong Van Hai, Nguyen Hai Ha, 2022, Whole exome sequencing revealed novel pathogenic mutations in Vietnamese patients with FEVR, *Molecular Vision*. (Accepted)
- Dương Thu Trang, Nguyễn Minh Phú, Phạm Minh Châu, Đỗ Mạnh Hưng, Nguyễn Hải Hà, Tổng quan về bệnh dịch kính - võng mạc xuất tiết có tính chất gia đình, 2022, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 64(7).

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gilmour D.F., 2015, Familial exudative vitreoretinopathy and related retinopathies, *Eye (Lond)*, 29(1), pp. 1-14.
2. Criswick V.G., Schepens C.L., 1969, Familial Exudative Vitreoretinopathy, *American Journal of Ophthalmology*, 68(4), pp. 578-594.
3. Ober R.R., Bird A.C., Hamilton A.M., Sehmi K., 1980, Autosomal dominant exudative vitreoretinopathy, *British Journal of Ophthalmology*, 64(2), pp. 112.
4. Tauqeer Z., Yonekawa Y., 2018, Familial Exudative Vitreoretinopathy: Pathophysiology, Diagnosis, and Management, *The Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, 7(3).
5. Tanenbaum R., Acon D., El Hamichi S., Negron C., Berrocal A.M., 2020, Unrecognized ROPER in a child with a novel pathogenic variant in ZNF408 gene, *Ophthalmic Genetics*, pp. 1-4.
6. Ranchod T.M., Ho L.Y., Drenser K.A., Capone A., Jr., Trese M.T., 2011, Clinical Presentation of Familial Exudative Vitreoretinopathy, *Ophthalmology*, 118(10), pp. 2070-2075.
7. Spandau U., Kim S.J., *Familial Exudative Vitreoretinopathy*, in *Pediatric Retinal Vascular Diseases: From Angiography to Vitrectomy*, U. Spandau and S.J. Kim, Editors. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 27-35.
8. Toomes C., Bottomley H.M., Scott S., Mackey D.A., Craig J.E., Appukuttan B., Stout J.T., Flaxel C.J., Zhang K., Black G.C.M., Fryer A., Downey L.M., Inglehearn C.F., 2004, Spectrum and Frequency of FZD4 Mutations in Familial Exudative Vitreoretinopathy, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(7), pp. 2083-2090.

9. Pendergast S.D., Trese M.T., 1998, Familial exudative vitreoretinopathy: Results of surgical management, *Ophthalmology*, 105(6), pp. 1015-1023.
10. Kashani A.H., Brown K.T., Chang E., Drenser K.A., Capone A., Trese M.T., 2014, Diversity of Retinal Vascular Anomalies in Patients with Familial Exudative Vitreoretinopathy, *Ophthalmology*, 121(11), pp. 2220-2227.
11. Trang D.T., Phú N.M., Châu P.M., Hung Đ.M., Hà N.H., 2022, Tổng quan về bệnh dịch kính - võng mạc xuất tiết có tính chất gia đình, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam B*, 64(7).
12. Kondo H., Matsushita I., Tahira T., Uchio E., Kusaka S., 2016, Mutations in ATOH7 gene in patients with nonsyndromic congenital retinal nonattachment and familial exudative vitreoretinopathy, *Ophthalmic Genetics*, 37(4), pp. 462-464.
13. Zhang L., Zhang X., Xu H., Huang L., Zhang S., Liu W., Yang Y., Fei P., Li S., Yang M., Zhao P., Zhu X., Yang Z., 2020, Exome sequencing revealed Notch ligand JAG1 as a novel candidate gene for familial exudative vitreoretinopathy, *Genetics in Medicine*, 22(1), pp. 77-84.
14. Tao Z., Bu S., Lu F., 2021, Two AOS genes attributed to familial exudative vitreoretinopathy with microcephaly: Two case reports, *Medicine*, 100(9), pp. e24633-e24633.
15. Wu J.-H., Liu J.-H., Ko Y.-C., Wang C.-T., Chung Y.-C., Chu K.-C., Liu T.-T., Chao H.-M., Jiang Y.-J., Chen S.-J., Chung M.-Y., 2016, Haploinsufficiency of RCBTB1 is associated with Coats disease and familial exudative vitreoretinopathy, *Human Molecular Genetics*, 25(8), pp. 1637-1647.

16. Robitaille J.M., Gillett R.M., LeBlanc M.A., Gaston D., Nightingale M., Mackley M.P., Parkash S., Hathaway J., Thomas A., Ells A., Traboulsi E.I., Héon E., Roy M., Shalev S., Fernandez C.V., MacGillivray C., Wallace K., Fahiminiya S., Majewski J., McMaster C.R., Bedard K., 2014, Phenotypic Overlap Between Familial Exudative Vitreoretinopathy and Microcephaly, Lymphedema, and Chorioretinal Dysplasia Caused by KIF11 Mutations, *JAMA Ophthalmology*, 132(12), pp. 1393-1399.
17. Warburg M., 1971, Norrie's disease, *Birth defects original article series*, 7(3), pp. 117–124.
18. Wang Y., Rattner A., Zhou Y., Williams J., Smallwood P.M., Nathans J., 2012, Norrin/Frizzled4 Signaling in Retinal Vascular Development and Blood Brain Barrier Plasticity, *Cell*, 151(6), pp. 1332-1344.
19. Xiao H., Tong Y., Zhu Y., Peng M., 2019, Familial Exudative Vitreoretinopathy-Related Disease-Causing Genes and Norrin/ β -Catenin Signal Pathway: Structure, Function, and Mutation Spectrums, *Journal of Ophthalmology*, 2019, pp. 5782536.
20. Robitaille J.M., Gillett R.M., LeBlanc M.A., Gaston D., Nightingale M., Mackley M.P., Parkash S., Hathaway J., Thomas A., Ells A., Traboulsi E.I., Héon E., Roy M.I., Shalev S., Fernandez C.V., MacGillivray C., Wallace K., Fahiminiya S., Majewski J., McMaster C.R., Bedard K., 2014, Phenotypic Overlap Between Familial Exudative Vitreoretinopathy and Microcephaly, Lymphedema, and Chorioretinal Dysplasia Caused by KIF11 Mutations, *JAMA Ophthalmology*, 132(12), pp. 1393-1399.
21. Hu H., Xiao X., Li S., Jia X., Guo X., Zhang Q., 2016, KIF11 mutations are a common cause of autosomal dominant familial exudative vitreoretinopathy, *British Journal of Ophthalmology*, 100(2), pp. 278.

22. Stone E.M., 2007, Genetic Testing for Inherited Eye Disease, *Archives of Ophthalmology*, 125(2), pp. 205-212.
23. Kashani A.H., Learned D., Nudleman E., Drenser K.A., Capone A., Trese M.T., 2014, High Prevalence of Peripheral Retinal Vascular Anomalies in Family Members of Patients with Familial Exudative Vitreoretinopathy, *Ophthalmology*, 121(1), pp. 262-268.
24. Nguyen H.H., Pham C.M., Nguyen H.T.T., Vu N.P., Duong T.T., Nguyen T.D., Nguyen B.D., Nguyen H.V., Nong H.V., 2021, Novel mutations of the PAX6, FOXC1, and PITX2 genes cause abnormal development of the iris in Vietnamese individuals, *Molecular vision*, 27, pp. 555-563.
25. Nguyen H.H., Nguyen H.T.T., Vu N.P., Le Q.T., Pham C.M., Huyen T.T., Manh H., Pham H.L.B., Nguyen T.D., Le H.T.T., Van Nong H., 2018, Mutational screening of germline RB1 gene in Vietnamese patients with retinoblastoma reveals three novel mutations, *Molecular vision*, 24, pp. 231-238.
26. Tao T., Xu N., Li J., Li H., Qu J., Yin H., Liang J., Zhao M., Li X., Huang L., 2021, Ocular Features and Mutation Spectrum of Patients With Familial Exudative Vitreoretinopathy, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62(15), pp. 4-4.
27. Seo S.H., Yu Y.S., Park S.W., Kim J.H., Kim H.K., Cho S.I., Park H., Lee S.J., Seong M.W., Park S.S., Kim J.Y., 2015, Molecular Characterization of FZD4, LRP5, and TSPAN12 in Familial Exudative Vitreoretinopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56(9), pp. 5143-5151.
28. Salvo J., Lyubasyuk V., Xu M., Wang H., Wang F., Nguyen D., Wang K., Luo H., Wen C., Shi C., Lin D., Zhang K., Chen R., 2015, Next-generation sequencing and novel variant determination in a cohort of 92

- familial exudative vitreoretinopathy patients, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(3), pp. 1937-1946.
29. Robitaille J.M., Zheng B., Wallace K., Beis M.J., Tatlidil C., Yang J., Sheidow T.G., Siebert L., Levin A.V., Lam W.-C., Arthur B.W., Lyons C.J., Jaakkola E., Tsilou E., Williams C.A., Weaver R.G., Shields C.L., Guernsey D.L., 2011, The role of Frizzled-4 mutations in familial exudative vitreoretinopathy and Coats disease, *British Journal of Ophthalmology*, 95(4), pp. 574.
 30. Arai E., Fujimaki T., Yanagawa A., Fujiki K., Yokoyama T., Okumura A., Shimizu T., Murakami A., 2014, Familial cases of Norrie disease detected by copy number analysis, *Japanese Journal of Ophthalmology*, 58(5), pp. 448-454.
 31. Halpin C., Sims K., 2008, Twenty years of audiology in a patient with Norrie disease, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 72(11), pp. 1705-1710.
 32. Hatsukawa Y., Nakao T., Yamagishi T., Okamoto N., Isashiki Y., 2002, Novel nonsense mutation (Tyr44stop) of the Norrie disease gene in a Japanese family, *The British journal of ophthalmology*, 86(12), pp. 1452-1453.
 33. Shastry B.S., 1998, Identification of a Recurrent Missense Mutation in the Norrie Disease Gene Associated with a Simplex Case of Exudative Vitreoretinopathy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(1), pp. 35-38.
 34. Kondo H., Hayashi H., Oshima K., Tahira T., Hayashi K., 2003, Frizzled 4 gene (FZD4) mutations in patients with familial exudative vitreoretinopathy with variable expressivity, *The British journal of ophthalmology*, 87(10), pp. 1291-1295.

35. Yang H., Li S., Xiao X., Wang P., Guo X., Zhang Q., 2012, Identification of FZD4 and LRP5 mutations in 11 of 49 families with familial exudative vitreoretinopathy, *Molecular vision*, 18, pp. 2438-2446.