

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**



Ma Thị Huyền Thương

**NGHIÊN CỨU BIẾN THỂ DI TRUYỀN LIÊN QUAN ĐẾN
CÁC BỆNH LY THƯƠNG BÌ BÓNG NƯỚC, BẠCH TẠNG
VÀ THIỂU SẢN VÀNH TAI BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ
HỆ GEN MÃ HÓA**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Ma Thị Huyền Thương

NGHIÊN CỨU BIẾN THỂ DI TRUYỀN LIÊN QUAN ĐẾN CÁC
BỆNH LY THƯỢNG BÌ BÓNG NƯỚC, BẠCH TẠNG
VÀ THIỂU SẢN VÀNH TAI BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ
HỆ GEN MÃ HÓA

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)



PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn PGS.TS. Nguyễn Hải Hà

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "*Nghiên cứu biến thể di truyền liên quan đến các bệnh Ly thượng bì bóng nước, Bạch tạng và Thiếu sản vành tai bằng giải trình tự hệ gen mã hóa*" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 15 tháng 09 năm 2023

Nghiên cứu sinh



Ma Thị Huyền Thương

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và kính trọng sâu sắc tới PGS.TS Nguyễn Đăng Tôn - Trưởng phòng Phân tích hệ gen và PGS.TS Nguyễn Hải Hà - Phó trưởng phòng Phân tích hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen. Trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu, thầy cô luôn nghiêm khắc hướng dẫn, chỉ bảo tận tình cũng như động viên, khích lệ, giúp tôi hoàn thành Luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc đến GS. TS Nông Văn Hải - Chủ tịch Hội đồng Khoa học Viện Nghiên cứu hệ gen đã luôn đưa ra những ý kiến đóng góp và chân thành nhất, giúp tôi hoàn thiện các công bố khoa học cũng như đưa ra lời khuyên quý báu khích lệ tôi phấn đấu trong học tập, nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp đã và đang công tác tại Phòng Phân tích hệ gen, luôn tạo điều kiện, đồng hành và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình công tác, học tập tại Phòng, đặc biệt là TS. Vũ Phương Nhung, ThS. Trần Thị Bích Ngọc và ThS. Nguyễn Thị Thanh Hoa.

Tôi xin chân thành cảm ơn các ý kiến đóng góp, nhận xét chuyên môn sâu sắc của các thầy cô trong các buổi báo cáo Hội đồng các cấp, các nhà khoa học, các cán bộ trong và ngoài Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp tôi hoàn thiện Luận án một cách tốt nhất.

Bên cạnh đó, tôi cũng xin chân thành cảm ơn ban Lãnh đạo Viện Nghiên cứu hệ gen, ban Giám đốc Học viện và Tập thể cán bộ Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Sau cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến gia đình, người thân và bạn bè đã luôn đồng hành, động viên, hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thiện Luận án.

Hà Nội, ngày 05 tháng 09 năm 2023

Nghiên cứu sinh



Ma Thị Huyền Thương

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC BẢNG.....	ix
DANH MỤC HÌNH.....	x
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	4
1.1 Bệnh ly thượng bì bóng nước.....	4
1.1.1. Giới thiệu chung về ly thượng bì bóng nước.....	4
1.1.2. Dịch tế học bệnh ly thượng bì bóng nước.....	6
1.1.3. Cơ chế bệnh sinh và các gen liên quan đến ly thượng bì bóng nước.....	10
1.1.4. Các phương pháp chẩn đoán ly thượng bì bóng nước.....	14
1.1.5. Chăm sóc và điều trị người bệnh ly thượng bì bóng nước.....	17
1.2 Bệnh bạch tạng.....	18
1.2.1. Giới thiệu chung về bệnh bạch tạng.....	18
1.2.2. Dịch tế học bệnh bạch tạng.....	19
1.2.3. Cơ chế bệnh sinh và các gen liên quan đến bạch tạng.....	21
1.2.4. Các phương pháp chẩn đoán, sàng lọc bạch tạng.....	25
1.2.5. Chăm sóc và điều trị người bệnh bạch tạng.....	26
1.3 Thiếu sản vành tai.....	27
1.3.1. Giới thiệu chung về thiếu sản vành tai.....	27
1.3.2. Dịch tế học thiếu sản vành tai.....	28
1.3.3. Các yếu tố nguy cơ có thể dẫn đến thiếu sản vành tai.....	32

1.3.4. Điều trị và chăm sóc người bệnh thiếu sản vành tai	36
1.4 Công nghệ giải trình tự thế hệ mới trong nghiên cứu bệnh hiếm.....	36
1.5 Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam	38
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	40
2.2.1. Bệnh ly thượng bì bóng nước	40
2.2.2. Bệnh bạch tạng.....	41
2.2.3. Bệnh thiếu sản vành tai.....	42
2.2. Đạo đức trong nghiên cứu	42
2.3. Thời gian, địa điểm nghiên cứu.....	42
2.4. Hóa chất, trang thiết bị và dụng cụ.....	43
2.5. Phương pháp nghiên cứu	44
2.5.1. Chuẩn bị DNA tổng số	45
2.5.2. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa.....	45
2.5.3. Phân tích dữ liệu giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa.....	49
2.5.4. Giải trình tự Sanger	51
2.5.5. Phân tích ảnh hưởng ghép nối của biến thể splicing.....	53
2.5.6. Khuếch đại đa đầu dò phụ thuộc phản ứng ghép nối (MLPA).....	54
2.5.7. Phân tích mạng lưới tương tác protein-protein.....	54
2.5.8. Phân tích làm giàu tập hợp gen theo KEGG	55
2.5.9. Phân loại khả năng gây bệnh của biến thể theo Hiệp hội Bệnh học phân tử và Di truyền Y học Hoa Kỳ.....	55
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	58
3.1. Đặc điểm lâm sàng ở người bệnh	58
3.1.1. Ly thượng bì bóng nước	58
3.1.2. Bạch tạng	61

3.1.3. Thiếu sản vành tai	64
3.2. Tách chiết DNA tổng số	65
3.3. Dữ liệu thô toàn bộ hệ gen mã hóa của người bệnh	65
3.4. Các biến thể liên quan đến bệnh.....	67
3.4.1. Ly thượng bì bóng nước	67
3.4.2. Bạch tạng	80
3.4.3. Thiếu sản vành tai	88
CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN.....	102
4.1. Mối tương quan kiểu gen, kiểu hình ở nhóm người bệnh ly thượng bì bóng nước mang các biến thể gen <i>COL7A1</i> và <i>KRT5</i>	102
4.2. Phân tích di truyền giúp chẩn đoán chính xác các phân nhóm bạch tạng mà lâm sàng khó có thể chỉ ra được	108
4.3. Yếu tố di truyền trong thiếu sản vành tai	112
4.4. Ý nghĩa của chẩn đoán phân tử trong công tác tư vấn di truyền và quản lý bệnh hiếm	115
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	122
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	124
TÀI LIỆU THAM KHẢO	125
PHỤ LỤC	144

CHỮ VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên đầy đủ tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
1000G	The 1000 genome project	Dự án 1000 hệ gen
5'UTR	5' untranslated region	Vùng không dịch mã đầu 5'
ACMG	American College of Medical Genetics	Hiệp hội Bệnh học phân tử và Di truyền Y học Hoa Kỳ
AD	Autosomal Dominant	Di truyền trội nhiễm sắc thể thường
ANNOVAR	ANNOtate VARiation	Chú giải biến thể
AR	Autosomal Recessive	Di truyền lặn nhiễm sắc thể thường
AVV	Adeno associated viral vector	
BA1	Benign stand-alone	Tiêu chí lành tính độc lập
Bmps	Bone morphogenetic proteins	Các protein hình thái xương
BMZ	Basement Membrane Zone	Màng nền
BOR	Branchiootorenal syndrome	Hội chứng cung mang-tai-thận
BP1-7	Benign supporting 1-6	Tiêu chí lành tính định hướng 1-6
BS1-4	Benign strong 1-4	Tiêu chí lành tính mạnh 1-4
BWA	Burrows-Wheeler Alignment	Thuật toán Burrows-Wheeler
CAD	Computer-assisted design	Thiết kế trên máy tính
CAM	Computer-aided manufacturing	Gia công với sự hỗ trợ của máy tính
cDNA	Complementary DNA	DNA bổ sung
CFM	Craniofacial Microsomia	Thiếu sản sọ mặt
CGH	Comparative Genomics Hybridization	Phép lai so sánh hệ gen
CHS	Chediak-Higashi syndrome	Hội chứng Chediak-Higashi
CNV	Copy Number Variation	Biến thể số lượng bản sao
COLVII	Type VII collagen	Collagen loại VII
dbSNP	Database of single nucleotide polymorphisms	Cơ sở dữ liệu đa hình nucleotide đơn
DDEB	Dominant Dystrophic Epidermolysis Bullosa	Ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng di truyền trội
DEB	Dystrophic epidermolysis bullosa	Ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng
DMSO	Dimethyl sulfoxit	
DNA	Deoxyribonucleic acid	ADN, axit deoxyribonucleic
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
EB	Epidermolysis Bullosa	Ly thượng bì bóng nước
EBS	Epidermolysis bullosa simplex	Ly thượng bì bóng nước đơn giản
ECM	Extracellular matrix	Cấu trúc nền ngoại bào
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	
ESE	Exonic Splicing Enhancers	Các yếu tố tăng cường ghép nối exon
ESS	Exonic Splicing Silencers	Các yếu tố bất hoạt ghép nối exon
FATHMM	Functional Analysis through Hidden Markov Models	Phân tích chức năng thông qua các mô hình Markov ẩn
FDR	False discovery rate	Tỉ lệ phát hiện sai

FGFs	Fibroblast growth factors	Các yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi
GATK	The Genome Analysis Toolkit	Bộ công cụ phân tích hệ gen
gnomAD	The Genome Aggregation Database	Cơ sở dữ liệu tổng hợp hệ gen
GS-EBS	Generalized severe epidermolysis bullosa	Ly thượng bì bóng nước đơn giản thể lan tỏa nặng
HGMD	Human genome mutation database	Cơ sở dữ liệu đột biến ở người
HPS	Hermansky-Pudlak syndrome	Hội chứng Hermansky-Pudlak
HPV	Human papillomavirus	Vi rút gây u nhú ở người
HSF	Human Splicing Finder	Xác định vị trí ghép nối trình tự hệ gen người
IFM	ImmunoFluorescence antigen Mapping	Nhuộm miễn dịch huỳnh quang
Indels	Insertions/Deletions	Thêm/mất nucleotide
JEB	Junctional epidermolysis bullosa	Ly thượng bì bóng nước liên kết
L-DOPA	Levodopa	
LRT	Likelihood ratio test	Kiểm tra tỉ số khả dĩ
MetaSVM	Meta-analytic support vector machine	Hệ thống thuật toán giám sát
MITF	Microphthalmia Transcription Factor	Yếu tố phiên mã cảm ứng tế bào hắc tố
MLPA	Multiplex ligation dependent probe amplification	Khuếch đại đa đầu dò phụ thuộc phản ứng ghép nối
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	ARN thông tin
MTOR	Mammalian target of rapamycin	Đích rapamycin ở động vật có vú
NEBR	The National EB Registry	Hệ thống đăng ký EB quốc gia
NICU	Neonatal Intensive Care Unit	Đơn vị chăm sóc tích cực trẻ sơ sinh
NOH	National Otorhinolaryngology Hospital	Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương
NTC	Negative control	Đối chứng âm
OA	Ocular albinism	Bạch tạng mắt
OAVS	Oculo-auriculo-vertebral spectrum	Hệ thống mắt-tai-cột sống
OCA	Oculocutaneous albinism	Bạch tạng da và mắt
OCA1-8	Oculocutaneous albinism type 1-8	Bạch tạng da và mắt loại 1-8
OCA1A	Oculocutaneous albinism type 1A	Bạch tạng da và mắt loại 1A
OCA1B	Oculocutaneous albinism type 1B	Bạch tạng da và mắt loại 1B
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng đồng trùng hợp
PM1-6	Pathogenic moderate 1-6	Tiêu chí gây bệnh trung bình 1-6
PP1-5	Pathogenic supporting 1-5	Tiêu chí gây bệnh định hướng 1-5
PS1-4	Pathogenic strong 1-4	Tiêu chí gây bệnh mạnh 1-4
PTC	Premature termination codon	Mã kết thúc sớm
PVS1	Pathogenic very strong	Tiêu chí gây bệnh rất mạnh
qPCR	Quantitative PCR	PCR định lượng
RDEB	Recessive dystrophic	Ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng di

	epidermolysis bullosa	truyền lặn
RNA	Ribonucleic acid	ARN, axit ribonucleic
RPE	Retinal Pigment Epithelium	Biểu mô sắc tố võng mạc
SCC	Squamous Cell Carcinoma	Ung thư biểu mô tế bào vảy
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant	
SMAD	Small Mothers Against Decapentaplegic	
SMaRT	Spliceosome-mediated RNA trans- splicing	
SNVs	Single nucleotide variants	Các biến thể đơn nucleotide
SPF	Sun Protection Factor	Định mức đo lường khả năng chống lại tia UVB/Chỉ số chống nắng
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism	Đa hình cấu trúc sợi đơn
TEM	Transmission Electron Microscopy	Kỹ thuật hiển vi điện tử
THD	Triple helix domain	Vùng xoắn ba
WES	Whole exome sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa
Wnts	Wingless/INT	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các gen liên quan đến ly thượng bì bóng nước	11
Bảng 1.2. Các gen liên quan đến OCA và OA	23
Bảng 1.3. Các hội chứng liên quan đến thiếu sản vành tai.....	29
Bảng 1.4. Hệ thống phân loại thiếu sản vành tai của Weerda và nhóm nghiên cứu của Hunter	32
Bảng 1.5. Các gen liên quan đến thiếu sản vành tai ở chuột và so sánh với kiểu hình tai ở người.....	35
Bảng 2.1. Chuẩn bị môi giải trình tự phù hợp với hệ thống giải trình tự NGS của Illumina với S4 flowcell phiên bản v1.5	49
Bảng 2.2. Cài đặt chu trình chạy	49
Bảng 2.3. Hướng dẫn phân loại tiêu chí đánh giá theo ACMG	56
Bảng 2.4. Quy tắc phân loại biến thể gây bệnh theo ACMG	57
Bảng 3.1. Các biểu hiện lâm sàng của những người bệnh EB	59
Bảng 3.2. Các đặc điểm lâm sàng ở 7 người bệnh bạch tạng.....	63
Bảng 3.3. Các biểu hiện lâm sàng ở những bệnh thiếu sản vành tai	64
Bảng 3.4. Kết quả đánh giá dữ liệu thô trong phân tích WES các mẫu người bệnh ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai	66
Bảng 3.5. Các biến thể liên quan được tìm thấy ở người bệnh EB	68
Bảng 3.6. Chẩn đoán xác định EB dựa trên lâm sàng kết hợp phân tích di truyền.....	80
Bảng 3.7. Các biến thể liên quan được tìm thấy ở các người bệnh bạch tạng	81
Bảng 3.8. Chẩn đoán xác định phân nhóm bạch tạng dựa trên lâm sàng kết hợp phân tích di truyền.....	88
Bảng 3.9. Danh sách các gen liên quan cùng được xác định ở ít nhất 2 người bệnh thiếu sản vành tai cùng các biến thể cụ thể	91
Bảng 3.10. Các gen có thể liên quan đến bệnh được tìm thấy ở nhóm người bệnh thiếu sản vành tai và mô hình di truyền của chúng	92
Bảng 3.11. Các biến thể gây hại/có thể gây hại trên 11 người bệnh thiếu sản vành tai	94
Bảng 3.12. Các biến thể ứng viên đáp ứng mô hình di truyền đơn gen.....	97

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Các đặc điểm lâm sàng ở người bệnh mắc EB.....	8
Hình 1.2. Vùng tiếp giáp giữa biểu bì và hạ bì trong cấu trúc da	10
Hình 1.3. Quy trình chẩn đoán EB	16
Hình 1.4. Các cấp độ của thiếu sản vành tai.....	31
Hình 2.1. Sơ đồ minh họa các bước thực hiện nghiên cứu	44
Hình 2.2. Sơ đồ phân tích nhóm bệnh thiếu sản vành tai.....	51
Hình 3.1. Hình ảnh lâm sàng của 7 người bệnh EB Việt Nam.	58
Hình 3.2. Hình ảnh lâm sàng của 6 người bệnh bạch tạng Việt Nam	62
Hình 3.3. Hình ảnh điện di đồ mẫu DNA tổng số trên gel agarose 0,8%	65
Hình 3.4. Dự đoán chức năng của biến thể <i>COL7A1</i> c.8279G>A bằng công cụ Polyphen-2.....	71
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên gel agarose 3%.....	72
Hình 3.6. Biến thể <i>COL7A1</i> c.8279G>A phát hiện ở gia đình người bệnh EB001.	73
Hình 3.7. Dị hợp tử phức đơn <i>COL7A1</i> c.2858_2859delAG và c.6081delC phát hiện ở gia đình người bệnh EB002.....	74
Hình 3.8. Dị hợp tử phức <i>COL7A1</i> c.8233C>T và c.6205C>T được tìm thấy ở gia đình người bệnh EB003.....	75
Hình 3.9. Dị hợp tử phức <i>COL7A1</i> c.5047C>T và c.4518+2delT được tìm thấy ở gia đình anh em người bệnh EB004 và EB005	76
Hình 3.10. Dị hợp tử phức <i>COL7A1</i> c.5821-2A>G và c.6205C>T được tìm thấy ở gia đình người bệnh EB006.....	77
Hình 3.11. Hai biến thể độc lập <i>COL7A1</i> c.1837C>T và c.3830G>A được tìm thấy ở gia đình người bệnh EB008.....	78
Hình 3.12. Kết quả phân tích MLPA người bệnh EB008 và em trai EB008.E không có gì bất thường.....	79
Hình 3.13. Biến thể <i>KRT5</i> c.1429G>A phát hiện ở gia đình người bệnh EB007	79

Hình 3.14. Dị hợp tử phức <i>TYR</i> c.346C>T và c.926insC được phát hiện ở gia đình người bệnh A1001 và A1002	83
Hình 3.15. Biến thể <i>TYR</i> c.115T>C được phát hiện ở gia đình người bệnh A1003 và A1004	84
Hình 3.16. Biến thể <i>TYR</i> c.559_560ins25 tìm thấy ở người bệnh A1005.....	85
Hình 3.17. Biến thể <i>OCA2</i> c.2323G>A tìm thấy ở gia đình người bệnh A1006	86
Hình 3.18. Biến thể <i>HPS1</i> c.927delC tìm thấy ở gia đình người bệnh A1007	87
Hình 3.19. Loại biến thể và tỉ lệ biến thể xác định được ở 11 người bệnh TSVT	89
Hình 3.20. Các gen ứng viên và lượng biến thể tìm thấy ở 11 người bệnh thiếu sản vành tai.	90
Hình 3.21. Mạng lưới PPI của 74 gen ứng viên có thể liên quan đến thiếu sản vành tai.	99
Hình 3.22. Biểu đồ phân tán các con đường tín hiệu có ý nghĩa trong phân tích KEGG	101

MỞ ĐẦU

Ngày nay, với sự tiến bộ và phát triển vượt bậc của công nghệ sinh học và sự ra đời của công nghệ giải trình tự thế hệ mới (NGS) đã giúp ích rất nhiều trong nghiên cứu các bệnh di truyền, bao gồm cả các bệnh di truyền hiếm gặp. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa (WES) là một trong những công nghệ NGS cho phép giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa của hệ gen người, vùng chỉ chiếm 1% kích thước bộ gen nhưng có chứa đến 85% số lượng các biến thể gây bệnh. Do vậy, WES được xem là một kỹ thuật đầy hứa hẹn trong nghiên cứu các rối loạn di truyền hiếm gặp với chi phí phù hợp, lượng dữ liệu đầu ra lớn cũng như hiệu quả phân tích không chênh lệch nhiều khi so với giải trình tự toàn bộ hệ gen.

Theo đạo luật thuốc hiếm (Orphan Drug Act), định nghĩa bệnh hiếm là các bệnh được tìm thấy với tỉ lệ mắc bệnh ít hơn 1/200.000 người ở Hoa Kỳ; trong khi tỉ lệ này theo Liên minh Châu Âu là 1/2000 người và hiện có khoảng 6000-7000 bệnh hiếm trên toàn thế giới đã được báo cáo (<https://www.orpha.net>). Theo tổ chức Y tế Thế giới (WHO), tại Việt Nam ước tính trong 15 người thì có 1 người mắc bệnh hiếm, tương đương với khoảng 6 triệu người đang sống chung với những căn bệnh này. Do tính chất hiếm gặp của những nhóm bệnh hiếm mà việc chẩn đoán chính xác và kịp thời được xem là một thách thức lớn đối với các hệ thống chăm sóc sức khỏe. Sự chậm trễ trong chẩn đoán có thể dẫn đến chậm trễ trong công tác điều trị cũng như xử lý bệnh không đúng, gây suy kiệt về thể chất cũng như tinh thần của người bệnh và gia đình.

Tại Việt Nam, cho đến nay, thông tin di truyền của ba bệnh hiếm gồm ly thượng bì bóng nước (tỷ lệ 11,1/1 triệu dân), bạch tạng (tỷ lệ 1/17.000 đến 1/20.000 người) và thiếu sản vành tai (0,83-17,4/10.000 ca sinh) đều rất hạn chế/chưa được báo cáo. Phổ lâm sàng của mỗi bệnh rộng, đôi khi chồng chéo giữa các phân nhóm khiến cho việc chẩn đoán chính xác trở nên khó khăn hơn, thậm chí là không phân loại được trong một số trường hợp phức tạp. Do đó các xét nghiệm di truyền là cần thiết, giúp phân loại chính xác các nhóm/phân nhóm những bệnh này. Bên cạnh đó, các nghiên cứu trên cộng đồng người phương Tây và số ít cộng đồng người châu Á đã công bố các biến thể gây bệnh nằm trên 21 gen gây nên ly thượng bì bóng nước trên 20 gen là nguyên nhân dẫn đến bạch tạng. Đối với thiếu sản vành tai, mặc dù nguyên nhân dẫn

đến bệnh vẫn chưa được làm rõ nhưng các yếu tố di truyền cũng đã được chỉ ra trong rất nhiều nghiên cứu với số lượng gen có thể liên quan đến bệnh ngày càng được mở rộng. Vì vậy, để có thể khảo sát tất cả các gen gây bệnh/liên quan này thì các phân tích dựa trên NGS được xem là phương pháp hiệu quả cao, giúp nhanh chóng xác định các thông tin di truyền bệnh một cách chính xác, tiết kiệm thời gian và giảm thiểu chi phí. Với những ưu điểm của WES đã được báo cáo trong rất nhiều các nghiên cứu bệnh hiếm, công nghệ này được lựa chọn là công cụ để thực hiện đề tài “***Nghiên cứu biến thể di truyền liên quan đến các bệnh Ly thượng bì bóng nước, Bạch tạng và Thiếu sản vành tai bằng giải trình tự hệ gen mã hóa***”. Các kết quả thu được trong nghiên cứu này bước đầu giúp xây dựng bộ dữ liệu về các biến thể di truyền ở nhóm người bệnh mắc ba bệnh hiếm này ở Việt Nam. Đồng thời, đây cũng là cơ sở khoa học hỗ trợ các bác sĩ/nhà di truyền học trong công tác tư vấn di truyền cũng như phát triển các nghiên cứu lâm sàng xa hơn hướng tới mục tiêu chữa trị các căn bệnh nói trên hay tiên lượng bệnh trong tương lai.

Mục tiêu nghiên cứu của luận án:

- Giải trình tự và phân tích trình tự hệ gen mã hóa trên các đối tượng người bệnh Việt Nam mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai.
- Xác định các biến thể nguyên nhân/nguy cơ, các gen tiềm năng có thể liên quan đến các cơ chế tiềm ẩn dẫn đến ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai.

Các nội dung nghiên cứu chính của luận án:

1. Khai thác thông tin lâm sàng, thu thập mẫu máu và tách chiết DNA tổng số của người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng, thiếu sản vành tai cùng các thành viên trong gia đình (nếu có).
2. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa các mẫu người bệnh.
3. Phân tích dữ liệu thu được và so sánh với các cơ sở dữ liệu đã công bố để xác định các biến thể gen liên quan/gây bệnh tiềm năng.

Những đóng góp mới của luận án:

Đã xác định được các biến thể gen là nguyên nhân di truyền ở người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước, trong đó có ba biến thể mới nằm trên gen *COL7A1* (c.8279G>A, c.4518+2delT và c.5821-2A>G).

Đã xác định được nguyên nhân di truyền ở người bệnh bạch tạng, trong đó, biến thể *TYR* c.115T>C (p.W39R) là nguyên nhân dẫn đến phân nhóm bạch tạng da và mắt loại 1 lần đầu tiên được tìm thấy ở trạng thái đồng hợp tử.

Đã xác định được 27 biến thể mới nằm trên các gen ứng viên có thể liên quan đến thiếu sản vành tai.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Trước đây, sử dụng công nghệ giải trình tự Sanger chỉ xác định được trình tự của một số đoạn gen trong một khoảng thời gian nhất định. Trong nghiên cứu bệnh di truyền nói chung và bệnh hiếm nói riêng, để xác định được các biến thể di truyền gây bệnh cần sàng lọc trên tất cả các gen liên quan, do đó tốn rất nhiều thời gian và kinh phí. Với số lượng bệnh hiếm không nhỏ (~ 11.000) đã được báo cáo, gây ra bởi các biến thể gây bệnh nằm rải rác trên các gen khác nhau, nếu chỉ dựa trên giải trình tự Sanger thì lượng biến thể di truyền liên quan đến bệnh được tìm thấy bị hạn chế, dẫn đến nhiều bệnh di truyền chưa xác định được nguyên nhân trong một thời gian dài. Với lượng dữ liệu lớn được trích xuất từ công nghệ NGS trong khoảng hơn một thập kỷ qua, đã giải quyết các vấn đề tồn đọng này một cách hiệu quả cũng như giảm thiểu thời gian chờ một cách đáng kể, đặc biệt rất có ý nghĩa trong nghiên cứu các bệnh hiếm gặp/các bệnh chưa rõ nguyên nhân.

Trong nghiên cứu này, thông qua WES chúng tôi tiến hành xác định các biến thể di truyền liên quan đến ba bệnh hiếm gặp chưa được nghiên cứu nhiều ở Việt Nam, bao gồm: bệnh ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai.

1.1 Bệnh ly thượng bì bóng nước

1.1.1. Giới thiệu chung về ly thượng bì bóng nước

Ly thượng bì bóng nước (Epidermolysis Bullosa - EB) là một nhóm rối loạn di truyền về da hiếm gặp được xác định bởi độ tổn thương trên da ở mức vừa phải cho đến tổn thương nghiêm trọng trên các biểu mô và hình thành các vết phỏng rộp. Biểu hiện lâm sàng ở người bệnh mắc EB có thể từ nhẹ đến nặng, rất nặng hoặc có thể dẫn đến tử vong. Trong các trường hợp bệnh nặng, biểu mô ở bất kỳ cơ quan nào của cơ thể cũng có thể bị ảnh hưởng, với nguy cơ tiến triển ác tính và tăng nguy cơ tử vong. Cho đến nay, chưa có cách chữa trị đặc hiệu cho bệnh này, các phương pháp điều trị chỉ tập trung vào điều trị triệu chứng, chủ yếu là chăm sóc vết thương, kiểm soát nhiễm trùng, hỗ trợ dinh dưỡng, phòng ngừa và điều trị các biến chứng [1].

Trong ba thập kỷ qua, một nhóm đồng thuận quốc tế đã tiến hành tổng cộng 5 cuộc họp, hội bàn để sửa đổi và cập nhật các phân nhóm của EB dựa trên đặc điểm

kiểu hình đặc trưng và các thông tin di truyền liên quan. Bốn phân nhóm chính của EB bao gồm: ly thượng bì bóng nước đơn giản - Epidermolysis bullosa simplex (EBS), ly thượng bì bóng nước liên kết - Junctional epidermolysis bullosa (JBS), ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng - Dystrophic bullermolysis bullosa (DEB) và hội chứng Kindler. Các phân nhóm này được phân biệt bởi trạng thái hình thành các nốt phỏng rộp ở các lớp nhất định của da [1]. Phân nhóm EBS là phổ biến nhất, chiếm ~70% các trường hợp EB, thường biểu hiện với các tổn thương ở bàn tay và bàn chân với sự hình thành vết phỏng rộp đầu tiên xuất hiện trong tế bào sừng ở lớp đáy (basal keratinocytes). Mô hình di truyền phổ biến trong EBS là di truyền trội nhiễm sắc thể thường, tuy nhiên một số rất nhỏ các trường hợp di truyền lặn cũng đã được báo cáo. Phân nhóm JEB có dạng di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, được đặc trưng bởi các vết phỏng rộp xuất hiện ở vùng lá sáng (lamina lucida) của màng đáy. Phân nhóm DEB là dạng di truyền lặn hoặc trội tùy thuộc vào các ảnh hưởng của từng phân nhóm thuộc DEB và vị trí của các tổn thương là tại vùng lá đặc (lamina densa) thuộc màng đáy. Phân nhóm cuối cùng của EB là hội chứng Kindler (EB Kindler), là một hội chứng di truyền lặn đặc trưng bởi các tổn thương xuất hiện ở màng đáy. Các biểu hiện lâm sàng ở các trường hợp EB Kindler thông thường với các vết phỏng rộp xuất hiện ở ngoài cùng (acral), da nhạy cảm với ánh sáng, có biểu hiện teo da và chứng da loang lổ/da đốm (poikiloderma) tiến triển. Các mức độ ảnh hưởng lâm sàng được đặc trưng trong và giữa các phân nhóm EB phản ánh mức độ nghiêm trọng của bệnh, các biến chứng đi kèm cũng như nguy cơ tử vong sớm ở một số phân nhóm. Ví dụ, các trường hợp JEB thể nặng có liên quan đến tỷ lệ tử vong sớm sau khi sinh ở trẻ, trong khi các trường hợp EBS thể khu trú thì các biểu hiện tương đối nhẹ và không ảnh hưởng đến tuổi thọ [1, 2].

Mặc dù EB được biết là một rối loạn di truyền gây ra bởi các biến thể gen, làm thay đổi hay phá vỡ tính cơ học của các protein cấu trúc, ảnh hưởng đến tính toàn vẹn và kết dính bên trong các mô; tuy nhiên cơ chế phân tử gây bệnh vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn. Với sự cải tiến và tối ưu liên tục trong công nghệ giải trình tự gen đã hỗ trợ một cách nhanh chóng, tiết kiệm và toàn diện cho quá trình xác định các đột biến cũng như các gen mới, giúp mở rộng cơ sở dữ liệu liên quan đến bệnh, hướng đến mục tiêu điều trị trong y học cá thể. Ngoài ra các nghiên cứu ở mức độ phân tử còn giúp bổ trợ và nâng cao hiểu biết về các vấn đề xung quanh liên quan đến bệnh, là cơ

sở dữ liệu hỗ trợ trong chẩn đoán, điều trị và tiên lượng tiến triển bệnh; đồng thời đây cũng là nguồn thông tin rất hữu ích cho công tác tư vấn di truyền cũng như lựa chọn các liệu pháp điều trị mục tiêu trong tương lai. Các khía cạnh xung quanh EB như dịch tễ, các ảnh hưởng lâm sàng, cơ chế bệnh sinh, tiến triển bệnh và các chiến lược trị liệu của bốn nhóm EB chính sẽ được thảo luận dưới đây.

1.1.2. Dịch tễ học bệnh ly thượng bì bóng nước

1.1.2.1 Tỷ lệ mắc bệnh

Dữ liệu dịch tễ học toàn diện nhất hiện có về EB dựa trên nghiên cứu kéo dài 16 năm của Hệ thống đăng ký EB quốc gia (The National EB Registry, NEBR) ở Hoa Kỳ với xấp xỉ 3300 người bệnh được thu thập từ năm 1986 đến năm 2002. Tỷ lệ mắc EB được báo cáo là khoảng 11,1/1 triệu dân và 19,6/1 triệu ca sinh, đồng thời không có sự khác biệt giữa hai nhóm giới tính cũng như giữa các nhóm dân tộc. Tỷ lệ mắc bệnh trong quần thể và trẻ sinh ra còn sống ở các trường hợp EBS lần lượt là 6/1 triệu dân và 7,87/1 triệu ca sinh. Hai tỷ lệ này ở các trường hợp JEB là 0,49/1 triệu dân và 2,68/1 triệu ca sinh; DEB di truyền trội là 1,49/1 triệu dân và 2,12/1 triệu ca sinh; và DEB di truyền lặn là 1,35/1 triệu dân và 3,05/1 triệu ca sinh. Phân nhóm cuối cùng là EB Kindler được báo cáo với hơn 250 người bệnh trên toàn thế giới. Thêm vào đó, có 2 tiểu phân nhóm nghiêm trọng nhất cũng được báo cáo là JEB thể nặng và RDEB thể nặng với tỷ lệ mắc bệnh lần lượt là 0,08/1 triệu dân và 0,50/1 triệu ca sinh, và 0,36/1 triệu dân và 0,57/1 triệu ca sinh [3].

Ngoài ra, dữ liệu về tỷ lệ mắc bệnh được báo cáo theo nghiên cứu ở Úc với lượng người bệnh được thu thập từ năm 2006 đến năm 2010 cũng cho thấy sự tương đồng với báo cáo của NEBR, cụ thể, tỷ lệ mắc bệnh trong quần thể là 10,3/1 triệu dân [4]. Bên cạnh đó, các dữ liệu tương tự về tỷ lệ này cũng được báo cáo ở nhóm nhỏ người bệnh người Na Uy (> 9,7/1 triệu dân), British Columbia, Canada (9,9/1 triệu dân), Ý (10,1/1 triệu dân) và Croatia (9,6/1 triệu dân) [5]. Khác với các quần thể trên, tỷ lệ mắc EB lại được báo cáo thấp hơn hẳn ở Nhật (4–5/1 triệu dân) [6] và Romania (4,4/1 triệu dân) [7]. Ngược lại, tỷ lệ mắc EB trong quần thể người ở Scotland lại được báo cáo cao hơn nhiều so với đa số các quần thể khác (49/1 triệu dân) [8].

Mặt khác, các nghiên cứu trên các phân nhóm EB cho thấy có sự khác biệt lớn trong tỷ lệ mắc bệnh giữa một số quần thể với nghiên cứu của NEBR. Tỷ lệ mắc JEB và các tiểu phân nhóm của JEB trong các quần thể này cao gấp nhiều lần khi so với tỷ lệ mắc JEB trong nghiên cứu của NEBR, cụ thể như ở Thụy Điển (cao hơn gấp 20 lần), Groningen, Hà Lan (tỷ lệ JEB thể nặng cao hơn gấp 8 lần) [9], Thụy Điển (cao hơn 14 lần) [10], Ý (cao hơn 7,6 lần) [11], Đức (cao gấp 3 lần) [12] và Chile (cao hơn ~ 2 lần) [13]. Ngoài ra, tỷ lệ mắc EB ở các nước Trung Đông cũng khá cao, có thể là một trong những hậu quả của hôn nhân cận huyết ngày càng tăng ở khu vực này [14, 15]. Cho đến hiện tại, ngoài các dữ liệu được cập nhật ở trên thì các dữ liệu về tỷ lệ mắc EB ở Châu Phi, các nước Châu Á trừ Nhật Bản và các khu vực Nam Mỹ vẫn chưa được thống kê [1].

1.1.2.2 Các đặc điểm lâm sàng của người bệnh ly thượng bì bóng nước

Có 4 phân nhóm chính thuộc EB đã được báo cáo là EBS, JEB, DEB và hội chứng Kindler. Mỗi phân nhóm này lại được chia nhỏ thành các tiểu phân nhóm dựa theo mức độ nặng nhẹ của bệnh hoặc hội chứng đi kèm. Trong phân nhóm EBS, có 3 dạng kiểu hình chính bao gồm, EBS thể khu trú (localized EBS), EBS thể trung bình (intermediate EBS) và EBS thể nặng (severe EBS). Ngoài những tiểu phân nhóm chính này thì EBS vẫn còn các tiểu phân khác dựa trên 3 tiểu phân nhóm chính kể trên kèm theo các bệnh đi kèm đặc trưng. Ví dụ như EBS thể khu trú kèm bệnh thận, EBS thể trung bình kèm bệnh cơ tim, EBS thể trung bình kèm loạn dưỡng cơ, EBS thể nặng kèm sa môn vị... Tương tự như EBS, JEB và DEB cũng gồm 3 tiểu phân nhóm chính là JEB/DEB thể khu trú (localized JEB/DEB), JEB/DEB thể trung bình (intermediate JEB/DEB) và JEB/DEB thể nặng (severe JEB/DEB). Ngoài ra cũng tồn tại các tiểu phân nhóm hiếm khác như JEB thể trung bình kèm sa môn vị, JEB thể ngược (inversa JEB), pruriginosa DEB (một biến chứng lâm sàng của DEB đặc trưng bởi sản ngứa dữ dội, các nốt sần phì đại và xơ hóa) v.v. Hội chứng Kindler là phân nhóm duy nhất của EB chỉ có một kiểu hình gần như tương đương ở tất cả các trường hợp phát hiện [1].

Mỗi phân nhóm thuộc EB đều có những đặc điểm, dấu hiệu nhận biết riêng dựa trên kiểu hình lâm sàng (*Hình 1.1*) phục vụ cho quá trình chẩn đoán ban đầu. Người bệnh mắc EBS thể khu trú được đặc trưng bởi các vết phỏng rộp và dày sừng lòng bàn tay, lòng bàn chân. Các đặc điểm lâm sàng gồm sừng hóa dày đặc ở lòng bàn tay bàn

chân và mụn nước mọc thành chùm là dấu hiệu của EBS thể nghiêm trọng. Người bệnh mắc JEB thường có tiếng khóc khàn lúc mới sinh, ở giai đoạn phát triển, các vết phỏng rộp có thể lan rộng dẫn đến sẹo, hình thành các mảng đỏ, gồ ghề gọi là mô hạt, xuất hiện các vết loét xung quanh miệng, nách và cổ, các biểu hiện có hại ở men răng đi kèm với có/không có móng ở các ngón tay và chân. Các biểu hiện gồm chứng miệng nhỏ (microstomia), chứng dính ngón (pseudosyndactyly), co rút ngón, các phỏng nước lan rộng, phát triển và hình thành sẹo cùng mụn hạt kê (milia) là dấu hiệu của JEB thể nghiêm trọng. Cuối cùng, các biểu hiện gồm da nhạy cảm với ánh sáng cùng chứng da đốm là dấu hiệu nhận biết của các trường hợp mắc hội chứng Kindler [1].



Hình 1.1. Các đặc điểm lâm sàng ở người bệnh mắc EB

(a) Các cụm bóng nước điển hình và (b) dày sừng bàn chân ở người bệnh EBS thể nặng. (c) Các mô hạt xung quanh mắt và miệng điển hình ở người bệnh JEB. (d) Các vết loét lan rộng ở lưng người bệnh JEB thể trung bình. (e) Dị tật bàn chân điển hình với co cứng khớp và dính ngón ở người bệnh DEB thể nặng. (f) Ung thư biểu mô tế bào vảy phát sinh từ một tổn thương mãn tính ở người bệnh DEB. (g) Viêm da, teo da đóng vảy trên các đốt ngón tay trái, và dày sừng lòng bàn tay phải ở người bệnh Kindler EB [1].

1.1.2.3 Các bệnh đi kèm và tỉ lệ tử vong của lý thượng bì bóng nước

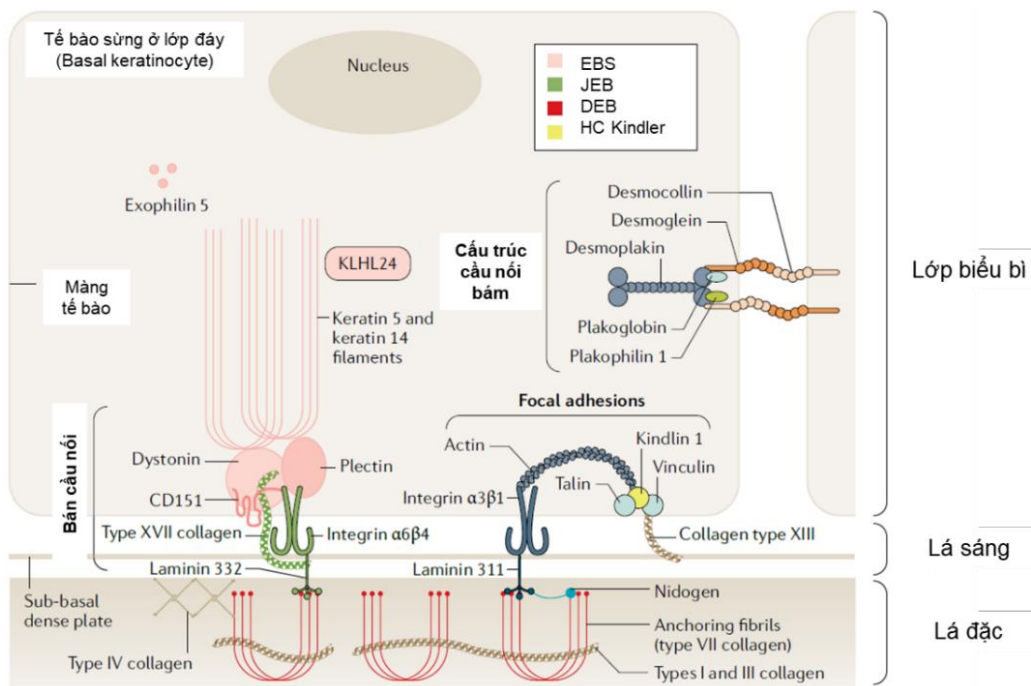
Ở một số phân nhóm của EB, đặc biệt là JEB thể nặng có tỷ lệ không hề nhỏ phát triển thành ung thư biểu mô tế bào vảy (SCC) ở da và niêm mạc, thường phát sinh ở giai đoạn sau của độ tuổi thanh thiếu niên (18-19 tuổi) và ngày càng tăng lên ở độ tuổi trung niên (40-59 tuổi). Ung thư biểu mô tế bào vảy là nguyên nhân tử vong hàng

đầu của phân nhóm bệnh này, nguy cơ tử vong bởi SCC di căn ở độ tuổi 35 là 38,7%, tăng lên 78,8% ở độ tuổi 55 và thời gian sống trung bình của người bệnh sau khi được chẩn đoán mắc SCC thường là 4–5 năm [16]. Tỷ lệ phát hiện SCC ở da trong nhóm người da trắng, độ tuổi 50-59 là xấp xỉ 1% [17, 18]; trong đó tỷ lệ phát triển từ JEB thể nặng ở nhóm tuổi 55 chiếm đến 90,1% [17]. Ngoài JEB thể nặng, DEB thể trung bình và JEB thể trung bình cũng có nguy cơ phát triển thành SCC nhưng với tỷ lệ thấp hơn. Tuy nhiên, SCC vẫn là nguyên nhân chính dẫn đến tử vong ở hai tiểu phân nhóm này [16, 19]. Hội chứng Kindler cũng là một phân nhóm EB có nguy cơ cao phát triển SCC ở da [20], thường khởi phát vào giai đoạn ngoài 40 tuổi và nguy cơ sẽ tăng lên 66,7% ở lứa tuổi trên 60 [21]. Ở một số trường hợp, SCC niêm mạc có thể xảy ra ở thực quản và thanh quản [22]. Bên cạnh SCC, ung thư biểu mô tế bào đáy cũng được báo cáo trên những người bệnh EB và chủ yếu xảy ra ở các trường hợp EBS thể nặng với tỷ lệ nguy cơ lên đến 43,6% ở độ tuổi 55.

Ảnh hưởng sức khỏe nặng nề nhất có thể kể đến các trường hợp mắc JEB thể nặng, với thời gian sống trung bình sau khi sinh là 6 tháng và thường khó có thể vượt qua được 1-2 năm đầu đời [12, 23, 24]. Mặc dù được điều trị tích cực, song nguyên nhân tử vong ở nhóm bệnh này chủ yếu do tình trạng chậm tăng cân hay còn gọi là hội chứng chậm lớn (FTT), nhiễm trùng huyết và suy hô hấp. Ở nhóm RDEB thể nghiêm trọng, các nguyên nhân tử vong thường thấy là do các bệnh cơ tim (cardiomyopathy) và suy tim sung huyết [25]. Ngoài ra, suy thận là một trong những nguyên nhân tử vong phổ biến ở một số phân nhóm EB thể nặng, với tỷ lệ điển hình là 12% ở nhóm RDEB thể nghiêm trọng trong độ tuổi 35 [26]. Các ảnh hưởng đi kèm khác có thể quan sát ở người bệnh EB bao gồm khả năng ăn và nuốt khó khăn, tương quan với mức độ nghiêm trọng của từng loại EB; đồng thời, các biến chứng ở thanh quản và thực quản có thể đe dọa tính mạng của người bệnh. Các ảnh hưởng này xảy ra ở hầu hết các trường hợp DEB, tuy nhiên lại ít phổ biến hơn ở nhóm JEB và EBS. Bên cạnh đó, các biến chứng ở mắt có thể xảy ra bao gồm đau do trầy xước giác mạc và chứng loạn dưỡng với nguy cơ có thể dẫn đến mù ở 6% người bệnh mắc RDEB [27]. Nhiều loại mô ngoài da của người bệnh EB cũng có thể bị ảnh hưởng với các triệu chứng như sưng, viêm kết mạc, viêm lợi mãn tính và thậm chí gây rụng răng sớm. Ngoài ra, các ảnh hưởng đến đường tiêu hóa có thể kể đến bao gồm hẹp thực quản và viêm đại tràng.

1.1.3. Cơ chế bệnh sinh và các gen liên quan đến ly thượng bì bóng nước

Da người là cơ quan có diện tích lớn nhất của cơ thể, gồm lớp biểu bì ở trên và hạ bì ở dưới, lớp hạ bì cũng là lớp chiếm phần lớn cấu trúc của da. Màng nền hay màng đáy (BMZ) là khu vực tiếp giáp của 2 lớp này, các ảnh hưởng phân tử tại vùng này được xem là nguyên nhân dẫn đến EB. BMZ không chỉ hoạt động như một giá đỡ, đảm bảo sự kết dính của tế bào da mà còn cung cấp chất nền hỗ trợ quá trình di chuyển của tế bào, đảm bảo tính thấm có chọn lọc cũng như làm khuôn mẫu cho quá trình sửa chữa, sinh sản và loại bỏ các tế bào chết trong quá trình sừng hoá. BMZ gồm 2 vùng lá sáng (lamina lucida) và lá đặc (lamina densa). Phía trên vùng lá sáng, các sợi trung gian của mạng lưới nội bào được gắn với các bán cầu nối (hemidesmosome) trên màng sinh chất nền của tế bào sừng. Các bán cầu nối này cũng được gắn với vùng lá đặc phía dưới lá sáng thông qua các sợi cơ neo giữ. Vùng lá đặc và lớp biểu bì phía trên được kết nối với vùng dưới lá đặc (sub-lamina densa) thông qua các vòng lặp sợi neo cơ gắn trong mặt dưới của vùng dưới lá đặc, từ đó tạo nên sự kết dính của các protein là các sợi cơ neo giữ nằm trong vùng hạ bì nông (papillary dermis) (Hình 1.2). Ở những người bị ảnh hưởng bởi EB, giữa hai lớp da gồm biểu bì và hạ bì bị thiếu protein neo giữ để giữ chúng lại với nhau, khiến da cực kỳ mỏng manh và không thể chịu được ngay cả khi chỉ bị tác động bởi một ma sát/chấn thương cơ học nhỏ.



Hình 1.2. Vùng tiếp giáp giữa biểu bì và hạ bì trong cấu trúc da

Các chữ viết tắt: EBS, ly thượng bì bóng nước đơn giản; JEB, ly thượng bì bóng nước liên kết; DEB, ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng; HC Kindler, hội chứng Kindler [1].

Cho đến nay, ít nhất 21 gen liên quan đến kiểu hình bệnh đã được mô tả (*Bảng 1.1*), các gen này tham gia mã hóa cho các thành phần của keratin, các protein tiếp xúc bám dính và cấu trúc cầu nối bám (desmosomes) [2]. Về mặt cấu trúc, sự suy yếu ở mức độ phân tử dẫn đến sai cấu trúc và chức năng của protein kết dính trong biểu bì hoặc protein neo giữ giữa hạ bì-biểu bì, do đó làm mất kết nối giữa các tế bào và mô. Cả hai mô hình di truyền trội và lặn nhiễm sắc thể thường đều đã được báo cáo dẫn đến ly thượng bì bóng nước.

Bảng 1.1. Các gen liên quan đến ly thượng bì bóng nước

STT	Gene	Protein bị ảnh hưởng	Dạng di truyền	Loại EB
1	KRT5	Keratin 5	AD	EBS
2	KRT14	Keratin 14	AD (AR)	EBS
3	DSP	Desmoplakin	AR	EBS
4	DST	Bullous pemphigoid antigen (BP ₂₃₀)	AR	EBS
5	EXPH5	Exophilin 5	AR	EBS
6	PLEC1	Plectin	AR (AD)	EBS
7	PKP1	Plakophilin	AR	EBS
8	JUP	Plakoglobin	AR	EBS
9	TGM5	Transglutaminase 5	AR	EBS
10	KLHL24	Kelch-like family 24	AD	EBS
11	CD151	Tetraspanin 151	AR	EBS
12	LAMA3	Laminin α 3	AR	JEB
13	LAMB3	Laminin β 3	AR	JEB
14	LAMC2	Laminin γ 2	AR	JEB
15	TGA6	Integrin α 6	AR	JEB
16	ITGB4	Integrin β 4	AR	JEB
17	COL17A1	Type VII collagen	AD	JEB
18	ITGA3	Integrin α 3	AR	JEB
19	COL7A1	Type VII collagen	AD, AR	DEB
20	PLOD3	Lysyl hydroxylase 3	AR	DEB
21	FERMT1 (KIND1)	kindlin-1	AR	Hội chứng Kindler

EB: ly thượng bì bóng nước, EBS: ly thượng bì bóng nước đơn giản, JEB: ly thượng bì bóng nước liên kết, DEB: ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng, AD: di truyền trội NST thường, AR: di truyền lặn NST thường. Bôi đậm, các gen là nguyên nhân chính.

Danh sách gen liên quan được tổng hợp dựa trên nghiên cứu tổng quan của Vahidnezhad và cộng sự [2]

Ly thượng bì bóng nước đơn giản (EBS) là loại EB phổ biến nhất, chiếm đến 75-85%, thường ảnh hưởng đến bàn tay và bàn chân với sự hình thành vết phỏng rộp đầu tiên xuất hiện trong tế bào sừng ở lớp đáy (basal keratinocytes). Hiện tại các biến thể trên 7 gen liên quan đã được báo cáo là nguyên nhân chính dẫn đến EBS, trong đó có đến 75% các trường hợp EBS mang các biến thể gây bệnh trên 2 gen mã hoá keratin 5 (*KRT5*) và keratin 14 (*KRT14*), là thành phần chính hình thành nên bộ khung của tế bào (cytoskeleton) trong tế bào sừng ở lớp đáy [28, 29]. Các biến thể gen *KRT5* và *KRT14* dẫn đến EBS di truyền trội bao gồm 3 dạng: Weber-Cockayne và Koebner có kiểu hình nhẹ hơn so với Dowling-Meara (dạng EBS nặng nhất). Các biến thể gen gây bệnh khác cũng đã được tìm thấy trong các gen mã hóa các protein bán cầu nối như plectin (*PLEC1*) và dystonin (*DST*), là nguyên nhân dẫn đến EBS dạng di truyền lặn. Đặc biệt, một phân nhóm EBS gây tử vong đã được báo cáo với biến thể gen *PLEC1* [30, 31]. Ngoài ra, một lượng nhỏ các biến thể trên các gen *EXPH5*, *KLHL24* và *CD151* cũng được xem là nguyên nhân dẫn đến EBS. Đây là các gen mã hoá cho các protein liên quan đến hình thành chức năng của các túi ngoại bào (*EXPH5*), hỗ trợ kiểm soát cân bằng cấu trúc keratin (*KLHL24*) và tham gia đóng góp trong khả năng kết dính tế bào cũng như vận chuyển các túi nội bào (*CD151*). Trong đó, *EXPH5* và *CD151* có mô hình di truyền lặn còn *KLHL24* tuân theo mô hình di truyền trội.

Ly thượng bì bóng nước liên kết (JEB) là một dạng EB di truyền lặn, gây ra bởi các đột biến trên các gen mã hóa cho các protein liên quan đến khả năng neo giữ keratin vào tế bào sừng ở lớp đáy (*COL17A1*), laminin 332 (*LAMA3*, *LAMB3* và *LAMC2*), integrin $\alpha 6\beta 4$ (*ITGA6* và *ITGB4*) và một tiểu đơn vị của integrin $\alpha 3$ (*ITGA3*). Collagen loại XVII và intergerin $\alpha 6\beta 4$ được biết đến lần lượt là những homotrimer và heterodimer, và đều là những protein xuyên màng của bán cầu nối (hemidesmosomes) với chức năng kết dính và phát tín hiệu. Trong đó, các đột biến gen mã hóa cho chuỗi intergerin $\alpha 6\beta 4$ có thể gây ra JEB với chứng viêm mô vùi [32, 33]. Laminin 332 là một heterotrimer, được tiết ra ngoại bào bởi tế bào sừng ở lớp đáy và tạo nên các sợi neo giữ trong vùng lá sáng - là một thành phần không thể thiếu của màng đáy biểu bì (Hình 1.2). Các đột biến trên gen *LAMA3*, *LAMB3* và *LAMC2* được xem là nguyên nhân chủ yếu được tìm thấy ở những người bệnh JEB. Đặc biệt, các đột biến làm mất hoàn toàn chức năng của laminin 332 có liên quan đến tỷ lệ tử vong cao trong 2 năm đầu đời ở các trường hợp JEB thể nghiêm trọng. Integrin $\alpha 3\beta 1$ là một thụ

thể xuyên màng chính của chất kết dính (focal adhesions) trong tế bào sừng ở lớp đáy, hình thành nên ma trận tế bào kết dính và phát tín hiệu. Đột biến gen *ITGA3* được xem là nguyên nhân gây bệnh ở một số trường hợp JEB với các biểu hiện lâm sàng kèm theo của bệnh phổi kẽ và dị tật thận [34, 35].

Trong JEB, các tổn thương được xuất phát từ vùng lá sáng trong màng nền, mức độ nghiêm trọng biểu hiện bởi sự mỏng manh ở da và niêm mạc, phản ánh mức độ thiếu hụt của các loại protein tương ứng tại vị trí đó. Tuy nhiên, chỉ cần một lượng nhỏ protein còn sót lại ngay cả khi bị cắt ngắn hoặc giảm một phần chức năng cũng có thể làm giảm mức độ nghiêm trọng biểu hiện ra kiểu hình [2, 36]. Phân tích cơ sở dữ liệu đột biến cho thấy các biến đổi gây tử vong là các biến đổi gây ra bởi đột biến tạo mã kết thúc sớm trong khi các biến đổi không gây tử vong có liên quan đến các đột biến sai nghĩa [2].

Ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng (DEB) là một rối loạn di truyền hiếm gặp được đặc trưng bởi sự mỏng manh trên da dẫn đến hình thành các vết phỏng rộp ở vị trí bên dưới lớp biểu bì bởi các ma sát hay chấn thương nhỏ và hình thành sẹo khi lành. Nguyên nhân dẫn đến DEB là do đột biến trên gen *COL7A1* - gen mã hóa cho collagen loại VII (COLVII) với ba chuỗi xoắn alpha giống hệt nhau được giới hạn bởi màng nền và bên dưới các tế bào biểu mô lát tầng sừng hóa (stratified squamous epithelia). Collagen loại VII được biết đến với vai trò là các sợi cơ neo giữa biểu mô bên ngoài và mô liên kết (stroma) bên dưới. Phân nhóm DEB được chia thành 2 tiểu phân nhóm dựa trên đặc điểm di truyền trội nhiễm sắc thể thường (DDEB) hay di truyền lặn nhiễm sắc thể thường (RDEB). DEB được chẩn đoán dựa trên các biểu hiện lâm sàng và phát hiện các đột biến/biến thể gây bệnh trên gen *COL7A1*. Cho đến nay, có hơn 800 biến thể di truyền của *COL7A1* có liên quan đến các trường hợp DEB được cập nhật trên cơ sở dữ liệu dành riêng cho *COL7A1* (<http://www.col7a1-database.info>). Ảnh hưởng lâm sàng ở các trường hợp mắc DDEB là tương đối nhẹ khi so với các trường hợp mắc RDEB. Trong DDEB, các vết phỏng rộp thường chỉ xuất hiện ở một số vị trí nhất định như bàn tay, bàn chân, đầu gối, khuỷu tay và tương đối lành tính. RDEB là một rối loạn da di truyền về da nghiêm trọng, được đặc trưng bởi các bóng nước lan rộng, hình thành sẹo teo, mụn thịt, loạn dưỡng móng một phần/toàn bộ hoặc không có móng [37]. Trong khi hầu hết các đột biến trong các trường hợp DDEB được

tìm thấy ở exon 73-75, các đột biến được tìm thấy ở các trường hợp mắc RDEB bao gồm các chèn, mất hay thay thế nucleotide và các đột biến splicing xảy ra ở cả hai alen dẫn đến hình thành các alen mất chức năng hoặc gây lệch khung đọc mở và tạo ra một protein không chức năng [38, 39]. Ngoài ra, ba biến thể gen *PLOD3* liên quan đến một số các trường hợp bệnh mang các đặc điểm lâm sàng giống với thể RDEB đã được chỉ ra [40, 41]. Gen *PLOD3* mã hóa cho lysyl hydroxylase 3 (LH3), là một trong những enzym xúc tác lysyl, hydroxyl hóa gốc lysine để tạo thành hydroxylysine trong quá trình sửa đổi sau dịch mã của collagen. Enzyme này được tiết ra và khu trú trong lớp biểu bì trên lá đặc trong màng nền (lamina densa basement membrane), ngay bên dưới bán cầu nối (hemidesmosome) và trong vùng dưới lá đặc (sub-lamina densa) trong khu vực tương ứng với miền collagen trung tâm của COLVII. Ở những người bệnh RDEB, nồng độ LH3 giảm đáng kể ở da và tế bào sừng, ngược lại, sự biểu hiện quá mức của COLVII trong RDEB dẫn đến sự gia tăng biểu hiện của LH3, cho thấy mối tương quan chức năng giữa LH3 và COLVII [42].

Hội chứng Kindler là hội chứng di truyền theo kiểu lặn, là một dạng của EB với đột biến gây mất chức năng trong gen *FERMT1* mã hóa cho kindlin-1. Kindlin-1 là một thành phần của các tiếp xúc bám dính trong tế bào sừng ở lớp đáy, mô nha chu và đại tràng [37]. Khác với các phân nhóm EB khác, trong hội chứng Kindler các vết phỏng rộp có thể hình thành ở một vài vị trí khác nhau trong vùng kết nối giữa biểu bì và hạ bì, có thể ở trong tế bào sừng ở lớp đáy, dọc theo vùng lá sáng hoặc dưới vùng lá đặc của màng đáy. Các ảnh hưởng lâm sàng ở những người bệnh mắc hội chứng Kindler bao gồm da mỏng manh, phỏng rộp, nhạy cảm với ánh sáng, và thường biểu hiện ngay từ lứa tuổi còn nhỏ. Khi tuổi càng cao, các ảnh hưởng này sẽ giảm dần, hình thành các vết loang sắc tố hay chứng da đốm (poikiloderma), các vết ban đỏ kèm theo teo da, sẹo niêm mạc và dày sừng ở lòng bàn tay. Một số trường hợp bệnh có thể phát triển thành viêm đại tràng. Bên cạnh đó, những người bệnh lớn tuổi mắc hội chứng Kindler cũng có nguy cơ phát triển thành ung thư biểu mô [43], bao gồm cả ung thư da ngoài tế bào hắc tố (non-melanoma skin cancer) [21].

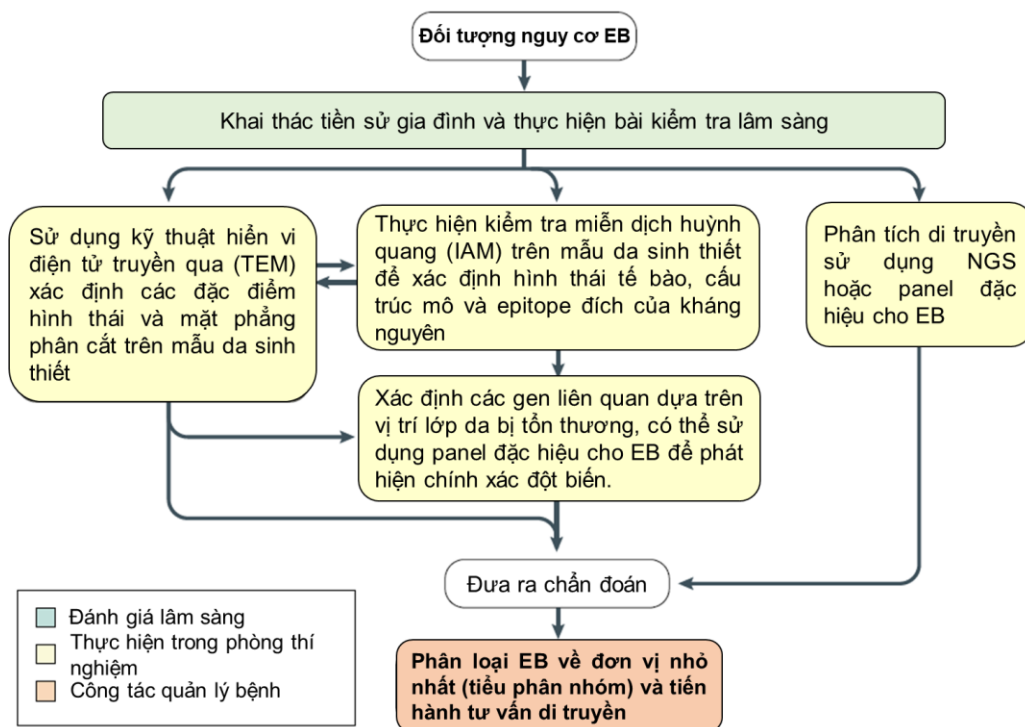
1.1.4. Các phương pháp chẩn đoán ly thượng bì bóng nước

Ly thượng bì bóng nước có thể biểu hiện ngay từ khi sinh hoặc trong thời kỳ sơ sinh, bao gồm các vết phỏng rộp, da mỏng manh và bong tróc với các mức độ nặng

nhẹ khác nhau tùy thuộc vào từng phân nhóm của bệnh. Chẩn đoán lâm sàng thường gặp khó khăn ở giai đoạn đầu này, ngay cả đối với các bác sĩ da liễu có kinh nghiệm trong việc chẩn đoán EB, đặc biệt là ở những trường hợp không có tiền sử gia đình. Ví dụ, ở các trường hợp EB với các vết phỏng rộp lan rộng (generalized blistering) khi sinh cần được xem xét cả 2 phân nhóm là EBS và DEB. Hoặc ở các trường hợp JEB thể nghiêm trọng, các vết phỏng rộp có thể không nhiều lúc trẻ mới sinh nhưng sau đó lại nhanh chóng lan ra khắp cơ thể, do đó rất dễ bị chẩn đoán nhầm với 2 phân nhóm EB trên. Ngoài ra, nếu tiền sử gia đình không có người liên quan đến EB thì cần phải chẩn đoán loại trừ các bệnh với các đặc trưng tương tự (bao gồm các vết phỏng rộp) trước khi kết luận là EB. Chẩn đoán loại trừ gồm: nhiễm trùng, bệnh chàm pompholyx, bệnh tự miễn, rối loạn chuyển hoá porphyria, bệnh vảy cá, bệnh dày sừng lòng bàn tay bàn chân, hội chứng ehler-danlos, bệnh nhiễm sắc tố dâm dề, hội chứng da đốm và bệnh tế bào mast.

Trong giai đoạn sơ sinh, các vết phỏng rộp thường xuất hiện ở những vị trí dễ bị cọ sát khi trẻ cử động như bàn tay, đầu gối, mông và vùng tiếp xúc với các cạnh của tã lót. Các tổn thương trên da sẽ nhẹ và giảm dần khi người bệnh lớn lên và có thể chỉ khu trú ở những vị trí nhất định mà không lan ra khắp cơ thể. Tuy nhiên, đôi khi các bóng nước lan rộng vẫn xuất hiện ở lứa tuổi trưởng thành trong một số trường hợp EB. Các phương pháp chẩn đoán cũng như phân loại các phân nhóm của EB được dựa trên các đặc điểm lâm sàng đặc trưng, các xét nghiệm hóa mô miễn dịch hoặc soi tế bào dưới kính hiển vi kết hợp với kết quả phân tích di truyền là chính xác nhất.

Để chẩn đoán EB, đầu tiên cần khai thác các thông tin bao gồm các triệu chứng lâm sàng từ quá khứ cho đến hiện tại, các bệnh đi kèm và tiền sử gia đình. Tiếp đó, các bài kiểm tra lâm sàng tập trung phát hiện các triệu chứng chính để kiểm chứng hoặc loại bỏ các thông tin lâm sàng đã được khai thác theo lời kể của người bệnh trước đó, đồng thời bài kiểm tra cũng giúp đánh giá tổng quát về mức độ nghiêm trọng của bệnh. Các kỹ thuật đánh giá tiếp theo sau được thực hiện để loại trừ các chẩn đoán có biểu hiện lâm sàng tương tự và chẩn đoán đặc hiệu các phân nhóm EB (bao gồm cả các tiểu phân nhóm thuộc 4 phân nhóm chính) gồm kỹ thuật hiển vi điện tử (TEM), nhuộm miễn dịch huỳnh quang (IFM) trên vùng da tổn thương và phân tích gen phát hiện đột biến gây bệnh [44]. Quy trình chẩn đoán được tóm tắt ở sơ đồ trong *Hình 1.3*.



Hình 1.3. Quy trình chẩn đoán EB

Các phương pháp chẩn đoán này được nhóm nghiên cứu của Bardhan và cộng sự tổng hợp và đề xuất dựa trên những tiến bộ của công nghệ giải trình tự kết hợp cùng với 2 phương pháp cơ bản TEM và IAM [1].

Phân tích di truyền xác định biến thể gây bệnh

Trong EB, các phân nhóm khác nhau được quy định bởi các gen liên quan khác nhau, việc chẩn đoán và phân loại sẽ trở nên dễ dàng hơn khi xác định được biến thể gây bệnh. Bên cạnh đó, vẫn tồn tại một số trường hợp EB khó kết luận chính xác khi sử dụng kỹ thuật TEM, lúc này phân tích di truyền là phương án cuối cùng và cũng là phương pháp chính xác nhất để xác định nguyên nhân gây bệnh và phân loại chúng. Có thể lựa chọn gen ứng viên ở bước phân tích này thông qua kết quả phân loại của TEM hoặc IFM trước đó, từ đó lựa chọn phương pháp chẩn đoán phân tử phù hợp, tiết kiệm và nhanh chóng nhất. Trái ngược lại, ở những trường hợp không được chẩn đoán bằng TEM/IFM thì việc xác định gen mục tiêu sẽ trở nên khó chính xác hơn nếu chỉ căn cứ theo các đặc điểm lâm sàng, vì đôi khi vẫn có các biểu hiện trộn lẫn giữa các phân nhóm/tiểu phân nhóm (chẳng hạn như RDEB thể khu trú và DDEB thể khu trú) khiến việc phân loại chính xác trở nên khó khăn hơn. Tuy nhiên, với sự phát triển và tiến bộ vượt bậc của công nghệ giải trình tự thế hệ mới đã giúp cho việc xác định nguyên nhân di truyền trở nên nhanh chóng, ít tốn kém và chính xác hơn bao gồm cả

các trường hợp khó phân loại nhất. Sử dụng các panel đặc hiệu trong sàng lọc các biến thể gây bệnh đã biết hoặc WES/WGS giúp mở rộng phạm vi tìm kiếm, giúp phát hiện các biến thể mới, mở rộng cơ sở dữ liệu liên quan đến EB [45-48].

Ngoài việc hỗ trợ chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây bệnh, phân tích gen còn có ý nghĩa trong tư vấn di truyền, hỗ trợ chẩn đoán tiền làm tổ, chẩn đoán trước sinh, và các thông tin liên quan giúp công tác quản lý bệnh trở nên hiệu quả, tối ưu hơn.

1.1.5. Chăm sóc và điều trị người bệnh ly thượng bì bóng nước

Cho đến nay, chưa có cách chữa trị đặc hiệu cho bệnh này, các phương pháp điều trị chỉ tập trung vào điều trị triệu chứng, chủ yếu là chăm sóc vết thương, kiểm soát nhiễm trùng, hỗ trợ dinh dưỡng, phòng ngừa và điều trị các biến chứng [1]. Bên cạnh đó, những nỗ lực tìm kiếm các phương pháp điều trị mới từ trước đến nay, bao gồm liệu pháp tế bào, liệu pháp gen, liệu pháp protein, cấy ghép tế bào sừng hoàn nguyên, ứng dụng các tế bào gốc cảm ứng đa năng và sử dụng thuốc căn cứ vào bệnh học phân tử bằng cách trực tiếp hay gián tiếp cho thấy triển vọng trong điều trị có hiệu quả và lâu dài. Tuy nhiên, cần phải thực hiện thêm các nghiên cứu chuyên sâu trước khi sử dụng các liệu pháp này trong lâm sàng. Liệu pháp gen bao gồm chuyển các locus gen và chuyển cDNA được thực hiện ở cả hai phương pháp là *in vivo* và *ex vivo*. Vào năm 2013, liệu pháp này đã được báo cáo trong điều chỉnh biểu hiện gen trên trường hợp DEB và EBS bằng phương pháp ghép nối RNA qua spliceosome trung gian (SMaRT) [49]. Đến năm 2019, nghiên cứu của Lwin và cộng sự trên các trường hợp RDEB đã chứng minh tính an toàn và hiệu quả điều trị tiềm năng của liệu pháp gen tạo ra các nguyên bào sợi với sự hiện diện của *COL7A1* đã biến đổi và sự phục hồi của collagen loại VII (COLVII) trên da của các tình nguyện viên sau một năm điều trị [50]. Liệu pháp tế bào dựa trên nguyên bào sợi được xem là tương đối an toàn, dễ thực hiện và ít tác dụng phụ. Bằng việc sử dụng liệu pháp này trên những người bệnh DEB, COLVII có thể được phục hồi và cũng có thể bình thường hóa các biến đổi cấu trúc trong một vài tháng [51]. Ngoài ra, phương pháp cấy ghép tế bào tủy xương thực hiện trên mô hình chuột cũng cho thấy các kết quả triển vọng như: COLVII và sợi cơ neo bám đã được sản xuất, khả năng kết dính của lớp hạ bì-biểu bì được cải thiện, các vết phỏng rộp giảm và thời gian sống được kéo dài một cách rõ rệt [52, 53]. Bên cạnh đó,

cấy ghép tủy xương được xem như một phương pháp điều trị cho một số dạng EB nghiêm trọng, đặc biệt trong các trường hợp JEB nặng với sự cải thiện trong lâm sàng và tăng cường biểu hiện của COLVII [53, 54]. Tuy nhiên, nguy cơ tử vong ở mức xấp xỉ 20% vẫn là một mối lo ngại từ phương pháp điều trị này, bên cạnh đó, hiểu biết về các tế bào cũng như cơ chế quan trọng tồn tại giữa tủy xương và da cũng chưa thực sự rõ ràng.

1.2 Bệnh bạch tạng

1.2.1. Giới thiệu chung về bệnh bạch tạng

Bạch tạng được mô tả là một bệnh di truyền hiếm gặp, đặc trưng bởi sự giảm sắc tố ở da, tóc và/hoặc mắt, đồng thời có ảnh hưởng liên quan đến võng mạc và có thể làm thay đổi thị lực của mắt. Những bất thường quan trọng ở mắt ở những người bệnh bạch tạng ngoài suy giảm sắc tố được biểu thị một cách rõ ràng thì còn có thể bao gồm các ảnh hưởng như thiếu sản hoàng điểm, giảm sắc tố của tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, giảm tế bào hình que cảm thụ ánh sáng (photoreceptor rod cell deficit), hoạt động sai dây thần kinh ở vùng giao thoa thị giác, giảm sắc tố ở mống mắt, có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng và rung giật nhãn cầu [55].

Có hai loại bạch tạng chính là bạch tạng da và mắt (oculocutaneous albinism – OCA) và bạch tạng mắt (ocular albinism – OA), được phân loại dựa trên kiểu hình lâm sàng, liên quan đến suy giảm sắc tố ở da, tóc và mắt (OCA), hoặc chỉ ở mắt (OA). Trong OCA, ở bất kỳ mức độ nào của sắc tố được quan sát thì số lượng và cấu trúc của melanin không thay đổi nhiều, trong khi sự xuất hiện số lượng lớn các tế bào sắc tố riêng biệt là đặc trưng ở các trường hợp OA. Bạch tạng da và mắt (OCA) là một rối loạn di truyền lặn nhiễm sắc thể thường, bao gồm 8 phân nhóm nhỏ OCA1-OCA8 [55, 56]. Các phân nhóm này được phân biệt bởi đột biến trên các gen khác nhau, tạo ra sản phẩm melanin khiếm khuyết dẫn đến melanin không được tổng hợp hoặc không được phân bố đúng cách trên các mô da. Ngoài 2 phân nhóm chính là OCA và OA thì còn có các hội chứng hiếm gặp của bạch tạng cũng đã được mô tả là hội chứng Hermansky-Pudlak (HPS) và hội chứng Chediak-Higashi (CHS). Biểu hiện lâm sàng ở HPS và CHS cũng bao gồm các ảnh hưởng đến da, tóc và mắt tương tự như các trường hợp mắc OCA, đồng thời đi kèm thêm một số các biểu hiện đặc trưng khác được tạo ra bởi các biến thể trên các gen mã hóa cho các protein có chức năng mở rộng hơn. Rối

loạn chức năng tiêu cầu và rối loạn chảy máu được tìm thấy ở những người bệnh mắc HPS. Các ảnh hưởng trong quá trình tổng hợp lysosome cũng có thể gây nhiễm trùng ở các trường hợp CHS [55].

1.2.2. Dịch tễ học bệnh bạch tạng

1.2.2.1. Tỷ lệ mắc bệnh

Tỷ lệ mắc bạch tạng được ước tính là 1/17.000 đến 1/20.000 trong quần thể, trong đó chiếm đến 70% là các trường hợp OCA, riêng các trường hợp OA thì tỷ lệ mắc bệnh trên toàn thế giới ước tính khoảng 1/50.000 người. Trong 7 phân nhóm của OCA thì OCA2 là phân nhóm bạch tạng phổ biến nhất trên thế giới, có tỷ lệ mắc bệnh tương ứng là 1/39.000. Đặc biệt, ở các nước châu Phi gần sa mạc Sahara có tỉ lệ OCA2 tương đối cao so với các quần thể khác, tỉ lệ mắc bệnh lên đến 1/1.000 người. Điều này có thể là kết quả của tình trạng hôn nhân cận huyết phổ biến tại đây. Bên cạnh đó, các quần thể người Mỹ gốc Phi (1/10.000) và người Mỹ nói chung (1/36.000) cũng là những quần thể có tỷ lệ OCA2 cao hơn so với các quần thể khác. Phân nhóm phổ biến thứ 2 sau OCA2 là OCA1, với tỉ lệ mắc bệnh là 1/40.000 người, tuy nhiên đây lại là phân nhóm phổ biến nhất ở các nước châu Âu gồm Đức, Pháp, Đan Mạch, và Italia [57, 58]. OCA3 và OCA4 là những phân nhóm ít phổ biến hơn, trong đó OCA3 được tìm thấy chủ yếu ở miền nam Châu Phi (1/8.500) và số ít ở các quần thể người Pakistan, Đức, Ấn Độ và Nhật Bản [59]. Tỷ lệ mắc OCA4 trên toàn thế giới là khoảng 1/100.000 và là phân nhóm khá phổ biến ở Nhật Bản (chiếm đến 24% các trường hợp bạch tạng ở Nhật). Bên cạnh đó, OCA4 cũng được tìm thấy ở nhiều quần thể khác như Đức, Thổ Nhĩ Kỳ, Ấn Độ, Hàn Quốc, Trung Quốc, Đan Mạch và Maroc [59]. Ba phân nhóm còn lại của OCA là OCA5, OCA6 và OCA7 là những phân nhóm hiếm, gần như mới chỉ được xác định trên một vài cá thể người Pakistan (OCA5), Trung Quốc và Ấn Độ (OCA6) và một gia đình dân tộc thiểu số Faroese (Đan Mạch) với tình trạng hôn nhân cận huyết [60-62]. Hội chứng Hermansky-Pudlak (HPS) có tỷ lệ mắc bệnh là 1/500.000 trên toàn thế giới, tuy nhiên tỷ lệ này ở Puerto Rico lại khá cao với 1/1800 người [55]. Hội chứng Chediak-Higashi (CHS) cũng là một hội chứng rất hiếm của bạch tạng với số lượng người bệnh ước tính ít hơn 500 trường hợp được công bố trong 20 năm qua [55, 63].

1.2.2.1. Các đặc điểm lâm sàng ở người bệnh bạch tạng

Triệu chứng của bạch tạng được nhận biết ở màu da, màu tóc, màu mắt và thị lực. Hầu hết những người bệnh bạch tạng có màu tóc trắng và màu da rất sáng. Màu da và màu tóc thay đổi trong khoảng từ trắng sang nâu và màu mắt dao động từ màu xanh da trời sáng đến nâu. Suy giảm thị lực là một yếu tố chính trong tất cả các dạng của bạch tạng. Các vấn đề về thị lực có thể xuất hiện như rung giật nhãn cầu, phân tán sắc tố móng mắt (iris transillumination), thoái hóa điểm vàng, giảm thị lực và giảm khả năng nhìn sâu. Ngoài ra, biểu hiện chậm phát triển tâm thần có thể xuất hiện ở một số trường hợp [55]. Các dạng bạch tạng khác nhau thì sẽ tồn tại những triệu chứng đặc trưng riêng.

Trong bạch tạng da và mắt, hiện có 8 phân nhóm chính (OCA1-OCA8) đã được chỉ ra. Ở phân nhóm OCA1, hai tiểu phân nhóm nhỏ được phân biệt với nhau là OCA1A và OCA1B; trong đó, OCA1A bị mất hoàn toàn sắc tố melanin trên da, được đặc trưng bởi màu da và màu tóc trắng, trông mắt hồng cho đến đỏ. Không giống nhóm OCA1A (thường có màu tóc trắng khi sinh ra), những người bệnh mắc OCA1B vẫn còn một chút sắc tố melanin và biểu thị trên da, tóc và mắt [59]. Ba phân nhóm OCA2, OCA4 và OCA6 có xu hướng nhẹ với biểu hiện sắc tố trên da, tóc và mắt sẫm màu hơn (gần với kiểu hình bình thường hơn) do đa phần sắc tố melanin vẫn được tổng hợp. Màu da và màu tóc ở các trường hợp OCA4 thường tương quan với nhau. Phân nhóm OCA3 hay còn gọi là OCA đỏ (rufous OCA) thường chủ yếu ảnh hưởng đến những người có da sẫm màu (chủ yếu là người Châu Phi). Những người bệnh thường có da màu nâu, nâu đỏ, tóc đỏ hoặc vàng đỏ, mắt màu hạt dẻ hoặc nâu sáng và có thể bị suy giảm thị lực nhưng rất khó phát hiện, thậm chí là không [55, 59]. Các ảnh hưởng lâm sàng đặc trưng trên các trường hợp OCA5 bao gồm da trắng, tóc vàng, có biểu hiện của rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm, có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng và suy giảm thị lực [59]. Ở các trường hợp OCA7 thì màu da của người bệnh thường chỉ nhạt hơn một chút khi so sánh với các thành viên trong gia đình. Tuy nhiên suy giảm thị lực lại ở mức nghiêm trọng trái ngược với sự giảm sắc tố nhẹ ở da và tóc trong phân nhóm này [59]. Phân nhóm OCA8 là một phân nhóm mới của bạch tạng được phát hiện, đặc trưng bởi giảm sắc tố nhẹ ở da và tóc, đồng thời người bệnh mang

các bất thường ở mắt bao gồm rung giật nhãn cầu, giảm thị lực, phân tán sắc tố mỏng mắt và giảm sắc tố võng mạc [64].

Những người bệnh HPS thường có làn da trắng đến ô liu (màu xanh lá cây ánh vàng xỉn), tóc từ trắng đến nâu, giảm sắc tố ở mắt, có biểu hiện rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm và phân tán sắc tố mỏng mắt. Thị lực của người bệnh thường giao động từ 20/50 đến 20/400. Ngoài các ảnh hưởng đến sắc tố trên da, tóc và mắt giống như OCA thì HPS thường đi kèm với hiện tượng chảy máu nhẹ đến trung bình do rối loạn chức năng tiểu cầu và một số bất thường ở phổi hoặc thận do lắng đọng ceroid. Có hai phân nhóm chính của HPS lần lượt liên quan đến chứng suy giảm miễn dịch (nhiễm trùng tái phát) và hội chứng thực bào máu. Ngoài ra còn có thể có các phân nhóm khác với biểu hiện xơ phổi ở độ tuổi ba mươi và viêm ruột từng vùng (bệnh Cronh/Granulomatous Colitis) [55, 59].

Cũng giống như HPS, các trường hợp CHS cũng mang các đặc điểm lâm sàng của OCA bao gồm giảm sắc tố trên da, tóc xám hoặc ánh bạc, có biểu hiện rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm và chứng sợ ánh sáng. Bên cạnh đó, tất cả các trường hợp CHS sẽ đi kèm thêm các ảnh hưởng lâm sàng đặc trưng như dễ bị nhiễm trùng, giảm bạch cầu trung tính, suy thoái thần kinh và rối loạn đông máu nhẹ [55, 59].

Bên cạnh phân nhóm OCA liên quan đến giảm sắc tố trên da, tóc và mắt thì OA là phân nhóm bạch tạng chỉ bị giảm sắc tố ở mắt. Khi so sánh với các thành viên trong gia đình thì da và mắt của người bệnh hơi nhợt nhạt hơn. Ngoài ra, các ảnh hưởng ở mắt có thể xuất hiện bao gồm rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm và chứng sợ ánh sáng. Thị lực ở các trường hợp mắc OA thường từ 20/100 đến 20/200. Những người bệnh nữ hiếm khi bị rung giật nhãn cầu và suy giảm thị lực hơn so với nam giới [59].

1.2.3. Cơ chế bệnh sinh và các gen liên quan đến bạch tạng

Tế bào biểu bì tạo hắc tố/ tế bào hắc tố (melanocytes) có nguồn gốc từ các mầm thần kinh trong quá trình phát triển phôi thai và được phân phối đến nhiều loại tế bào, bao gồm da, mắt, tóc và tế bào mạch máu ở tai trong. Các tế bào hắc tố chiếm khoảng 5% đến 10% lượng tế bào ở lớp đáy biểu bì, và tỷ lệ này là không thay đổi ngay cả ở các bệnh nhân bạch tạng. Sự khác biệt giữa bệnh nhân bạch tạng và những người khỏe mạnh là lượng sắc tố melanin được tạo ra từ tế bào hắc tố ít hơn. Melanin được biết

đến với vai trò quan trọng là bảo vệ cơ thể khỏi tia cực tím (UV) có hại. Có hai loại sắc tố melanin chính là eumelanin và pheomelanin, được tổng hợp trong bào quan chuyên biệt của tế bào hắc tố gọi là melanosome. Eumelanin làm cho da có màu đen hoặc nâu, đồng thời đóng vai trò bảo vệ da chống lại tác hại của bức xạ cực tím B (UVB) bằng cách hấp thụ và phân tán các tia cũng như ngăn chặn sự thâm nhập của tia cực tím vào cơ thể một cách tự nhiên. Pheomelanin chịu trách nhiệm tạo ra các sắc tố có màu vàng, hồng cho đến đỏ tùy theo số lượng của loại sắc tố melanin này [55].

Quá trình tổng hợp melanin được thực hiện thông qua 3 phản ứng, đầu tiên là quá trình oxy hóa L-tyrosine thành L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), tiếp đó là quá trình chuyển đổi L-DOPA thành DOPAquinone và cuối cùng là quá trình chuyển đổi DOPAquinone thành một trong 2 dạng melanin là eumelanin và pheomelanin. Trong đó, tyrosinase là enzyme xúc tác giúp thực hiện 2 quá trình chuyển đổi từ L-tyrosine thành L-DOPA đến DOPAquinone. Ở giai đoạn 3, hình thành sắc tố melanin, eumelanin được tổng hợp khi không có cysteine hoặc glutathione thông qua phản ứng tự phát hoặc cần sự xúc tác của DOPACHrome tautomerase (DCT/TYRP2). Ngược lại, pheomelanin được sản xuất khi các cysteine cùng tham gia với DOPAquinone. Ngoài các phản ứng cần tyrosinase thì tất cả các phản ứng còn lại là tự phát và không cần thêm chất xúc tác nào. Ở những người bệnh bạch tạng, ảnh hưởng trực tiếp hay gián tiếp đến hoạt động của tyrosine trong quá trình tổng hợp melanin dẫn đến thiếu hụt sắc tố này được xem là nguồn gốc bệnh lý hay chính là nguyên nhân dẫn đến bệnh [65].

Về mặt di truyền bệnh, bạch tạng được phân loại tùy theo các biến thể gen phát hiện ở các gen gây bệnh khác nhau. Tổng số ít nhất 20 gen dẫn đến bạch tạng đã được báo cáo, trong đó 19 gen liên quan đến các trường hợp OCA và một gen nằm trên nhiễm sắc thể X liên quan đến OA (*Bảng 1.2*). Hiện có 8 phân nhóm OCA không hội chứng (OCA1-OCA8) đã được xác định cho đến nay. Ngoại trừ OCA5 chưa xác định được gen gây bệnh thì đột biến trên các gen bao gồm *TYR*, *OCA2*, *TYRP1*, *SLC45A2*, *SLC24A5*, *C10orf11* và *DCT* được biết đến lần lượt là nguyên nhân dẫn đến các kiểu hình OCA1, OCA2, OCA3, OCA4, OCA6, OCA7 và OCA8 [56, 66].

Bảng 1.2. Các gen liên quan đến OCA và OA

Phân nhóm bạch tạng	Mô hình di truyền	Gen	Vị trí
OCA không hội chứng [63]			
OCA1	AR	<i>TYR</i>	11q14.3
OCA2	AR	<i>OCA2</i>	15q12-q13.1
OCA3	AR	<i>TYRP1</i>	9p23
OCA4	AR	<i>SLC45A2</i>	5p13.2
OCA5	AR	Chưa biết	4q24
OCA6	AR	<i>SLC24A5</i>	15q21.1
OCA7	AR	<i>C10orf11</i>	10q22.2-q22.3
OCA8	AR	<i>DCT</i>	13q32.1
OCA hội chứng [63]			
HPS1	AR	<i>HPS1</i>	10q23.1-q23.3
HPS2	AR	<i>AP3B1</i>	5q14.1
HPS3	AR	<i>HPS3</i>	3q24
HPS4	AR	<i>HPS4</i>	22cen-q12.3
HPS5	AR	<i>HPS5</i>	11p14
HPS6	AR	<i>HPS6</i>	10q24.32
HPS7	AR	<i>DTNBP1</i>	6p22.3
HPS8	AR	<i>BLOC1S3</i>	19q13.32
HPS9	AR	<i>PLDN</i>	15q21.1
HPS10	AR	<i>AP3D1</i>	19p13.3
HPS11	AR	<i>BLOC1S5</i>	6p24.3
CH1	AR	<i>LYST</i>	1q42.1-q42.3
Bạch tạng mắt (OA) [63]			
OA1	Liên kết NST X	<i>GPR143</i>	Xp22.3

Phân nhóm OCA1 (MIM 203100) liên quan đến các biến thể gây bệnh trên gen *TYR* (MIM 606933) nằm trên nhiễm sắc thể 11 tại vị trí 11q14.3, bao gồm 5 exon với kích thước khoảng 65 kb, mã hóa cho tyrosinase gồm 529 axit amin [67]. Đây là enzyme quan trọng, đóng vai trò xúc tác quá trình sinh tổng hợp sắc tố melanin trong tế bào hắc tố melanosome. Trong đó, OCA1A liên quan đến các biến thể *TYR* hình thành nên tyrosinase mất hoàn toàn chức năng, trong khi OCA1B là kết quả của các biến thể *TYR* hình thành một tyrosinase mất một phần chức năng, dẫn đến không tổng hợp được (kiểu hình OCA1A) hoặc chỉ tổng hợp được một lượng nhỏ (OCA1B) eumelanin trong tế bào hắc tố [55].

Phân nhóm OCA2 (MIM 203200) là kết quả của các biến thể trên gen *OCA2* hay còn gọi là gen *P* có kích thước 345 kb (24 exon) nằm trên nhiễm sắc thể 15 vị trí 15q11.2-q12, mã hóa cho protein P gồm 838 axit amin [68]. Mặc dù chức năng chính xác của protein P vẫn chưa được hiểu một cách đầy đủ nhưng dường như có liên quan đến quá trình vận chuyển protein đến melanosome, hỗ trợ ổn định phức hợp protein cũng như điều chỉnh pH ổn định trong melanosome và/hoặc xúc tác cho quá trình tổng hợp glutathione (chất ức chế quá trình tạo melanin từ tyrosine, kích thích sự sản sinh pheomelanin). Những người bệnh mang kiểu hình OCA2 sẽ không có loại sắc tố

eumelanin (sắc tố có màu nâu hoặc đen), thay vào đó là pheomelanin (sắc tố màu vàng, hồng cho đến đỏ) với lượng sắc tố tăng dần theo độ tuổi [69-71].

Phân nhóm OCA3 (MIM 203290) là kiểu hình gây ra bởi biến thể trên gen *TYRP1* (MIM 115501) nằm trên nhiễm sắc thể số 9 tại vị trí 9p23 có kích thước 17 kb và bao gồm 8 exon [72], mã hóa cho một protein hay enzyme liên màng TYRP1 (Tyrosinase Related Protein 1) gồm 536 axit amin [73]. Protein TYRP1 đóng vai trò ổn định TYR trong melanosome, các biến thể gây bệnh gen *TYRP1* có liên quan đến sự suy thoái sớm của TYR và trưởng thành muộn của tế bào melanosome, ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp sắc tố eumelanin [74]. Tuy nhiên, tác động này là không quá lớn khi đánh giá tương quan kiểu gen – kiểu hình ở các trường hợp mắc OCA3 với ảnh hưởng lâm sàng tương đối nhẹ.

Phân nhóm OCA4 (MIM 696574) gây ra bởi các biến thể trên gen *SLC45A2* (MIM 606202, 5p13.3; kích thước khoảng 4 kb) bao gồm 7 exon, mã hóa cho một protein vận chuyển màng thuộc melanosome (MATP, 530 axit amin). Giống như protein P (OCA2), MATP tham gia, hỗ trợ kiểm soát ổn định độ pH trong melanosome. Biến thể gây bệnh gen *SLC45A2* trong các trường hợp OCA4 dẫn đến ức chế quá trình sinh tổng hợp melanin diễn ra trong melanosome [74].

Phân nhóm OCA5 (MIM 615312) được xác định bởi các biến thể gen nằm trên nhiễm sắc thể số 4 tại 4q24. Đây là phân nhóm OCA duy nhất hiện nay vẫn chưa xác định được chính xác gen gây bệnh [55, 74].

Phân nhóm OCA6 (MIM 609802) gây ra bởi các biến thể gen *SLC24A5* được phát hiện bởi nhóm nghiên cứu của Wei Li và cộng sự thuộc Viện Di truyền và Sinh học phát triển, Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc (Bắc Kinh, Trung Quốc) khi tiến hành giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa của những người bệnh bạch tạng có nguồn gốc khác nhau [62]. Gen *SLC24A5* nằm trên nhiễm sắc thể 15 vị trí 15q21.1 có kích thước hơn 21 kb mã hóa cho protein SLC24A5 (solute carrier family 24, member 5) gồm 500 axit amin. Protein SLC24A5 (hay NCKX5) hoạt động như một chất vận chuyển ion trên màng tế bào hắc tố cùng với OCA2 và SLC45A2 [21]. Ở những người bệnh OCA6, hàm lượng eumelanin trong tóc thấp hơn đáng kể so với những thành viên khác trong gia đình chỉ mang gen mà không biểu hiện bệnh. Khi soi da dưới kính hiển vi, các trường hợp OCA6 có melanosome trưởng thành hơn so với các melanosome chưa trưởng thành biểu thị trong cả toàn bộ tế bào và đuôi gai tế bào biểu

bì tạo hắc tố (melanocyte). Điều này chỉ ra SLC24A5 tham gia vào quá trình trưởng thành melanosome hoặc hỗ trợ sản xuất melanin trong melanosome trưởng thành [62].

Phân nhóm OCA7 (MIM 615179) được xác định bởi các biến thể gây bệnh trên gen biệt hóa tế bào hắc tố *C10orf11* (10q22.2-q22.3, kích thước > 1000 kb) mã hóa cho protein LRMDA (Leucine-Rich Melanocyte Differentiation-Associated Protein) liên quan đến sự di cư của tế bào biểu bì tạo sắc tố (melanocyte) [75].

Phân nhóm OCA8 (MIM 619165) là phân nhóm bạch tạng da và mắt mới được xác định gần đây, gây ra bởi biến thể đồng hợp tử hoặc dị hợp tử phức gen *DCT* (*TYRP2*) nằm trên nhiễm sắc thể số 13 vị trí 13q32.1 có kích thước lớn hơn 112 kb. Protein được mã hóa bởi *DCT* đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp melanin, xúc tác qua trình chuyển hóa L-DOPAchrome thành axit 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic (DHICA), hình thành nên eumelanin [56].

Ngoài 7 gen liên quan đến các phân nhóm OCA kể trên, còn tồn tại nhiều gen khác là nguyên nhân dẫn đến hai hội chứng của bạch tạng da và mắt là HPS và CHS bao gồm *HPS1*, *AP3B1* (HPS2), *HPS3*, *HPS4*, *HPS5*, *HPS6*, *DTNBP1* (HPS7), *BLOC1S3* (HPS8), *PLDN*, *AP3D1* (HPS10), *BLOC1S5* (HPS11) và *LYST* (CH1) [55, 56, 74].

Trong các trường hợp OA, các biến thể gen *GPR143* (kích thước > 60 kb, bao gồm 9 exon) nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X tại vị trí Xp22.3 mã hóa cho một protein gồm 404 axit amin được xem là nguyên nhân dẫn đến bệnh [76]. *GPR143* là một thụ thể kết hợp protein G liên kết với melanosome tham gia vào quá trình sinh tổng hợp melanosome trong quá trình biệt hóa tế bào biểu bì tạo hắc tố (melanocyte). Đồng thời, *GPR143* điều chỉnh kích thước và số lượng melanosome thông qua kích hoạt yếu tố phiên mã cảm ứng tế bào hắc tố (MITF), giúp kiểm soát giai đoạn phát triển và hoạt động của các tế bào hắc tố (có nhiệm vụ sản xuất melanin) [77].

1.2.4. Các phương pháp chẩn đoán, sàng lọc bạch tạng

Chẩn đoán OCA được thực hiện dựa trên các đánh giá lâm sàng liên quan đến giảm sắc tố ở da và tóc bên cạnh các triệu chứng đặc trưng ở mắt. Thông thường, các bác sĩ sẽ chú ý đến các biểu hiện giảm sắc tố ở mắt ở trẻ 2 đến 4 tháng tuổi khi nghi ngờ OCA (biểu hiện này ở trẻ sơ sinh không phải là hiếm gặp nên không cần phải chú ý như một đặc điểm nguy cơ ở lứa tuổi này). Các biểu hiện giảm sắc tố da toàn thân kèm theo rung giật nhãn cầu và thính lực bình thường là những điều kiện đủ để nghi

ngờ nguy cơ mắc bạch tạng. Ngoài ra, các triệu chứng khác có thể đi kèm như nhiễm trùng tái phát, chảy máu, chậm phát triển trí tuệ cũng được đánh giá để không bỏ sót các hội chứng liên quan của bạch tạng.

Tuy nhiên, do sự trùng lặp về mặt lâm sàng giữa các kiểu phụ của OCA, chẩn đoán phân tử là cần thiết để xác định gen gây bệnh, giúp phân loại bạch tạng một cách chính xác nhất. Cho đến nay, ít nhất 20 gen và locus 4q.24 đã được báo cáo liên quan đến các phân nhóm khác nhau của bạch tạng [78]. Các phương pháp chẩn đoán phổ biến hiện nay có thể kể đến như giải trình tự Sanger, MLPA và giải trình tự thế hệ mới (NGS). Giải trình tự Sanger có thể được sử dụng trong các trường hợp đã xác định được gen mục tiêu thông qua các đặc điểm lâm sàng rất đại diện cho một loại phân nhóm của bạch tạng, thường là các kiểu phụ của OCA, được quy định bởi 1 gen duy nhất cho mỗi loại. Phương pháp MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) giúp xác định các biến thể liên quan đến số lượng bản sao (CNV) mà giải trình tự Sanger không thể phát hiện được. Mặt khác, trong các trường hợp không thể phân loại được hoặc khó chẩn đoán thì giải trình tự thế hệ mới được xem là phương pháp tối ưu nhất, giúp sàng lọc một nhóm gen hoặc tất cả các gen liên quan đến bệnh một cách nhanh chóng, chính xác và giảm thiểu chi phí. Đây là phương pháp được sử dụng phổ biến ở các phòng thí nghiệm trên toàn thế giới trong chẩn đoán và sàng lọc bạch tạng (www.genetests.org).

Trong bạch tạng, chẩn đoán sớm được xem là mục tiêu quan trọng nhất giúp quá trình quản lý bệnh trở nên tối ưu và có hiệu quả. Những lợi ích từ chẩn đoán sớm có thể có được như giúp đánh giá và tiên lượng sớm các triệu chứng ở mắt cũng như có thể đảm bảo suy giảm thị lực ở mức tối thiểu nhất; từ đó giúp tối ưu các vấn đề liên quan đến sức khỏe chung của người bệnh cũng như các vấn đề xã hội khác như khả năng học tập, phát triển nhận thức và sự tích cực trong suy nghĩ, tránh mặc cảm, tự ti. Chẩn đoán sàng lọc sớm bệnh trên các đối tượng có nguy cơ ngày càng trở nên dễ dàng và chính xác hơn bao giờ hết dựa trên chẩn đoán di truyền ở mức độ phân tử. Hơn nữa, chẩn đoán phân tử đặc biệt có ý nghĩa trong tư vấn và chẩn đoán trước sinh cũng như trong chẩn đoán tiền làm tổ, giúp giảm thiểu nguy cơ sinh ra trẻ bị bệnh ở những gia đình có tiền sử.

1.2.5. Chăm sóc và điều trị người bệnh bạch tạng

Cũng giống như đa số các bệnh di truyền hiếm gặp khác, hiện chưa có cách chữa khỏi bạch tạng hoàn toàn, việc điều trị hiện nay là điều trị triệu chứng, ngăn ngừa

tác hại của ánh nắng mặt trời đến da và tóc của người bệnh, đồng thời thăm khám nhãn khoa định kỳ.

Ngoài ra, hiện có 3 hướng điều trị tiềm năng sử dụng L-DOPA, AVV (Adeno associated viral vector) và Nitisinone có thể ứng dụng trong điều trị người bệnh bạch tạng [59]. L-DOPA là một amino acid quan trọng được chuyển đổi từ L-tyrosine trong quá trình sinh tổng hợp sắc tố melanin, điều chỉnh sự phát triển bình thường của võng mạc thông qua tín hiệu OA1 (thụ thể chọn lọc của L-DOPA). Do đó, bổ sung L-DOPA ngoại sinh có thể được xem là khả thi, hỗ trợ tăng cường phát triển thần kinh võng mạc cho các trường hợp mắc OCA [74]. Nghiên cứu của Summers và cộng sự đã cho thấy hiệu quả sử dụng L-DOPA sau 20 tuần ở 45 người bệnh OCA với thị lực được cải thiện [79]. Liệu pháp gen sử dụng AVV lần đầu tiên được giới thiệu bởi Surface và cộng sự trong nghiên cứu hiệu quả điều trị trên mô hình chuột mắc OA1, kết quả chỉ ra khả năng cải thiện các bất thường về điện sinh lý và cấu trúc của tế bào biểu mô sắc tố (RPE) ở mắt [80]. Ngoài ra, liệu pháp này cũng được báo cáo là có thể có hiệu quả trong điều trị các trường hợp OCA1 trên mô hình chuột, với sự gia tăng sắc tố được biểu thị rõ trên võng mạc [81]. Nitisinone là thuốc điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa tyrosinemia loại 1 (hereditary tyrosinemia type 1), làm tăng nồng độ của tyrosine trong huyết tương và cải thiện sắc tố ở mắt và da, đã được quan sát trên mô hình chuột mắc OCA1B, từ đó cho thấy tiềm năng điều trị của phương pháp này [82]. Nghiên cứu thử nghiệm trên 5 người trưởng thành mắc bạch tạng được điều trị bằng nitisinone với liều dùng 2 mg/ ngày kéo dài trong 1 năm cũng cho kết quả khả quan, với hàm lượng sắc tố ở da và tóc tăng lên một cách đáng kể [83].

1.3 Thiếu sản vành tai

1.3.1. Giới thiệu chung về thiếu sản vành tai

Thiếu sản vành tai là một dị tật bẩm sinh của tai ngoài, hình thành trong quá trình phát triển phôi thai không đúng cách, được nhận biết bởi hình dạng tai nhỏ và bất thường (auricle-pinna). Triệu chứng đi kèm thường là ống tai hẹp, bị bịt hoặc là không có ống tai. Trường hợp nghiêm trọng nhất với vành tai hoàn toàn không phát triển được gọi là anotia. Thiếu sản vành tai có thể xảy ra ở một hoặc cả hai bên tai, tuy nhiên trường hợp dị tật một bên là phổ biến hơn cả, chiếm 79-93% các cá nhân bị ảnh hưởng [84]. Trong số các trường hợp bị thiếu sản vành tai một bên thì trường hợp dị tật ở tai phải chiếm đến 60% trong tổng số các trường hợp phát hiện [85, 86]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra, thiếu sản vành tai có xu hướng xảy ra ở nam giới với nguy cơ

cao hơn ở nữ giới là 40% [87]. Thiếu sản vành tai có thể xảy ra như một dị tật bẩm sinh độc lập hoặc là một phần biểu hiện trong một tập hợp nhiều dị tật hoặc một hội chứng nào đó có liên quan đến sự bất thường từ cung mang thứ nhất và cung mang thứ hai trong quá trình phát triển phôi. Các khía cạnh bao gồm dịch tễ học bệnh, các yếu tố nguy cơ (môi trường và di truyền), cách điều trị và chăm sóc người bệnh thiếu sản vành tai sẽ được thảo luận dưới đây.

1.3.2. Dịch tễ học thiếu sản vành tai

1.3.2.1. Tỷ lệ mắc bệnh

Tỷ lệ ước tính mắc thiếu sản vành tai rất khác nhau giữa các quốc gia, khu vực và dao động từ 0,8 đến 17,4 trên 10000 ca sinh. Tỷ lệ lưu hành cao hơn được báo cáo ở quần thể người Ecuador (17,4/10000 ca sinh), Chile (8,8/10000 ca sinh) và Phần Lan (4,3/10000 ca sinh) [88, 89]. Nghiên cứu tại Hoa Kỳ cho thấy tỷ lệ này là cao hơn ở có gốc Châu Á (2,2-3,2/10000 ca sinh), đảo Thái Bình Dương (4,61/10000 ca sinh) và người Mỹ bản địa (4-12/10000 ca sinh) khi so với người Mỹ gốc Tây Ban Nha (1,9-3,4/10000 ca sinh) [89]. Ở Trung Quốc, tỷ lệ mắc thiếu sản vành tai được báo cáo dao động từ 0,8 đến 1,53 trên 10000 ca sinh [90]. Ở Nhật Bản, số lượng người có biểu hiện của thiếu sản vành tai là 6000 đến 10000 [91]. Mức độ phổ biến với khoảng giới hạn khá rộng có thể được giải thích do sự khác biệt giữa các nghiên cứu về tiêu chí lựa chọn cũng như xác định các cá thể bệnh. Thiếu sản vành tai là một bất thường bên ngoài có thể được xác định khi khám sức khỏe cho trẻ sơ sinh; tuy nhiên, các dạng ít nghiêm trọng hơn có thể không được phát hiện hoặc chỉ được mô tả như một dạng dị tật tai thông thường trong hồ sơ y tế và ngược lại. Điều này có thể dẫn đến việc báo cáo ít hoặc vượt mức trong các báo cáo về tỷ lệ hiện mắc của thiếu sản vành tai.

1.3.2.2. Các rối loạn liên quan đến thiếu sản vành tai

Khoảng 20-60% trẻ em mắc thiếu sản vành tai có các dị tật khác hoặc có liên quan đến một hội chứng đã biết (*Bảng 1.3*), do đó trẻ được chẩn đoán mắc thiếu sản vành tai nên được kiểm tra các bất thường khác về hình thái một cách toàn diện. Thiếu sản vành tai là một đặc điểm phổ biến của chứng thiếu sản sọ mặt một bên, hội chứng Townes-Brocks và các chứng loạn xương mặt hàm dưới (ví dụ: hội chứng Treacher-Collins và hội chứng Nager). Ngoài ra còn có rất nhiều các hội chứng hiếm gặp khác liên quan đến thiếu sản vành tai đã được chỉ ra (*Bảng 1.3*) [89]. Tất cả các rối loạn này nên được hội chẩn kết hợp khi đánh giá một cá thể có biểu hiện của thiếu sản vành tai.

Bảng 1.3. Các hội chứng liên quan đến thiếu sản vành tai

STT	Hội chứng [89]	Các đặc điểm lâm sàng đặc trưng
1	HC Bixler (Hypertelorism-microtia-clefting)	Tai ngoài kém phát triển, khe hở môi, khoảng cách lớn hơn bình thường giữa hai hốc mắt và khe hở mắt
2	HC Bosley-Salih-Alorainy	Rối loạn vận nhãn chiều ngang, khiếm thính nặng do thần kinh cảm giác hai bên cùng với dị tật tai trong nghiêm trọng, dị tật mạch máu não, dị tật tim, chậm phát triển, tự kỉ
3	HC Cung mang-mắt-mặt (Branchiooculofacial, BOF)	Dị tật ở da, mắt và có các đặc điểm đặc trưng ở mặt
4	HC Cung mang (Branchiootic syndrome, BO)	Dị tật cung mang thứ hai (u nang và lỗ rò), dị tật tai ngoài, tai giữa và tai trong cùng với mất thính lực do thần kinh cảm giác, do ống dẫn hoặc hỗn hợp, không có bất thường ở thận
5	HC Cung mang-tai-thận (Branchiootorenal, BOR)	Dị tật ở cổ, dị tật tai ngoài, mất thính lực và dị tật ở thận
6	HC CHARGE	Khiếm khuyết ở mắt (coloboma), dị tật tim, tắc hẹp mũi sau, chậm phát triển, bất thường bộ phận sinh dục và/hoặc đường tiết niệu và dị tật tai cùng với khiếm thính
7	HC Điếc bẩm sinh, lão hóa tai trong, thiếu sản vành tai, răng nhỏ	Điếc bẩm sinh, lão hóa tai trong, thiếu sản vành tai, răng nhỏ
8	HC Thiếu sản sọ mặt (CFM)	Sọ mặt kém phát triển, không đối xứng
9	HC Fraser	Dị tật đường mí mắt, dính ngón, dị tật đường sinh dục và đường tiết niệu.
10	HC Kabuki	Đặc điểm mặt đặc trưng, dị tật xương, tầm vóc nhỏ, dị tật tim và thiếu năng trí tuệ
11	HC Klippel-Feil	Cổ ngắn, đường chân tóc thấp, quay cổ hạn chế, bất thường tai ngoài, giữa, tai trong
12	HC Lacrimo-auriculo-dento-digital	Thiếu sản, bất sản hoặc hẹp hệ thống tuyến lệ, dị tật tai cùng với thần kinh cảm giác hoặc mất thính lực hỗn hợp, thiếu sản, bất sản hoặc hẹp tuyến nước bọt, dị tật răng và các dị tật ngón
13	HC Meier-Gorlin (tầm vóc ngắn ở tai-xương bánh chè)	Tai và ống tai rất nhỏ, tầm vóc ngắn và không có hoặc xương bánh chè rất nhỏ
14	HC Thiếu sản vành tai-khiếm thính-hở hàm ếch	Thiếu sản vành tai cả hai bên, suy giảm thính lực và hở hàm ếch
15	HC Miller	Cằm nhỏ, khe hở môi và/hoặc vòm miệng, thiếu sản hoặc bất sản các yếu tố sau trục của các chi, khuyết mí mắt, và thừa núm vú
16	HC Nager	Thiếu sản đầu tận các xương sọ mặt một bên, thường kết hợp bất thường chi
17	HC Oculo-auricular	Thiếu sản vành tai/Anotia, dị tật tim và chậm phát triển trí tuệ
18	HC Pallister Hall	Phổ dị tật từ thừa ngón, khe hở nắp thanh quản không triệu chứng, và u hamartoma vùng dưới đồi thể nhẹ đến khe hở thanh quản gây tử vong ở thể nặng
19	HC Townes Brocks (TBS)	Dị tật hậu môn, vòm miệng, ngón cái, tứ chi, dị tật

STT	Hội chứng [89]	Các đặc điểm lâm sàng đặc trưng
		tai ngoài do TBS điển hình bao gồm tai nhỏ, cụp phần trên gờ luân hay gờ luân nhỏ kèm theo nụ thịt thừa trước tai
20	HC Treacher-Collins	Dị tật tai nhỏ hai bên, thiếu sản mắt, xương hàm, gò má, tròng mắt lệch xuống dưới, khuyết mi dưới điển hình
21	HC Wildervanck (Cervicooculoacoustic)	Dính liền đốt sống cổ (hội chứng Klippel-Feil), liệt dây thần kinh số VI hai bên cùng với mắt bị co rút (hội chứng Duane) và khiếm thính bẩm sinh.

Những dị tật phổ biến nhất liên quan đến thiếu sản vành tai bao gồm: dị tật cột sống (vẹo cột sống do đốt sống kém phát triển), tật miệng rộng (macrostomia), khe hở miệng (oral clefts), mặt bất cân xứng (facial asymmetry), các bất thường ở thận (thiếu sản thận một bên), dị tật tim (thiếu vách ngăn tâm thất bẩm sinh), teo nhãn cầu, úng não thủy, và dị tật thừa ngón [89]. Ngoài ra, khoảng một phần ba đến một nửa số người bệnh thiếu sản vành tai có thiếu sản sọ mặt một bên (craniofacial microsomia) [88]. Các đặc điểm bất thường này hầu hết có liên quan đến hệ thống mắt-tai-cột sống (OAVS), một rối loạn đáng chú ý với nhiều biến thể trong lâm sàng, đặc biệt là các bất thường kinh điển trong hội chứng Goldenhar hoặc các biến dạng Klippel-Feil [92]. Thiếu sản vành tai và OAVS có chung một số đặc điểm như sau: (1) đa dạng biểu hiện kiểu hình, (2) các cấu trúc ở khuôn mặt bất cân xứng, (3) ưu thế phát triển về bên phải, (4) xu hướng xảy ra ở nam giới, và (5) thiếu sản vành tai hoặc các dị tật liên quan có tính chất gia đình như xuất hiện nụ thịt thừa trước lỗ tai. Dựa trên những quan sát này, thiếu sản vành tai được cho là một kiểu hình nhẹ của OAVS.

1.3.2.3. Phân loại thiếu sản vành tai

Do biểu hiện kiểu hình dị tật tai bẩm sinh khá đa dạng và trùng lặp, nên việc phát triển một hệ thống phân loại chính xác đầu là kiểu hình liên quan đến thiếu sản vành tai trở nên khó khăn. Tuy nhiên, vẫn cần một hệ thống phân loại tiêu chuẩn để thuận lợi cho việc chẩn đoán, điều trị cũng như chuẩn hóa quá trình thu thập dữ liệu trong các nghiên cứu.

Hệ thống phân loại đầu tiên của thiếu sản vành tai được Hermann Marx đưa ra vào năm 1926, đặt tên là phân loại Marx [93] dựa trên di tích tai còn lại, gồm 3 cấp độ áp dụng cho dị tật tai nhỏ. Phân loại Marx được Meurman sửa đổi vào năm 1957, bổ sung thêm cấp độ thứ 4 của thiếu sản vành tai [94]. Bốn cấp độ của thiếu sản vành tai được đưa ra theo hệ thống phân loại Marx/Meurman: cấp độ I với sự phát triển tai ngoài không hoàn chỉnh và cấu trúc nhận dạng ống tai ngoài nhỏ, cấp độ II với đỉnh tai

không phát triển và ống tai ngoài hẹp gây mất thính lực, cấp độ III là cấp độ phổ biến nhất ở thiếu sản vành tai được nhận dạng thông qua không có ống tai ngoài và màng tai, và cấp độ IV là trường hợp mất hoàn toàn tai (anotia) (*Hình 1.4*). Đây được xem là một trong những hệ thống phân loại tiêu chuẩn được sử dụng cho đến ngày nay.



Hình 1.4. Các cấp độ của thiếu sản vành tai.

Anotia (A); thiếu sản vành tai cấp độ III (B và C); cấp độ II (D – F) và cấp độ I bao gồm tai dạng cốc hoặc thùy (G) và vành tai bị vùi lấp (cryptotia) (H) [95].

Hệ thống phân loại thứ hai dựa trên tỉ lệ dị tật hay là các bất thường về tai tương quan với phương pháp phẫu thuật được công bố bởi Tanzer vào năm 1975 [96]. Hệ thống phân loại này gồm 5 loại dị tật: (1) không tai, (2) dị tật tai nhỏ, (3) dị tật 1/3 giữa vành tai, (4) dị tật 1/3 trên vành tai và (5) tai vênh.

Hệ thống phân loại thứ ba được Weerda và cộng sự đưa ra vào năm 1988, dựa trên trên hai hệ thống phân loại trước của Marx và Tanzer, đồng thời sửa đổi chúng, bổ sung thêm cả các bất thường diễn ra trong quá trình phát triển phôi thai [97]. Hệ thống phân loại này được chia làm ba cấp độ loạn sản (dysplasia) của tai.

Năm 2009, dựa trên hệ thống phân loại của Weerda, nhóm nghiên cứu của Hunter và cộng sự đã đưa ra một hệ thống phân loại mới gồm 4 cấp độ của thiếu sản vành tai [98]. Chi tiết hệ thống phân loại của Weerda và nhóm nghiên cứu của Hunter được trình bày trong *Bảng 1.4*.

Bảng 1.4. Hệ thống phân loại thiếu sản vành tai của Weerda và nhóm nghiên cứu của Hunter

Hệ thống phân loại của Weerda [95]	Hệ thống phân loại Hunter [95]
<p><i>Loạn sản cấp độ I:</i></p> <p>Hầu hết các cấu trúc của tai ngoài (auricle) là bình thường và quan sát được, chủ yếu là các dị tật nhỏ: vành tai to (macrotia), tai nhô ra ngoài nhưng không mất thính lực (protruding), không có vành tai trên, tai ẩn (cryptoptia), không có xoắn trên, dị tật tai nhỏ, dị tật tiêu thùy (dái tai) và dị tật tai hình cốc.</p>	<p><i>Thiếu sản vành tai cấp độ I:</i></p> <p>Các thành phần cấu tạo của tai đầy đủ, chiều dài tai theo chiều dọc nhỏ hơn từ 2 SD so với mức trung bình.</p>
<p><i>Loạn sản cấp độ II:</i></p> <p>Chỉ một số cấu trúc tai ngoài là bình thường, chủ yếu là dị tật tai hình cốc loại III và dị tật tai nhỏ.</p>	<p><i>Thiếu sản vành tai cấp độ II:</i></p> <p>Chiều dài tai theo chiều dọc nhỏ hơn từ 2 SD so với mức trung bình và chỉ có một phần nhỏ cấu tạo của tai là bình thường</p>
<p><i>Loạn sản cấp độ III:</i></p> <p>Toàn bộ cấu trúc tai ngoài là bất thường, bao gồm: dị tật 1 bên, dị tật 2 bên, tai có hình hạt đậu và không có tai.</p>	<p><i>Thiếu sản vành tai cấp độ III:</i></p> <p>Biểu hiện với sự bất thường và khó xác định được các thành phần của tai ngoài.</p>
	<p><i>Anotia:</i></p> <p>Mất hoàn toàn tai</p>

1.3.3. Các yếu tố nguy cơ có thể dẫn đến thiếu sản vành tai

Quá trình phát triển tai ngoài được bắt đầu trong tuần thai thứ năm, phát triển từ lớp trung mô của khe mang thứ nhất và khe mang thứ hai, đồng thời được kiểm soát bởi các gen định hình hai khe mang này. Vành tai được hình thành từ các đôi tai hay còn gọi là đôi His (chỗ lồi lên trong hai khe mang, được hình thành trong tuần thai thứ sáu). Những đôi này bao quanh khe mang đầu tiên tạo thành không gian giữa hai khe mang và góp phần hình thành nên từng cấu trúc của vành tai bắt đầu từ khoảng tuần thai thứ 12. Các đôi tai phát triển, hợp nhất và trải qua quá trình phát sinh hình thái tạo ra một phần phễu, chuyển các rung động vào ống tai và dọc theo ống tai đến màng nhĩ. Quá trình này được diễn ra một cách chặt chẽ hình thành nên tai có chức năng với hình dạng vành tai gần như hoàn thiện ở tuần thai thứ 18, đạt 85% kích thước tai hoàn chỉnh cũng như sụn vành tai gần như hoàn chỉnh khi trẻ 5 tuổi, và tiếp tục phát triển đến hoàn chỉnh khi trẻ 9 tuổi [89]. Bất kỳ tác động nào dẫn đến các bất thường trong quá trình phát triển của tai trong giai đoạn phát triển phôi có thể là nguy cơ dẫn đến thiếu

sản vành tai. Các tác động này có thể là các tác nhân trong môi trường hoặc cũng có thể liên quan đến yếu tố di truyền.

1.3.3.1. Các yếu tố môi trường

Nguyên nhân dẫn đến thiếu sản vành tai ở hầu hết trẻ sơ sinh hiện vẫn chưa được làm rõ. Tuy nhiên, các nghiên cứu cũng chỉ ra các yếu tố nguy cơ có liên quan đến các trường hợp bệnh bao gồm trẻ sinh thiếu cân, thai phụ đã qua nhiều lần sinh nở hoặc mắc các bệnh cấp tính cũng như quá trình sử dụng thuốc không đúng trong thai kỳ và các yếu tố môi trường khác bao gồm thực phẩm sử dụng và môi trường tiếp xúc trong suốt thời kỳ mang thai [95].

Nguy cơ sinh con bị dị tật nói chung và thiếu sản vành tai nói riêng tăng lên ở những phụ nữ bị thiếu máu, mắc bệnh tiểu đường, sinh nhiều lần; ngoài ra, có thể liên quan đến yếu tố chủng tộc và tuổi sinh con ở cả bố và mẹ [99, 100]. Một nghiên cứu từ rất sớm ở Nhật vào năm 1996, phân tích các yếu tố nguy cơ trên 592 trẻ mắc thiếu sản vành tai đã báo cáo có 28% phụ huynh (mẹ của người bệnh) bị cảm lạnh trong quá trình mang thai, có tiền sử sảy thai tự nhiên hoặc bị thiếu máu [86]. Cũng trong thời gian này, một nghiên cứu khác ở khu vực Mỹ Latinh cũng đưa ra một số yếu tố nguy cơ liên quan đến các bệnh mắc phải ở mẹ trong tam cá nguyệt đầu tiên của thai kỳ [101]. Đặc biệt, những bà mẹ mắc tiểu đường loại I mãn tính có nguy cơ sinh con bị thiếu sản vành tai cao hơn đáng kể so với các trường hợp khác [84].

Một yếu tố nguy cơ khác làm tăng nguy cơ sinh con bị thiếu sản vành tai liên quan đến sử dụng thuốc trong thai kỳ. Một số bằng chứng về mối tương quan giữa thiếu sản vành tai phơi nhiễm với các chất gây dị tật thai bao gồm axit retinoic, thalidomide (một loại biệt dược giảm đau, an thần, hỗ trợ giấc ngủ), mycophenolate mofetil (một loại thuốc ức chế miễn dịch) đã được chỉ ra [102, 103]. Đặc biệt, có đến 83% trẻ mang các dị tật bẩm sinh nghiêm trọng bao gồm cả thiếu sản vành tai được sinh ra bởi các sản phụ có sử dụng isotretinoin (một dạng dẫn xuất của vitamin A, thường được sử dụng để điều trị mụn) trong thai kỳ [104, 105].

1.3.3.2. Yếu tố di truyền

Ngoài các yếu tố môi trường đã được chỉ ra từ những thập niên 90 của thế kỷ XX thì các bất thường trên gen cũng được xem là một yếu tố nguy cơ trong thiếu sản vành tai ở kỷ nguyên mới. Yếu tố di truyền trong thiếu sản vành tai được phản ánh trong các bằng chứng sau: (1) xảy ra ở trường hợp sinh đôi cùng trứng cao hơn trường

hợp sinh đôi khác trứng; (2) xảy ra ở các gia đình được báo cáo là di truyền lặn tự phát hoặc di truyền trội; (3) tỉ lệ xảy ra trong cùng một gia đình ước tính 3-34%; (4) các khiếm khuyết đơn gen hoặc sai cấu trúc nhiễm sắc thể được báo cáo trong hơn 18 hội chứng thiếu sản vành tai khác nhau; (5) các đột biến ở các gen cụ thể được xác định là nguyên nhân dẫn đến kiểu hình bệnh có đi kèm biểu hiện thiếu sản vành tai [106]. Việc áp dụng các chiến lược mới trong sinh học phát triển và di truyền học đã hỗ trợ làm sáng tỏ các cơ chế kiểm soát, phát triển liên quan đến sự hình thành đầu và mặt bao gồm cả quá trình hình thành tai [89]. Các nghiên cứu này chỉ ra nhiều khả năng di truyền Mendel xảy ra trong các trường hợp thiếu sản vành tai liên quan đến một hội chứng di truyền nào đó và có yếu tố gia đình (tiền sử gia đình); trong khi các nguyên nhân đa yếu tố (di truyền và môi trường) và đa gen cần được xem xét trong các trường hợp phát sinh mới (sporadic).

Mặc dù cho đến nay chưa có gen nào được khẳng định là nguyên nhân dẫn đến thiếu sản vành tai một cách độc lập, nhưng các gen gây ra các hội chứng có liên quan đến thiếu sản vành tai đã được chỉ ra (*Bảng 1.5*). Những gen này đã được mô tả trong các trường hợp thiếu sản vành tai mang thể 3 nhiễm sắc thể 18, 21, 22 cũng như thể 3 nhiễm sắc thể 13 (trisomy), dạng thể khảm ở nhiễm sắc thể 18 [107, 108] và đột biến mất đoạn ở vị trí 4p, 5p, 18p, 18q và 22q11.2 [89]. Ngoài ra, sự hoán vị nhiễm sắc thể bao gồm vùng 6p24 có liên quan đến trường hợp mắc thiếu sản vành tai cả hai bên (bilateral microtia) và hở hàm ếch (orofacial clefting) [109]. Vào năm 2003, sử dụng kỹ thuật lai CGH (comparative genomics hybridization), một mất đoạn dài 5 Mb (18q22.3-18q22.23) đã được xác định ở tất cả người bệnh mắc chứng anotia. Do đó, vùng này trên nhiễm sắc thể 18 được coi là vùng ứng viên để xác định trường hợp anotia [110]. Trong nghiên cứu phá hệ di truyền một gia đình năm thế hệ (56 thành viên) với 20 người có biểu hiện của thiếu sản vành tai đã xác định được một biến thể sai nghĩa trên exon 3 gen *GSC* có thể liên quan đến kiểu hình bệnh trong gia đình này [111]. Ngoài ra, các mức độ methyl hóa tương đối thấp của promoter gen *EYAI* quan sát thấy ở những người bệnh thiếu sản vành tai khi so với nhóm chứng cho thấy mức độ methyl hóa có thể liên quan đến quá trình phát sinh bệnh [112]. Một phân tích đột biến các gen *GSC*, *HOXA2*, và *PRKRA* trên 106 người bệnh thiếu sản vành tai bẩm sinh (Trung Quốc) mà không có bất kỳ dị tật kết hợp nào đã xác định được 2 biến thể mới trong vùng 5'UTR của gen *HOXA2* [113]. Trong năm tiếp theo, thông qua giải trình tự mục tiêu, các đột biến trên 307 gen gây điếc ở 32 người bệnh thiếu sản vành tai đã được sàng lọc. Nghiên cứu này nhấn mạnh các gen ứng viên, trong đó *COL4A4*

và *COL1A1* có thể là những gen ứng viên dẫn đến thiếu sản vành tai thông qua con đường kết dính tập trung (focal adhesion) và con đường tương tác thụ thể ECM (extracellular matrix – cấu trúc nền) [114].

Bảng 1.5. Các gen liên quan đến thiếu sản vành tai ở chuột và so sánh với kiểu hình tai ở người

	Gene [89]	Kiểu hình tai ở chuột	Kiểu hình tai ở người
1	<i>BMP5</i>	Tai ngoài nhỏ / OTN bình thường	nr
2	<i>CHUK (IKKA)</i>	Anotia	MIM: 613630- không có dị tật tai trong hai trường hợp có đột biến <i>IKKA</i>
3	<i>CYP26B1</i>	Tai ngoài nhỏ	nr
4	<i>DLX5/DLX6</i>	Không có tai ngoài Tai giữa bị ảnh hưởng nghiêm trọng	nr
5	<i>EDN1</i>	Tai ngoài rất nhỏ / không có OTN / Không có tai giữa	nr
6	<i>EDNRA</i>	Tai ngoài nhỏ	nr
7	<i>EYA1</i>	Anotia	<i>EYA1</i> : 30% với dị tật tai ngoài (bị gập / biến dạng)
8	<i>FGF8</i>	Tai ngoài nhỏ / Dị tật tai giữa	nr
9	<i>FGF10</i>	Tai ngoài nhỏ	nr
10	<i>FREM2</i>	Anotia	nr
11	<i>GSC</i>	Giảm nhẹ tai ngoài / Không có OTN / Dị tật tai trong	Thiếu sản vành tai độ II [111]
12	<i>HFM locus</i>	Tai ngoài nhỏ / Anotia / Không có OTN / Dị tật tai giữa	Không xác định được gen tương quan ở người
13	<i>HOXA1</i>	Tai ngoài nhỏ / Dị tật tai giữa và tai trong	Tai biến dạng (chỉ xuất hiện trong một số trường hợp)
14	<i>HOXA1/HOXB1</i>	Anotia	nr
15	<i>HOXA2</i>	“Anotia” (khó xác định các gờ lồi)	Thiếu sản vành tai độ I và II
16	<i>HOX2.2 (HOXB6)</i>	Tai ngoài nhỏ	nr
17	<i>IRF6</i>	Anotia	nr
18	<i>PAX8</i>	Dị tật tai / Tai ngoài nhỏ / OTN hẹp / Dị tật tai giữa và tai trong	nr
19	<i>PRRX1/PRRX2 (PMX1)</i>	Tai ngoài nhỏ / Dị tật tai giữa và tai trong	nr
20	<i>PRKRA</i>	Tai ngoài nhỏ / Dị tật tai giữa	nr
21	<i>RAR</i>	Tai ngoài nhỏ / Anotia	nr
22	<i>SALL1</i>	Không bị ảnh hưởng	Thiếu sản vành tai độ I-II / Thịt thừa trước tai
23	<i>SIX1/SIX4</i>	Anotia	nr
24	<i>TBX1</i>	Tai ngoài nhỏ / Anotia / Dị tật tai giữa và tai trong	Thiếu sản vành tai độ I (không phổ biến)
25	<i>TCFAP2A</i>	Anotia	nr
26	<i>TCOF1</i>	Tai hình chén / Dị tật tai giữa	Thiếu sản vành tai và teo ống tai.
27	<i>WNT5A</i>	Tai ngoài rất nhỏ / không có OTN / không có tai giữa	nr

Các con đường tín hiệu liên quan đến quá trình phát triển tai ngoài cũng được chỉ ra bao gồm nhóm các yếu tố tăng trưởng là các protein hình thái xương (Bmps), các con đường tín hiệu Wingless/INT (Wnts), các yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (Fgfs) và các axit retinoic. Rối loạn điều hòa các con đường tín hiệu này có thể được kích hoạt bởi yếu tố di truyền hoặc các yếu tố môi trường, tiềm ẩn các tác động có hại đến sự phát triển của tế bào, gây rối loạn phát triển tai ngoài [115].

1.3.4. Điều trị và chăm sóc người bệnh thiếu sản vành tai

Vì thiếu sản vành tai được xác định khi không có ống tai ngoài, trẻ bị thiếu sản vành tai có thể bị mất thính lực một phần hoặc toàn bộ ở tai bị ảnh hưởng, do đó ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống. Nếu những đứa trẻ mắc bệnh ở cả hai tai, chúng có thể gặp khó khăn khi học nói và mặc cảm về tình trạng của mình khi chúng lớn lên. Do đó, mục tiêu điều trị thiếu sản vành tai hiện nay là tạo hình dạng tốt nhất cũng như cải thiện chức năng của tai kém phát triển. Hiện có 2 lựa chọn phổ biến để tạo hình tai cho trẻ là sử dụng tai silicone nhân tạo hoặc phẫu thuật tái tạo lại hình dạng cũng như cấu trúc tai (sử dụng sụn sụn tự thân hoặc vật liệu nhân tạo như Medpor, Omnipor) [116]. Ngoài ra, sử dụng công nghệ mô trong nuôi cấy, tái tạo tai và các mô sụn đã có những bước tiến tiềm năng và đầy hứa hẹn với mục tiêu tạo ra các mô có kích thước khác nhau phù hợp với các đặc tính cấu trúc, sinh hóa cũng như cơ học của sụn tai một cách tự nhiên [117, 118]. Với sự trợ giúp của máy tính (CAD/CAM), khuôn sinh học được dựng lên dựa theo hình dáng của tai lành đặc trưng cho từng người bệnh; sau đó tiến hành nuôi cấy mô trong khuôn để tạo thành tai hoàn chỉnh [117-121]. Trong năm 2018, Guangdong và cộng sự đã báo cáo thực hiện thành công công nghệ này trên 5 trường hợp bệnh nhi mắc dị tật tai nhỏ người Trung Quốc [119], từ đó báo hiệu một bước tiến mới trong thực hành lâm sàng tạo hình dạng tai.

1.4 Công nghệ giải trình tự thế hệ mới trong nghiên cứu bệnh hiếm

Kể từ khi công nghệ giải trình tự thế hệ mới xuất hiện, số lượng gen liên quan đến các bệnh di truyền liên tục được xác định và tăng theo cấp số nhân trong tất cả các lĩnh vực y học. Trong 10 năm (từ 2007 đến 2017), số lượng gen gây bệnh mới được báo cáo trên cơ sở dữ liệu OMIM tăng từ 2049 gen lên 4978 gen [122]. Sự bùng nổ dữ liệu này là do NGS có thể được sử dụng để giải trình tự bất kỳ vùng nào trong hệ gen của con người một cách nhanh chóng và chính xác. Tùy loại hình NGS mà có thể tiếp

cận dữ liệu của một tập hợp gen hay toàn bộ hệ gen. Lượng dữ liệu lớn được trích xuất từ phân tích NGS đã mang đến nhiều cơ hội để giải quyết các câu hỏi nghiên cứu mới cũng như truyền tải các kiến thức, thông tin mới hỗ trợ cho thực hành lâm sàng. Các chương trình như “Chăm sóc bệnh hiếm”, “Giải mã các rối loạn phát triển”, “Dịch vụ chẩn đoán bệnh hiếm và bệnh chưa rõ nguyên nhân” và “Mạng lưới bệnh chưa rõ nguyên nhân” đã chứng minh NGS giúp chẩn đoán sớm và chính xác, từ đó giảm thiểu chi phí, do tập trung điều trị đích thay vì điều trị dần trải tốn kém trước đây khi chưa xác định được nguyên nhân gây bệnh [123-125]. Ngoài ra, các xét nghiệm xâm lấn không cần thiết cũng như tác động tiêu cực đến sức khỏe tinh thần của người bệnh cũng được giảm tải. Chỉ trong vài tuần hoặc thậm chí ít hơn, các phân tích dựa trên NGS có thể đưa ra kết quả về các biến thể hay các gen có liên quan, giúp thiết lập chẩn đoán nhanh trong một cơ sở các trường hợp. Do đó, không có gì ngạc nhiên khi các hệ thống chăm sóc sức khỏe tốt nhất trên thế giới hiện nay sử dụng những công cụ mạnh mẽ này như một phần của quy trình chẩn đoán thông thường. Trong nghiên cứu bệnh hiếm, ba công nghệ NGS chủ yếu được sử dụng bao gồm: Gene Panel, Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa (WES) và Giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) [122].

Với chiến lược xác định gen gây bệnh mục tiêu, bao gồm cả các gen đã biết hoặc chưa biết liên quan đến kiểu hình bệnh thì hai cách tiếp cận chính thường được sử dụng là WES và WGS. Quá trình được tiến hành bằng việc (1) phân tích nhóm người bệnh có cùng đặc điểm lâm sàng và tiến hành sàng lọc các biến thể liên quan cũng như gây bệnh tiềm năng, kết hợp (2) sàng lọc các biến thể nguy cơ này trên cha mẹ và/hoặc các thành viên gia đình khác, từ đó xác định phương thức di truyền phù hợp để khu trú lại đâu là biến thể gây bệnh mục tiêu [122]. Trong đó, WES gần như thống trị thị trường nghiên cứu bệnh hiếm trong những năm gần đây. Nhiều bệnh chưa rõ nguyên nhân đã được xác định thông qua WES [126] với hiệu quả phân tích không chênh lệch nhiều so với WGS mà chi phí lại giảm cũng như tiết kiệm thời gian hơn do chỉ tập trung vào vùng trình tự mã hóa - vùng chỉ chiếm khoảng 1% (~30 Mb) kích thước bộ gen nhưng có chứa đến 85% các biến thể gây bệnh [126]. Tuy nhiên, WES lại rất hạn chế trong việc phát hiện các biến thể cấu trúc, các mất đoạn/lặp đoạn lớn trong hệ gen [122]. Trong trường hợp này có thể sử dụng WGS để tăng khả năng phát hiện các biến thể gây bệnh mục tiêu nằm trong các vùng trình tự mà WES không thể tiếp cận được. Ngoài ra, sử dụng Gene Panel có thể tăng khả năng phát hiện biến thể

liên quan đến số lượng bản sao (CNV) và các đột biến khảm soma hơn so với WES do chỉ cần tập trung vào các nhóm gen đã biết (độ bao phủ sẽ cao hơn) nhưng lại có một hạn chế là không có khả năng xác định các gen gây bệnh mới và chi phí thực hiện đôi khi lớn hơn so với WES [122]. Do đó, việc lựa chọn loại hình NGS phù hợp để sử dụng trong nghiên cứu bệnh hiếm tùy thuộc vào mục tiêu cũng như giới hạn kinh phí cho phép.

1.5 Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu hay thống kê chính thức nào liên quan đến tỉ lệ mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai. Tuy nhiên, theo Bệnh viện Tai mũi họng Trung Ương, mỗi năm bệnh viện tiếp nhận khoảng 20-30 ca mang các khiếm khuyết vành tai mô lần đầu bên cạnh rất nhiều các trường hợp mô tạo hình vành tai ở thì 2, thì 3. Cũng giống như các bệnh hiếm khác, điều trị lâm sàng hiện nay chủ yếu là điều trị các triệu chứng, giúp cải thiện chất lượng cuộc sống cho người bệnh. Bệnh viện Nhi Đồng Thành phố Hồ Chí Minh và Bệnh viện Nhi Trung Ương đã tổng hợp và soạn thảo một tài liệu riêng hướng dẫn chăm sóc người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước. Trong năm 2018, một Hội thảo chuyên đề về bệnh lý “Ly thượng bì bóng nước di truyền” thuộc chương trình hợp tác với tổ chức Fondation Urgo – Pháp đã được tổ chức tại Bệnh viện Nhi Đồng 1, Thành phố Hồ Chí Minh. Tại hội thảo, ThS. BS Nguyễn Thị Thanh Hương – Phó khoa Sơ sinh đã trình bày các trường hợp ly thượng bì bóng nước đã điều trị thành công tại Bệnh viện Nhi Đồng 1. Đồng thời BS Nguyễn Thị Ngọc Trắng – Khoa Sơ sinh cũng trình bày về các bước chăm sóc vết thương ở trẻ mắc EB, từ cách làm sạch vết thương, xử trí bóng nước, loại bỏ tế bào chết, xử lý nhiễm trùng và cách băng vết thương (<http://nhidong.org.vn>). Trong chăm sóc bạch tạng, người bệnh được khuyến cáo tránh tiếp xúc với ánh sáng mặt trời, sử dụng kem chống nắng và kính màu, kính điều chỉnh thị lực; đối với các trường hợp bị rung giật nhãn cầu có thể can thiệp bằng phương thức phẫu thuật, tuy nhiên không giúp cải thiện thị lực. Đối với người bệnh thiếu sản vành tai, phẫu thuật tạo hình vành tai mới sử dụng sụn sườn tự thân hầu hết được thực hiện tại Bệnh viện Tai mũi họng Trung ương (NOH). Nếu trẻ có tai giữa và tai trong thì việc tạo hình ống tai từ giai đoạn sớm sẽ giúp trẻ nghe nói được bình thường. Trong đợt phẫu thuật từ thiện tại NOH diễn ra từ ngày 4/11 đến 10/11/2018, đoàn chuyên gia đến từ tổ chức

Face to Face (Mỹ) đã tiến hành phẫu thuật cho 55 trường hợp bị khuyết tật vành tai, trong đó có 20 người bệnh mổ lần đầu và 35 người bệnh được tiếp tục thực hiện các lượt mổ tiếp theo trong chuỗi phẫu thuật tạo hình vành tai. Ngoài Bệnh viện Tai mũi họng Trung Ương thì tính đến năm 2017, Khoa Tạo hình hàm - mặt - thẩm mỹ Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức cũng đã thực hiện được hơn 50 ca tạo hình vành tai với kết quả khả quan.

Mặc dù đây là những căn bệnh hiếm gặp và chưa có cách chữa trị nhưng đang ngày càng được các nhà nghiên cứu và các bác sĩ y khoa quan tâm với mong muốn mang lại một tương lai tươi sáng hơn cho người bệnh và gia đình. Tuy nhiên, cho đến thời điểm năm 2018, chưa có một nghiên cứu di truyền chuyên sâu nào được tiến hành trên các đối tượng mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai ở Việt Nam. Các nghiên cứu chủ yếu báo cáo về các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và biến chứng của bệnh, cụ thể là ở các bệnh nhi mắc ly thượng bì bóng nước được thăm khám và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Da liễu Trung ương trong giai đoạn 2007-2011 [127, 128]. Nghiên cứu của chúng tôi tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, được bắt đầu thực hiện vào năm 2019 có thể được xem là một trong những nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam, đi sâu phát hiện, đánh giá các biến thể là nguyên nhân gây bệnh/có thể gây bệnh ở các nhóm người bệnh ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và/hoặc thiếu sản vành tai. Kết quả nghiên cứu của 2/3 bệnh đã được công bố trên các tạp chí Quốc tế uy tín vào năm 2021 và 2022. Ngoài ra, vào cuối năm 2022, PGS.TS Nguyễn Thùy Dương và cộng sự cũng đã báo cáo hai trường hợp bệnh nhi trong một gia đình, cùng mắc ly thượng bì bóng nước thể nặng với biến thể đồng hợp tử gen *COL7A1* được xác định [129].

Dựa trên các thông tin được cung cấp trong nghiên cứu này, có thể hình dung ra được tầm quan trọng của chẩn đoán phân tử trong việc xác định chính xác nguyên nhân dẫn đến bệnh ở những người bệnh ly thượng bì bóng nước và bạch tạng cũng như yếu tố nguy cơ trong thiếu sản vành tai. Thông qua các chẩn đoán di truyền ở mức độ phân tử, các thông tin di truyền hữu ích có thể được cung cấp làm cơ sở khoa học phục vụ trong chẩn đoán, điều trị, tiên lượng tiến triển bệnh trong tương lai cũng như tư vấn di truyền phù hợp.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tám người bệnh ly thượng bì bóng nước, bảy người bệnh bạch tạng và 11 người bệnh thiếu sản vành tai được thăm khám, chẩn đoán và kết luận bởi các bác sĩ tại Đại học Y Hà Nội và Học viện Quân y. Mẫu máu ngoại vi của người bệnh cùng các thành viên gia đình (ngoại trừ thành viên gia đình bệnh nhân bạch tạng lớn tuổi A1005) được tiến hành thu thập để phục vụ nghiên cứu. Riêng nhóm thiếu sản vành tai không thu được mẫu thành viên gia đình. Danh sách người bệnh cùng các thành viên gia đình tham gia nghiên cứu được liệt kê chi tiết trong *Phụ lục 1* (trạng -1-, Phụ lục).

2.2.1. Bệnh ly thượng bì bóng nước

2.2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

Tất cả người bệnh có đủ các tiêu chuẩn sau đây sẽ được lựa chọn để đưa vào nghiên cứu:

- Xuất hiện các mụn nước, bóng nước, hạt sừng trên da (có thể nhẹ/nặng) sau những sang chấn nhẹ trên da và niêm mạc, ở những vị trí tỷ lệ dễ bị cọ sát như bàn tay, bàn chân, khuỷu tay, đầu gối, mông, v.v. và có thể lan ra khắp cơ thể.

- Người bệnh hoặc người bảo hộ đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Loại trừ các bệnh: bệnh chàm pompholyx, bệnh tự miễn, rối loạn chuyển hoá porphyria, bệnh vẩy cá, bệnh dày sừng lòng bàn tay bàn chân, hội chứng ehler-danlos, bệnh nhiễm sắc tố dầm dề, hội chứng da đốm và bệnh tế bào mast... Tiêu chuẩn loại trừ liên quan lâm sàng tuân theo hướng dẫn tổng hợp bởi Bardhan và cộng sự [1].

Hồ sơ nghiên cứu của người bệnh không đầy đủ.

Người bệnh hoặc người bảo hộ không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2.1.3. Phân loại ly thượng bì bóng nước theo lâm sàng

Phân loại theo lâm sàng được dựa trên các tiêu chuẩn được tổng hợp bởi Bardhan và cộng sự [1]; đồng thời tham khảo tài liệu “Hướng dẫn chẩn đoán và điều

trị các bệnh da liễu” ban hành bởi Bộ Y tế theo Quyết định số 75/QĐ-BYT ngày 13/01/2015 [130]. Các đặc điểm đặc trưng cho một số phân nhóm/tiểu phân nhóm EB chính được liệt kê chi tiết trong *Phụ lục 2* (trang -5-, Phụ lục)

Do các đặc điểm lâm sàng đôi khi trộn lẫn giữa các phân nhóm nên rất khó để có thể chẩn đoán xác định một cách chính xác nếu chỉ dựa trên các dấu hiệu lâm sàng. Tuy nhiên, một số trường hợp vẫn có thể xác định được chẳng hạn như biểu hiện co rút ngón, dính ngón tay, ngón chân tạo thành bọc là đặc điểm nhận diện đặc trưng của phân nhóm RDEB thể nặng.

2.2.2. Bệnh bạch tạng

2.2.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

Người bệnh có biểu hiện suy giảm sắc tố ở da, tóc và/hoặc mắt đi kèm với thính lực bình thường (để loại trừ các hội chứng/rối loạn không liên quan cũng có biểu hiện suy giảm sắc tố).

Người bệnh hoặc người bảo hộ đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2.2.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Chẩn đoán loại trừ với các hội chứng/rối loạn khác trùng lặp về một số đặc điểm lâm sàng đặc trưng:

- Các hội chứng có bao gồm suy giảm sắc tố: hội chứng Vici, hội chứng Waardenburg loại II và hội chứng Tietz.

- Các hội chứng/rối loạn có biểu hiện bất thường ở mắt (biểu hiện sớm của rung giật nhãn cầu): teo/thiếu sản dây thần kinh thị giác, loạn dưỡng võng mạc di truyền, hội chứng rung giật nhãn cầu bẩm sinh ở trẻ sơ sinh, dị tật móng mắt và chứng mù màu (Achromatopsia).

Hồ sơ nghiên cứu của người bệnh không đầy đủ.

Người bệnh hoặc người bảo hộ không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2.2.3. Phân loại bạch tạng theo lâm sàng

Phân loại theo lâm sàng được thực hiện dựa trên tiêu chuẩn được tổng hợp bởi Federico và Krishnamurthy [55]. Các đặc điểm đặc trưng của các phân nhóm bạch tạng được liệt kê chi tiết trong *Phụ lục 3* (trang -8-, Phụ lục)

2.2.3. Bệnh thiếu sản vành tai

2.2.3.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

Người bệnh được chẩn đoán dị tật tai nhỏ/thiếu sản vành tai bẩm sinh và đã được phân mức dị tật theo phân loại Marx (từ cấp độ I đến IV):

- Độ I: các cấu trúc chi tiết trên vành tai đầy đủ nhưng tai nhỏ hơn, dị tật ở các mức độ khác nhau, cùng với mức độ tai cup, tật, hẹp ống tai ngoài khác nhau.

- Độ II: chỉ một số cấu trúc tai ngoài là bình thường, đỉnh tai không phát triển, thường đi kèm với tật ống tai ngoài.

- Độ III: chỉ còn lại vết tích nhỏ của tai, điển hình có hình dáng “hạt đậu” hoặc “xúc xích” đồng thời không có vành tai, bất thường vị trí da tai, không có ống tai ngoài.

- Độ IV: Không có vành tai.

Có thông tin tiền sử gia đình (*Phụ lục 4, trang -10-*).

Người bệnh hoặc người bảo hộ đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2.3.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Hồ sơ nghiên cứu của người bệnh không đầy đủ.

Người bệnh hoặc người bảo hộ không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được thông qua bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam theo Quyết định số 2-2019/NCHG-HĐĐĐ ngày 02 tháng 04 năm 2019. Bên cạnh đó, trước khi tiến hành thu mẫu máu, mục đích nghiên cứu đã được giải thích rõ ràng, người bệnh (hoặc người bảo hộ) cũng đã xác nhận vào đơn tình nguyện tham gia nghiên cứu.

2.3. Thời gian, địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ 09/2019 đến 09/2022 tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam.

2.4. Hóa chất, trang thiết bị và dụng cụ

Các hóa chất, máy móc và thiết bị phục vụ cho nghiên cứu này thuộc Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các hóa chất sử dụng chính trong nghiên cứu bao gồm: bộ sinh phẩm *ExgeneTM Blood SV mini Kit* (GeneAll-Hàn Quốc) sử dụng để tách chiết DNA tổng số; xác định nồng độ DNA/thư viện DNA thông qua *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies-Mỹ); sử dụng *Sure Select V6-Post* (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Mỹ) để chuẩn bị thư viện cho giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa (WES); sử dụng *DNA 1000 chip* (Agilent Technologies, Mỹ) và *Agilent qPCR NGS Library Quantification Kit* (Agilent, Mỹ) để đánh giá chất lượng, kích thước của thư viện DNA; sử dụng *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Mỹ) trong giải trình tự trực tiếp; sử dụng *Monarch® Total RNA Miniprep Kit* (New England Biolab, Mỹ) để tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA được thực hiện nhờ sử dụng bộ *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit* (New England Biolab, Mỹ).

Các thiết bị sử dụng chính bao gồm: máy giải trình tự thế hệ mới NextSeq 500 (Illumina, Mỹ), hệ thống máy tính hiệu năng cao HPC sử dụng trong phân tích dữ liệu WES, máy điện di tự động 2100 Bioanalyzer (Agilent, Mỹ); máy real-time PCR Light Cycle 96 (Roche, Thụy Sĩ) máy giải trình tự gen ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), cân kỹ thuật (Ohaus, Mỹ), tủ mát có ngăn đông (Electrolux, Thụy Điển), máy ly tâm (Eppendorf, Đức) và máy ly tâm lạnh đa năng (5810R-Đức); máy PCR Mastercycler pro S (Đức); máy điện di (Bio-Rad); máy soi gel và chụp ảnh tự động DigiDoc-It® Imaging System của Ultra-violet production (Mỹ); máy cô quay chân không-SpeedVac (Eppendorf, Đức), máy đo quang phổ (UV-Vis BioSpectrometer Basic, Đức); máy đo huỳnh quang Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)... ;

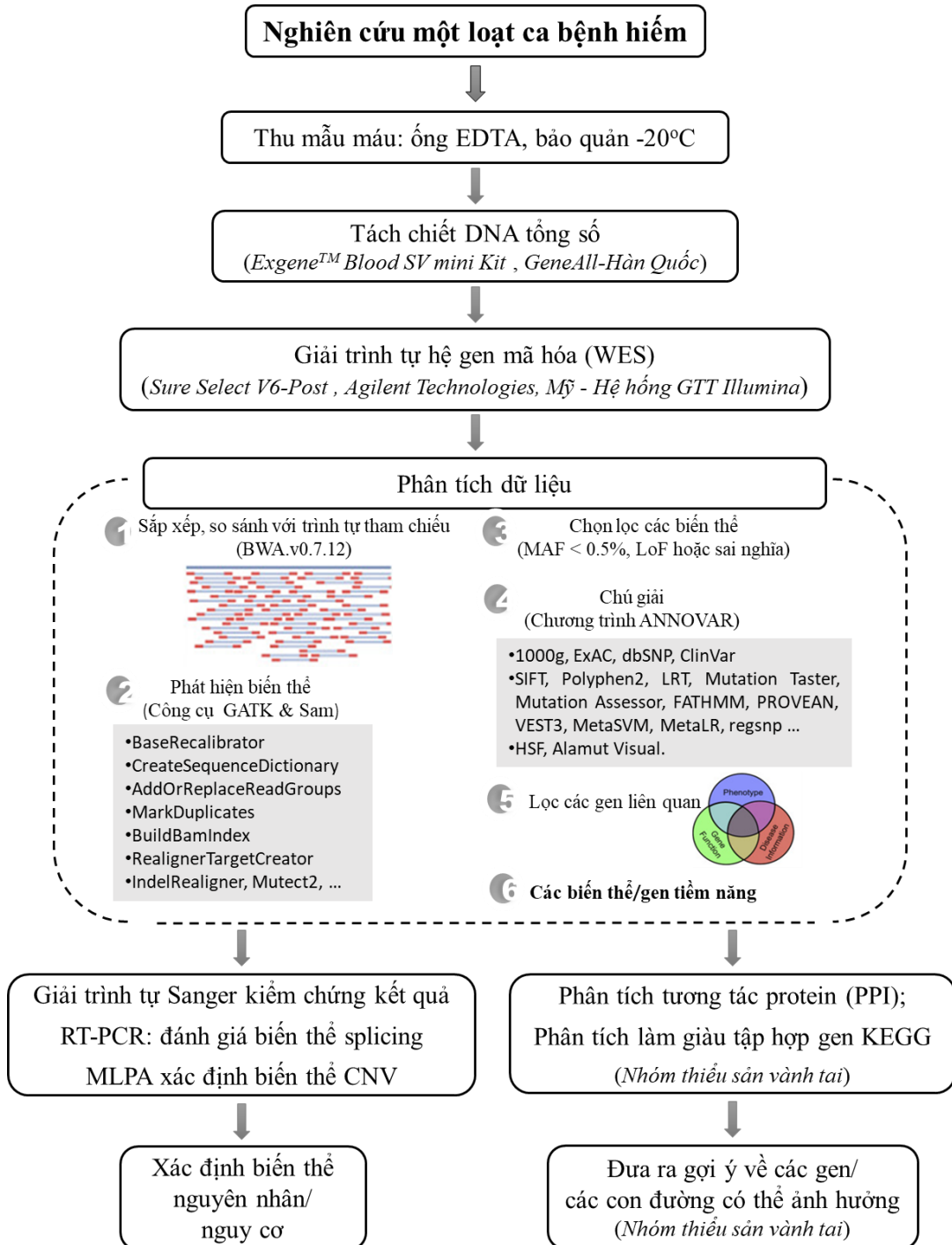
Các dụng cụ thí nghiệm được sử dụng bao gồm: ống chứa máu EDTA-K2 (Việt Nam), micropipette đơn kênh và đa kênh (Eppendorf, Đức), stepper pipette (Eppendorf, Đức), combitips dùng cho stepper pipette (Eppendorf, Đức), ống eppendorf đựng mẫu thể tích 1,5 ml (Corning, Mỹ), ống ly tâm falcon thể tích 15 ml-50 ml (Biologix, Mỹ), ống PCR 0,2 ml (QSP), ống sử dụng để phân mảnh DNA Covaris microTUBE (Covaris, Mỹ); đĩa chạy PCR 96 giếng (Biologix-Mỹ), đĩa chạy real-time

PCR 96 giếng (Roche, Thụy Sĩ), đĩa giải trình tự 96 giếng (ABI-Mỹ), đĩa tinh sạch sản phẩm PCR 96 giếng (Merck-Milipore, Mỹ).

2.5. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu:

Nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp một loạt ca bệnh hiếm. Sơ đồ chi tiết quá trình thực hiện nghiên cứu được tóm tắt trong *Hình 2.1* dưới đây.



Hình 2.1. Sơ đồ minh họa các bước thực hiện nghiên cứu

2.5.1. Chuẩn bị DNA tổng số

2.5.1.1. Tách chiết DNA tổng số

Mẫu máu ngoại vi (2 ml mỗi cá thể) được thu vào ống chứa máu EDTA K2 và lưu giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng. Các mẫu sau khi tiếp nhận đã được mã hóa sau đó tách chiết DNA tổng số bằng *ExgeneTM Blood SV mini Kit* (GeneAll-Hàn Quốc) tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau khi tách chiết được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0.8%, đo nồng độ sử dụng máy đo quang phổ và sau đó được lưu trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.5.1.2. Đo nồng độ DNA bằng Qubit dsDNA HS Assay Kit

DNA tổng số tách từ mẫu máu được đem kiểm tra nồng độ DNA sợi kép (dsDNA) sử dụng bộ *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies-Mỹ) tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5.2. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa

Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa (WES) được thực hiện trên 8 người bệnh ly thượng bì bóng nước, 7 người bệnh bạch tạng và 11 người bệnh thiếu sản vành tai. Thư viện DNA được thiết lập sử dụng bộ *Sure Select V6-Post* (Agilent Technologies, Mỹ) với quy trình được thực hiện lần lượt như sau:

2.5.2.1. Chuẩn bị mẫu

Phân mảnh DNA và gắn adapter

DNA tổng số được phân mảnh sử dụng enzyme giới hạn, tiếp sau đó là quá trình gắn adapter vào các mảnh DNA. Cả quá trình này được thực hiện sử dụng bộ *SureSelect^{QXT} Reagent Kit* tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tinh sạch các mảnh DNA đã gắn adapter

Trước khi bắt đầu tiến hành quá trình tinh sạch, các hạt từ *AMPure XP* được bỏ ra ngoài nhiệt độ phòng trước ít nhất 30 phút và luôn giữ ở nhiệt độ này trong suốt quá trình thao tác thí nghiệm. Ngoài ra cần chuẩn bị thêm ethanol 70%. Các bước tinh sạch được tiến hành ngay sau quá trình phân mảnh DNA trước đó và được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm sau khi tinh sạch (~10 µl) được giữ trên đá cho đến khi thực hiện các bước thí nghiệm tiếp theo.

Khuếch đại các mảnh DNA đã được gắn adapter và tinh sạch sản phẩm PCR

Hỗn hợp 40 μ l phản ứng PCR chưa bao gồm mẫu được chuẩn bị bao gồm 10 μ l *Herculase II 5 \times Reaction Buffer*, 0,5 μ l *100 mM dNTP Mix* (25 mM each dNTP), 2,5 μ l DMSO, 1 μ l *SureSelect QXT Primer Mix*, 1 μ l *Herculase II Fusion DNA Polymerase* và 25 μ l nước khử ion. Tất cả các hóa chất sau khi rã đông được giữ trên đá, ngoại trừ DMSO. Sau đó, bổ sung 40 μ l hỗn hợp này vào 10 μ l thư viện DNA đã được gắn adapter, trộn đều toàn bộ dung dịch, ly tâm nhanh chóng và thực hiện chu trình nhiệt trên máy PCR: 68°C – 2 phút; 98°C – 2 phút; 8 chu kỳ (98°C – 30 giây, 57°C – 30 giây, 72°C – 1 phút); 72°C – 5 phút; 4°C - ∞ .

Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch sử dụng các hạt từ *AMPure XP* (đã được đưa ra ngoài nhiệt độ phòng trước ít nhất 30 phút) và cồn 70% theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch (~13 μ l) được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Định lượng và đánh giá chất lượng của thư viện DNA

Chất lượng của thư viện DNA được đánh giá thông qua hệ thống điện di tự động *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer* sử dụng *DNA 1000 chip* (Agilent Technologies, Mỹ) với kích thước nằm trong khoảng từ 245 bp đến 325 bp. Các bước thực hiện tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5.2.2. Quá trình lai và thu giữ các đầu dò

Quá trình lai

Quá trình lai được thực hiện sử dụng *SureSelect^{QXT} Reagent Kit* tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tổng thể tích lai là 17 μ l bao gồm 5 μ l *SureSelect QXT Fast Blocker Mix* và 12 μ l thư viện DNA đã được khuếch đại và tinh sạch. Tiếp đó, phản ứng PCR được tiến hành với chu trình nhiệt: 95°C – 5 phút; 65°C – 10 phút; 65°C – 1 phút (tạm dừng ở đây); 60 chu kỳ (65°C – 1 phút, 37°C – 3 giây); 65°C – ∞ .

Sau khi kết thúc chu trình nhiệt thứ 3 của phản ứng lai và máy đang giữ ở chế độ tạm dừng, tiến hành bổ sung 13 μ l hỗn hợp *Capture Library Hybridization Mix* (bao gồm 2 μ l *RNase Block solution 25%*, 3 μ l đầu dò và 6 μ l *SureSelect Fast Hybridization Buffer*) vào mỗi ống mẫu và trộn đều bằng pipet từ 8 đến 10 lần. Tiếp

tục trộn hỗn hợp bằng máy voltex ở tốc độ cao trong 5 giây, ly tâm nhanh chóng và đặt lại vào máy PCR, tiếp tục thực hiện các chu trình nhiệt còn lại đã được cài đặt.

Thu giữ đầu dò

Trước khi tiến hành thu giữ đầu dò, cần chuẩn bị các hạt từ được bao bởi streptavidin sử dụng các hóa chất trong *SureSelect^{QXT} Reagent Kit* và *Dynabeads MyOne Streptavidin T1*. Các bước thực hiện tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm của quá trình thu giữ đầu dò (23 μ l dung dịch) được giữ trên đá cho đến khi thực hiện phản ứng PCR tiếp theo.

2.5.2.3. Chuẩn bị thư viện cho giải trình tự

PCR khuếch đại thư viện đã được gắn và thu giữ đầu dò với cặp mồi gắn chỉ mục (indexing primers)

Chọn các mồi chỉ mục phù hợp cho từng mẫu theo hướng dẫn (tham khảo hướng dẫn chi tiết của kit với mã số G9681-90000). Hỗn hợp hóa chất cho phản ứng PCR được chuẩn bị với tổng thể tích 25 μ l bao gồm: 10 μ l *Herculase II 5 \times Reaction Buffer*, 0,5 μ l *100 mM dNTP Mix*, 1 μ l *Herculase II Fusion DNA Polymerase* và 13,5 μ l nước khử ion. Bổ sung 25 μ l hỗn hợp hóa chất PCR vừa chuẩn bị vào 23 μ l mẫu thu được từ quá trình lai và thu giữ đầu dò. Bổ sung 1 μ l *P7 dual indexing primer* (P7 i1 đến P7 i12) vào hỗn hợp phản ứng PCR trên. Chú ý, mỗi phản ứng chỉ bổ sung duy nhất một mồi chỉ mục trong số 12 chỉ mục P7. Tiếp đó, bổ sung 1 μ l *P5 dual indexing primer* (P5 i13 đến P7 i20) vào hỗn hợp phản ứng PCR trên. Chú ý, mỗi phản ứng chỉ bổ sung duy nhất một mồi chỉ mục trong số 8 chỉ mục P5. Trộn đều hỗn hợp phản ứng bằng pipet và thực hiện chu trình nhiệt trên máy PCR đã được cài đặt: 98°C – 2 phút; 12 chu kỳ (98°C – 30 giây, 58°C – 30 giây, 72°C – 1 phút); 72°C – 5 phút; 4°C – ∞ .

Sau khi quá trình PCR kết thúc, ly tâm nhanh sản phẩm và đặt lên giá từ ở nhiệt độ phòng để loại bỏ các hạt từ. Đợi khoảng 2 phút để dung dịch trở nên trong suốt, sau đó hút toàn bộ dịch sang ống mới (~ 50 μ l).

Tinh sạch sản phẩm PCR

Trước khi bắt đầu tiến hành quá trình tinh sạch, các hạt từ *AMPure XP* được bỏ ra ngoài nhiệt độ phòng trước ít nhất 30 phút và luôn giữ ở nhiệt độ này trong suốt quá trình thao tác thí nghiệm. Ngoài ra cần chuẩn bị thêm 400 μ l cồn 70% cho mỗi mẫu.

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch (~25 µl) được bảo quản ở -20°C nếu không tiếp tục thực hiện luôn các bước thí nghiệm tiếp theo.

Định lượng và đánh giá chất lượng của thư viện DNA

Chất lượng, kích thước của thư viện DNA được đánh giá thông qua hệ thống điện di tự động *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer* sử dụng *DNA 1000 chip* (Agilent Technologies, Mỹ) với kích thước nằm trong khoảng từ 325 đến 450 bp. Các bước thực hiện tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ngoài ra, thư viện DNA được định lượng thông qua qPCR sử dụng bộ *Agilent QPCR NGS Library Quantification Kit* tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kết quả của qPCR được tiến hành phân tích thông qua các bước sau: (1) Tạo đường chuẩn dựa trên dải nồng độ pha loãng của DNA chuẩn; (2) Đảm bảo rằng đường chuẩn có giá trị $R^2 > 0,98$ và $E = 90-110\%$; (3) Sử dụng đường chuẩn để tính Ct cho từng mẫu thư viện và (4) Tính nồng độ trung bình (nM) cho mỗi mẫu thư viện. Nếu cả 2 giá trị Ct ở 2 điều kiện pha loãng đều nằm trong đường chuẩn thì lấy giá trị trung bình. Nếu chỉ có 1 giá trị Ct của 1 điều kiện pha loãng nằm trên đường chuẩn thì sẽ sử dụng nồng độ tương ứng với giá trị Ct đó. Nếu kích thước của thư viện khác xa (>310 bp hoặc <260 bp) so với kích thước của DNA chuẩn (288 bp) thì cần điều chỉnh lại nồng độ của thư viện tính toán được ở bước (4) sử dụng công thức sau:

$$\text{Nồng độ điều chỉnh} = \text{Nồng độ thực tế} \times (288 \text{ bp} / \text{kích thước trung bình của thư viện})$$

Tạo mẫu gộp và chuẩn bị mẫu cho giải trình tự

Sử dụng công thức sau để tính thể tích mẫu thư viện tùy thuộc số lượng mẫu gộp:

$$\text{Thể tích mẫu sử dụng} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

Trong đó:

$V(f)$: thể tích cuối cùng của mẫu gộp,

$C(f)$: nồng độ giống nhau của tất cả các mẫu thư viện trong mẫu gộp,

$\#$: số lượng thư viện (index) trong mẫu gộp

$C(i)$: nồng độ của từng mẫu thư viện.

Sau khi đã tính toán xong thể tích sử dụng của từng mẫu thư viện, nếu tổng thể tích của các mẫu thư viện nhỏ hơn $V(f)$ thì bổ sung thêm TE vào phần thể tích còn thiếu. Ngược lại, trong trường hợp tổng thể tích các mẫu thư viện lớn hơn $V(f)$ thì cần làm khô hay cô đặc lại hỗn hợp về đúng thể tích mong muốn.

Để chuẩn bị mẫu giải trình tự, bộ môi *SureSelect^{QXT} Primer* bao gồm *SureSelect QXT Read Primer 1*, *SureSelect QXT Read Primer 2*, *SureSelect QXT Index 1 Read Primer* và *SureSelect QXT Index 2 Read Primer* được sử dụng với thể tích và vị trí trên hộp tra mẫu giải trình tự được thể hiện chi tiết trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Chuẩn bị môi giải trình tự phù hợp với hệ thống giải trình tự NGS của Illumina với S4 flowcell phiên bản v1.5

Chiều đọc	Thể tích môi <i>SureSelect^{QXT}</i>	Thể tích môi Illumina	Tổng thể tích	Vị trí trên hộp tra mẫu giải trình tự
Read 1	21,9 μ l <i>SureSelect QXT Read Primer 1</i>	7278,1 μ l BP10 (giếng 24)	7,3 ml	5
Index 1+ Index 2	15 μ l <i>SureSelect QXT Index 1 Read Primer</i> + 15 μ l <i>SureSelect QXT Index 2 Read Primer</i>	4970 μ l VP14 (giếng 23)	5 ml	7
Read 2	10,5 μ l <i>SureSelect QXT Read Primer 2</i>	3489,5 μ l BP11 (giếng 13)	3,5 ml	6

2.5.2.4. Giải trình tự trên nền tảng Illumina

Cài đặt hệ thống máy giải trình tự theo thông số trong Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Cài đặt chu trình chạy

Chu trình chạy	Số chu kỳ
Read 1	100
Index1 (i7)	8
Index 2 (i5)	8
Read 2	100

Sau khi quá trình giải trình tự hoàn thành, dữ liệu được chuyển đổi về định dạng FASTQ thông qua một kênh hướng dẫn của Illumina là bcl2fastq.

2.5.3. Phân tích dữ liệu giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa

2.5.3.1. Xác định biến thể

Các đoạn đọc được sắp xếp và so sánh với trình tự tham chiếu hg19/GRCh37 nhờ sử dụng công cụ BWA.v0.7.12 [131]. Đồng thời, sử dụng công cụ Picard để đánh dấu các đoạn lặp. Sử dụng tập hợp các công cụ phân tích hệ gen (GATK) để phát hiện

các biến đổi đơn nucleotide (SNVs) và các thêm/mất đoạn ngắn (Indels). Toàn bộ các các biến thể với độ bao phủ dưới 20x và các điểm hoặc chèn/mất đoạn ngắn ở vùng khoảng 10 bp từ đầu mút các đoạn đọc cũng bị loại bỏ. Sau cùng, các biến thể được lọc qua các cơ sở dữ liệu bao gồm 1000G, dbSNP và gnomAD. Tất cả các biến thể có tần số lớn hơn 5% sẽ được loại bỏ.

2.5.3.2. Chú giải và dự đoán chức năng

Tất cả các biến thể được chú giải sử dụng chương trình ANNOVAR [132]. Các chú giải được đưa ra bởi ANNOVAR bao gồm danh sách các biến thể phát hiện được với các trường thông tin về nhiễm sắc thể, vị trí biến đổi trên nhiễm sắc thể, kiểu biến đổi, tần số alen, có được báo cáo trong dbSNP hay không, điểm và đánh giá trên các công cụ như SIFT/PolyPhen/LRT/ MutationTaster/MutationAssessor/FATHMM/Meta SVM/MetaLR...

Alamut Visual là phần mềm tập hợp các thuật toán chất lượng đã được công nhận trong một ứng dụng duy nhất sử dụng trong phân tích, đánh giá các biến thể. Trong đánh giá *in silico* về ảnh hưởng của các biến thể đối với quá trình ghép nối các truy vấn được tích hợp bao gồm EX-SKIP, MaxEntScan, HSF, GenSplicer, ESEFinder, RESCUE-ESE và thuật toán NNSPLICE từ fruitfly.org cũng được tích hợp một phần.

2.5.3.3. Xác định biến thể nguy cơ/gây bệnh tiềm năng

Bệnh ly thượng bì bóng nước:

Toàn bộ các biến thể nằm trên 21 gen liên quan đến ly thượng bì bóng nước (*Bảng 1.1*) với tần số nhỏ hơn 0,5% (do tỷ lệ mắc bệnh là 11,1 trên 1 triệu dân) sẽ được chọn. Dựa trên mô hình di truyền phù hợp của các gen gây bệnh (*Bảng 1.1*), chọn ra các biến thể ứng viên để tiếp tục đánh giá kiểm tra lại bằng giải trình tự Sanger (chi tiết phương pháp trong mục 2.5.4, trang 54) cả trên đối tượng người bệnh cũng như các thành viên gia đình (nếu có).

Bệnh bạch tạng:

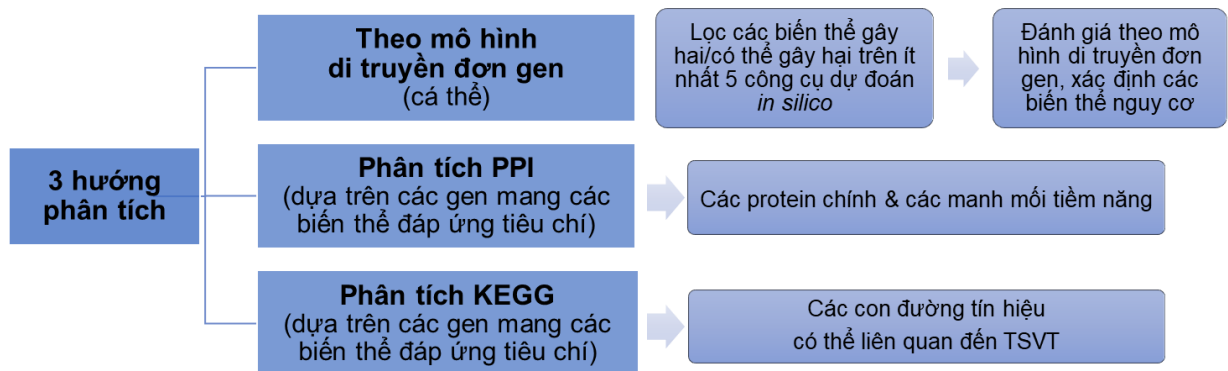
Toàn bộ các biến thể nằm trên 20 gen và vị trí locus 4q.24 liên quan đến bạch tạng (*Bảng 1.2*) với tần số nhỏ hơn 0,5% (do tỷ lệ mắc bệnh là 1:17000) được lựa chọn

để đánh giá tiếp dựa trên mô hình di truyền lặn nhiễm sắc thể thường. Các biến thể ứng viên được sàng lọc qua mô hình di truyền sẽ được đánh giá lại bằng giải trình tự Sanger (chi tiết phương pháp trong mục 2.5.4, trang 53) trên đối tượng người bệnh và các thành viên gia đình (nếu có).

Thiếu sản vành tai:

Đầu tiên, tiến hành lọc dữ liệu WES (đã trải qua phân tích gọi biến thể và chú giải chức năng) của 27 gen liên quan gần nhất đến thiếu sản vành tai (*Bảng 1.5*). Nếu không xác định được biến thể nguy cơ ở các mẫu người bệnh thì tiếp tục lọc trên 428 gen biểu hiện trong cung mang hoặc ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh, di cư và biệt hóa tế bào mào thần kinh sọ (*Phụ lục 8*). Các biến thể có tần số nhỏ hơn 0,5% được lựa chọn để tiếp tục phân tích do tỷ lệ mắc bệnh ở thiếu sản vành tai là 0,83 đến 17,4 trên 10000 ca sinh.

Do đây là bệnh chưa xác định được chính xác nguyên nhân di truyền nên có 3 hướng phân tích sẽ tiếp tục được thực hiện trong nghiên cứu này nhằm mục tiêu không bỏ sót các giả thuyết có thể xảy ra trong cơ chế bệnh sinh dựa trên khuôn khổ cũng như kinh phí của nghiên cứu. Sơ đồ chi tiết 03 hướng phân tích được biểu thị trong *Hình 2.2* dưới đây:



Hình 2.2. Sơ đồ phân tích nhóm bệnh thiếu sản vành tai

2.5.4. Giải trình tự Sanger

2.5.4.1. Phản ứng PCR giải trình tự

Các biến thể ứng viên được chỉ ra sau phân tích WES tiếp tục được đánh giá lại bằng giải trình tự Sanger. Các vùng trình tự mang các biến thể này được PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu với kích thước dao động từ 247 bp đến 485 bp (*Phụ lục 6 & Phụ*

lục 7). Các cặp mồi được thiết kế sử dụng phần mềm *Primer 3* (v.0.4.0); đồng thời kiểm tra các thông số liên quan (số lượng nucleotide, tỉ lệ G và C, nhiệt độ nóng chảy, khả năng tự bắt cặp, khả năng tạo cấu trúc kẹp tóc) sử dụng công cụ *IDT OligoAnalyzer Tool*. Tính đặc hiệu của cặp mồi được kiểm tra bằng phần mềm *in silico PCR amplification*. Cặp mồi thiết kế sau các bước kiểm tra như trên được đặt tổng hợp nhân tạo bởi công ty *PHUSA Biochem* (Cần Thơ, Việt Nam).

Khuôn dùng cho phản ứng PCR giải trình tự là sản phẩm PCR đặc hiệu đã tinh sạch khuếch đại vùng trình tự mang biến thể quan tâm. Thành phần phản ứng bao gồm: 4 μ l *BigDye Terminator Master Mix* (2,5 \times), 2 μ l *BigDye Terminator 5 \times Sequencing Buffer* (5 \times), 1 μ l mồi giải trình tự (1,6 pmole/ μ l), sản phẩm PCR đã tinh sạch (lượng DNA cho mỗi phản ứng được điều chỉnh tùy vào nồng độ của DNA của sản phẩm PCR đã tinh sạch trước đó) và đưa tổng thể tích của phản ứng lên 20 μ l bằng nước khử ion. Lưu ý phản ứng PCR giải trình tự có sử dụng huỳnh quang cho mỗi loại nucleotide nên trong quá trình thao tác tránh tiếp xúc với ánh sáng mạnh. Phản ứng được tiến hành trên đĩa PCR 96 giếng trên máy PCR được cài đặt theo chu trình nhiệt: 96°C – 1 phút; 25 chu kỳ (96°C – 10 giây, 50°C – 5 giây, 60°C – 4 phút); 4°C - ∞ .

Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự

Sản phẩm PCR giải trình tự sau phản ứng được tinh sạch thu lấy DNA theo phương pháp EDTA/Ethanol tuân theo hướng dẫn chi tiết của nhà sản xuất đi kèm bộ kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Mỹ). Sản phẩm tinh sạch thu được có thể được giữ lạnh ở 4°C và tránh ánh sáng cho tới khi được biến tính và giải trình tự trên hệ thống phân tích trình tự.

Biến tính sản phẩm PCR giải trình tự và điện di mao quản trên máy 3500

Sản phẩm PCR Sequencing đã tinh sạch ở trên được đem biến tính thành sợi đơn (bổ sung 6 μ l HiDi, biến tính ở 95°C trong 5 phút và làm lạnh nhanh trong đá) trước khi cho lên máy đọc trình tự. Trình tự các đoạn DNA đặc hiệu cho từng alen được điện di mao quản và đọc tín hiệu huỳnh quang trên máy giải trình tự *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Mỹ). Tín hiệu được ghi tự động, phân tích và lưu trữ trên máy tính.

2.5.4.4. Phân tích kết quả giải trình tự Sanger

Phần mềm Bioedit được sử dụng để phân tích các kết quả giải trình tự từ máy giải trình tự tự động 3500. Các trình tự nucleotide của các mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự tham chiếu bằng phần mềm BioEdit để xác định nucleotide tại vị trí quan tâm.

2.5.5. Phân tích ảnh hưởng ghép nối của biến thể splicing

2.5.5.1. Tách chiết RNA tổng số

Mẫu máu ngoại vi của 2 anh em người bệnh ly thượng bì bóng nước (EB004, EB005) và bố mẹ (2 ml mỗi cá thể) được thu mới vào ống chứa máu EDTA K2 và lưu giữ ở 4°C trong ngày. Các mẫu sau khi tiếp nhận đã được mã hóa, sau đó tách chiết RNA tổng số sử dụng *Monarch® Total RNA Miniprep Kit* (New England Biolab, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA tổng số sau khi tách chiết được bảo quản ở -20°C trong thời gian khoảng 1 tuần và lâu hơn ở -80°C

2.5.5.2. Tổng hợp cDNA

Quá trình tổng hợp cDNA được thực hiện nhờ sử dụng bộ *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit* (New England Biolab, Mỹ). Phản ứng PCR phiên mã ngược (RT-PCR) được thực hiện với tổng thể tích là 20 µl bao gồm các thành phần sau: 30 ng RNA tổng số, 2 µl d(T)₂₃VN, 10 µl *ProtoScript II Reaction Mix (2×)*, 2 µl *ProtoScript II Enzyme Mix (2×)* và 3 µl nước khử ion. Phản ứng được thực hiện ở 42°C trong 1 giờ. Sau đó enzyme được bất hoạt ở nhiệt độ 80°C trong 5 phút.

2.5.5.3. PCR khuếch đại vùng mã hóa gồm toàn bộ exon 42 đến exon 44 gen COL7A1

Phần mềm *Primer 3 (v.0.4.0)* được sử dụng để thiết kế cặp mồi khuếch đại đoạn mã hóa kéo dài từ exon 42 (mồi xuôi: 5'-GGTGACCGGGGCTTCCA-3') đến exon 44 (mồi ngược: 5'-TTCAGGACCCTTGGCTCCAG-3') gen *COL7A1* (vùng trình tự mang biến thể c.4518delT) dựa trên trình tự gen tham chiếu được tham khảo tại cơ sở dữ liệu NCBI. Thông số của cặp mồi (số lượng nucleotide, tỉ lệ G và C, nhiệt độ nóng chảy, khả năng tự bắt cặp, khả năng tạo cấu trúc kẹp tóc) được kiểm tra bằng phần mềm *IDT OligoAnalyzer Tool*. Tính đặc hiệu của cặp mồi được kiểm tra bằng phần mềm *in silico PCR amplification*. Cặp mồi thiết kế sau các bước kiểm tra như trên được đặt tổng hợp nhân tạo bởi công ty *PHUSA Biochem* (Cần Thơ, Việt Nam).

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 20 µl bao gồm các thành phần sau: 2 µl cDNA, 10 µl *Green DreamTaq Master Mix* (2×) (Thermo Scientific, Mỹ), 10 pmol mỗi môi và 6.4 µl nước khử ion (Thermo Scientific, Mỹ). Chu trình nhiệt được tiến hành như sau: 95°C-5 phút, 40 chu kỳ (95°C-30 giây, 58°C-30 giây, 72°C-20 giây), kéo dài ở 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR thu được, được sử dụng làm nguyên liệu trong phản ứng Nested-PCR tiếp đó và sản phẩm PCR cuối cùng được điện di trên gel agarose 3%.

2.5.6. Khuếch đại đa đầu dò phụ thuộc phản ứng ghép nối (MLPA)

Sự thay đổi về số lượng bản sao của gen *COL7A1* (trường hợp EB008 và EB008.E) được xác định bởi bộ kit thương mại SALSA MLPA P415 COL7A1, KRT5 probemix (MRC-Holland, Amsterdam, Hà Lan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đầu dò của bộ kit được thiết kế đặc hiệu cho việc lai và khuếch đại một số exon của gen *COL7A1* (28 đầu dò cho 27 exon/118 exon: 1 (2 đầu dò), 3, 6, 10, 13, 17, 19, 22, 26, 31, 37, 48, 53, 57, 64, 65, 70, 75, 80, 89, 92, 96, 102, 108, 113, 117, 118) và toàn bộ 9 exon gen *KRT5* (9 đầu dò cho 9 exon: 1-9). Mỗi đầu dò là một cặp oligonucleotide và mỗi oligo sẽ bắt cặp bổ sung với trình tự trên DNA đích, khi nào cả 2 oligo của một đầu dò đã được lai với trình tự đích thì các oligo này sẽ được ghép nối (ligate) với nhau và trở thành một đầu dò hoàn chỉnh. Mỗi một đầu dò có một chiều dài khác nhau, do đó tạo phản ứng khuếch đại sử dụng môi có đánh dấu huỳnh quang sẽ tạo nên các sản phẩm với kích thước khác nhau và được phân tách bằng điện di mao quản trên máy giải trình tự tự động, sử dụng ứng dụng phân tách đoạn.

2.5.7. Phân tích mạng lưới tương tác protein-protein

Khi phân tích dữ liệu giải trình tự của bệnh thiếu sản vành tai, mạng lưới tương tác chức năng giữa các protein được dự đoán dựa trên liên kết giữa các gen mã hóa chúng sử dụng công cụ STRING (<http://string-db.org/>) [133]. Trong STRING, mỗi tương tác protein-protein (PPI) được chú thích bằng một hoặc nhiều “điểm số”, biểu thị giá trị về độ tin cậy hay có thể hiểu đơn giản là STRING đánh giá một tương tác là đúng hay sai dựa trên các bằng chứng có sẵn. Trong nghiên cứu này, các PPI có điểm tin cậy trung bình lớn hơn 0,4 được lựa chọn để tối đa hóa khả năng khai thác dữ liệu. Ngoài ra, các nút trung tâm có nhiều PPI nhất và điểm tin cậy cao nhất được chọn, đại diện cho một tỷ lệ nhỏ các nút có khả năng trao đổi thông tin tối đa với những nút khác và được kỳ vọng sẽ đóng một vai trò quan trọng trong con đường sinh học.

2.5.8. Phân tích làm giàu tập hợp gen theo KEGG

Phân tích làm giàu tập hợp gen (Enrichment analysis) sử dụng KEGG (Bách khoa toàn thư về gen và hệ gen của Kyoto) được thực hiện để xác định các biến thể, các gen ứng viên có tiềm năng là yếu tố nguy cơ liên quan đến thiếu sản vành tai hay không. Gọi G_{KEGG} là giá trị biểu thị cho một tập hợp gồm các gen được chú giải thông qua một con đường tín hiệu KEGG (KEGG pathway) K_j . Điểm làm giàu KEGG $S_{KEGG}(g, K_j)$ của g và K_j được định nghĩa là giá trị P của phép thử siêu bội (hypergeometric test) [134-137] cả trên $G_{(g)}$ và G_{KEGG} dựa theo công thức sau:

$$S_{KEGG}(g, K_j) = -\log_{10} \left(\sum_{k=m}^n \frac{\binom{M}{k} \binom{N-M}{n-k}}{\binom{N}{n}} \right)$$

Trong đó:

N và M lần lượt biểu thị cho số lượng gen trong mỗi con đường tín hiệu ($G_{(g)}$) và trong tất cả các con đường tín hiệu (bao gồm trong cả $G_{(g)}$ và G_{KEGG});

n và m lần lượt biểu thị cho số lượng gen gây bệnh tiềm ẩn trong mỗi con đường tín hiệu ($G_{(g)}$) và tất cả các con đường tín hiệu (bao gồm trong cả $G_{(g)}$ và G_{KEGG}).

Điểm làm giàu KEGG ($S_{KEGG}(g, K_j)$) càng lớn thì sự liên kết chức năng giữa gen g và con đường tín hiệu KEGG K_j càng mạnh.

2.5.9. Phân loại khả năng gây bệnh của biến thể theo Hiệp hội Bệnh học phân tử và Di truyền Y học Hoa Kỳ

Hiệp hội Bệnh học phân tử và Di truyền Y học Hoa Kỳ (ACMG) đưa ra hướng dẫn phân loại biến thể với 5 cấp độ (hệ thống 5 bậc), bao gồm: gây bệnh, có khả năng gây bệnh, không chắc chắn, có khả năng lành tính và lành tính [138]. Có hai bộ tiêu chí được đưa ra, một bộ để phân loại các biến thể gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh và một bộ để phân loại các biến thể lành tính hoặc có khả năng lành tính. Các tiêu chí gây bệnh được phân cấp gồm: rất mạnh (PVS1), mạnh (PS1-4); trung bình (PM1-6) hoặc định hướng (PP1-5). Tương tự như vậy, các tiêu chí lành tính cũng được chia thành các cấp độ gồm: độc lập (BA1), mạnh (BS1-4) hoặc định hướng (BP1-7). Đối với một biến thể nhất định, các tiêu chí được chọn dựa trên các bằng chứng quan sát được cho biến thể đó theo hướng dẫn chi tiết trong *Bảng 2.3*, sau đó được kết hợp theo các quy tắc cho điểm trong *Bảng 2.4* để chọn một phân loại từ hệ thống 5 bậc.

Bảng 2.3. Hướng dẫn phân loại tiêu chí đánh giá theo ACMG

		← Lành tính →		← Gây bệnh →			
		Mạnh	Định hướng	Định hướng	Trung bình	Mạnh	Rất mạnh
Dữ liệu quần thể	MAF quá cao đối với bệnh BA1/BS1 HOẶC thấy trong mẫu đối chứng phù hợp với không phù hợp với tính thâm của bệnh BS2				Không có trong dữ liệu quần thể PM2	Phân bố ở mẫu bệnh cao hơn mẫu đối chứng về mật thống kê PS4	
Dữ liệu tính toán và dự đoán		Nhiều bằng chứng dự đoán không ảnh hưởng đến gen/ sản phẩm của gen BP4 Đột biến nhằm nghĩa ở các gen mà chỉ có đột biến làm ngắn protein là gây bệnh BP1 Biến thể cảm với tác động tại vị trí cắt nối không dự đoán được BP7	Nhiều bằng chứng dự đoán tác động gây hại đến gen/ sản phẩm của gen PP3	Sự thay thế mới tại cùng vị trí amino acid đã được báo cáo là gây bệnh bởi biến sai nghĩa khác trước đó PM5 Biến thể làm thay đổi chiều dài protein PM4	Thay đổi cùng amino acid của biến thể đã báo cáo là gây bệnh PS1	Dự đoán biến thể vô nghĩa của gene mà mất chức năng thì sẽ gây bệnh PVS1	
Dữ liệu chức năng	Nghiên cứu chức năng cho thấy không gây hại BS3		Biến thể sai nghĩa ở gen ít có biến thể sai nghĩa gây bệnh PP2	Đột biến tại điểm nóng hoặc tại các domain đã biết rõ chức năng và không xuất hiện biến thể lành tính PM1	Nghiên cứu chức năng cho thấy tác động gây hại PS3		
Dữ liệu phân li	Không phân li cùng bệnh BS4		Phân li cùng với bệnh trong các thành viên gia đình có bệnh PP1	→ Tăng số liệu phân li của biến thể →			
Dữ liệu De novo				Đột biến phát sinh mới (ko kiểm tra được mẫu bố mẹ) PM6	Đột biến phát sinh mới (kiểm tra được mẫu bố mẹ) PS2		
Dữ liệu alen		Hiện diện ở khác sợi DNA có biến thể trội BP2 Hiện diện ở cùng sợi DNA có biến thể trội BP2		Cho các bệnh di truyền lặn phát hiện ở khác sợi DNA đã có đột biến gây bệnh PM3			
Cơ sở dữ liệu khác		Các nguồn dữ liệu cho thấy ảnh hưởng lành tính BP6	Các nguồn dữ liệu cho thấy ảnh hưởng gây hại PP5				
Các thông tin khác		Tìm thấy ở các ca bệnh có cả nguyên nhân khác BP5	Kiểu hình của người bệnh hoặc tiền sử gia đình đặc biệt phù hợp với gen gây bệnh được xác định PP4				

Bảng 2.4. Quy tắc phân loại biến thể gây bệnh theo ACMG

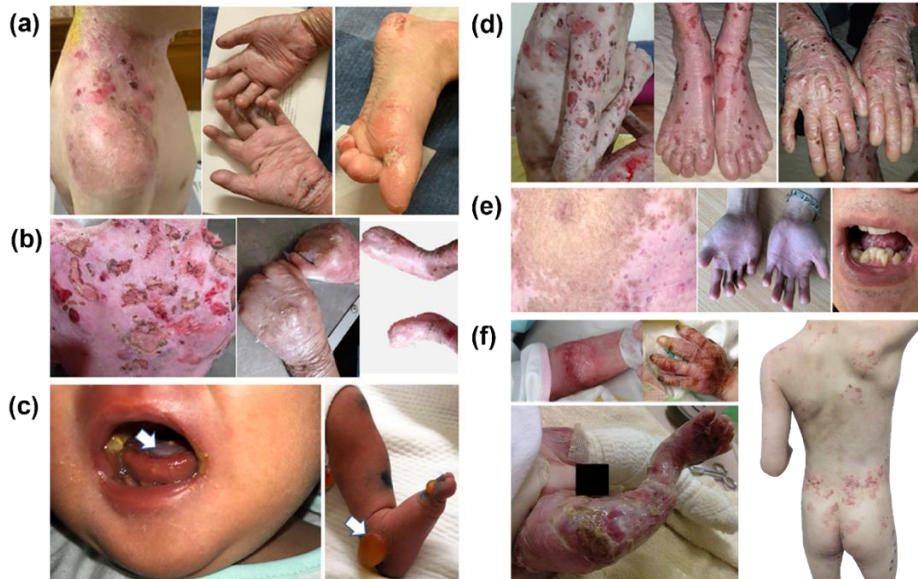
Phân loại	Tiêu chí
Gây bệnh	(i) 1 Rất mạnh (PVS1) và (a) ≥ 1 Mạnh (PS1-PS4) hoặc; (b) ≥ 2 Trung bình (PM1-PM6) hoặc; (c) 1 Trung bình (PM1-PM6) và 1 Định hướng (PP1-PP5) hoặc; (d) ≥ 2 Định hướng (PP1-PP5) (ii) ≥ 2 Mạnh (PS1-PS4) hoặc; (iii) 1 Mạnh (PS1-PS4) và (a) ≥ 3 Trung bình (PM1-PM6) hoặc; (b) 2 Trung bình (PM1-PM6) và ≥ 2 Định hướng (PP1-PP5)
Có khả năng gây bệnh	(i) 1 Rất mạnh (PVS1) và 1 Trung bình (PM1-PM6) hoặc (ii) 1 Mạnh (PS1-PS4) và 1-2 Trung bình (PM1-PM6) hoặc (iii) 1 Mạnh (PS1-PS4) và ≥ 2 Định hướng (PP1-PP5) hoặc (iv) ≥ 3 Trung bình (PM1-PM6) hoặc (v) 2 Trung bình (PM1-PM6) và ≥ 2 Định hướng (PP1-PP5) hoặc (vi) 1 Trung bình (PM1-PM6) và ≥ 4 Định hướng (PP1-PP5)
Lành tính	(i) 1 Độc lập “Stand-alone” (BA1) hoặc (ii) ≥ 2 Mạnh (BS1-BS4)
Có khả năng lành tính	(i) 1 Mạnh (BS1-BS4) và 1 Định hướng (BP1-BP7) hoặc (ii) ≥ 2 Định hướng (BP1-BP7)
Chưa rõ tác động	(i) Các chỉ số không khớp với các tiêu chí trên (ii) Các tiêu chí cho Lành tính và Gây bệnh trái ngược nhau

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm lâm sàng ở người bệnh

3.1.1. Ly thượng bì bóng nước

Tất cả 08 người bệnh (làm WES) và em trai của người bệnh EB008 đều được chẩn đoán mắc ly thượng bì bóng nước dựa trên thăm khám lâm sàng, biểu hiện với các tổn thương trên da bao gồm các vết phỏng rộp và hình thành sẹo (*Hình 3.1*). Người bệnh chủ yếu là nam (7/9 người bệnh, bao gồm cả EB008.E) và chủ yếu là bệnh nhi và trẻ chưa thành niên. Dựa trên hướng dẫn phân loại theo lâm sàng (*Bảng 2.3* và *Bảng 2.4*, trang 56-57), đã tiến hành phân loại được 3 nhóm người bệnh. Trong đó, có 4 người bệnh có thể xếp vào phân nhóm DEB, bao gồm: EB001, EB002 cùng anh em người bệnh EB004 và EB005. Nhóm thứ hai là nhóm gồm hai phân nhóm kiểu hình nghi ngờ được đưa ra, bao gồm 2 người bệnh EB006 và EB007. Nhóm cuối cùng gồm người bệnh EB003 và anh em EB008, EB008.E là nhóm chưa xác định được phân nhóm phù hợp do các đặc điểm ở người bệnh đều có khả năng tìm thấy ở tất cả các phân nhóm của EB. Các thông tin lâm sàng của người bệnh tham gia nghiên cứu được thu thập và tóm tắt trong *Bảng 3.1*.



Hình 3.1. Hình ảnh lâm sàng của 7 người bệnh EB Việt Nam.

- (a) Bóng nước phỏng rộp mức vừa phải trên vai, tay và chân ở người bệnh EB001. (b) Bóng nước toàn thân cùng các vết loét và sẹo ở lưng; co cứng khớp ở tay và chân dạng bọc ở người bệnh EB002. (c) Phỏng rộp trên lưỡi và bàn chân ở bệnh nhi EB003. (d) Tổn thương nghiêm trọng trên lưng, da khô, dính ngón, co rút ngón ở cặp anh em EB004 và EB005. (e) Giảm sắc tố ở bẹn, co cứng các khớp ngón tay, khuôn miệng nhỏ và tổn thương ở lưỡi ở người bệnh EB006. (f) Trợt da ở cẳng tay, cẳng chân thời điểm sơ sinh và tiến triển nhẹ dần theo thời gian ở người bệnh EB007.

Bảng 3.1. Các biểu hiện lâm sàng của những người bệnh EB

STT	Người bệnh	Tuổi	Giới tính	Tổn thương da	Tổn thương móng	Co rút ngón	Các đặc điểm khác	Phân loại theo lâm sàng
1	EB001	4	Nam	Bóng nước ở vai, lưng, hông, tay chân	Loạn dưỡng móng	-	-	
2	EB002	8	Nữ	Bóng nước trên mặt, trợt da ở chân khi mới sinh	Không có móng tay	Có	-	DEB
3	EB004 ⁱ	15	Nam	Bóng nước lan rộng toàn cơ thể, da tay chân khô	Không có móng	Có	-	
4	EB005 ⁱ	7	Nam					
5	EB006	30	Nam	Giảm sắc tố vùng lưng dưới và bẹn	-	Có	Chứng miệng nhỏ, cứng khớp hàm và tổn thương lưỡi	JEB/ HC Kindler
6	EB007	3	Nam	Trợt da ở cẳng tay và chân khi mới sinh, cải thiện dần khi lớn lên	Loạn dưỡng móng ngón tay cái, ngón tay trỏ và các ngón chân	-	-	EBS/DEB
7	EB003	~ 1 tháng	Nữ	Bóng nước trong miệng, tay và chân	-	-	-	
8	EB008 ⁱⁱ	13	Nam	Bóng nước lan rộng, loét và hình thành sẹo	-	-	-	Chưa rõ
9	EB008.E ^{ii,s}	7	Nam					

^{i,ii}Những người bệnh là anh em trong cùng gia đình

^sNgười bệnh không làm WES

Phân nhóm DEB

Người bệnh EB001 là một bé trai 4 tuổi, các tổn thương trên da bao gồm các bóng nước, các vết loét và sẹo. Các tổn thương này chủ yếu tập trung ở vùng vai, lưng, khuỷu tay, hông và tay, chân của người bệnh (*Hình 3.1a*, trang 58). Ngoài ra, biểu hiện loạn dưỡng móng cũng được quan sát thấy ở tay và chân của người bệnh, riêng hiện tượng co rút ngón thì chỉ xuất hiện ở các ngón chân.

Người bệnh EB002 là một bé gái 8 tuổi, biểu hiện lâm sàng lúc mới sinh tương đối nặng với tình trạng bóng nước xuất hiện trên mặt và bị trợt da ở chân. Biểu hiện dính ngón, co rút các ngón và mất hoàn toàn các móng ở cả tay và chân được quan sát thấy trong trường hợp này. Các bóng nước tiếp tục lan rộng ra khắp cơ thể, bị vỡ ra, có dịch, đóng vảy và hình thành sẹo theo thời gian lớn lên. Bên cạnh đó, chân người bệnh phát triển hình thành kiểu hình dị dạng đặc trưng (mitten deformity) (*Hình 3.1b*, trang 58). Xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang cho thấy giảm biểu hiện của collagen loại 7 (COLVII).

Người bệnh EB004, 15 tuổi và EB005, 7 tuổi, là 2 anh em trai trong cùng một gia đình, với các biểu hiện nghiêm trọng, bao gồm các bóng nước trên khắp cơ thể, đồng thời hình thành các vết loét và sẹo. Vùng da ở tay và chân của người bệnh rất khô biểu hiện với các vết nứt trên da, thêm vào đó người bệnh không có móng ở cả tay và chân cùng với hiện tượng dính ngón và co rút ngón, đặc biệt là ở bàn chân của người bệnh với dị dạng điển hình dạng bọc (*Hình 3.1d*, trang 58).

Nhóm nghi ngờ gồm hai phân loại kiểu hình được dự đoán

Người bệnh EB006 là nam, 30 tuổi, các biểu hiện lâm sàng quan sát thấy bao gồm vùng giảm sắc tố đỏ ở lưng dưới và bẹn, có hiện tượng co rút các ngón tay và chân, khẩu hình miệng bị giới hạn (chứng miệng nhỏ), cứng lưỡi và có các vết loét (*Hình 3.1e*, trang 58).

Người bệnh EB007 là một bé trai 3 tuổi (tại thời điểm thu mẫu), với cân nặng lúc sinh là 2,9 kg, bị trợt da ở cẳng chân và cẳng tay từ ngày thứ hai sau sinh do ma sát từ cử động của trẻ. Do gia đình chưa biết cách chăm sóc nên tình trạng của trẻ tiến triển nặng hơn và có dấu hiệu hoại tử ở chân (có mùi hôi) khoảng 2 tuần đầu sau khi sinh. Sau 3 tuần tuổi, nhờ vệ sinh, thay băng và dưỡng ẩm thường xuyên nên da trẻ có tiến triển hơn. Tuy nhiên các bóng nước vẫn tiếp tục lan rộng ra khắp cơ thể, trung bình một ngày lên khoảng 50 bóng nước. Sử dụng kim vô trùng để lấy các bóng nước

giúp da không bị loét, tránh để trẻ gãi làm vỡ bóng nước hoặc ma sát vào bóng chưa được xử lý sẽ gây trợt da. Các biểu hiện bệnh của trẻ được cải thiện theo thời gian khi lớn lên, đến khoảng 6 tuổi thì các bóng nước ở lòng bàn tay và bàn chân phát triển thành lớp sừng và đóng vảy. Hiện tượng loạn dưỡng móng xuất hiện ở ngón tay cái, ngón tay trỏ và các ngón chân của người bệnh (*Hình 3.1f*, trang 58).

Nhóm chưa xác định được phân nhóm kiểu hình cụ thể

Người bệnh EB003 là một trẻ sơ sinh khoảng 1 tháng tuổi với biểu hiện lâm sàng lúc mới sinh bao gồm các bóng nước ở tay, chân và trong miệng của trẻ (*Hình 3.1c*, trang 58).

Người bệnh EB008 là nam, 13 tuổi, cùng em trai (EB008.E, 7 tuổi) được chẩn đoán mắc ly thượng bì bóng nước với các biểu hiện lâm sàng đặc trưng gồm các bóng nước lan rộng, hình thành các vết loét và sẹo trên khắp cơ thể (hình ảnh không được cung cấp). Cả hai anh em đều gặp khó khăn trong việc ăn uống cũng như vệ sinh cá nhân.

3.1.2. Bạch tạng

Toàn bộ 07 người bệnh bạch tạng trong nghiên cứu này đều được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt (OCA) với biểu hiện suy giảm sắc tố trên da, tóc và mắt đi kèm với biểu hiện suy giảm thị lực ở một số cá nhân; không có biểu hiện của chậm phát triển tâm thần. Tuy nhiên rất khó để phân loại các phân nhóm nhỏ thuộc OCA nếu chỉ dựa trên các đặc điểm lâm sàng, ngoại trừ người bệnh lớn tuổi A1005 được xếp vào tiêu phân nhóm OCA1A với các biểu hiện mất hoàn toàn sắc tố ở cả da, tóc và mắt.

Người bệnh A1001, 7 tuổi và A1002, 5 tuổi, là hai anh em trai, đều được chẩn đoán mắc bệnh bạch tạng da và mắt với các biểu hiện lâm sàng khá tương đồng nhau. Cả 2 người bệnh đều có nước da trắng, tóc trắng, mắt xanh (*Hình 3.2a*), có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng (photophobia) với cảm giác khó chịu và đau mắt khi tiếp xúc với ánh sáng, có hiện tượng rung giật nhãn cầu (tăng khi ồm và căng thẳng) và dị sản màng đệm. Người anh (A1001) bị cận thị nhẹ 1/10 (1,5-2 Diop) ở cả hai mắt, trong khi đó người em (A1002) cận nặng đến 14 diop. Thêm vào đó, khả năng nhìn sâu của cả hai anh em đều chỉ tầm 2-3 m (*Bảng 3.2*, trang 63). Ngoài ra, người em (A1002) hay bị viêm phổi trong khoảng thời gian trước đó.

Người bệnh A1003, nam 27 tuổi và A1004, nữ 23 tuổi, là hai con đầu trong một gia đình có ba người con, cả hai đều có nước da trắng, tóc vàng sáng, mắt nâu (*Hình 3.2b*), đều có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng, rung giật nhãn cầu, bị nhược thị và khả

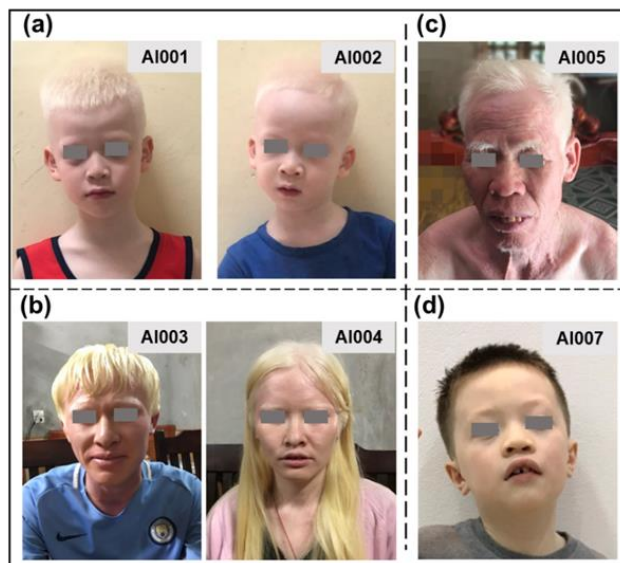
năng nhìn sâu giảm. Người em (A1004) có biểu hiện lác ở mắt phải, có tiền sử viêm cầu thận, viêm da có vảy và xuất huyết dưới da (*Bảng 3.2*, trang 63).

Người bệnh A1005 là nam 63 tuổi, có màu da trắng, tóc và lông mày, lông mi có màu trắng, mắt xanh và có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng (*Hình 3.2c*). Người bệnh bị cận thị 6/10 ở cả hai mắt và khả năng nhìn sâu giảm. Biểu hiện rung giật nhãn cầu và thiếu sản hoàng điểm không được quan sát thấy ở người bệnh này (*Bảng 3.2*, trang 63).

Người bệnh A1006 là nữ, 26 tuổi, là con thứ hai trong gia đình, có nước da trắng hồng, tóc và lông mày, lông mi có màu nâu sáng, mắt nâu và có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng (hình ảnh của người bệnh không được cung cấp). Người bệnh phát triển thể chất, tâm thần, vận động bình thường, không có biểu hiện của rung giật nhãn cầu, dị sản màng đệm và các tật khúc xạ (*Bảng 3.2*, trang 63).

Người bệnh A1007 là một bé trai 5 tuổi, là con thứ hai trong gia đình, người bệnh biểu hiện với nước da trắng, tóc đỏ vàng cho đến nâu, mắt xanh (*Hình 3.2d*), có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng, bị loạn thị và phải đeo kính. Các ảnh hưởng khác bao gồm chứng rung giật nhãn cầu, khả năng nhìn sâu giảm đều được quan sát thấy ở người bệnh A1007 (*Bảng 3.2*, trang 63).

Căn cứ theo các đặc điểm lâm sàng, cả 7 người bệnh đều được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt (OCA). Trong đó, chỉ có duy nhất người bệnh A1005 có thể xếp vào phân nhóm OCA1A với biểu hiện mất hoàn toàn sắc tố trên da và tóc (*Bảng 3.2*, trang 63).



Hình 3.2. Hình ảnh lâm sàng của 6 người bệnh bạch tạng Việt Nam

Biểu hiện suy giảm sắc tố ở da, tóc (trắng ở A1001, A1002 và A1005; vàng ở A1003 và A1004; nâu ở A1007) và màu mắt dao động từ xanh (A1001, A1002 và A1007) đến nâu (A1003-A1005). Hình ảnh của người bệnh A1006 không được cung cấp.

Bảng 3.2. Các đặc điểm lâm sàng ở 7 người bệnh bạch tạng

Người bệnh	Tuổi	Giới tính	Màu da, màu tóc	Màu mắt	Chứng sợ ánh sáng	Tật khúc xạ	Rung giật nhãn cầu	Lác	Thiếu sản hoàng điểm	Vết bầm máu (Ecchymosis)	Giảm khả năng nhìn sâu (Reduced stereopsis)	Phân loại theo lâm sàng
AI001	7	Nam	Da trắng, tóc vàng sáng	Xanh	+	Cận thị 14 D	+	-	+	.	+	OCA
AI002	5	Nam	Da trắng, tóc vàng sáng	Xanh	+	Cận thị 1/10 (1,5-2 D)	+	-	+	.	+	OCA
AI003	27	Nam	Da trắng hồng, tóc vàng	Nâu	+	Nhược thị	+	-	-	-	+	OCA
AI004	23	Nữ	Da trắng hồng, tóc vàng	Nâu	+	Nhược thị	+	+	-	+	+	OCA
AI005	63	Nam	Da trắng, tóc trắng	Nâu	+	Cận thị 6/10 (~0,5 D)	-	-	-	.	+	OCA1A
AI006	26	Nữ	Da trắng hồng, tóc nâu sáng	Nâu	+	Không	-	-	-	.	-	OCA
AI007	5	Nam	Da trắng, tóc đỏ vàng đến nâu	Xanh	+	Loạn thị	+	-	-	.	+	OCA

(+), có; (-), không; (.), không có thông tin.

AI: bạch tạng; OCA: bạch tạng da và mắt; OCA1A: bạch tạng da và mắt loại 1A; D: diop

3.1.3. Thiếu sản vành tai

Người bệnh được chẩn đoán thiếu sản vành tai trong nghiên cứu này bao gồm 6 nam (Mi001, Mi002, Mi004, Mi005, Mi007 và Mi011) và 5 nữ (Mi003, Mi006, Mi008, Mi009 và Mi010) (Bảng 3.3). Tất cả người bệnh đều được chẩn đoán với tối thiểu một bên tai bị dị tật và toàn bộ người bệnh đều phát hiện dị tật tai phải. Trong số 11 người bệnh thì có 3 người bệnh bị dị tật ở cả hai tai là 2 người bệnh nam Mi002, Mi004 và 1 người bệnh nữ Mi009. Ngoài ra, 3 người bệnh gồm Mi002, Mi009 và Mi011 có biểu hiện của các dị tật khác ngoài các đặc điểm bất thường ở tai.

Bảng 3.3. Các biểu hiện lâm sàng ở những người bệnh thiếu sản vành tai

STT	Người bệnh	Chẩn đoán thiếu sản vành tai	Các dị tật quan sát được				Dị tật kèm theo
			Phân độ dị tật tai phải	Phân độ dị tật tai trái	Tịt, hẹp ống tai ngoài phải	Tịt, hẹp ống tai ngoài trái	
1	Mi001	Phải độ III	III	-	Không có OTN	-	Không
2	Mi002	Phải độ I trái độ II	I	II	Không	Không	Rò luân nhĩ 2 bên, rò vùng cổ đã phẫu thuật, chỉ có 1 quả thận
3	Mi003	Phải độ III	III	I	Không	Hẹp	Không
4	Mi004	Phải độ I, trái độ III	I	III	-	Hẹp	Không
5	Mi005	Phải độ II	II	BT	Có	BT	-
6	Mi006	Phải độ III	III	BT	Có	BT	Không
7	Mi007	Phải độ III	III	BT	BT	BT	Không
8	Mi008	Phải độ III	III	BT	Không có OTN	BT	Không
9	Mi009	Hai bên độ III	III	III	Không có OTN	Không có OTN	Thiếu sản xương hàm 2 bên, mụn thịt thừa trước tai phải
10	Mi010	Phải độ III	III	BT	Tịt OTN	Không	Không
11	Mi011	Trái độ III	BT	III	BT	Hẹp OTN	Thiếu sản xương hàm

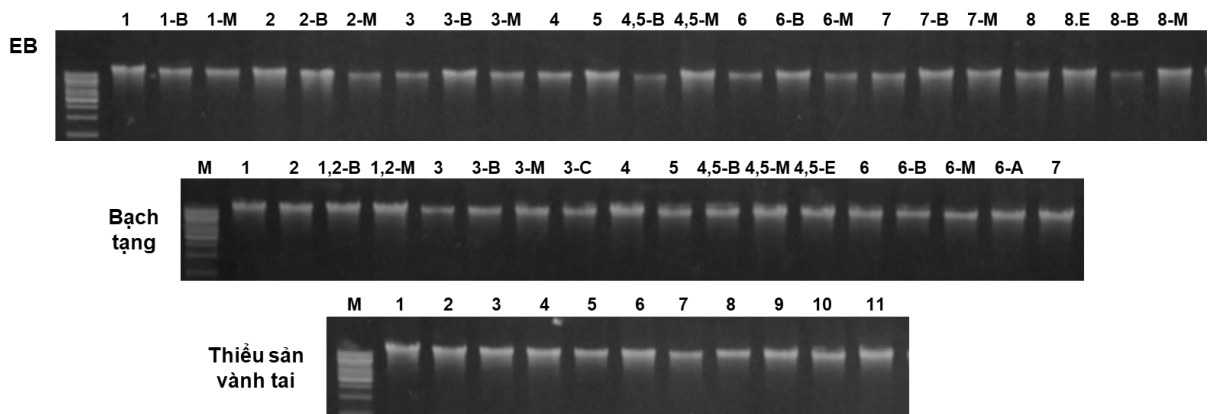
Viết tắt: OTN, ống tai ngoài; BT, bình thường (-), không có thông tin

Các mức độ dị tật tai được quan sát ở người bệnh bao gồm: cấp độ I với sự phát triển tai ngoài không hoàn chỉnh và cấu trúc nhận dạng ống tai ngoài nhỏ; cấp độ II với đỉnh tai không phát triển và ống tai ngoài hẹp gây mất thính lực; cấp độ III được nhận diện thông qua không có ống tai ngoài và màng tai; không có trường hợp nào được chẩn đoán mắc thiếu sản vành tai cấp độ IV (trường hợp mất hoàn toàn tai, anotia). Đa phần các người bệnh được chẩn đoán mắc thiếu sản vành tai độ III, trong đó 5/11

người bệnh mang dị tật ở tai phải, 1/11 người bệnh mang dị tật tai trái và duy nhất người bệnh Mi009 được chẩn đoán cấp độ III ở cả hai tai. Ảnh hưởng tịt, hẹp ống tai ngoài (OTN), không có ống tai ngoài (OTN) ở một hoặc cả hai tai được xác định ở 10/11 người bệnh, trong đó có một người bệnh (Mi009) không có OTN ở cả hai tai. Ngoài ra các dị tật khác cũng được quan sát thấy ở 3/11 người bệnh, bao gồm biểu hiện rò luân nhĩ hai bên, rò vùng cổ đã phẫu thuật và chỉ có một quả thận ở người bệnh Mi002. Dị tật thiếu sản xương hàm được báo cáo ở hai trường hợp Mi009 và Mi011, cả hai người bệnh này đều được chẩn đoán mắc thiếu sản vành tai độ III.

3.2. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của 8 người bệnh ly thượng bì bóng nước, 7 người bệnh bạch tạng cùng các thành viên gia đình và 11 người bệnh thiếu sản vành tai sau khi tách chiết từ máu ngoại vi được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 0,8% và đo OD ở bước sóng 260 nm và 280 nm kiểm tra độ tinh sạch. Kết quả điện di cho thấy hầu hết sản phẩm DNA tổng số sau khi tách chiết có các dải băng rõ ràng, không bị đứt gãy (Hình 3.3). Nồng độ DNA tổng số của các mẫu nghiên cứu thu được nằm trong khoảng từ 19,2 đến 86,6 ng/ μ l, có độ tinh sạch cao ($A_{260}/A_{280} > 1,80$) (Phụ lục 5), đảm bảo yêu cầu về chất lượng cho các bước sàng lọc gen tiếp theo.



Hình 3.3. Hình ảnh điện di đồ mẫu DNA tổng số trên gel agarose 0,8%

EB: ly thượng bì bóng nước; B: bố, M: mẹ, E: em, C: chị, A: anh; M: marker 1 Kb.

3.3. Dữ liệu thô toàn bộ hệ gen mã hóa của người bệnh

Kết quả giải trình tự thô của các mẫu người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai được lưu giữ trên hệ thống máy chủ của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Kết quả dữ liệu giải trình tự thô cho thấy hàng tỷ base đã được đọc trên mỗi mẫu, với số lượng trung bình vào khoảng hơn 7 tỷ base/ mẫu và số đoạn đọc trung bình tới hơn 48 triệu. Độ chính xác của từng nucleotide được đánh giá bằng điểm chất lượng Phred với số Q càng cao biểu thị độ chính xác càng cao (ví dụ Q20 tương đương với khả năng xảy ra lỗi nhỏ hơn 1/100, Q30 tương đương với khả năng xảy ra lỗi nhỏ hơn 1/1000). Kết quả đọc dữ liệu thô của các mẫu người bệnh cho thấy độ chính xác của phép đọc rất cao với Q30 trung bình là 94,34% (từ 93,19% - 95,63%), còn Q20 trung bình là 98,03% trong dải từ 97,53% đến 98,56% (Bảng 3.4). Kết quả này đảm bảo dữ liệu đáp ứng đủ chất lượng và độ tin cậy để tiến hành các phân tích tiếp theo.

Bảng 3.4. Kết quả đánh giá dữ liệu thô trong phân tích WES các mẫu người bệnh ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai

STT	Tên mẫu	Tổng số nucleotide được đọc	Tổng số đoạn đọc	GC%	AT%	Q20%	Q30%
<i>Ly thượng bì bóng nước</i>							
1	gal_EB001	7,046,852,900	46,667,900	51.51	48.49	97.78	94.18
2	gal_EB002	7,116,019,356	47,125,956	57.7	48.3	97.99	94.21
3	gal_EB003	7,695,057,848	50,960,648	51.93	48.07	98.21	94.81
4	gal_EB004	7,458,168,746	49,391,846	51.03	48.97	97.98	94.1
5	gal_EB005	7,823,959,904	51,814,304	51.4	48.6	97.88	94.4
6	gal_EB006	7,080,173,164	46,888,564	51.95	48.05	97.72	93.81
7	gal_EB007	6,784,609,690	44,931,190	51.68	48.32	97.87	94.39
8	gal_EB008	6,816,949,964	45,145,364	51.59	51.59	98.41	93.19
<i>Bạch tạng</i>							
9	gal_AI001	7,335,264,712	48,577,912	51.2	48.8	97.91	94.18
10	gal_AI002	7,733,829,212	51,217,412	51.58	48.42	97.7	93.76
11	gal_AI003	6,456,190,428	42,756,228	51.53	48.47	97.53	93.4
12	gal_AI004	8,190,220,370	54,239,870	51.81	48.19	98.04	94.34
13	gal_AI005	7,060,714,096	46,759,696	51.56	48.44	97.67	93.7
14	gal_AI006	10,620,793,380	70,336,380	51.62	48.38	97.96	94.31
15	gal_AI007	7,000,830,516	46,363,116	50.39	49.61	97.75	93.83
<i>Thiếu sản vành tai</i>							
16	gal_Mi001	7,270,141,734	48,146,634	51.52	48.48	98.5	95.63
17	gal_Mi002	6,079,889,972	40,264,172	52.62	47.38	98.06	94.46
18	gal_Mi003	7,833,329,756	51,876,356	51.54	48.46	98.18	94.76
19	gal_Mi004	8,416,949,890	55,741,390	52.44	47.56	98.35	95.34
20	gal_Mi005	6,713,678,950	44,461,450	52.11	52.11	97.89	94.13
21	gal_Mi006	6,826,549,746	45,452,634	51.59	51.59	98.41	95.19
22	gal_Mi007	8,685,772,774	57,521,674	51.65	48.35	98.05	94.44
23	gal_Mi008	6,318,952,568	41,847,368	51.67	48.33	98	94.32
24	gal_Mi009	8,612,939,736	57,039,336	51.94	48.06	98.37	95.39
25	gal_Mi010	6,545,348,982	43,346,682	51.44	51.44	98.56	94.13
26	gal_Mi011	6,151,616,180	40,739,180	52.2	47.8	98.06	94.47
Trung bình		7,372,107,868	48,831,279	51.89	48.86	98.03	94.34

3.4. Các biến thể liên quan đến bệnh

3.4.1. Ly thượng bì bóng nước

Dựa trên bộ dữ liệu WES đã được phân tích, các biến thể nonsynonymous và các indel có tần số nhỏ hơn 0,5% nằm trên 13 gen liên quan đến ly thượng bì bóng nước đã được xác định, bao gồm *COL7A1*, *DSP*, *TGM5*, *KRT5*, *KRT14*, *ITGA3*, *ITGB4*, *LAMA3*, *LAMC2*, *PLEC*, *EXPH5* và *DST*. Trong đó, *COL7A1* (8 biến thể), *DSP* (5 biến thể) và *TMG5* (5 biến thể) là 3 gen phát hiện được nhiều biến thể nhất (Bảng 3.5, trang 68). Số lượng các biến thể được tìm thấy lần lượt ở các mẫu người bệnh như sau: EB001, 3 biến thể; EB002, 4 biến thể; EB003, 7 biến thể; EB004, 4 biến thể; EB005, 8 biến thể; EB006, 3 biến thể; EB007, 4 biến thể; EB008-EB012, 2 biến thể/ mẫu.

Thông qua phân tích đánh giá, phân loại biến thể, xác định được 10 biến thể gen *COL7A1* (NM_000094.4, MIM:120120) ở 7/8 người bệnh và 1 biến thể gen *KRT5* (NM_000424, MIM:148030) ở người bệnh còn lại (8/9 người bệnh được tiến hành làm WES), là những biến thể ứng viên trong xác định nguyên nhân dẫn đến EB. Các biến thể phát hiện được trên gen *COL7A1* bao gồm 1 biến thể đồng hợp tử (c.8279G>A) và 9 biến thể dị hợp tử (c.2858_2859delAG, c.6081delC, c.6205C>T, c.8233C>T, c.4518+2delT, c.5047C>T, c.5821-2A>G, c.1837C>T và c.3830C>T); trong đó, có 3 biến thể mới (c.8279G>A, c.4518+2delT, c.5821-2A>G) chưa được công bố trên bất kỳ cơ sở dữ liệu nào. Biến thể duy nhất phát hiện được trên gen *KRT5* là biến thể dạng dị hợp tử (c.1429G>A) (Bảng 3.5, trang 68).

Bảng 3.5. Các biến thể liên quan được tìm thấy ở người bệnh EB

Người bệnh	Gen	Exon	Biến thể	Tần số		Loại biến thể	dbSNP	Dự đoán <i>in silico</i>					ClinVar/ACMG†	Kiểu gen	Kiểu di truyền
				1000g	gnomAD			SIFT	Polyphen2	MuTas	HSF	Alamut Visual			
EB001	<i>COL7A1</i> (NM_000094.4)	exon111	c.8279G>A [#] (p.G2760E)	.	.	nonsyn	.	D	D	D	.	.	P [†] (PM2, PM3 PP1, PP3-PP5)	hom	AR
	<i>DSP</i> (NM_004415)	exon23	c.4103C>T (p.T1368I)	3.99×10 ⁻⁴	.	nonsyn	rs530481219	T	D	D	.	.	.	het	AR
	<i>TGM5</i> (NM_004245)	exon9	c.1264G>A (p.V422M)	0.0421326	0.0141	nonsyn	rs7171797	T	P	N	.	.	LB	het	AR
EB002	<i>COL7A1</i> (NM_000094.4)	Exon 22	c.2958_2859delAG (p.E953fs*8)	.	.	FS del	P [†] (PVS1, PM3, PM4 PP1, PP4)	het	AR
		Exon 73	c.6081delC (p.P2029fs*177)	.	0.3491×10 ⁻⁴	FS del	rs780623622	P	het	AR
	<i>DSP</i> (NM_004415)	Exon 4	c.502G>A (p.G168S)	.	0.3979×10 ⁻⁵	nonsyn	.	T	B	D	.	.	.	het	AR
	<i>TGM5</i> (NM_004245)	Exon 9	c.1264G>A (p.V422M)	0.042	0.0141	nonsyn	rs7171797	T	P	N	.	.	LB	het	AR
EB003	<i>COL7A1</i> (NM_000094.4)	Exon 74	c.6205C>T (p.R2069C)	.	0.1989×10 ⁻⁴	nonsyn	rs121912855	D	B	A	.	.	P	het	AR
		Exon 111	c.8233C>T (p.R2745*)	.	0.3995×10 ⁻⁶	stopgain	rs768202310	het	AR
	<i>ITGA3</i> (NM_002204)	Exon 13	c.1766G>A (p.R589Q)	.	.	nonsyn	.	T	B	D	.	.	.	het	AR
	<i>LAMA3</i> (NM_002204)	Exon 30	c.3622C>A (p.P1208T)	0.047	0.06353	nonsyn	rs17202961	D	D	D	.	.	.	het	AR
	<i>LAMC2</i> (NM_005562)	Exon 4	c.407A>T (p.D136V)	0.015	0.004509	nonsyn	rs12037099	T	B	N	.	.	LB	het	AR
	<i>PLEC</i> (NM_201384)	Exon 30	c.3958C>T (p.T1320C)	0.0025959	0.000432	nonsyn	rs372256096	D	B	D	.	.	LB/U	het	AD/AR
Exon 31		c.5653G>A (p.A1885T)	0.0087859	0.004201	nonsyn	rs201070741	T	D	D	.	.	B	het	AD/AR	
EB004 ⁱ	<i>COL7A1</i> (NM_000094.4)	intron43	c.4518+2delT [#]	.	.	splicing	.	.	.	Không ảnh hưởng	Có thể bỏ qua	.	het	AR	

Người bệnh	Gen	Exon	Biến thể	Tần số		Loại biến thể	dbSNP	Dự đoán <i>in silico</i>					ClinVar/ACMG†	Kiểu gen	Kiểu di truyền
				1000g	gnomAD			SIFT	Polyphen2	MuTas	HSF	Alamut Visual			
												exon 43			
		exon54	c.5047C>T (p.R1683*)	.	8.48×10 ⁻⁶	stopgain	rs760063197	.	.	A	.	.	P	het	AR
	DSP (NM_004415)	exon23	c.3923G>A (p.R1308Q)	0.0031949	0.0012	nonsyn	rs184154918	T	D	N	.	.	B/LB	het	AR
	TGM5 (NM_004245)	exon3	c.326C>T (p.T109M)	0.0217652	0.0098	nonsyn	rs113463533	T	B	N	.	.	LB	het	AR
EB005 ⁱ	COL7A1 (NM_000094.4)	intron43	c.4518+2delT [#]	.	.	nonsyn	Không ảnh hưởng	Có thể bỏ qua exon 43	.	het	AR
		exon54	c.5047C>T (p.R1683*)	.	8.48×10 ⁻⁶	nonsyn	rs760063197	.	.	A	.	.	P	het	AR
	LAMC2 (NM_005562)	exon6	c.741C>A (p.D247E)	0.0642971	0.0559	nonsyn	rs2296306	T	B	P	.	.	LB	het	AR
	DSP (NM_004415)	exon23	c.3923G>A (p.R1308Q)	0.0031949	0.0012	nonsyn	rs184154918	T	D	N	.	.	B/LB	het	AR
	EXPH5 (NM_001308019)	exon3	c.2630A>G (p.Y877C)	3.99×10 ⁻⁴	5.8×10 ⁻⁵	nonsyn	rs573273280	T	B	N	.	.	.	het	AR
	TGM5 (NM_004245)	exon3	c.326C>T (p.T109M)	0.0217652	0.0098	nonsyn	rs113463533	T	B	N	.	.	LB	het	AR
	KRT14 (NM_000526)	exon6	c.1237G>A (p.A413T)	0.0277556	0.0184	nonsyn	rs59780231	T	D	P	.	.	B	het	AD
	ITGB4 (NM_001005619)	exon19	c.2359C>T (p.R787C)	2.00×10 ⁻⁴	4.23×10 ⁻⁵	nonsyn	rs150184884	D	D	N	.	.	.	het	AR
EB006	COL7A1 (NM_000094.4)	exon74	c.6205C>T (p.R2069C)	.	1.65×10 ⁻⁵	nonsyn	rs121912855	D	B	A	.	.	P	het	AR
		exon71	c.5821-2A>G [#]	.	.	splicing	Có thể có thay đổi ở vị trí tiếp nối (accepter)	Có thể bỏ qua exon 71	.	het	AR
	DSP (NM_004415)	exon12	c.1481A>T (p.Y494F)	0.0177716	0.0118	nonsyn	rs28763961	T	B	N	.	.	B	het	AR

Người bệnh	Gen	Exon	Biến thể	Tần số		Loại biến thể	dbSNP	Dự đoán <i>in silico</i>					ClinVar/ACMG†	Kiểu gen	Kiểu di truyền
				1000g	gnomAD			SIFT	Polyphen2	MuTas	HSF	Alamut Visual			
EB007	<i>DSP</i> (NM_004415)	exon12	c.1481A>T (p.Y494F)	0.0177716	0.0118	nonsyn	rs28763961	T	B	N	.	.	B/LB	het	AR
	<i>DST</i> (NM_001723)	exon23	c.3673G>A (p.E1225K)	.	1.65×10 ⁻⁵	nonsyn	rs532648332	T	B	het	AR
	<i>KRT5</i> (NM_000424)	exon7	c.1429G>A (p.E477K)	.	.	nonsyn	rs59190510	D	D	D	.	.	P	het	AD
	<i>TGM5</i> (NM_004245)	exon3	c.326C>T (p.T109M)	0.0217652	0.0098	nonsyn	rs113463533	T	B	N	.	.	LB	het	AR
EB008	<i>COL7A1</i> (NM_000094.4)	exon14	c.1837C>T (p.R613*)	.	0.00002473	stopgain	rs759634066	.	.	A	.	.	U† (PVS1)	het	AR
		exon30	c.3830C>T (p.P1277L)	0.0227636	0.0418	nonsyn	rs35761247	D	D	D	.	.	B/LB	het	
	<i>DSP</i> (NM_004415)	exon24	c.8605A>G (p.I2869V)	0.00459265	0.0022	nonsyn	rs28763971	D	B	N	.	.	B/LB	het	AR
	<i>KLHL24</i> (NM_001349427)	exon30	c.590A>C (p.D197A)	0.00599042	0.0019	nonsyn	rs116961268	D	B	D	.	.	.	het	AR
	<i>LAMA3</i> (NM_002204)	exon9	c.1256C>A (p.A419D)	0.00019968	0.0001	nonsyn	rs557523147	D	D	D	.	.	.	het	AR
	<i>PLEC</i> (NM_201384)	exon27	c.3682C>T (p.R1228W)	0.00199681	0.0048	nonsyn	rs144610086	D	D	N	.	.	B	het	AR

Chữ viết tắt: 1000g, Cơ sở dữ liệu 1000 genome; gnomAD, Cơ sở dữ liệu tổng hợp bộ gen; SIFT, Sorting Intolerant From Tolerant/Công cụ dự đoán tác động của các thay thế amino acid đến chức năng của protein.

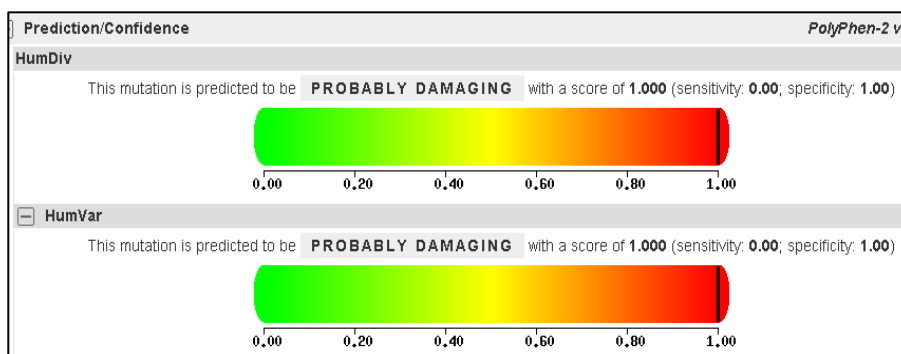
A, gây bệnh; B/LB/N/T, lành tính/có thể là lành tính/trung tính; D, có hại/gây bệnh; L, độ ảnh hưởng thấp; P, đa hình/lành lỉnh (in MutTaster); U, chưa rõ tác động; hom, đồng hợp tử; het, dị hợp tử; wt, kiểu dại; nonsyn, non-synonymous; FS del, xoá dịch khung; PVS, gây bệnh rất mạnh; PM, gây bệnh trung bình; PP, gây bệnh định hướng; AD, di truyền trội; AR, di truyền lặn. Các biến thể được bôi đậm là những biến thể ứng viên chính cho nguyên nhân gây bệnh.

ⁱ những người bệnh là anh em ruột trong một gia đình.

[#] các biến thể mới, chưa từng được công bố trên bất kỳ cơ sở dữ liệu nào.

3.4.1.1. Dự đoán chức năng *in silico* của các biến thể mới

Cả 2 mô hình HumDiv và HumVar của Polyphen-2 đều đưa ra kết quả dự đoán chức năng của biến thể c.8279G>A (p.G2760E) nằm trên exon 11 gen *COL7A1* có khả năng gây hại đến protein được mã hóa với Score = 1 (Hình 3.4). Tương tự, kết quả dự đoán chức năng sử dụng công cụ SIFT và Mutation Taster cũng cho thấy sự kiện thay thế glycine bằng axit glutamic tại vị trí 2760 trên chuỗi polypeptide có khả năng gây hại đến protein này với Score lần lượt bằng 0 và 1 tương ứng với dự đoán gây hại (D) đến chức năng của protein. Như vậy, việc ảnh hưởng đến chức năng của protein được mã hóa có thể dẫn tới thay đổi hoạt tính của enzyme.



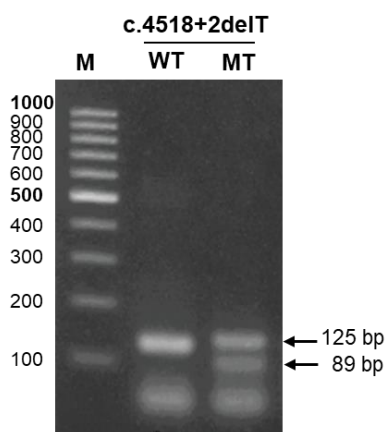
Hình 3.4. Dự đoán chức năng của biến thể *COL7A1* c.8279G>A bằng công cụ Polyphen-2

Cả hai mô hình HumDiv (trên) và HumVar (dưới) đều đưa ra dự đoán có khả năng gây hại với điểm dự đoán là 1.

Đối với các biến thể mới nằm trong intron của gen *COL7A1*, sử dụng công cụ Human Splicing Finder (HSF) và phần mềm Alamut Visual để đánh giá khả năng ảnh hưởng đến mô hình cắt nối tự nhiên của mRNA *COL7A1*. Kết quả cho thấy cả 2 công cụ đều chỉ ra ảnh hưởng của biến thể c.5821-2A>G đến mô hình cắt nối tự nhiên của mRNA của gen *COL7A1* với dự đoán xóa hoàn toàn exon 71 trên phân tử protein được mã hóa. Riêng biến đổi c.4581+2delT, có sự đối lập về dự đoán ảnh hưởng của biến thể đến mô hình cắt nối giữa 2 công cụ, HSF cho rằng c.4581+2delT không ảnh hưởng, trong khi Alamut Visual dự đoán có ảnh hưởng và có thể dẫn đến xóa hoàn toàn exon 43 trên phân tử protein được mã hóa (Bảng 3.5, trang 68).

3.4.1.2. Phân tích chức năng liên quan đến biến thể splicing c.4581+2delT

Để đánh giá ảnh hưởng đến mô hình ghép nối tự nhiên của mRNA *COL7A1* của biến thể c.4581+2delT, mẫu máu của 2 anh em người bệnh (EB004 và EB005) cùng bố mẹ được thu mới và tiến hành tách chiết RNA tổng số. Quá trình tổng hợp cDNA sau đó được thực hiện và tiến hành khuếch đại vùng trình tự mã hoá mang đột biến kéo dài từ exon 42 đến hết exon 44 gen *COL7A1*. Phản ứng Nested-PCR được thực hiện để khuếch đại một lần nữa vùng trình tự này, kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 3% cho thấy một băng sản phẩm duy nhất có kích thước 125 bp ở mẫu bố với kiểu gen đại (wt) và thêm một băng sản phẩm thứ 2 với kích thước 89 bp ngoài băng 125 bp ở mẫu bệnh mang biến thể dị hợp tử c.4581+2delT (Hình 3.5). Kết quả này cho thấy, có một alen đã bị mất một vùng trình tự mã hóa có kích thước 36 bp, tương ứng với kích thước của exon 43 trên gen *COL7A1*.



Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên gel agarose 3%

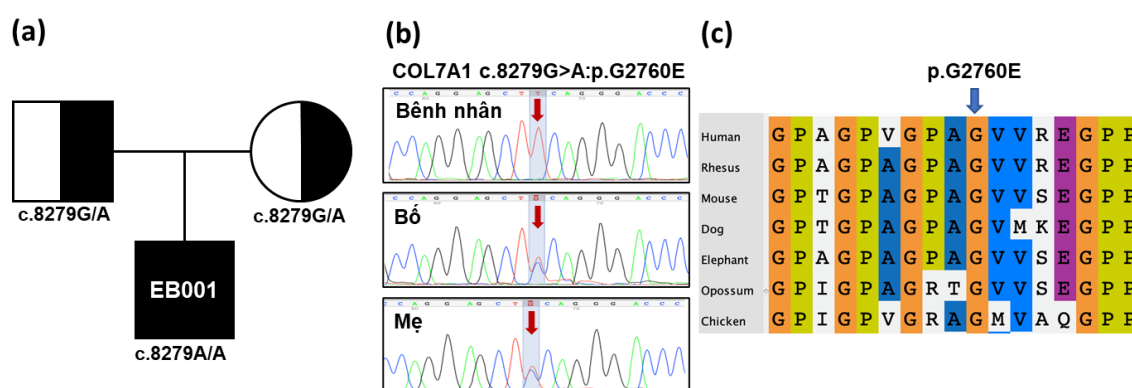
Dải băng lớn hơn có kích thước 125 bp biểu thị bản sao kiểu đại (WT), dải băng nhỏ hơn với kích thước 89 bp biểu thị bản sao đột biến (MT), các dải băng phía dưới cùng của bản gel là các môi dư. M: marker 1 Kb plus.

3.4.1.3. Các trường hợp DEB mang biến thể gen *COL7A1*

Người bệnh EB001

Phân tích kết quả giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa của người bệnh EB001, phát hiện biến thể đồng hợp tử c.8279G>A trên exon 111 gen *COL7A1*, làm thay đổi axit amin tại vị trí 2760, trong đó glycine được thay thế bằng axit glutamic (p.G2760E) (Bảng 3.5, trang 68). Đây là một biến thể mới, chưa được tìm thấy trên bất cứ cơ sở dữ liệu hay công bố nào trước đó. Kiểm tra lại bằng giải trình tự

Sanger trên hệ thống máy ABI 3500 Genetic Analyzer cũng cho kết quả tương đồng. Bên cạnh đó, biến thể này cũng được tìm thấy ở cả bố và mẹ của người bệnh ở trạng thái dị hợp tử (Hình 3.6). Dựa theo hướng dẫn phân loại biến thể gây bệnh/lành tính của Hiệp hội Bệnh học Phân tử và Di truyền Y học Hoa Kỳ (ACMG) (Bảng 2.3 và Bảng 2.4, trang 56-57), biến thể *COL7A1* c.8279G>A được đề xuất xếp vào nhóm biến thể “gây bệnh” với 6 minh chứng gồm PM2, PM3 và PP1, PP3 - PP5 (Bảng 3.5, trang 68). Biến thể mới này đã được nhóm nghiên cứu khai báo trên cơ sở dữ liệu biến thể LOVD (Leiden Open Variation Database) (<https://databases.lovd.nl/shared/individuals/00432346>).



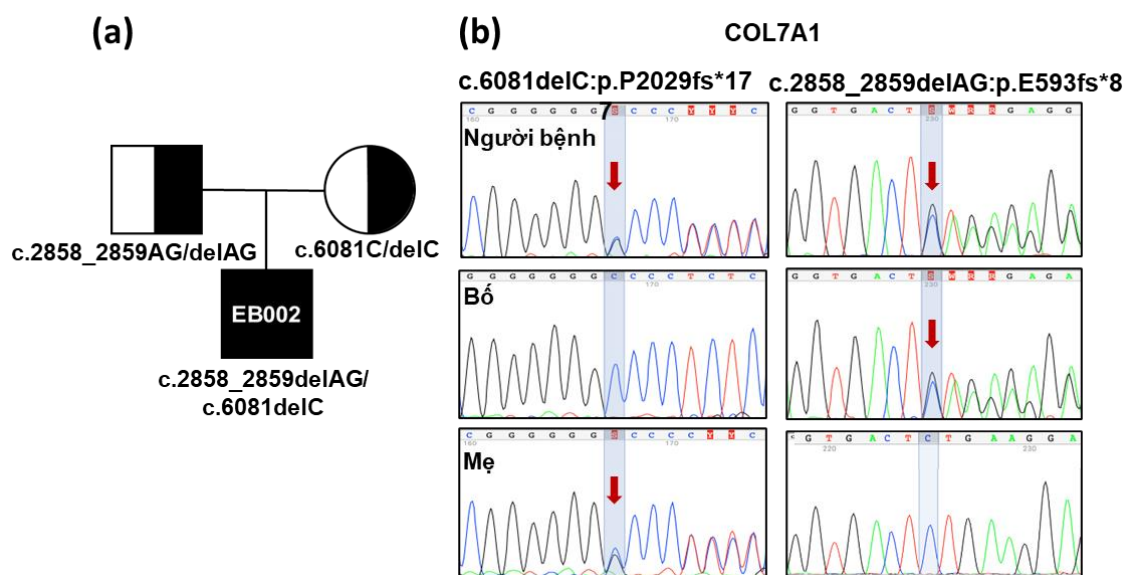
Hình 3.6. Biến thể *COL7A1* c.8279G>A phát hiện ở gia đình người bệnh EB001.

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh EB001, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/nửa đen biểu thị người bệnh/người mang biến thể. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh và bố mẹ. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ. (c) Thay đổi axit amin nằm ở vị trí bảo thủ, được đánh dấu bằng mũi tên màu xanh.

Người bệnh EB002

Sự kết hợp của hai biến thể dị hợp tử làm dịch khung đọc của gen *COL7A1* được tìm thấy ở người bệnh EB002. Biến thể đầu tiên là c.2858_2859delAG nằm trên exon 22 (Bảng 3.5, trang 68). Mặc dù biến thể này chưa được công bố trên các cơ sở dữ liệu bao gồm 1000 Genomes, dsSNP, gnomAD và HGMD, nhưng trên cơ sở dữ liệu riêng dành cho gen *COL7A1* (<http://www.col7a1-database.info>) đã báo cáo 2 trường hợp liên quan mắc ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng thể nghiêm trọng (RDEB-GS), bao gồm một bé gái 1 tuổi và một bé trai 3 tuổi. Biến thể c.2858_2859delAG làm xuất hiện mã kết thúc sớm tại vị trí amino axit thứ 8 sau codon 953 trên exon 22 (p.E953fs*8), dẫn đến xóa hoàn toàn 1984 amino axit phía

sau đó của protein COLVII. Biến thể dị hợp thứ hai được phát hiện là biến thể c.6081delC nằm trên exon 73 và cũng tạo một mã kết thúc sớm tại codon 2206 (p.P2029fs*177) (Bảng 3.5, trang 68). Đây là một biến thể đã biết và được báo cáo là gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000418654), có liên quan đến các trường hợp RDEB [139, 140]. Sự tương đồng kết quả được chỉ ra khi kiểm chứng lại bằng giải trình tự Sanger, đồng thời cho thấy hai biến thể này lần lượt được di truyền từ bố (c.2858_2859delAG) và mẹ (c.6081delC) của người bệnh (Hình 3.7). Biến thể c.2858_2859delAG (p.E953fs*8) được đề xuất xếp vào nhóm biến thể “gây bệnh” dựa theo tiêu chí phân loại của ACMG (Bảng 2.3 và Bảng 2.4, trang 56-57) với một minh chứng rất mạnh (PVS1), hai minh chứng trung bình (PM3, PM4) và hai minh chứng định hướng (PP1 và PP4) (Bảng 3.5, trang 68).



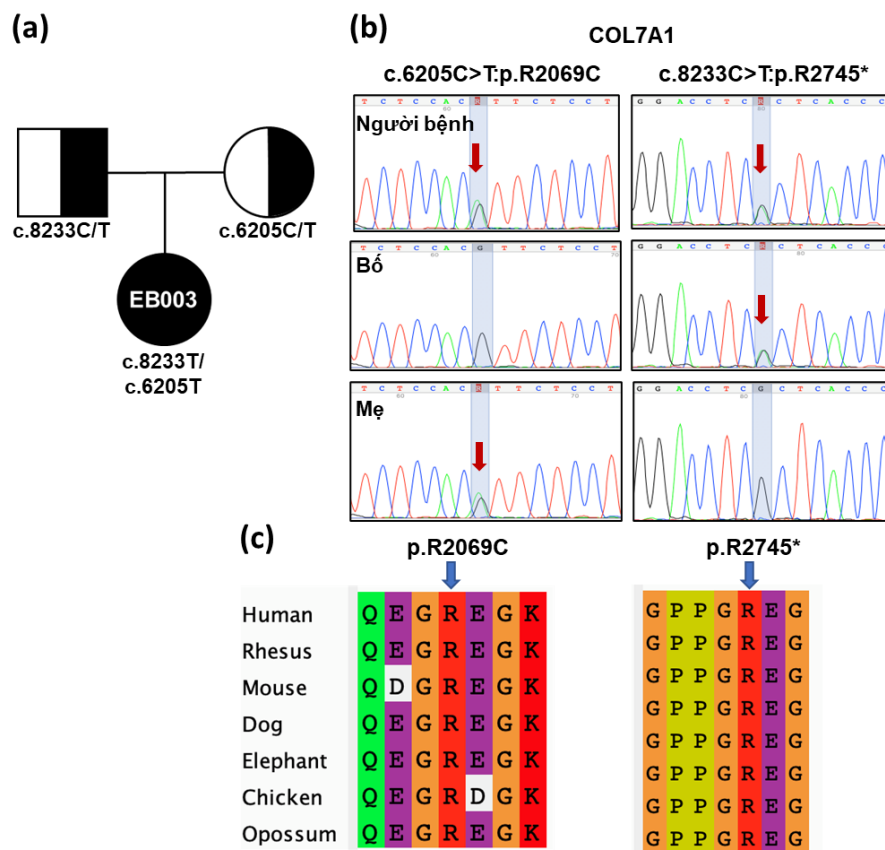
Hình 3.7. Dị hợp tử phức đơn COL7A1 c.2858_2859delAG và c.6081delC phát hiện ở gia đình người bệnh EB002

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh EB001, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/nửa đen biểu thị người bệnh/người mang biến thể. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh và bố mẹ. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

Người bệnh EB003 và hai anh em người bệnh EB004, EB005

Sự kết hợp hai biến thể dị hợp tử, bao gồm 1 biến thể vô nghĩa tạo mã kết thúc và một biến thể sai nghĩa được tìm thấy ở người bệnh EB003 và hai anh em EB004 và EB005. Người bệnh EB003 mang hai biến thể c.6205C>T và c.8233C>T, cả hai biến thể này đều được công bố trên cơ sở dữ liệu của dbSNPs với ID lần lượt là rs121912855 và rs768202310 (Bảng 3.5, trang 68). Biến thể c.6205C>T làm thay

đổi axit amin arginine thành cysteine tại vị trí codon 2069 (p.R2069C), đồng thời biến thể này được báo cáo là gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000017463) và được tìm thấy trên nhóm người bệnh RDEB. Cả hai biến thể tìm thấy ở người bệnh EB003 được kiểm chứng lại bằng giải trình tự Sanger với kết quả tương đồng với WES. Bên cạnh đó, mỗi biến thể cũng lần lượt được tìm thấy ở trạng thái dị hợp tử khi tiến hành giải trình tự mẫu mẹ (c.6205C>T) và bố (c.8233C>T) của người bệnh (Hình 3.8).

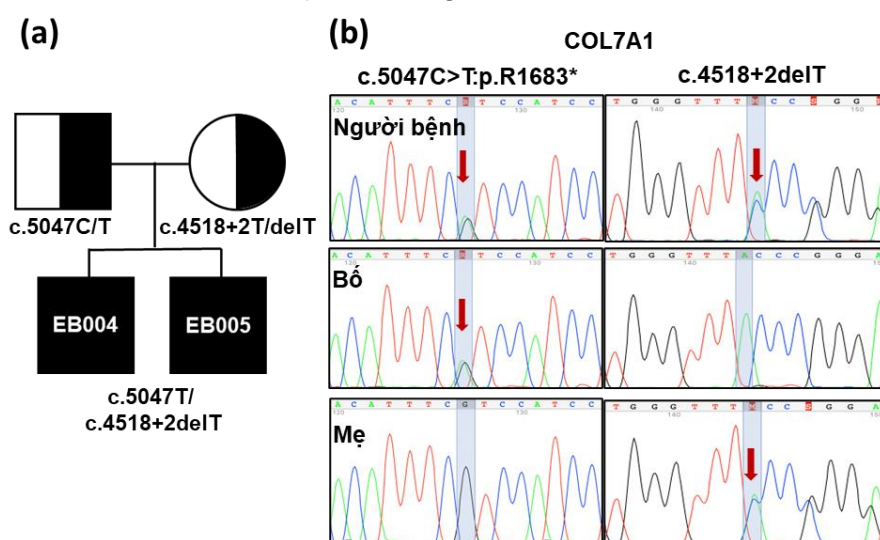


Hình 3.8. Dị hợp tử phức COL7A1 c.8233C>T và c.6205C>T được tìm thấy ở gia đình người bệnh EB003

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh EB003, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/nửa đen biểu thị người bệnh/người mang biến thể. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh và bố mẹ. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ. (c) Thay đổi axit amin nằm ở vị trí bảo thủ, được đánh dấu bằng mũi tên màu xanh.

Người bệnh EB004 và EB005 là anh em trai, cùng mang hai biến thể dị hợp tử c.4518+2delT trên intron 43 và c.5047C>T trên exon 54 gen COL7A1. Kết quả giải trình tự Sanger chỉ ra cả 2 anh em cùng nhận 2 biến thể c.4518+2delT và c.5047C>T lần lượt từ mẹ và bố (Hình 3.9). Trong đó, biến thể ảnh hưởng đến mô hình cắt nối thông thường c.4518+2delT là biến thể mới, chưa được công bố trên

bất kỳ cơ sở dữ liệu nào trước đó. Căn cứ theo hướng dẫn phân loại biến thể gây gây bệnh/lành tính của ACMG (*Bảng 2.3* và *Bảng 2.4*, trang 56-57), biến thể này được xếp vào nhóm biến thể “gây bệnh” bao gồm các minh chứng PVS1, PM2, PP1, PP3 và PP4. Biến thể mới c.4518+2delT đã được nhóm nghiên cứu khai báo lên cơ sở dữ liệu biến thể LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/individuals/00432473>). Biến thể c.5047C>T là một biến thể vô nghĩa, tạo mã kết thúc tại vị trí codon 1683 tương ứng trên trình tự axit amin (p.R1683*). Biến thể này là một biến thể đã biết, có trong cơ sở dữ liệu của dbSNPs (rs587780490) và là một biến thể gây bệnh được báo cáo trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000130673) (*Bảng 3.5*, trang 68).



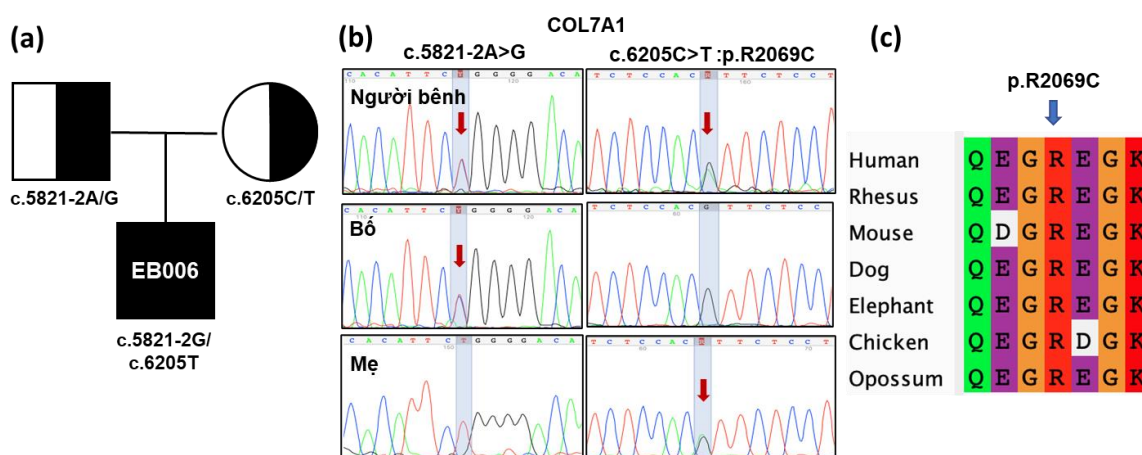
Hình 3.9. Dị hợp tử phức COL7A1 c.5047C>T và c.4518+2delT được tìm thấy ở gia đình anh em người bệnh EB004 và EB005

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh EB004 & EB005, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/nửa đen biểu thị người bệnh/người mang biến thể. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh và bố mẹ. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

Người bệnh EB006

Sự kết hợp của hai biến thể dị hợp tử bao gồm một biến thể ảnh hưởng đến mô hình cắt nối thông thường (c.5821-2A>G) và một biến thể sai nghĩa (c.6205C>T) được tìm thấy ở người bệnh EB006. Kiểm chứng bằng giải trình tự Sanger chỉ ra kết quả tương đồng với phân tích WES với dị hợp tử phức COL7A1 c.5821-2A>G và c.6205C>T được xác định ở người bệnh EB006. Trong đó, biến thể c.5821-2A>G được di truyền từ bố và biến thể c.6205C>T được di truyền từ mẹ (*Hình 3.10*). Biến thể c.5821-2A>G là một biến thể mới trong khi biến thể

c.6205C>T là biến thể gây bệnh đã biết (rs121912855, VCV000017463) dẫn đến thay thế axit amin arginine thành cystein tại vị trí codon 2069 trên chuỗi polypeptide. Biến thể c.6205C>T (p.R2069C) cũng là biến thể được tìm thấy ở trường hợp người bệnh EB003 trước đó (Bảng 3.5, trang 68). Dựa theo tiêu chí phân loại biến thể gây bệnh/lành tính của ACMG (Bảng 2.3 và Bảng 2.4, trang 56-57), biến thể *COL7A1* c.5821-2A>G được đề xuất xếp vào nhóm biến thể “có khả năng gây bệnh” với một minh chứng mạnh (PM2) và ba minh chứng định hướng (PP1, PP3 và PP4) được xác định (Bảng 3.5, trang 68). Ngoài ra, biến thể mới này đã được nhóm nghiên cứu khai báo lên cơ sở dữ liệu biến thể LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/individuals/00432531>).



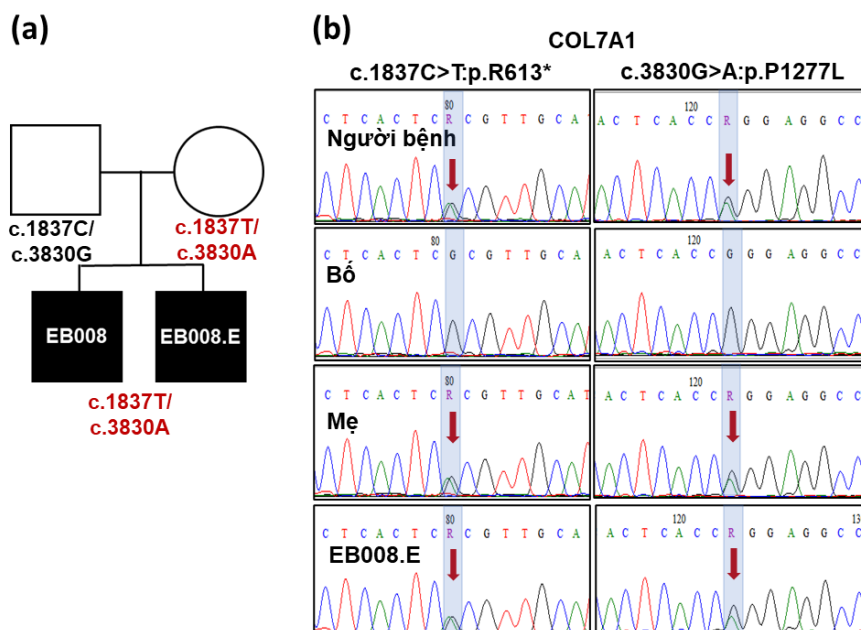
Hình 3.10. Dị hợp tử phức *COL7A1* c.5821-2A>G và c.6205C>T được tìm thấy ở gia đình người bệnh EB006

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh EB006, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/nửa đen biểu thị người bệnh/người mang biến thể. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh và bố mẹ. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ. (c) Thay đổi axit amin nằm ở vị trí bảo thủ, được đánh dấu bằng mũi tên màu xanh.

Người bệnh EB008

Người bệnh EB008 và em trai (EB008.E) đều được chẩn đoán mắc ly thượng bì bóng nước. Kết quả phân tích WES mẫu EB008 đưa ra 2 biến thể dị hợp tử ứng viên nằm trên gen *COL7A1* là c.1837C>T (p.R613*) và c.3830G>A (p.P1277L) có thể là nguyên nhân dẫn đến bệnh. Cả hai biến thể này đều được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNP với mã số lần lượt là rs759634066 và rs35761247 (Bảng 3.5, trang 68), và biến thể c.3830G>A (p.P1277L) là một biến thể lành tính, đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu ClinVar với mã số VCV000255109.16. Giải trình tự Sanger ở cả

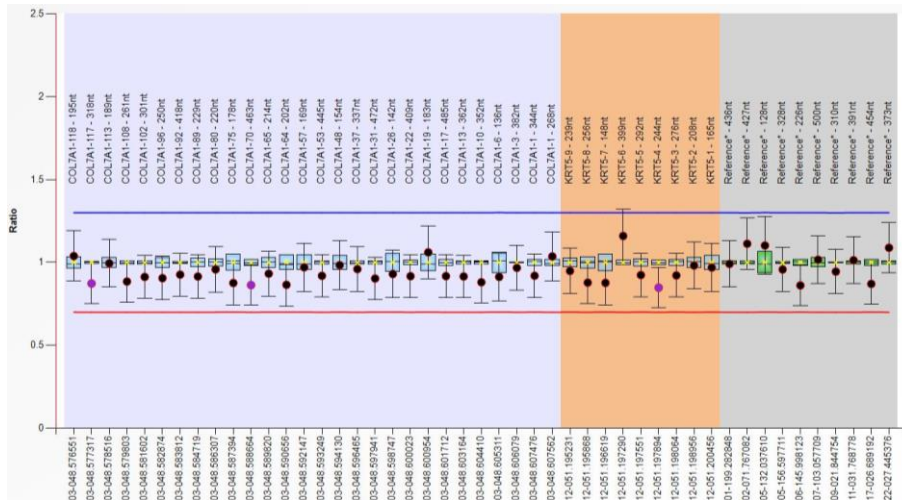
mẫu người bệnh và thành viên gia đình cho thấy cả hai biến thể này đều được tìm thấy ở hai anh em và người mẹ ở trạng thái dị hợp tử; bố người bệnh không mang biến thể nào (Hình 3.11). Như vậy, chưa kết luận được đây là hai biến thể nguy cơ do không chỉ ra được mô hình di truyền phù hợp (di truyền lặn nhiễm sắc thể thường). Thêm vào đó, mặc dù cùng mang hai biến thể c.1837C>T và c.3830G>A trên gen *COL7A1* nhưng người mẹ lại không có biểu hiện nào bất thường trong kiểu hình.



Hình 3.11. Hai biến thể độc lập *COL7A1* c.1837C>T và c.3830G>A được tìm thấy ở gia đình người bệnh EB008

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh EB008, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/trắng biểu thị người bệnh/người khỏe mạnh. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu anh em người bệnh và bố mẹ. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

Với mong muốn tìm ra căn nguyên di truyền trong trường hợp này, phân tích MLPA được thực hiện trên hai mẫu người con (EB008 và EB008.E) để xác định các mất đoạn lớn gen *COL7A1* mà WES không phát hiện được do hạn chế trong phân tích CNV. Tuy nhiên, kết quả MLPA cho thấy không phát hiện được bất thường nào về số lượng bản sao ở hai anh em người bệnh EB008 và EB008.E (Hình 3.12). Dựa theo tiêu chí phân loại biến thể của ACMG (Bảng 2.3 và Bảng 2.4, trang 56-57) căn cứ trên kết quả về kiểu gen, kiểu hình và tham khảo mô hình di truyền, minh chứng PVS1 được xác định đối với biến thể *COL7A1* c.1837C>T (p.R613*), do đó đề xuất xếp biến thể này vào nhóm biến thể “không chắc chắn” về khả năng gây bệnh (Bảng 3.5, trang 68).

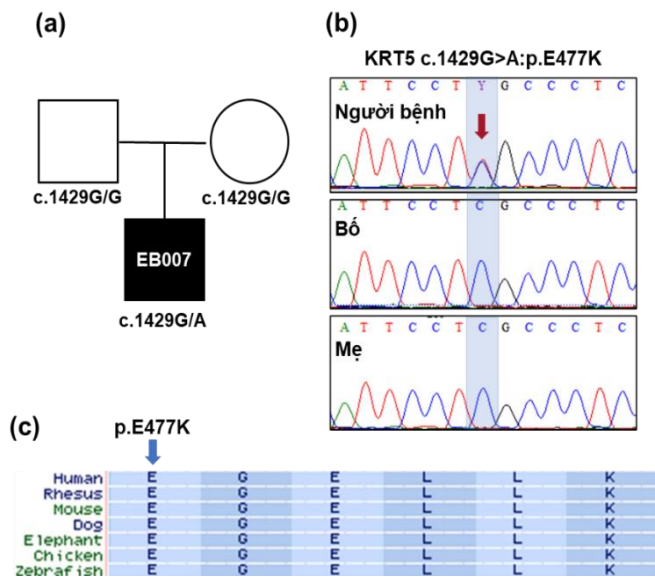


Hình 3.12. Kết quả phân tích MLPA người bệnh EB008 và em trai EB008.E không có gì bất thường.

Vùng màu tím nhạt/cam/xám lần lượt biểu thị các probe gen COL7A1, KRT5 và tín hiệu chuẩn. Các nốt tròn biểu thị tín hiệu nhận diện probe. Các đường thẳng màu xanh/đỏ biểu thị đường giới hạn trên/dưới tỉ lệ (ratio) bình thường.

3.4.1.2. Trường hợp EBS mang biến thể gen KRT5

Biến thể duy nhất nằm trên gen KRT5 là biến thể dị hợp tử c.1429G>A được tìm thấy ở người bệnh EB007. Biến thể c.1429G>A dẫn đến thay thế axit glutamic thành lysin tại vị trí codon 477 (p.E477K). Đây là biến thể đã biết, tương ứng với ID rs59190510 trên dbSNPs và được báo cáo là biến thể gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000021174.4) (Bảng 3.5, trang 68). Kết quả giải trình tự Sanger trên mẫu người bệnh và bố mẹ của người bệnh chỉ ra đây là biến thể phát sinh mới (*de novo*) ở người bệnh và không tìm thấy ở cả bố và mẹ (Hình 3.13).



Hình 3.13. Biến thể KRT5 c.1429G>A phát hiện ở gia đình người bệnh EB007

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh EB007. Màu đen/trắng biểu thị các cá thể bị ảnh hưởng/không bị ảnh hưởng. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh và bố mẹ. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ. (c) Sự thay thế axit amin ở vị trí axit glutamic thứ hai (mũi tên màu xanh) nằm trong mô típ bảo thủ nhất (KLLEGE) của sợi trung gian.

Tổng kết lại, thông qua phân tích di truyền, 7/8 trường hợp đã xác định được các biến thể nguyên nhân, liên quan đến kiểu hình bệnh. Dựa vào đó, các phân nhóm của EB đã được chỉ ra một cách chính xác, trong khi nếu chỉ căn cứ theo lâm sàng thì rất khó để phân loại cụ thể (Bảng 3.6).

Bảng 3.6. Chẩn đoán xác định EB dựa trên lâm sàng kết hợp phân tích di truyền

Người bệnh	Phân loại EB	
	Lâm sàng	Phân tích gen
EB001	DEB	DEB
EB002	DEB	DEB
EB003	Chưa rõ	DEB
EB004 & EB005	DEB	DEB
EB006	JEB/ HC Kindler	DEB
EB007	EBS/DEB	EBS
EB008 & EB008.E	Chưa rõ	Chưa rõ (có thể là DEB)

3.4.2. Bạch tạng

Tổng số 13 biến thể nonsynonymous và các indel có tần số nhỏ hơn 0,05% nằm trên 8 gen liên quan đến bạch tạng (*TYR*, *OCA2*, *AP3B1*, *DTNBPI*, *MITF*, *MC1R*, *HPS1* và *HPS4*) được xác định (Bảng 3.7). Mô hình di truyền của bạch tạng da và mắt (OCA) được biết đến là di truyền lặn, do đó tất cả các biến thể không tuân theo mô hình này sẽ bị loại bỏ. Như vậy, xác định được 6 biến thể gây hại, liên quan đến bạch tạng đã được xác định bao gồm 4 biến thể (c.346C>T, c.929insC, c.115T>C và c.559_560insCATTATTATGTGTCAAATTATCCCC) trên gen *TYR* (NM_000372.3) phát hiện ở 5 người bệnh, 1 biến thể (c.2323G>A) trên gen *OCA2* (NM_000275.3) ở 1 người bệnh và 1 biến thể (c.972delC) trên gen *HPS1* (NM_000195) ở 1 người bệnh (Bảng 3.7).

Bảng 3.7. Các biến thể liên quan được tìm thấy ở các người bệnh bạch tạng

Người bệnh	Gen	Exon	Biến thể	Tần số		Loại biến thể	ID (dbSNP/HGMD)	Dự đoán <i>in silico</i>			ClinVar/ACMG†	Kiểu gen	Kiểu di truyền
				1000g	gnomAD			SIFT	Polyphen2	MuTas			
AI001 ^a	TYR (NM_000372.3)	exon1	c.346C>T (p.R116*)	.	2.47×10^{-5}	stopgain	rs61753256	.	.	A	P	het	AR
		exon2	c.929dupC (p.R311Kfs*7)	.	4.95×10^{-5}	FS ins	rs281865527	.	.	.	P	het	AR
	HPS1 (NM_001322492)	exon8	c.775G>A (p.A259T)	0.00179712	0.0008	nonsyn	rs191172528	het	AR
AI002 ^a	TYR (NM_000372.3)	exon1	c.346C>T (p.R116*)	.	2.47×10^{-5}	stopgain	rs61753256	.	.	A	P	het	AR
		exon2	c.929dupC (p.R311Kfs*7)	.	4.95×10^{-5}	FS ins	rs281865527	.	.	.	P	het	AR
AI003 ^b	TYR (NM_000372.3)	exon1	c.115T>C (p.W39R)	.	.	nonsyn	CM100987	D	D	D	LP† (PM2, PM3, PP1-PP4)	hom	AR
	<i>MITF</i> (NM_000248)	exon3	c.302A>G (p.E101G)	0.00179712	0.0002	nonsyn	rs200108255	D	P	D	LB	het	AR
AI004 ^b	TYR (NM_000372.3)	exon1	c.115T>C (p.W39R)	.	.	nonsyn	CM100987	D	D	D	.	hom	AR
	<i>MC1R</i> (NM_002386)	exon1	c.274G>A (p.V92M)	0.0796725	0.0764	nonsyn	rs2228479	T	B	P	B	het	AR
	<i>MITF</i> (NM_000248)	exon3	c.302A>G (p.E101G)	0.00179712	0.0002	nonsyn	rs200108255	D	B	D	LB	het	AR

Người bệnh	Gen	Exon	Biến thể	Tần số		Loại biến thể	ID (dbSNP/HGMD)	Dự đoán <i>insilico</i>			ClinVar/ACMG†	Kiểu gen	Kiểu di truyền
				1000g	gnomAD			SIFT	Polyphen2	MuTas			
A1005	TYR (NM_000372.3)	exon1	c.559_560ins CATTATTATGTGT CAAATTATCCCC (p.G190Cfs*12)	.	.	FS ins	CN1414183	.	.	.	P† (PVS1, PM4, PP1, PP3, PP4)	hom	AR
A1006	OCA2 (NM_000275.3)	exon22	c.2323G>A (p.G775S)	.	8.68×10 ⁻⁶	nonsyn	rs774822330	D	D	D	LP† (PM2, PM3, PP1-PP4)	hom	AR
	HPS4 (NM_152841)	exon11	c.1932G>A (p.M644I)	0.00279553	0.0013	nonsyn	rs146303784	T	B	N	.	het	AR
A1007	HPS1 (NM_000195)	exon11	c.972delC (p.M325Wfs*6)	.	0.0009	FS del	rs281865082	.	.	.	P	hom	AR
	AP3B1 (NM_001271769)	exon16	c.1607T>A (p.V536E)	.	0.8628	nonsyn	rs6453373	T	B	P	B	het	AR
	DTNBP1 (NM_001271669)	exon8	c.931G>A (p.G311S)	.	.	nonsyn	.	T	B	N	.	het	AR
	OCA2 (NM_000275.3)	exon13	c.1363A>G (p.R455G)	0.0009984	0.0003	nonsyn	rs200764804	D	P	D	.	het	AR

†Trong nghiên cứu này; (.) Không có thông tin

Chữ viết tắt: 1000g, Cơ sở dữ liệu 1000 genome; gnomAD, Cơ sở dữ liệu tổng hợp bộ gen; A/D, gây bệnh; B/N/T, lành tính/trung tính; P: đa hình/lành lỉnh (MutTaster); hom, đồng hợp tử; het, dị hợp tử; wt, kiểu dại; nonsyn, non-synonymous; FS del, xoá dịch khung; PVS, gây bệnh rất mạnh; PM, gây bệnh trung bình; PP, gây bệnh định hướng; AD, di truyền trội; AR, di truyền lặn.

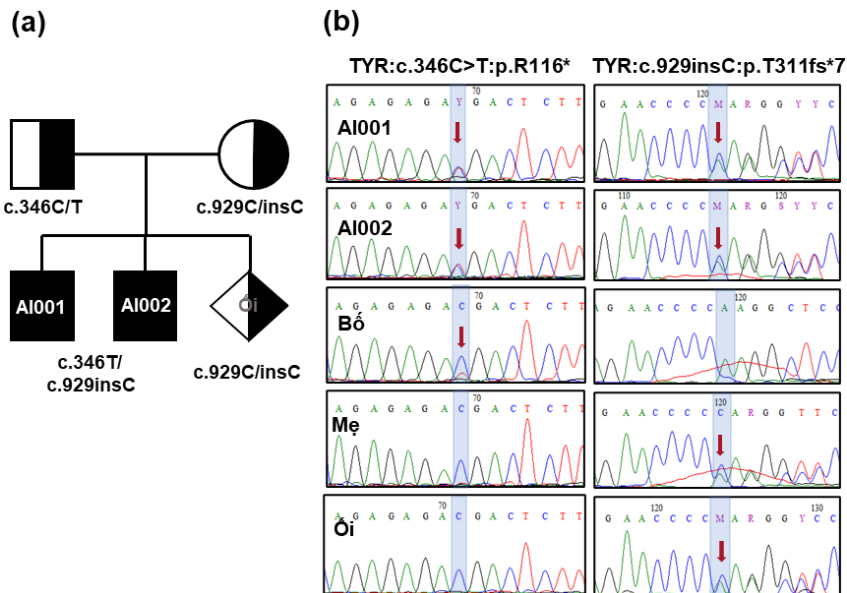
Các biến thể được bôi đậm là những biến thể ứng viên chính cho nguyên nhân gây bệnh

^{a,b} những người bệnh là anh em ruột trong một gia đình.

3.4.2.1. Các trường hợp bạch tạng da và mất mang biến thể gen *TYR*

Người bệnh A1001 và A1002

Người bệnh A1001 và A1002 là hai anh em trai trong cùng một gia đình, phân tích kết quả WES cho thấy cả 2 anh em đều mang 2 biến thể dị hợp tử lần lượt nằm trên exon 1 (c.346C>T) và exon 2 (c.926insC) gen *TYR* (NM_000372.3). Cả 2 biến thể này đều là những biến thể tạo mã kết thúc sớm (PTCs), trong đó biến thể c.346C>T làm thay đổi axit amin arginine thành mã kết thúc phiên mã tại vị trí codon 116 (p.R116*), biến thể c.926insC làm xuất hiện mã kết thúc sớm tại vị trí codon số 7 sau codon 311 (p.R311fs*7) trên trình tự axit amin. Đây đều là những biến thể đã biết, đã được công bố trên các cơ sở dữ liệu mở, đồng thời được báo cáo là gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar, có liên quan đến thể bạch tạng da và mất nhóm 1 (OCA1) (Bảng 3.7, trang 81). Kiểm chứng bằng giải trình tự Sanger chỉ ra sự tương đồng với kết quả WES, trong đó biến thể c.346C>T được di truyền từ bố và biến thể c.926insC được di truyền từ mẹ. Ngoài ra, sàng lọc trước sinh 2 biến thể trên sử dụng giải trình tự Sanger trên mẫu dịch ối (mang thai lần 3) phát hiện biến thể dị hợp tử c.926insC (Hình 3.14). Cũng giống như bố mẹ, em bé sinh ra không có bất kỳ biểu hiện nào của bạch tạng và hiện tại vẫn đang phát triển khỏe mạnh.

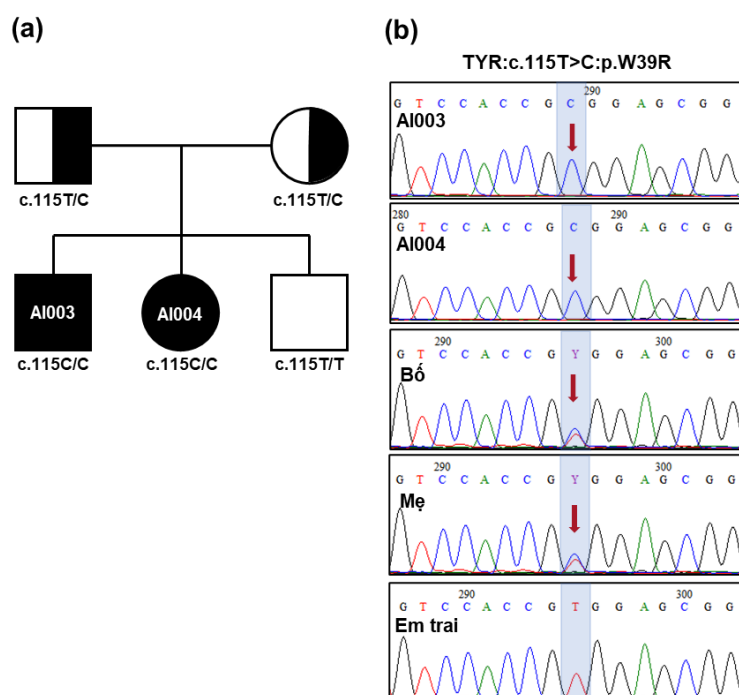


Hình 3.14. Dị hợp tử phức *TYR* c.346C>T và c.926insC được phát hiện ở gia đình người bệnh A1001 và A1002

(a) Sơ đồ phá hệ gia đình người bệnh A1001 và A1002, hình vuông/tròn/thoi biểu thị nam/nữ/chưa xác định giới tính, màu đen/nửa đen biểu thị người bệnh/người mang biến thể. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh, bố mẹ và mẫu dịch ối. Các biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

Người bệnh AI003 và AI004

Người bệnh AI003 và AI004 là hai con đầu trong một gia đình có ba người con, được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt với các biểu hiện lâm sàng đặc trưng liên quan đến màu da, màu tóc và màu mắt và suy giảm thị lực. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa phát hiện biến thể thay thế đồng hợp tử c.115T>C nằm trên exon 1 gen *TYR* (NM_000372.3). Biến thể này gây ra sự thay thế tryptophan thành arginine tại vị trí codon 39 trên chuỗi polypeptide của tyrosinase. Đây là một biến thể đã biết và được báo cáo trên cơ sở dữ liệu đột biến HGMD với mã số CM100987, có liên quan đến thể bạch tạng da và mắt nhóm 1B (OCA1B) (Bảng 3.7, trang 81). Giải trình tự Sanger chỉ ra c.115C>T được tìm thấy ở hai anh em người bệnh, cho thấy sự tương đồng kết quả với phân tích WES, và biến thể này được di truyền đồng thời từ bố và mẹ của người bệnh. Thêm vào đó, kết quả giải trình tự Sanger còn cho thấy người em trai út không mang biến thể này (Hình 3.15). Biến thể *TYR* c.115C>T được đề xuất là biến thể “có khả năng gây bệnh” theo tiêu chí phân loại biến thể của ACMG (Bảng 2.3 và Bảng 2.4, trang 56-57) với hai minh chứng trung bình (PM2, PM3) và bốn minh chứng định hướng (PP1-PP4) (Bảng 3.7, trang 81).

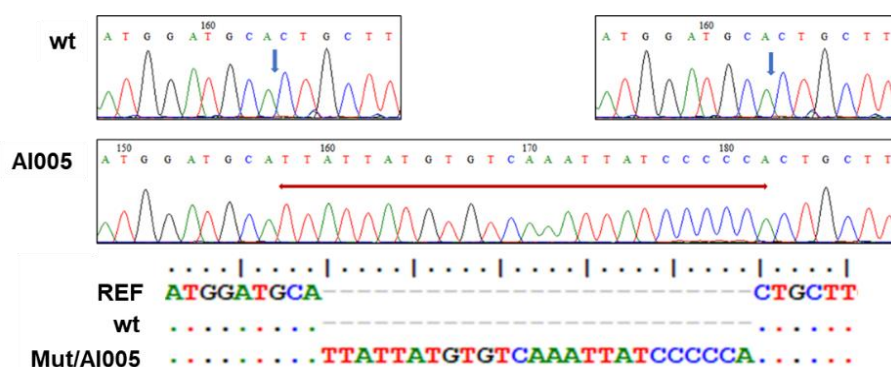


Hình 3.15. Biến thể TYR c.115T>C được phát hiện ở gia đình người bệnh AI003 và AI004

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh AI003 và AI004, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/nửa đen/trắng biểu thị người bệnh/người mang biến thể/người khỏe mạnh. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh, bố mẹ và em trai của người bệnh. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

Người bệnh A1005

Người bệnh A1005 được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa phát hiện biến thể thêm 25 nucleotide (CATTATTATGTGTCAAATTATCCCC) ở trạng thái đồng hợp tử tại vị trí 559_560 trên trình tự mã hóa gen *TYR* (NM_000372). Biến thể này làm thay đổi trình tự axit amin từ vị trí codon 190, đồng thời làm xuất hiện sớm mã bộ ba kết thúc trên trình tự chuỗi polypeptide (p.G190Cfs*12) (Bảng 3.7, trang 81). Đây là biến thể hiếm đã biết, được tìm thấy trước đó ở trạng thái dị hợp tử ở 2 người bệnh bạch tạng loại OCA1A người Trung Quốc vào năm 2014 [141] và 2019 [142], được báo cáo trên cơ sở dữ liệu đột biến HGMD với mã số CN1414183. Như vậy, đây là lần đầu tiên biến thể này được phát hiện ở trạng thái đồng hợp tử. Kiểm chứng lại bằng giải trình tự Sanger cũng chỉ ra kết quả tương đồng với phân tích WES (Hình 3.16). Do đây là người bệnh cao tuổi nên không thu được mẫu bố mẹ, vì vậy chưa xác định được chính xác mô hình di truyền. Tuy nhiên, tham khảo dựa trên 2 người bệnh bạch tạng mang đột biến trước đó thì cả 2 trường hợp đều nhận biến thể này từ bố hoặc mẹ [141, 142], do đó có thể dự đoán cả bố và mẹ của người bệnh A1005 trong nghiên cứu này đều mang biến thể c.559_560ins25 ở trạng thái dị hợp tử và cùng di truyền cho con. Biến thể *TYR* c.559_560ins25 được đề xuất là biến thể “gây bệnh” dựa theo hướng dẫn phân loại của ACMG (Bảng 2.3 và Bảng 2.4, trang 56-57) với một minh chứng rất mạnh (PVS1), một minh chứng trung bình (PM4) và ba minh chứng định hướng (PP1, PP3 và PP4) (Bảng 3.7, trang 81).



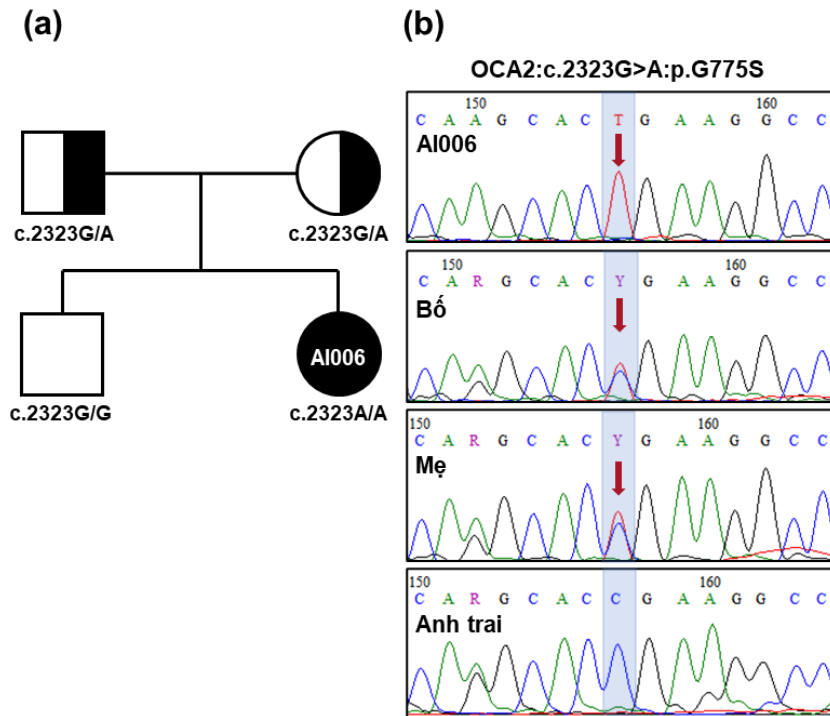
Hình 3.16. Biến thể *TYR* c.559_560ins25 tìm thấy ở người bệnh A1005

Giải trình tự Sanger chỉ ra biến thể (mut) đồng hợp tử *TYR* c.559_560ins25 ở người bệnh A1005 khi so sánh với trình tự chuẩn (REF) và mẫu không mang biến thể. Mũi tên màu xanh chỉ vị trí c.559_560 trên trình tự nucleotide kiểu dại (wt), mũi tên nằm ngang hai chiều màu đỏ đánh dấu vị trí và trình tự 25 nucleotide được thêm vào.

3.4.2.2. Trường hợp bạch tạng da và mắt mang biến thể gen *OCA2*

Người bệnh AI006

Người bệnh AI006 là nữ, là con thứ hai trong gia đình. Bố mẹ và anh trai của người bệnh đều có kiểu hình bình thường, trong khi đó người bệnh được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt. Kết quả phân tích WES cho thấy người bệnh mang biến thể đồng hợp tử c.2323G>A trên exon 22 gen *OCA2* (NM_000275.3), là nguyên nhân dẫn đến sự thay thế glycine tại vị trí 775 thành serine (p.G775S) trên chuỗi polypeptide. Biến thể này là một biến thể hiếm đã biết, được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNPs (rs774822330) với tần số 8×10^{-6} trên GnomAD và 9×10^{-6} trên ExAC (Bảng 3.7, trang 81). Giải trình tự Sanger cho thấy người bệnh nhận cả 2 alen mang biến thể từ bố và mẹ, trong khi đó anh trai của người bệnh lại nhận được hai alen kiểu dại ở trạng thái bình thường (Hình 3.17). Dựa theo hướng dẫn phân loại biến thể của ACMG (Bảng 2.3 và Bảng 2.4, trang 56-57), *OCA2* c.2323G>A được xếp vào nhóm “có khả năng gây bệnh” với các minh chứng PM2, PM3 và PP1-PP4 (Bảng 3.7, trang 81).



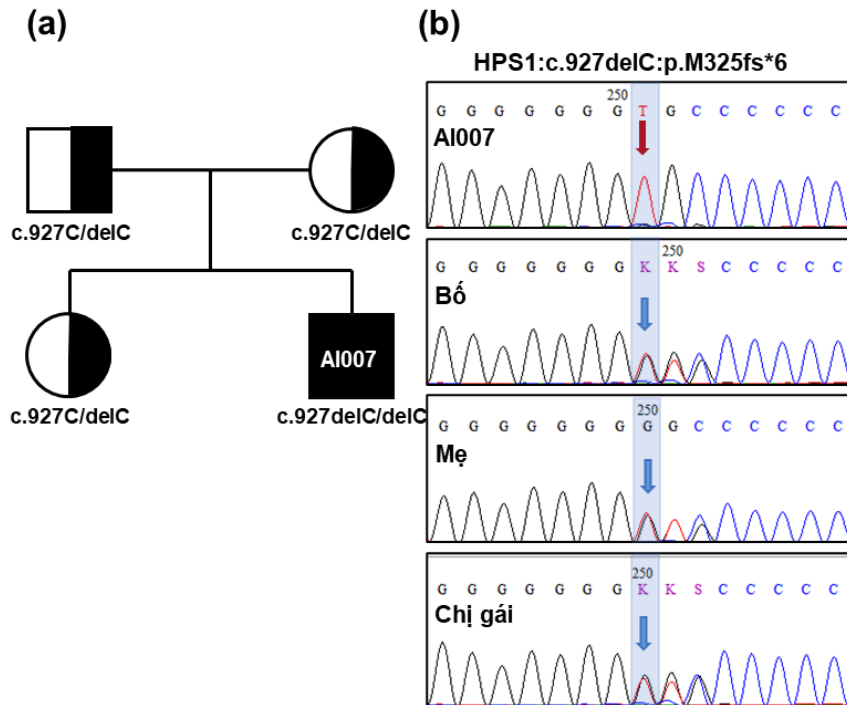
Hình 3.17. Biến thể *OCA2* c.2323G>A tìm thấy ở gia đình người bệnh AI006

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh AI006, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/nửa đen/trắng biểu thị người bệnh/người mang biến thể/người khỏe mạnh. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu người bệnh, bố mẹ và anh trai của người bệnh. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

3.4.2.3. Trường hợp bạch tạng da và mất mắt biến thể gen *HPS1*

Người bệnh A1007

Người bệnh A1007 được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mất mắt. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa phát hiện biến thể đồng hợp tử c.972delC trên exon 11 gen *HPS1* (NM_000195), là nguyên nhân dẫn đến tạo mã kết thúc sớm trên trình tự chuỗi polypeptide (p.M325fs*6). Đây là biến thể đã biết, được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNPs (rs281865082) với tần số trên ExAC là 0,1%, đồng thời biến thể này được báo cáo là biến thể gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000005280.5) và có liên quan đến các trường hợp mắc hội chứng Hermansky–Pudlak, một dạng bạch tạng da và mất mắt thể hiếm (Bảng 3.7, trang 81). Biến thể c.972delC được kiểm chứng lại trên mẫu người bệnh và các thành viên trong gia đình bao gồm bố, mẹ và chị gái sử dụng phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả cho thấy người bệnh mang biến thể đồng hợp tử c.972delC trong khi bố mẹ và anh trai của người bệnh đều mang biến thể này ở trạng thái dị hợp tử và có kiểu hình bình thường. Như vậy, người bệnh đồng thời nhận biến thể này từ cả bố và mẹ và biểu hiện bệnh (Hình 3.18).



Hình 3.18. Biến thể *HPS1* c.972delC tìm thấy ở gia đình người bệnh A1007

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh A1007, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/nửa đen biểu thị người bệnh/người mang biến thể. (b) Giải trình tự Sanger chỉ ra biến thể đồng hợp tử (mũi tên đỏ) *HPS1* c.972delC ở người bệnh và dị hợp tử (mũi tên xanh) ở bố mẹ và chị gái của người bệnh.

Tổng kết lại, toàn bộ 7 người bệnh bạch tạng da và mắt trong nghiên cứu này đều đã xác định được các biến thể nguyên nhân, từ đó các phân nhóm của OCA đã được chỉ ra một cách chính xác. Thông qua phân tích di truyền, 6 người bệnh (A1001-A1006) được xếp vào nhóm OCA không hội chứng và chỉ có duy nhất người bệnh A1007 mắc hội chứng Hermasky-Pudlak (*Bảng 3.8*). Trước đó, dựa trên thăm khám lâm sàng toàn bộ 07 người bệnh đều được chẩn đoán mắc OCA và rất khó để có thể phân loại một cách cụ thể các phân nhóm trong nhóm này.

Bảng 3.8. Chẩn đoán xác định phân nhóm bạch tạng dựa trên lâm sàng kết hợp phân tích di truyền

Người bệnh	Phân loại bạch tạng	
	Lâm sàng	Phân tích gen
A1001 & A1002	OCA	OCA1A
A1003 & A1004	OCA	OCA1B
A1005	OCA1A	OCA1A
A1006	OCA	OCA2
A1007	OCA	HPS

3.4.3. Thiếu sản vành tai

3.4.3.1. Các biến thể hiếm và mới tìm thấy ở người bệnh thiếu sản vành tai

Lượng biến thể và gen có thể liên quan

Dữ liệu phân tích WES của 11 người bệnh thiếu sản vành tai trong nghiên cứu này sau khi sàng lọc trên 27 gen (*Bảng 1.5*, trang 35) được đánh giá có thể là tác nhân gần nhất thì chỉ xác định được một biến thể dị hợp tử duy nhất nằm trên gen *EYA1* (c.922C>T, p.R308*) ở người bệnh Mi002. Mở rộng quy mô sàng lọc trên 428 gen (*Phụ lục 8*) bao gồm toàn bộ các gen biểu hiện trong các cung mang hoặc ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh, di cư và biệt hóa của các tế bào mào thần kinh sọ có thể là nguy cơ trong thiếu sản vành tai dựa theo MGI (Mouse Genomes Informatic, <http://www.informatics.jax.org/>) đã phát hiện được 108 biến thể (MAF < 0,5%) và đều ở trạng thái dị hợp tử bao gồm: 105 biến thể sai nghĩa (biến thể thay thế) chiếm 97%, 2 biến thể dịch khung (FS) chiếm 2% và 1 biến thể vô nghĩa (nonsense/stopgain) chiếm 1%. Trong đó có 27 biến thể mới chưa được tìm thấy trên bất kỳ cơ sở dữ liệu cũng như công bố khoa học nào, bao gồm cả 2 biến thể dịch khung, còn lại đều là các biến

thể sai nghĩa (25 biến thể) (Hình 3.19). Hai biến thể dịch khung mới là *PCDH15* c.5027delA (p.E1676Gfs*128) và *CANT1* c.775dupC (p.H259Pfs*25), lần lượt được tìm thấy ở người bệnh Mi005 và Mi010. Các biến thể dịch khung này tạo mã kết thúc sớm trên phân tử mRNA, dẫn đến hình thành một protein không hoàn chỉnh, ngắn hơn so với thông thường hoặc một protein mất hoàn toàn chức năng sau quá trình dịch mã. Biến thể *EYA1* c.C922T (p.R308*) là biến thể vô nghĩa (tạo mã kết thúc) duy nhất được xác định ở người bệnh Mi002 trong nghiên cứu này. Danh sách chi tiết các biến thể tìm thấy ở từng người bệnh thiếu sản vành tai trong nghiên cứu này được liệt kê trong Phụ lục 9.



Hình 3.19. Loại biến thể và tỉ lệ biến thể xác định được ở 11 người bệnh TSVT

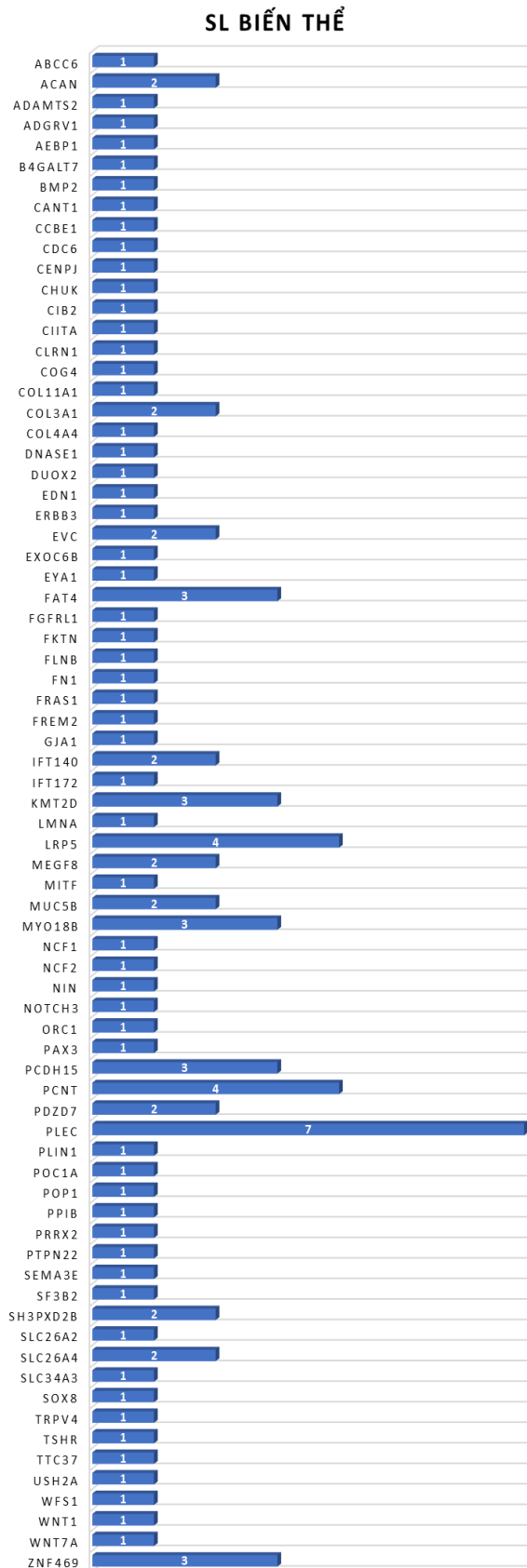
Phân tích chỉ ra các biến thể được tìm thấy nằm trên 74 gen khác nhau, với số lượng biến thể tìm thấy trên mỗi gen dao động từ 1 đến 9 biến thể (Hình 3.20).

Gen *PLEC* là gen phát hiện được nhiều biến thể nhất, với 7 biến thể thay thế lần lượt được tìm thấy ở những người bệnh Mi002 (2 biến thể), Mi003 (2 biến thể), Mi005 (2 biến thể) và Mi011 (3 biến thể); trong đó Mi005 và Mi011 có một biến thể giống nhau.

Hai gen *LRP5* và *PCNT* là những gen cùng phát hiện được 4 biến thể thay thế; trong đó có ba người bệnh gồm Mi003, Mi008 và Mi009 mang cả hai biến thể ở cả hai gen (các biến thể là khác nhau), trong khi Mi005 (*LRP5*) và Mi011 (*PCNT*), mỗi người bệnh lần lượt mang một biến thể của hai gen này.

Năm gen *FAT4*, *MYO18B*, *KMT2D*, *PCDH15* và *ZNF469* là những gen xác định được 3 biến thể, trong đó có 1 biến thể dịch khung gen *PCDH15*, còn lại đều là các biến thể thay thế. Ba biến thể gen *FAT4* được tìm thấy ở người bệnh Mi004 (2 biến thể) và người bệnh Mi008 (1 biến thể). Ba biến thể gen *KMT2D* được tìm thấy ở 2 người bệnh Mi002 (1 biến thể) và Mi006 (2 biến thể). Ba biến thể gen *MYO18B* khác nhau lần lượt được tìm thấy ở ba người bệnh Mi003, Mi006 và Mi011. Ba biến thể gen *PCDH15* được

tìm thấy ở hai người bệnh Mi005 (2 biến thể) và Mi011 (1 biến thể). Ở gen *ZNF469*, ba biến thể khác nhau lần lượt được tìm thấy ở những người bệnh Mi006, Mi007 và Mi011.



Ngoài ra, có 9 gen cùng phát hiện được 2 biến thể thay thế, bao gồm: *ACAN*, *EVC*, *FAT4*, *KMT2D*, *NCF1*, *PCDH15*, *COL3A1*, *IFT140*, *MEGF8*, *MUC5B*, *PDZD7*, *SH3PXD2B* và *SLC26A4*. Như vậy, tổng số có 17/74 gen phát hiện được ít nhất 2 biến thể và tất cả đều được tìm thấy ở những người bệnh thiếu sản vành tai khác nhau, trong đó có 3 gen (*LRP5*, *PCNT* và *PLEC*) được xác định trên 4 người bệnh, 5 gen (*ACAN*, *MYO18B*, *NCF1* và *ZNF469*) tìm thấy ở 3 người bệnh và 9 gen (*COL3A1*, *FAT4*, *KMT2D*, *MEGF8*, *MUC5B*, *PCDH15*, *PDZD7*, *SH3PXD2B* và *SLC26A4*) được xác định ở 2 người bệnh. Sự phân bố của 17 gen này cùng các biến thể tìm thấy ở 11 người bệnh thiếu sản vành tai được biểu thị chi tiết trong *Bảng 3.9* (trang 91). Số gen còn lại (57 gen) được xác định riêng lẻ trên mỗi cá thể bệnh mà không tìm thấy ở những người bệnh thiếu sản vành tai khác trong nghiên cứu.

Hình 3.20. Các gen ứng viên và lượng biến thể tìm thấy ở 11 người bệnh thiếu sản vành tai.

Các gen được sắp xếp lần lượt theo bảng chữ cái và số lượng (SL) biến thể được biểu thị bằng các thanh nằm ngang màu xanh.

Bảng 3.9. Danh sách các gen liên quan cùng được xác định ở ít nhất 2 người bệnh thiếu sản vành tai cùng các biến thể cụ thể

Gen và số lượng người bệnh mang biến thể gen	Mi001	Mi002	Mi003	Mi004	Mi005	Mi006	Mi007	Mi008	Mi009	Mi010	Mi011
ACAN	3		p.N658S p.T1403A	p.T1403A							p.T1403A
COL3A1	2		p.P566L							p.A1045T	
EVC	3	p.R760Q	p.Y780H	p.E681K							
FAT4	2			p.G4362V p.H4601R				p.R4294T			
KMT2D	2	p.P2382S				p.T4110I p.L4575I					
LRP5	4		p.A233V		p.V61M			p.A720T	p.C967F		
MEGF8	2		p.R1142W								p.R1886H
MUC5B	2							p.T4091R		p.T1309M	
MYO18B	3		p.T590M			p.V1011L					p.R2410C
NCF1	3	p.R90H				p.R90H	p.R90H				
PCDH15	2				(p.E1676Gfs*128) (p.E49G)						p.G539R
PCNT	4		p.K2046T					p.E1730G	p.E384K		p.E209Q
PDZD7	2	p.P513L								p.P513L	
PLEC	4	p.A1871T p.R1306C	p.R3660H p.R1999Q		p.D3627N p.Q1737P						p.R1082C p.D3627N p.R2310Q p.R324W
SH3PXD2B	2		p.R613Q								
SLC26A4	2	p.D661E							p.G282R		
ZNF469	3					p.G1344R	p.R3821Q				p.A1156T

In nghiêng đậm: các biến thể giống nhau trên cùng 1 gen

Xác định mô hình di truyền của 74 gen tìm thấy trên 11 người bệnh thiếu sản vành tai

Trong tổng số 74 gen được xác định, 71/74 gen đã biết mô hình di truyền trong khi 3 gen gồm *KMT2D*, *PRRX2* và *ADGRV1* chưa xác định được mô hình di truyền cụ thể. Toàn bộ các gen tìm thấy trong nghiên cứu đều nằm trên nhiễm sắc thể thường, không có gen nào nằm trên nhiễm sắc thể giới tính. Trong đó, có 12 gen được báo cáo xuất hiện cả mô hình di truyền trội và lặn, bao gồm: *ACAN*, *COL3A1*, *LRP5*, *LMNA*, *TSHR*, *ERBB3*, *ABCC6*, *PAX3*, *COG4*, *FLNB*, *COL11A1* và *GJA1*. Các gen có mô hình di truyền trội nhiễm sắc thể thường (14 gen) bao gồm: *IFT140*, *EVC*, *EDN1*, *SEMA3E*, *EYA1*, *BMP2*, *FGFRL1*, *NOTCH3*, *TTC37*, *DNASE1*, *MUC5B*, *SF3B2*, *FN1* và *MITF*. Còn lại 44 gen được báo cáo liên quan đến mô hình di truyền lặn (Bảng 3.10).

Bảng 3.10. Các gen có thể liên quan đến bệnh được tìm thấy ở nhóm người bệnh thiếu sản vành tai và mô hình di truyền của chúng

	Di truyền trội nhiễm sắc thể thường (15 gen)	Di truyền lặn nhiễm sắc thể thường (44 gen)	Mô hình di truyền bao gồm cả trội và lặn (12 gen)	Chưa xác định (3 gen)
Mi001	<i>IFT140</i>	<i>FKTN</i> , <i>POCIA</i> , <i>SLC26A4^a</i> , <i>NCF1^b</i> , <i>NCF2</i>	-	-
Mi002	<i>EVC</i> , <i>EDN1</i> , <i>SEMA3E</i> , <i>EYA1</i>	<i>ORC1</i> , <i>FRAS1</i> , <i>PLEC</i> , <i>PDZD7</i> , <i>NIN</i> , <i>CDC6</i>	-	<i>KMT2D</i>
Mi003	<i>EVC</i> , <i>PLIN1</i> , <i>TRPV4</i> ,	<i>CIB2</i> , <i>PCNT^f</i> , <i>PLEC</i> , <i>WFS1</i> , <i>AEBP1</i> , <i>MEGF8^m</i> , <i>MYO18Bⁿ</i> , <i>POP1</i> , <i>SH3PXD2B^v</i>	<i>ACAN^g</i> , <i>COL3A1ⁱ</i> , <i>LRP5^k</i>	<i>PRRX2</i>
Mi004	<i>EVC^c</i> , <i>BMP2</i> ,	<i>FAT4^q</i> , <i>ADAMTS2</i> , <i>EXOC6B</i> , <i>SLC34A3</i> , <i>BMP2</i>	<i>ACAN^g</i> , <i>LMNA</i> , <i>TSHR</i>	<i>ADGRV1</i>
Mi005	<i>FGFRL1</i>	<i>CHUK</i> , <i>PCDH15^r</i> , <i>PLEC^d</i> , <i>B4GALT7</i> , <i>DUOX2</i>	<i>ERBB3</i> , <i>LRP5^k</i>	-
Mi006	<i>NOTCH3</i>	<i>COL4A4</i> , <i>CENPJ</i> , <i>CIITA</i> , <i>MYO18Bⁿ</i> , <i>NCF1^b</i> , <i>ZNF469^l</i>	<i>ABCC6</i>	<i>KMT2D^e</i>
Mi007	<i>TTC37</i>	<i>PTPN22</i> , <i>ZNF469^l</i>	<i>PAX3</i>	-
Mi008	<i>DNASE1</i> , <i>MUC5B^u</i> , <i>SF3B2</i>	<i>FAT4^q</i> , <i>PCNT^f</i> , <i>WNT7A</i>	<i>LRP5^k</i>	-
Mi009	<i>FN1</i>	<i>CLRN1</i> , <i>PCNT^f</i> , <i>SLC26A4^a</i> , <i>USH2A</i> , <i>SLC26A2</i>	<i>COG4</i> , <i>FLNB</i> , <i>LRP5^k</i>	-
Mi010	<i>MUC5B^u</i>	<i>PDZD7</i> , <i>CANT1</i> , <i>IFT172</i> , <i>PPIB</i>	<i>COL3A1ⁱ</i>	-
Mi011	<i>MITF</i>	<i>FREM2</i> , <i>PCDH15^r</i> , <i>PCNT</i> , <i>PLEC</i> , <i>CCBE1</i> , <i>MEGF8^m</i> , <i>MYO18Bⁿ</i> , <i>SH3PXD2B^v</i> , <i>WNT1</i> , <i>ZNF469^l</i>	<i>COL11A1</i> , <i>ACAN^g</i> , <i>GJA1</i>	-

a,e,f,i,m,n,q,r,s,u,v các gen liên quan được tìm thấy ở 2 mẫu người bệnh,

b,c,h,t các gen liên quan được tìm thấy ở 3 mẫu người bệnh,

d,g,k các gen liên quan được tìm thấy ở 4 mẫu người bệnh.

Đánh giá ảnh hưởng của các biến thể dựa trên phân tích in silico

Để đánh giá mức độ ảnh hưởng của các biến thể đến chức năng của protein, tập hợp 9 công cụ online tích hợp trong ANNOVAR được sử dụng, bao gồm: SIFT/PolyPhen/LRT/MutationTaster/MutationAssessor/FATHMM/PROVEAN/MetaSVM/MetaLR. Trong tổng số 108 biến thể thì chỉ có duy nhất 8 biến thể được đánh giá là lành tính trên tất cả các công cụ phân tích (*Phụ lục 9*). Còn lại 100 biến thể được đánh giá là có ảnh hưởng có hại trên tối thiểu một công cụ dự đoán (số lượng công cụ dự đoán gây hại càng nhiều thì mức độ tin cậy càng cao) hoặc đã được báo cáo là gây bệnh/có khả năng gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar.

Sau khi phân tích *in silico* dự đoán mức độ ảnh hưởng, tất cả các biến thể được đánh giá là gây hại/có khả năng gây hại trên ít nhất 5 công cụ dự đoán bên cạnh các biến thể dịch khung và biến thể tạo mã kết thúc tiếp tục được sàng lọc để đánh giá tiếp. Sau quá trình sàng lọc, tổng số có 47 biến thể đáp ứng tiêu chí trên nằm trên 45 gen khác nhau; trong đó chỉ có 2 biến thể đã được báo cáo là gây bệnh (*EYAI* p.R308*) và có khả năng gây bệnh (*ABCC6* p.R1235W) trên cơ sở dữ liệu ClinVar. Ngoài ra, trong số 47 biến thể nguy cơ được sàng lọc thì chỉ có hai biến thể gen *NCF1* p.R90H và *PLEC* p.D3627N cùng được xác định ở những người bệnh khác nhau, còn lại, mỗi biến thể chỉ tìm thấy trên một người bệnh mà không xuất hiện ở những người bệnh khác. Mặt khác, số lượng các biến thể ứng viên được tìm thấy trên mỗi người bệnh cũng khác nhau, dao động từ 2 đến 8 biến thể được xác định; trong đó Mi011 là người bệnh mang nhiều biến thể nhất. Toàn bộ 47 biến thể nguy cơ tìm thấy ở 11 người bệnh thiếu sản vành tai được liệt kê chi tiết trong *Bảng 3.11*.

Bảng 3.11. Các biến thể gây hại/có thể gây hại trên 11 người bệnh thiếu sản vành tai

STT	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2	Polyphen2	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta	Meta	CVr		
						HDIV	HVAR				SVM	LR										
1	Mi001	FKTN (NM_001351498)	exon5	c.559G>A (p.G187S)	nonsyn	.	.	.	het	D	D	D	D	D	M	D	N	D	D	.		
2		POC1A (NM_001161580)	exon3	c.215C>T (p.S72L)	nonsyn	.	0.0002	rs746676896	het	T	D	P	D	D	L	D	D	D	D	D	.	
3		SLC26A4 (NM_000441)	exon17	c.1983C>A (p.D661E)	nonsyn	0.000399	0.0001	rs199588131	het	D	D	D	D	D	M	D	D	D	D	D	D	.
4		NCF1 (NM_000265)	exon4	c.269G>A (p.R90H) [#]	nonsyn	.	0.001	rs201802880	het	D	B	B	D	D	M	D	D	D	D	D	D	.
5		NCF2 (NM_000433)	exon2	c.232G>A (p.G78R)	nonsyn	.	.	.	het	D	D	D	D	D	M	T	D	D	D	D	D	.
6	Mi002	EYA1 (NM_000503)	exon10	c.922C>T (p.R308*)	stopgain	.	.	rs121909195	het	.	.	.	D	A	P	
7		PLEC (NM_201378)	exon31	c.5611G>A (p.A1871T)	nonsyn	0.008786	0.0044	rs201070741	het	T	D	D	U	D	L	D	N	D	D	D	.	
8	Mi003	PRRX2 (NM_016307)	exon4	c.706C>T (p.R236C)	nonsyn	0.0002	0.0002	rs202233874	het	D	D	D	D	D	L	D	D	PRO	D	D	.	
9		ACAN (NM_001135)	exon10	c.1973A>G (p.N658S)	nonsyn	.	5.82×10^{-5}	rs370283261	het	D	D	D	N	D	M	T	D	T	T	T	.	
10		COL3A1 (NM_000090)	exon24	c.1697C>T (p.P566L)	nonsyn	0.001198	0.0003	rs150543864	het	T	D	D	N	D	M	D	D	D	D	D	.	
11		MEGF8 (NM_001410)	exon20	c.3424C>T (p.R1142W)	nonsyn	0.002596	0.0011	rs372257661	het	D	D	P	N	D	M	T	D	T	T	T	.	
12		MYO18B (NM_001318245)	exon7	c.1769C>T (p.T590M)	nonsyn	.	9.98×10^{-5}	rs370187232	het	D	D	D	D	D	M	D	D	D	D	D	D	.
13		SH3PXD2B (NM_001017995)	exon13	c.1838G>A (p.R613Q)	nonsyn	.	3.27×10^{-6}	rs745393171	het	D	D	P	D	D	M	T	N	T	T	T	.	
14		TRPV4 (NM_147204)	exon4	c.760G>C (p.V254L)	nonsyn	0.000399	0.0002	rs143548402	het	D	D	D	D	D	M	T	D	D	D	T	.	
15	Mi004	EVC (NM_001306090)	exon14	c.2041G>A (p.E681K)	nonsyn	0.001797	0.0001	rs201877358	het	D	D	P	D	D	M	T	N	T	T	T	.	
16		FAT4 (NM_001291285)	exon17	c.13085G>T (p.G4362V)	nonsyn	0.001797	0.0006	rs199797338	het	T	D	D	U	D	L	D	N	D	D	D	.	
17		SOX8 (NM_014587)	exon3	c.796A>G (p.I266V)	nonsyn	0.000399	7.64×10^{-5}	rs545677635	het	T	P	P	D	D	H	T	N	D	D	D	.	
18		LMNA (NM_170708)	exon10	c.1628C>T (p.S543L)	nonsyn	.	0.0001	rs60890628	het	D	P	B	N	A	M	D	N	D	D	D	.	

STT	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2	Polyphen2	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta	Meta	CVr	
						HDIV	HVAR				SVM	LR									
19	Mi005	PCDH15 (NM_001142767)	exon31	<i>c.5027delA (p.E1676Gfs*128)</i>	FS del	.	.	.	het
20			exon3	c.146A>G (p.E49G)	nonsyn	0.000599	0.0001	rs184026653	het	D	P	B	.	D	L	T	D	T	T	.	
21		PLEC (NM_201378)	exon32	<i>c.10879G>A (p.D3627N)^c</i>	nonsyn	0.000399	0.0001	rs146233901	het	T	D	D	U	D	M	T	N	D	D	.	
22			exon31	<i>c.5210A>C (p.Q1737P)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	D	D	U	N	N	D	N	D	D	D	.
23		LRP5 (NM_001291902)	exon9	c.181G>A (p.V61M)	nonsyn	.	$.65 \times 10^{-5}$	rs371615673	het	D	P	P	U	D	M	D	N	D	D	D	.
24	Mi006	COL4A4 (NM_000092)	exon11	<i>c.661C>T (p.P221S)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	B	B	.	N	M	D	D	D	D	.	
25		ABCC6 (NM_001171)	exon26	c.3703C>T (p.R1235W)	nonsyn	0.0002	3.26×10^{-6}	rs63750402	het	D	D	D	N	D	H	D	D	D	D	LP	
26		NCF1 (NM_000265)	exon4	<i>c.269G>A (p.R90H)^a</i>	nonsyn	.	0.001	rs201802880	het	D	B	B	D	D	M	D	D	D	D	D	.
27		ZNF469 (NM_001127464)	exon2	c.4030G>A (p.G1344R)	nonsyn	0.000399	5.21×10^{-5}	rs368674617	het	D	D	D	.	N	L	T	D	T	T	.	
28	Mi007	NCF1 (NM_000265)	exon4	<i>c.269G>A (p.R90H)^a</i>	nonsyn	.	0.001	rs201802880	het	D	B	B	D	D	M	D	D	D	D	.	
29		PTPN22 (NM_012411)	exon11	c.1071T>A (p.H357Q)	nonsyn	.	.	rs1031818331	het	D	D	D	N	D	M	T	D	T	T	.	
30	Mi008	DNASE1 (NM_005223)	exon5	c.343G>T (p.D115Y)	nonsyn	.	2.05×10^{-5}	rs775559875	het	D	D	D	D	D	H	T	D	T	T	.	
31		SF3B2 (NM_006842)	exon11	<i>c.1219C>G (p.P407A)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	B	B	D	D	L	.	D	T	T	.	
32		WNT7A (NM_004625)	exon3	c.400G>T (p.D134Y)	nonsyn	0.0001997	.	rs546145028	het	D	D	D	D	D	H	T	D	D	D	.	
33	Mi009	SLC26A4 (NM_000441)	exon13	<i>c.1486C>T (p.L496F)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	D	P	N	D	M	D	D	D	D	.	
34		USH2A (NM_206933)	exon52	c.10274G>T (p.C3425F)	nonsyn	.	3.25×10^{-3}	rs200328442	het	D	D	D	D	D	M	T	D	T	T	.	
35		COG4 (NM_001195139)	exon12	c.1624G>T (p.D542Y)	nonsyn	.	$.65 \times 10^{-2}$	rs777169655	het	D	D	P	D	D	M	T	D	T	T	.	
36		FN1 (NM_001306131)	exon32	c.5078T>C (p.M1693T)	nonsyn	0.0001997	5.59×10^{-2}	rs199684110	het	T	P	D	D	D	L	T	D	T	T	.	
37		LRP5 (NM_001291902)	exon23	c.2900G>T (p.C967F)	nonsyn	0.0003994	0.0003	rs147618989	het	D	D	D	U	D	M	D	D	T	T	.	

STT	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2	Polyphen2	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta	Meta	CVr	
						1000g	gnomAD				HDIV	HVAR						SVM	LR		
38		SLC26A2 (NM_000112)	exon3	c.844G>C (p.G282R)	nonsyn	0.0001997	1.12×10 ⁻²	rs571410872	het	D	D	D	D	D	H	D	D	D	D	D	.
39	Mi010	PDZD7 (NM_001195263)	exon10	c.1538C>T (p.P513L)	nonsyn	0.0001997	0.0001	rs572462059	het	T	T	.	
40		CANT1 (NM_138793)	exon3	c.775dupC (p.H259Pfs*25)	FS ins	.	.	.	het	
41		COL3A1 (NM_000090)	exon43	c.3133G>A (p.A1045T)	nonsyn	0.0017971	0.0006	rs149722210	het	T	D	P	N	D	L	D	N	D	D	.	
42		IFT172 (NM_015662)	exon15	c.1513C>T (p.R505W)	nonsyn	.	1.94×10 ⁻²	rs779152335	het	D	D	P	D	D	L	T	D	T	T	.	
43		COL11A1 (NM_080630)	exon58	c.4147C>T (p.P1383S)	nonsyn	0.0001997	0.91×10 ⁻²	rs199952288	het	D	D	D	D	D	L	D	D	D	D	D	.
44	Mi011	FREM2 (NM_207361)	exon16	c.7873C>A (p.R2625S)	nonsyn	0.0001997	0.0002	rs115492820	het	D	D	D	D	D	L	T	D	T	T	.	
45		MITF (NM_000248)	exon3	c.332C>T (p.A111V)	nonsyn	.	2.51×10 ⁻²	rs182533927	het	D	D	P	D	D	L	T	N	T	T	.	
46		PCDH15 (NM_001142767)	exon13	c.1615G>A (p.G539R)	nonsyn	.	.	.	het	T	D	D	.	D	N	T	D	T	T	.	
47		PLEC (NM_201378)	exon26	c.3244C>T (p.R1082C)	nonsyn	0.000599	0.0003	rs533410461	het	D	D	D	U	D	M	T	D	T	T	.	
48			exon32	c.10879G>A (p.D3627N)^c	nonsyn	0.0003994	0.0001	rs146233901	het	T	D	D	U	D	M	T	N	D	D	.	
49		MEGF8 (NM_001410)	exon33	c.5657G>A (p.R1886H)	nonsyn	.	1.13×10 ⁻²	rs771233244	het	D	D	P	D	D	N	T	N	T	T	.	
50		MYO18B (NM_001318245)	exon43	c.7228C>T (p.R2410C)	nonsyn	.	3.28×10 ⁻³	rs763160003	het	D	D	D	N	D	L	D	D	D	D	.	

Mi: thiếu sản vành tai; nonsyn: biến thể thay thế; FS ins: biến thể dịch khung dạng chèn nucleotide; FS del: biến thể dịch khung dạng mất nucleotide; 1000g, Cơ sở dữ liệu 1000 genome; gnomAD, Cơ sở dữ liệu tổng hợp bộ gen; avsnp150, Cơ sở dữ liệu đa hình đơn nucleotide phiên bản 150; het: dị hợp tử; MuTast: Mutation Taster; MuAss: Mutation Assessor; FATH: FATHMM; PRO: PROVEAN; CVr: ClinVar; D/P: có hại, B/N/T: lành tính/trung tính; L: độ ảnh hưởng thấp.

In đậm, các biến thể được phát hiện ít nhất ở 2 người bệnh trở lên.

In nghiêng đậm, các biến thể mới.

^{a,b} chỉ các biến thể phát hiện ở 3 người bệnh.

^c chỉ các biến thể phát hiện ở 2 người bệnh.

3.4.3.2. Phân tích dựa trên mô hình di truyền đơn gen

Căn cứ dựa theo mô hình di truyền trội/lặn của từng gen phát hiện tương ứng trên mỗi người bệnh thiếu sản vành tai (Bảng 3.10), tiến hành lọc các biến thể ứng viên đáp ứng điều kiện này. Kết quả đã xác định được các biến thể ứng viên nguy cơ ở 9/11 người bệnh, ngoại trừ hai người bệnh Mi001 và Mi007 (Bảng 3.12).

Bảng 3.12. Các biến thể ứng viên đáp ứng mô hình di truyền đơn gen

STT	Mã số mẫu	Gen	Mô hình di truyền	Exon	Biến thể	Loại biến thể	dbSNP	Kiểu gen
1	Mi001	Không xác định được						
2	Mi002	EYA1 (NM_000503)	AD	exon10	c.922C>T (p.R308*)	stopgain	rs121909195	het
3	Mi003	TRPV4 (NM_147204)	AD	exon4	c.760G>C (p.V254L)	nonsyn	rs143548402	het
4	Mi004	EVC (NM_001306090)	AD	exon14	c.2041G>A (p.E681K)	nonsyn	rs201877358	het
5		LMNA (NM_170708)	AD	exon10	c.1628C>T (p.S543L)	nonsyn	rs60890628	het
6	Mi005	PCDH15 (NM_001142767)	AR	exon31	c.5027delA (p.E1676Gfs*128)	FS del	.	het
7				exon3	c.146A>G (p.E49G)	nonsyn	rs184026653	het
8		PLEC (NM_201378)	AR	exon32	c.10879G>A (p.D3627N)	nonsyn	rs146233901	het
9				exon31	c.5210A>C (p.Q1737P)	nonsyn	.	het
10		LRP5 (NM_001291902)	AD/AR	exon9	c.181G>A (p.V61M)	nonsyn	rs371615673	het
11	Mi006	ABCC6 (NM_001171)	AD	exon26	c.3703C>T (p.R1235W)	nonsyn	rs63750402	het
12	Mi007	Không xác định được						
13	Mi008	DNASE1 (NM_005223)	AD	exon5	c.343G>T (p.D115Y)	nonsyn	rs775559875	het
14	Mi009	COG4 (NM_001195139)	AD/AR	exon12	c.1624G>T (p.D542Y)	nonsyn	rs777169655	het
15		FN1 (NM_001306131)	AD	exon32	c.5078T>C (p.M1693T)	nonsyn	rs199684110	het
16		LRP5 (NM_001291902)	AD/AR	exon23	c.2900G>T (p.C967F)	nonsyn	rs147618989	het
17	Mi010	COL3A1 (NM_000090)	AD/AR	exon43	c.3133G>A (p.A1045T)	nonsyn	rs149722210	het
18	Mi011	COL11A1 (NM_080630)	AD/AR	exon58	c.4147C>T (p.P1383S)	nonsyn	rs199952288	het
19		MITF (NM_000248)	AD	exon3	c.332C>T (p.A111V)	nonsyn	rs182533927	het
20		PLEC (NM_201378)	AR	exon26	c.3244C>T (p.R1082C)	nonsyn	rs533410461	het
21				exon32	c.10879G>A (p.D3627N)	nonsyn	rs146233901	het

Mi: thiếu sản vành tai; dbSNP: Cơ sở dữ liệu đa hình đơn nucleotide; AD: di truyền trội nhiễm sắc thể thường; AR: di truyền lặn nhiễm sắc thể thường
 Bôi đậm: các biến thể mới
 In nghiêng: biến thể giống nhau.

Trong tổng số 9 người bệnh thiếu sản vành tai xác định được các biến thể gen tuân theo mô hình di truyền thì có 5 người bệnh gồm Mi002, Mi003, Mi006, Mi008 và Mi010, mỗi người bệnh mang một biến thể dị hợp tử trên 5 gen khác nhau tương ứng với mô hình di truyền trội nhiễm sắc thể thường (AD). Các biến thể gen ứng viên tìm thấy ở các trường hợp này lần lượt là *EYAI* p.R308*, *TRPV4* p.V254L, *ABCC6* p.R1235W, *DNASE1* p.D115Y và *COL3A1* p.A1045T. Ngoài 2 biến thể (*EYAI* p.R308*) và (*ABCC6* p.R1235W) đã được xác định là gây bệnh/có khả năng gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar, thì đây đều là các biến thể đã biết và đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNP (Bảng 3.12).

Ở trường hợp người bệnh Mi004, có hai biến thể sai nghĩa dị hợp tử nằm trên 2 gen khác nhau được biết đến với mô hình di truyền trội nhiễm sắc thể thường (AD) được xác định là *EVC* p.E681K và *LMNA* p.S543L. Cả hai biến thể thay thế tìm thấy ở người bệnh Mi004 đều đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNP lần lượt với mã số rs201877358 và rs60890628 (Bảng 3.12).

Ở trường hợp người bệnh Mi005, cả hai mô hình di truyền trội/lặn nhiễm sắc thể thường (AD và AR) đều được chỉ ra với tổng số 5 biến thể ứng viên được xác định (Bảng 3.12). Trong đó, hai dị hợp tử phức (compound heterozygous) gồm *PCDH15* (p.E1676Gfs*128 và p.E49G) và *PLEC* (p.D3627N và p.Q1737P) liên quan đến mô hình di truyền lặn nhiễm sắc thể thường. Biến thể dị hợp tử gen *LRP5* p.V61M được xác định tuân theo mô hình di truyền trội nhiễm sắc thể thường (AD). Trong 5 biến thể ứng viên được chỉ ra thì có 2 biến thể mới là *PCDH15* p.E1676Gfs*128 và *PLEC* p.Q1737P, 3 biến thể còn lại là biến thể đã biết và đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNP (Bảng 3.12).

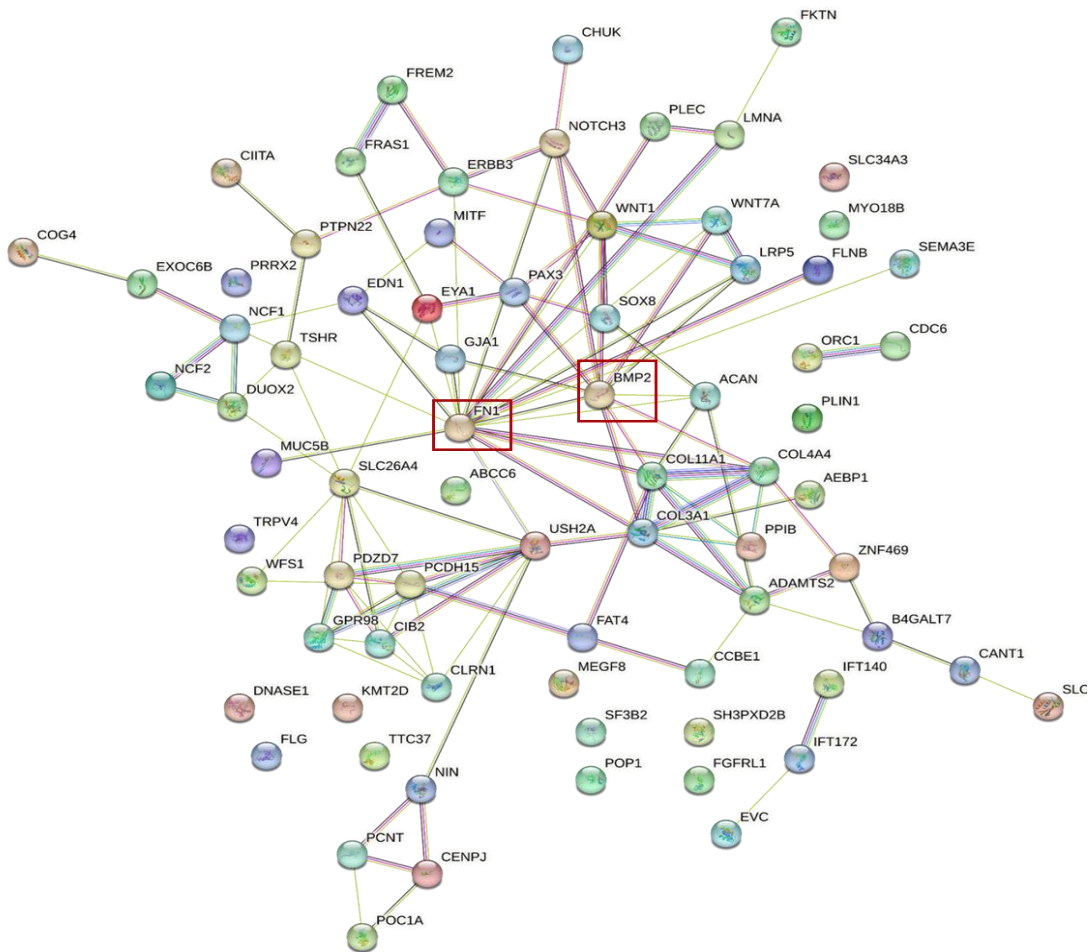
Ở trường hợp Mi009, có 3 biến thể ứng viên liên quan đến mô hình di truyền trội nhiễm sắc thể thường (AD) được xác định, bao gồm: *COG4* p.D542Y, *FNI* p.M1693T và *LRP5* p.C967F. Đây đều là những biến thể đã biết, đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNP với ID lần lượt là rs777169655, rs199684110 và rs147618989 (Bảng 3.12).

Ở người bệnh Mi011, cả hai mô hình di truyền trội/lặn nhiễm sắc thể thường (AD và AR) được chỉ ra với tổng số 4 biến thể ứng viên được xác định. Hai biến thể dị hợp tử độc lập gồm *COL11A1* p.P1383S và *MITF* p.A111V tương ứng với mô hình di truyền trội; trong khi dị hợp tử phức (compound heterozygous) *PLEC* p.R1082C và p.D3627N tương ứng với mô hình di truyền lặn. Ngoài ra, biến thể

PLEC p.D3627N cũng được tìm thấy ở người bệnh Mi005 cùng với một biến thể *PLEC* dị hợp tử khác (p.Q1737P), tạo thành một dị hợp tử phức tạp tuân theo mô hình di truyền lặn nhiễm sắc thể thường (Bảng 3.12).

3.4.3.3. Mạng lưới tương tác protein-protein

Phân tích mạng lưới tương tác protein (PPI) dựa trên 74 gen ứng viên mang các biến thể hiếm ($MAF < 0,5\%$) được sàng lọc trên 11 người bệnh thiếu sản vành tai được thực hiện, mạng lưới bao gồm 74 nút tương ứng với 74 protein và 116 cạnh tương ứng với 116 tương tác protein-protein. Trong đó với FN1 và BMP2 là hai protein trung tâm với lượng tương tác nhiều nhất (Hình 3.21).



Hình 3.21. Mạng lưới PPI của 74 gen ứng viên có thể liên quan đến thiếu sản vành tai.

Các nút có màu sắc khác nhau biểu thị cho các protein khác nhau. Các tương tác protein-protein được biểu thị bằng các đường thẳng có màu sắc khác nhau, bao gồm:

Tương tác đã biết:

●—● Từ cơ sở dữ liệu được quản lý ●—● Xác định bằng thực nghiệm

Tương tác được dự đoán:

●—● Các gen lân cận ●—● Dung hợp gen ●—● Cùng tác động (gene co-occurrence)

Các tương tác khác:

●—● Khai thác văn bản (textmining) ●—● Cùng biểu hiện ●—● Protein tương đồng

Số tương tác trung bình mà một protein có thể có trong mạng lưới là 3,09; hệ số phân cụm biểu thị cho mức độ kết nối giữa các protein trong mạng lưới hay điểm tin cậy của PPI là 0,45; số tương tác dự kiến là 39 và giá trị P của phân tích PPI là $< 1 \times 10^{-16}$. Các thông số này cho thấy các protein liên quan đến 74 gen ứng viên trong nghiên cứu này tương tác với nhau nhiều hơn một cách đáng kể so với một tập hợp ngẫu nhiên các protein khác có cùng số lượng và mức độ phân bố. Với giá trị của phân tích PPI là rất nhỏ ($< 1 \times 10^{-16}$) cho thấy mức độ tin cậy của dự đoán, biểu thị sự kết nối về mặt sinh học một cách chặt chẽ giữa các protein hay các nhóm protein với nhau.

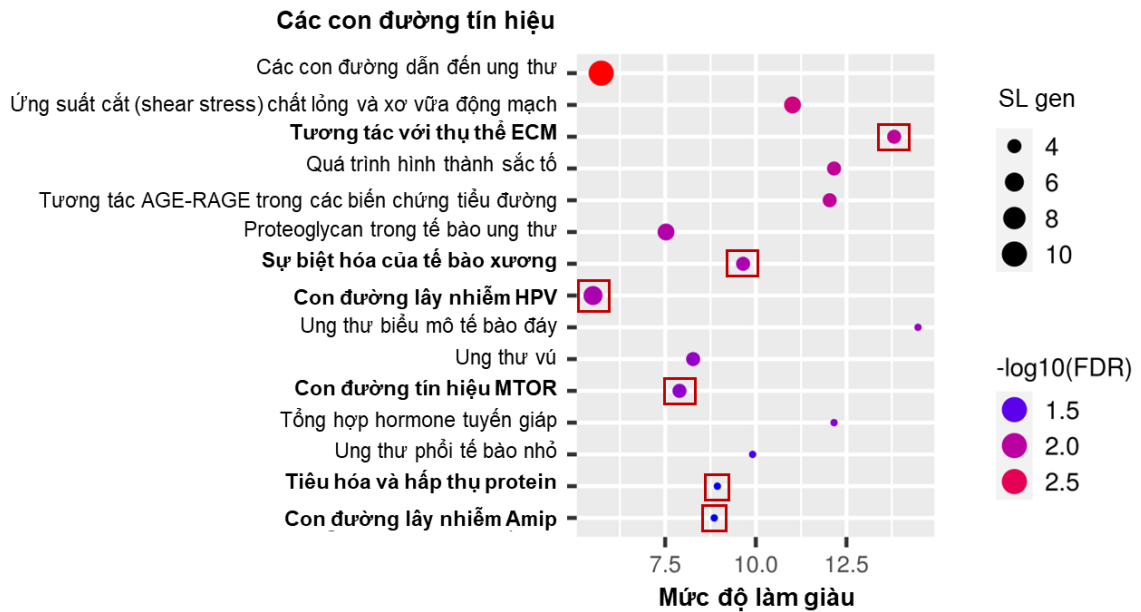
3.4.3.4. Phân tích làm giàu tập hợp gen dựa theo KEGG

Để xác định các con đường tín hiệu có thể được hình thành liên quan đến 74 gen ứng viên được phát hiện trên 11 người bệnh thiếu sản vành tai, phân tích làm giàu tập hợp gen theo KEGG sử dụng cơ sở dữ liệu KEGG PATHWAY được thực hiện. Phân tích chỉ ra có tổng cộng 39 con đường tín hiệu KEGG được phát hiện với chỉ số FDR (false discovery rate) từ 0,0012 đến 0,1825 (Phụ lục 10). Chỉ số FDR càng nhỏ thì điểm làm giàu $S_{KEGG}(g, K_j)$ càng lớn, tương ứng với mức độ liên kết chức năng càng chặt giữa các gen gây bệnh tiềm năng trong con đường tín hiệu đó.

Trong tổng số 39 con đường tín hiệu được xác định, có 16 con đường tín hiệu với chỉ số FDR $< 0,05$ được chỉ ra trong phân tích làm giàu tập hợp gen theo KEGG. Chỉ số FDR $< 0,05$ ($-\log_{10}(FDR) > 1,3$) là ngưỡng “cut-off” để xác định phân tích là đáng tin cậy hay không, FDR càng nhỏ thì phân tích KEGG càng có ý nghĩa. Trong 16 con đường này, có 6 con đường tín hiệu có thể có liên quan đến thiếu sản vành tai, bao gồm: (1) Tương tác với thụ thể ECM, (2) Sự biệt hóa của tế bào xương, (3) Con đường lây nhiễm HPV, (4) Đường dẫn tín hiệu MTOR, (5) Tiêu hóa và hấp thụ protein, và (6) Con đường lây nhiễm Amip (Hình 3.22).

Tổng số 12 gen (*COL4A4*, *FNI*, *FRAS1*, *FREM2*, *EDN1*, *FNI*, *COL3A1*, *NOTCH3*, *WNT1*, *WNT7A*, *CHUK* và *COL11A1*) được chỉ ra, liên quan đến 6 con đường tín hiệu này. Trong đó 4 gen *COL4A4*, *FNI*, *FRAS1* và *FREM2* liên quan đến “Tương tác với thụ thể ECM”; 4 gen *EDN1*, *COL4A4*, *FNI* và *COL3A1* liên quan đến “Sự biệt hóa của tế bào xương”, 6 gen *NOTCH3*, *COL4A4*, *FNI*, *WNT1*, *WNT7A* và *CHUK* liên quan đến “Con đường lây nhiễm HPV ở người”; 4 gen *WNT1*, *WNT7A*, *LRP5* và *CHUK* liên quan đến “Đường dẫn tín hiệu MTOR”; 3 gen *COL11A1*,

COL4A4 và *COL3A1* liên quan đến “Tiêu hóa và hấp thụ protein” và 3 gen *COL4A4*, *FNI* và *COL3A1* liên quan đến “Con đường lây nhiễm Amip” (Phụ lục 8).



Hình 3.22. Biểu đồ phân tán các con đường tín hiệu có ý nghĩa trong phân tích KEGG

Trong đó, mỗi điểm đại diện cho mức độ làm giàu ($FDR < 0.05$), màu sắc tương ứng với giá trị $-\log_{10}(FDR)$ và kích thước tương ứng với số lượng gen được làm giàu trong con đường tín hiệu. Màu đỏ/xanh da trời biểu thị giá trị $-\log_{10}(FDR)$ lớn nhất/nhỏ nhất; giá trị $-\log_{10}(FDR)$ càng lớn, phân tích càng có ý nghĩa. Các con đường tín hiệu có thể liên quan đến thiếu sản vành tai được bôi đậm và các điểm làm giàu tương ứng được đóng khung đỏ.

CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN

4.1. Môi trường quan kiểu gen, kiểu hình ở nhóm người bệnh ly thượng bì bóng nước mang các biến thể gen *COL7A1* và *KRT5*

Như đã biết, ly thượng bì bóng nước (EB) là một rối loạn di truyền về da hiếm gặp và được chia thành 4 phân nhóm chính (EBS, JEB, DEB và hội chứng Kindler) được xác định dựa trên trạng thái hình thành các vết phỏng rộp ở các lớp nhất định của da. Trong đó EBS là phân nhóm chiếm đa số với 75-85% các trường hợp EB [38]. Nguyên nhân dẫn đến ly thượng bì bóng nước được biết đến là do các đột biến gen dẫn đến các khiếm khuyết do di truyền ở các protein bám dính biểu mô và ít nhất 21 gen liên quan đã được mô tả là nguyên nhân dẫn đến bệnh [2]. Trong nghiên cứu này, phân tích WES đã xác định được 13/21 gen có liên quan đến EB (*COL7A1*, *DSP*, *TGM5*, *KRT5*, *KRT14*, *ITGA3*, *ITGB4*, *LAMA3*, *LAMC2*, *PLEC*, *EXPH5* và *DST*). Tuy nhiên, không phải tất cả các biến thể tìm thấy trên các gen này đều là biến thể nguyên nhân/nguy cơ dẫn đến kiểu hình bệnh. Căn cứ vào các tiêu chí về mô hình di truyền (di truyền trội hay di truyền lặn), phân tích ảnh hưởng trên các công cụ *in silico*, báo cáo về mối liên hệ giữa biến thể và kiểu hình trên ClinVar cũng như các nghiên cứu khoa học cụ thể để chỉ ra được đâu là biến thể nguyên nhân.

Các biến thể nằm trên gen *COL7A1* có thể là nguyên nhân dẫn đến bệnh ở các trường hợp EB001, EB002, EB004, EB006 và EB008. Bên cạnh đó, biến thể dị hợp tử nằm trên gen *KRT5* có thể được xem là nguyên nhân dẫn đến bệnh ở người bệnh EB007. Ở trường hợp EB003, ngoài 2 biến thể dị hợp tử *COL7A1* thì có 2 biến thể dị hợp tử nằm trên gen *PLEC* cũng được xem là những biến thể ứng viên căn cứ theo mô hình di truyền. Tuy nhiên, các phân tích *in silico* cũng như báo cáo trên ClinVar chỉ ra 2 biến thể *PLEC* phát hiện được ở người bệnh EB003 là 2 biến thể lành tính, trong khi 2 biến thể *COL7A1* cho các kết quả gây hại (Bảng 3.5, trang 68). Do vậy, ở trường hợp EB003, 2 biến thể dị hợp tử *COL7A1* cũng được xem là nguyên nhân có thể dẫn đến kiểu hình bệnh. Tương tự như vậy, ở trường hợp người bệnh EB005, mặc dù biến thể nằm trên gen *KRT14* có mô hình di truyền phù hợp, tuy nhiên 2/3 công cụ phân tích *in silico* và cơ sở dữ liệu ClinVar chỉ ra đây là một đa hình thông thường và là một biến thể lành tính (Bảng 3.5, trang 68). Mặt khác, 2 biến thể *COL7A1* được tìm thấy ở

người bệnh này đều được dự đoán là những biến thể gây hại trên các công cụ phân tích *in silico* và có 1 biến thể đã được báo cáo là biến thể gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar. Thêm vào đó, 2 biến thể này cũng được tìm thấy và được xem là ứng viên gây bệnh ở trường hợp EB004, là anh trai của người bệnh EB005.

Thông qua quá trình đánh giá và kiểm chứng kết quả phân tích WES dựa trên các phương pháp sinh học phân tử khác thì 8 trường hợp EB trong nghiên cứu này chỉ có 1 trường hợp duy nhất thuộc phân nhóm EBS gây ra bởi một biến thể gen *KRT5* (EB007), 6 trường hợp thuộc phân nhóm DEB gây ra bởi các biến thể gen *COL7A1* và 1 trường hợp chưa kết luận được nguyên nhân gây bệnh (EB008).

Ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng (DEB) là một rối loạn di truyền hiếm gặp được đặc trưng bởi sự mỏng manh trên da dẫn đến hình thành các vết phỏng rộp ở vị trí bên dưới lớp biểu bì, trên lớp hạ bì bởi các ma sát hay chấn thương nhỏ và hình thành sẹo khi lành. Nguyên nhân dẫn đến DEB là do sự xuất hiện của các biến thể gây bệnh ở gen *COL7A1*, là gen mã hóa cho collagen loại VII (COLVII). DEB được chia thành 2 nhóm dựa trên đặc điểm di truyền trội nhiễm sắc thể thường (DDEB) hay di truyền lặn nhiễm sắc thể thường (RDEB). DEB được chẩn đoán dựa trên các biểu hiện lâm sàng và phát hiện các biến thể gây bệnh trên gen *COL7A1*. Cho đến nay, có hơn 800 biến thể di truyền của *COL7A1* có liên quan đến các trường hợp DEB (<http://www.col7a1-database.info>) [143]. Trong số này, hầu hết các trường hợp DDEB được tìm thấy mang các biến thể thay thế glycine nằm trong vùng xoắn ba (THD) Gly-X-Y của COLVII [1, 48]. Ảnh hưởng lâm sàng ở các trường hợp mắc DDEB là tương đối nhẹ khi so với các trường hợp mắc RDEB. Trong DDEB, các vết phỏng rộp thường chỉ xuất hiện ở một số vị trí nhất định như bàn tay, bàn chân, đầu gối, khuỷu tay và tương đối lành tính. RDEB là một rối loạn da di truyền về da nghiêm trọng, đặc trưng bởi các bóng nước lan rộng, hình thành sẹo teo, mụn thịt, loạn dưỡng móng một phần/toàn bộ hoặc không có móng [37]. Trong khi các trường hợp DDEB được chỉ ra bởi hầu hết các biến thể nằm trên exon 73-75 gen *COL7A1* thì ở các trường hợp mắc RDEB, các biến thể gây bệnh lại là các thêm/mất hay thay thế nucleotide và các biến thể ảnh hưởng đến mô hình ghép nối thông thường (splicing) xảy ra ở cả hai alen, dẫn đến hình thành các alen mất chức năng hoặc gây lệch khung đọc mở và tạo ra một protein không chức năng [38, 39, 144]. Trong nghiên cứu này, một biến thể đồng hợp tử và bốn dị hợp tử phức (compound heterozygous) trên gen *COL7A1* đã được tìm

thấy trên 6 người bệnh EB (EB001-EB006). Bên cạnh đó, mỗi biến thể ở trạng thái dị hợp tử cũng được tìm thấy ở bố và mẹ của các bệnh nhân và những người này đều không có biểu hiện bất kỳ triệu chứng bệnh nào, do đó có thể dự đoán mô hình di truyền lặn ở các trường hợp này.

Dị hợp tử phức PTC (c.2858_2859delAG và c.6081delC) được tìm thấy ở người bệnh EB002 với các biểu hiện kiểu hình nghiêm trọng (*Hình 3.1b*, trang 58). Các đặc điểm lâm sàng quan sát thấy bao gồm các vết phỏng rộp lan rộng, sẹo lan, co cứng các ngón và dị dạng bàn chân đặc trưng. Mối tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình chỉ ra rằng các đột biến PTC xảy ra trên cả hai alen của *COL7A1* là kiểu đột biến phổ biến được tìm thấy ở các trường hợp RDEB, đặc biệt là trong các trường hợp RDEB nghiêm trọng (RDEB-GS). Sự kết hợp của hai biến thể loại này là nguyên nhân hình thành protein có hại thông qua cơ chế điều hòa sau phiên mã NMD (nonsense-mediated decay) hoặc tạo ra một chuỗi polypeptide bị cắt ngắn, do đó làm giảm đáng kể hoặc thiếu hoàn toàn collagen loại VII (COLVII) ảnh hưởng đến khả năng bám dính của các sợi neo giữ (AFs) giữa đáy biểu bì với chất nền ngoại bào của da [145]. Trong một số ít trường hợp, RDEB-GS có thể là kết quả của dị hợp tử phức gồm một biến thể PTC và một biến thể sai nghĩa hoặc hai biến thể sai nghĩa [145]. Ở trường hợp gia đình có hai con đều mắc EB (EB004 và EB005), các biểu hiện lâm sàng tương đối nặng được quan sát thấy ở người bệnh bao gồm các bóng nước lan rộng, các vết loét, sẹo trên khắp cơ thể, có biểu hiện dính và co rút ngón tay, ngón chân, đồng thời mất toàn bộ móng ở cả tay và chân (*Hình 3.1d*, trang 58). Các ảnh hưởng nghiêm trọng này có thể do sự kết hợp của một biến thể PTC (p.R1683*) và một biến thể splicing (c.4518+2delT) gen *COL7A1*, được tìm thấy ở cả hai anh em EB004 và EB005. Mặt khác, các biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn quan sát các trường hợp RDEB khác thường tìm thấy sự kết hợp của một biến thể PTC và một biến thể sai nghĩa [146]. Người bệnh EB003 có kiểu hình nhẹ, đặc trưng bởi các vết phỏng rộp ở tay, chân và lưỡi (*Hình 3.1c*, trang 58), phân tích di truyền chỉ ra một dị hợp tử phức bao gồm một biến thể PTC (p.R2745*) và một biến thể sai nghĩa (p.R2069C). Các biến thể khác trên gen *COL7A1* không tạo ra codon tạo mã kết thúc sớm thường biểu hiện với các ảnh hưởng ít nghiêm trọng hơn. Điều này có thể được giải thích ở hai trường hợp EB001 và EB006, với các vết phỏng rộp, vết loét nhẹ và sẹo trên cơ thể (EB001, *Hình 3.1a*, trang 58), giảm sắc tố ở vùng lưng dưới và vùng bẹn, khẩu hình miệng bị hạn chế, cứng

khớp hàm và tổn thương lười (EB006, *Hình 3.1e*, trang 58). Phân tích di truyền cho thấy, một biến thể sai nghĩa ở trạng thái đồng hợp tử dẫn đến thay thế glycine (p.G2760E) trên phân tử protein và một dị hợp tử phức gồm hai biến thể sai nghĩa (c.5821-2A>G và c.6205C>T) lần lượt được phát hiện ở người bệnh EB001 và EB006. Như vậy, có thể thấy, các ảnh hưởng tương quan từ kiểu gen đến kiểu hình được quan sát ở những người bệnh EB trong nghiên cứu này, với sự có mặt của ít nhất một đột biến PTC có liên quan đến những biểu hiện lâm sàng nghiêm trọng nhất, đồng thời cho thấy sự tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố trước đây.

Ba biến thể *COL7A1* mới đã được xác định trong nghiên cứu này dựa trên phân tích dữ liệu WES của 6 người bệnh RDEB (EB001-EB006). Biến thể mới thứ nhất là biến thể đồng hợp tử c.8279G>A dẫn đến thay thế glycine bằng axit glutamic (p.G2760E) trong vùng trình tự mã hoá collagen, gây mất ổn định và ảnh hưởng đến các axit amin quan trọng trong cấu trúc THD. Thêm vào đó, các thay thế glycine đã được báo cáo có ảnh hưởng đến sự suy giảm của COLVII, do đó ảnh hưởng suy yếu đến cấu trúc của các sợi neo giữ AF [147]. Ngoài ra, một biến thể sai nghĩa khác (c.8278G>A) cũng dẫn đến sự thay thế glycine ở vị trí codon 2760 (p.G2760R) đã được báo cáo trước đó với ảnh hưởng có hại [148], do vậy có thể xem biến thể thay thế glycine trong nghiên cứu này (p.G2760E) như một biến thể “*gây bệnh*” dựa theo hướng dẫn phân loại của ACMG. Hai biến thể splicing mới là các biến thể lần lượt nằm ở vị trí donor (c.4518+2delT) và acceptor (c.5281-2A>G) của gen *COL7A1*. Đây là vùng trình tự có độ bảo thủ cao, xác định ranh giới exon/intron bao gồm mô típ GT và AG lần lượt ở đầu 5' và 3' của intron. Các ảnh hưởng đến mô hình ghép nối tại các vị trí +1 và +2 tại donor đầu 5' và các vị trí -1 và -2 tại acceptor đầu 3' được xem là các biến thể cổ điển nhất. Các biến thể xảy ra trong vùng trình tự liên kết chuẩn (canonical splice site) này có thể làm thay đổi tương tác trong mô hình cắt nối tự nhiên của phân tử mRNA loại bỏ các intron trước khi dịch mã thành protein, tạo nên một phân tử protein không hoàn chỉnh hoặc mất chức năng sau quá trình dịch mã. Ảnh hưởng phổ biến nhất gây ra bởi các biến thể tại vùng trình tự liên kết chuẩn này thường là bỏ qua hoàn toàn một exon trong quá trình cắt nối [149]. Ảnh hưởng này cũng là dự đoán *in silico* của phần mềm Alamut Visual cho hai biến thể splicing c.4518+2delT và c.5281-2A>G, cụ thể là bỏ qua một exon trong quá trình cắt nối (*Bảng 3.5*, trang 68). Tuy nhiên, chỉ duy nhất biến thể c.5281-2A>G nằm trên intron 70 được dự đoán là có ảnh hưởng đến quá trình cắt nối trên công cụ HSF (*Bảng 3.5*,

trang 68). Mặc dù dự đoán bằng HSF không chỉ ra ảnh hưởng đến mô hình cắt nối của biến thể c.4518+2delT, biến thể này đã được chứng minh trên mô hình RNA ở hai anh em người bệnh EB004 và EB005 với sự bỏ qua/mất hoàn toàn exon 43 (12 axit amin) nằm trong trung tâm THD bao gồm các trình tự lặp đi lặp lại của bộ ba Gly-X-Y trên COLVII trong quá trình phiên mã và tương đồng với dự đoán *in silico* sử dụng phần mềm Alamut Visual trước đó. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ảnh hưởng của biến thể c.4518+2delT có thể dẫn đến bất hoạt gen *COL7A1* dẫn đến tạo thành một COLVII mất chức năng. Vì RNA của người bệnh EB006 không có sẵn, do đó nên xem xét sử dụng một mô hình khác trong phân tích chức năng của c.5281-2A>G tác động đến mô hình cắt nối tự nhiên của mRNA.

Trường hợp EBS duy nhất gây ra bởi biến thể gen *KRT5* được xác định trong nghiên cứu này là người bệnh EB007. EBS là phân nhóm phổ biến nhất trong EB, do biến thể gen trội trên NST thường ở các gen mã hoá keratine bao gồm *KRT5* và *KRT14*, làm biến đổi phân tử protein, gây ra sự bất ổn định trong cấu trúc cytoskeleton dẫn đến dễ hình thành các tổn thương cơ học tạo ra trong quá trình cọ sát [28, 29]. EBS được chia thành các phân nhóm, được xác định dựa trên mức độ tổn thương tăng dần với các tổn thương khu trú (localized EBS) đến tổn thương lan tỏa (generalized EBS) và cuối cùng là tổn thương lan tỏa nghiêm trọng (generalized severe EBS, GS-EBS), hay còn được biết đến với các tên gọi tương ứng trước đây là Weber-Cockayne, Koebner và Dowling-Meara [38].

Người bệnh EB007 được chẩn đoán mắc EB với các tổn thương tương đối nặng khi sinh, tuy nhiên, các tổn thương này có xu hướng giảm nhẹ và cải thiện theo thời gian khi trẻ lớn lên (Hình 3.1f, trang 58). Phân tích di truyền phát hiện một biến thể dị hợp tử phát sinh mới (c.1429G> A) trên gen *KRT5*, dẫn đến sự thay thế axit amin glutamic bằng axit glycine tại vị trí bảo thủ, codon 477 (p.E477K) trên chuỗi polypeptide. Cho đến nay, bốn biến thể sai nghĩa tại codon 477 trong phân tử protein được mã hóa bởi *KRT5* đã được xác định, với các mức độ nghiêm trọng khác nhau biểu hiện trong kiểu hình. Trong đó, đột biến p.E477G được tìm thấy trong các trường hợp EBS thể khu trú, trong khi p.E477D, p.E477K và p.E477* được xem là nguyên nhân dẫn đến kiểu hình GS-EBS [150-156]. Đặc biệt, biến thể p.E477K có liên quan chặt chẽ đến tỷ lệ tử vong cao ở các trường hợp GS-EBS [155], với ít nhất bảy trường hợp tử vong trong vòng sáu tháng đầu đời được báo cáo trong các nghiên cứu trước đó

[154-157]. Kiểu hình nghiêm trọng do p.E477K gây ra có thể được giải thích do sự thay thế axit glutamic (E) bởi lysine (K) nằm trong chuỗi trình tự axit amin bảo thủ nhất KLLEGE ở đầu C trong vùng 2B của chuỗi xoắn alpha trung tâm, do đó làm phá vỡ cấu trúc của các sợi trung gian hình thành nên các tế bào sừng ở lớp đáy [156, 158]. Mặc dù p.E477K có liên quan đến kiểu hình nghiêm trọng và có khả năng gây tử vong ở các trường hợp GS-EBS, tuy nhiên vẫn có những trường hợp ngoại lệ được báo cáo với các biểu hiện nghiêm trọng khi sinh và trong thời thơ ấu với các tổn thương nặng, lan rộng, được cải thiện khi lớn lên và thường tiến triển với các biểu hiện dày sừng lòng bàn tay và loạn sản móng [154, 155, 157]. Các đặc điểm này cũng được quan sát thấy ở người bệnh EB007 trong nghiên cứu này với sự hiện diện của biến thể *KRT5* p.E477K.

Trường hợp duy nhất không kết luận được biến thể gây bệnh trong nghiên cứu này là trường hợp gia đình người bệnh EB008. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa người bệnh EB008 chỉ ra hai biến thể dị hợp tử trên gen *COL7A1* (p.R613* và p.P1277L), đồng thời hai biến thể này cũng được tìm thấy ở người em trai (EB008.E) với biểu hiện lâm sàng tương đồng và đã được chẩn đoán mắc EB. Biến thể p.P1277L là một biến thể lành tính đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000255109.16), đồng thời giải trình tự Sanger chỉ ra biến thể này cũng được tìm thấy ở mẹ người bệnh cùng với biến thể p.R613* nhưng lại không biểu hiện bệnh. Biến thể p.R613* hình thành mã kết thúc trên chuỗi polypeptide, do đó có thể dẫn đến một protein thiếu hoặc mất chức năng sau quá trình dịch mã. Tuy nhiên, chưa đủ căn cứ để có thể kết luận đây là biến thể nguy cơ dẫn đến kiểu hình bệnh ở hai người con trong gia đình này. Phân tích MLPA cũng không phát hiện thêm bất kỳ biến thể nào liên quan đến thêm/mất đoạn lớn gen *COL7A1*. Do đó, trong trường hợp này nên mở rộng nghiên cứu trên toàn bộ hệ gen hoặc phân tích microarray trong các nghiên cứu xa hơn, giúp mở rộng khả năng phát hiện biến thể gây bệnh.

Các thông tin di truyền hữu ích được xác định thông qua chẩn đoán phân tử trên nhóm người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước trong nghiên cứu này có thể được cung cấp làm cơ sở khoa học phục vụ trong điều trị cũng như tư vấn di truyền phù hợp và tiên lượng lý thuyết tiến triển bệnh trong tương lai.

4.2. Phân tích di truyền giúp chẩn đoán chính xác các phân nhóm bạch tạng mà lâm sàng khó có thể chỉ ra được

Trong nghiên cứu này, cả 7 người bệnh đều được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt (OCA) dựa trên các biểu hiện lâm sàng đặc trưng liên quan đến suy giảm sắc tố ở da, tóc và mắt. Các ảnh hưởng thị lực liên quan đến khả năng nhìn sâu và các tật khúc xạ được quan sát thấy ở 6/7 người bệnh (trừ người bệnh A1006) cho thấy bất thường này là phổ biến. Rung giật nhãn cầu cũng là một biểu hiện lâm sàng thường thấy ở những người bệnh bạch tạng, với 5/7 người bệnh tham gia nghiên cứu có biểu hiện này (A1001-A1005). Thiếu sản hoàng điểm xuất hiện ở 2/7 người bệnh (anh em A1001 và A1002) và các ảnh hưởng đi kèm với nó thường bao gồm giảm thị lực và rung giật nhãn cầu [159, 160] cũng được mô tả. Từ đó, có thể thấy các vấn đề liên quan đến thị lực ở những người bệnh bạch tạng trong nghiên cứu này cũng tương đồng với các phát hiện trước đó.

Chẩn đoán phân tử đã được thực hiện ở 7 người bệnh bạch tạng trong nghiên cứu này thông qua giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa. Phân tích chỉ ra cả 7 trường hợp đều phát hiện các biến thể liên quan đến OCA, bao gồm 5 trường hợp OCA1 (A1001-A1005), 1 trường hợp OCA2 (A1006) và 1 trường hợp liên quan đến hội chứng Hermansky-Pudlak (HPS) (A1007). OCA1 và OCA2 là hai phân nhóm phổ biến nhất của OCA, trong khi đó HPS là một hội chứng hiếm của OCA.

Các biến thể gen *TYR* (NM_000372) là nguyên nhân dẫn đến OCA1 được phát hiện, bao gồm dị hợp tử phức c.346C>T (p.R116*) và c.929insC (p.R311fs*7) ở hai anh em người bệnh A1001 và A1002, hai biến thể đồng hợp tử c.115T>C (p.W39R) và c.559_560ins25 (p.G190Cfs*12) lần lượt được phát hiện ở hai anh em người bệnh A1003, A1004 và người bệnh lớn tuổi A1005. Có hai phân nhóm chính của OCA1 là OCA1A và OCA1B, được phân biệt dựa trên các biểu hiện lâm sàng đặc trưng và đặc biệt liên quan đến dạng biến thể gen *TYR* ảnh hưởng đến khả năng hoạt động của enzyme tyrosinase. Trong khi OCA1A là phân nhóm liên quan đến các biến thể vô nghĩa hoặc các biến thể dịch khung dẫn đến không hình thành hoặc hình thành một tyrosinase mất hoàn toàn chức năng. Ở phân nhóm OCA1B, sự giảm hoạt động của tyrosinase gây ra bởi các biến thể có tác động nhỏ hơn (thường là các biến thể thay thế) cho phép tích tụ một số tế bào sắc tố melanin theo thời gian. Do đó, phân tích di

truyền được xem là một yếu tố quan trọng và cần thiết để chẩn đoán chính xác hai phân nhóm này.

Trong năm trường hợp OCA1 được chỉ ra trong nghiên cứu này, ba người bệnh (A1001, A1002 và A1005) được xếp vào nhóm OCA1A, mang các biến thể gen *TYR* (NM_000372) tạo mã kết thúc sớm (PTC) (p.R116*; p.R311fs*7 và p.G190Cfs*12) ở cả hai alen, là nguyên nhân dẫn đến hình thành một tyrosinase mất chức năng, do đó không sản xuất được melanin trong tế bào hắc tố. Cả ba biến thể này đều là những biến thể đã biết, trong đó c.346C>T (p.R116*) được báo cáo ở những người bệnh Trung Quốc và người da trắng [142, 161, 162]. Biến thể c.929insC (p.R311fs*7) lần đầu tiên được phát hiện vào năm 1989 trên một người bệnh ở Nhật [67]. Các nghiên cứu sau này chỉ ra c.929insC (p.R311fs*7) khá phổ biến ở nhóm OCA1A người Trung Quốc [162-165] và một số nước Tây Á khác như Nhật Bản và Hàn Quốc [166-168]. Đặc biệt, trong ba biến thể *TYR* (NM_000372) liên quan đến OCA1A được xác định trong nghiên cứu này thì c.559_560ins25 (p.G190Cfs*12) là một biến thể tương đối hiếm. Theo hiểu biết của nhóm nghiên cứu thì người bệnh A1005 là trường hợp thứ tư mang biến thể này và là ca bệnh đầu tiên được tìm thấy không phải là người Trung Quốc [141, 142, 165]. Ở trường hợp gia đình có 2 con cùng bị bạch tạng (A1001 và A1002), tư vấn di truyền đã được thực hiện trong lần mang thai thứ ba của người mẹ, em bé sinh ra hoàn toàn khỏe mạnh và không có biểu hiện bất thường nào của OCA. Từ đó cho thấy sàng lọc trước sinh ở các cặp vợ chồng có nguy cơ là khả thi và có hiệu quả.

Các ảnh hưởng lâm sàng ở người bệnh OCA1A được đặc trưng bởi màu da và màu tóc trắng, trông mắt màu xanh lam đến hồng và hoàn toàn trong mờ. Rung giật nhãn cầu có thể xuất hiện khi mới sinh hoặc có thể phát triển trong 3 đến 4 tháng đầu đời. Thị lực dao động từ 20/100 đến 20/400 và thường xuất hiện lác xen kẽ. Giảm thị lực có liên quan đến thiếu sản hoàng điểm, đồng thời chứng sợ ánh sáng là khá phổ biến ở các trường hợp này [59, 169]. Cả 3 người bệnh OCA1A (A1001, A1002 và A1005) trong nghiên cứu này đều có màu da và màu tóc trắng, mắt xanh, cận thị từ 0,5-14 diop, đều có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng và rung giật nhãn cầu. Riêng hai anh em A1001 và A1002 có thêm biểu hiện của thiếu sản hoàng điểm. Như vậy, có thể thấy mối tương quan chặt chẽ giữa kiểu gen và kiểu hình của cả ba trường hợp OCA1A trong nghiên cứu này, tương đồng với các nghiên cứu trước đó.

Trường hợp của hai anh em người bệnh A1003 và A1004 được xếp vào nhóm OCA1B, với biến thể gen *TYR* c.115T>C (p.W39R) được tìm thấy, liên quan đến giảm hoạt động của tyrosinase, kéo theo một lượng rất nhỏ melanin được tạo ra và tích lũy theo thời gian. Đây là một biến thể hiếm đã biết, được báo cáo trước đó ở một người bệnh nam người Trung Quốc ở trạng thái dị hợp tử. Người bệnh này ban đầu được chẩn đoán mắc OCA2 dựa trên lâm sàng, tuy nhiên khi tiến hành phân tích di truyền thì được xếp vào nhóm OCA1B mang hai biến thể dị hợp tử gen *TYR* (NM_000372) gồm c.1265G>A (p.R422Q) và c.115T>C (p.W39R) [164]. Như vậy, đồng hợp tử *TYR* c.115T>C (p.W39R) lần đầu tiên được xác định, tìm thấy ở anh em người bệnh A1003 và A1004 trong nghiên cứu này. Ngoài biến thể thay thế nucleotide tại vị trí 115 (c.115T>C, p.W39R) trên trình tự mã hóa, hai thay thế khác lần lượt tại vị trí 116 (c.116G>A, p.W39*) và 117 (c.117G>T, p.W39C) cùng được báo cáo tác động tại vị trí codon 39 trên trình tự axit amin, liên quan đến các trường hợp OCA1B [164, 170]. Do đó, nghiên cứu đề xuất biến thể *TYR* c.115T>C (p.W39R) là một biến thể “*có khả năng gây bệnh*” theo tiêu chí phân loại của Hiệp hội Bệnh học Phân tử và Di truyền Y học Hoa Kỳ (ACMG) (Bảng 3.7, trang 81).

Khác với OCA1A có màu tóc trắng từ khi sinh, những người bệnh OCA1B thường có tóc màu trắng hoặc vàng nhạt khi mới sinh, nhưng theo thời gian, tóc có thể sẫm lại thành vàng hoặc nâu nhạt. Lông mi có thể sẫm màu hơn màu tóc và lông mày. Da vẫn trắng như kem nhưng có thể bị sạm da một chút cùng với tàn nhang và nám. Rung giật nhãn cầu có thể biểu hiện từ khi sinh, hoặc cho đến khi trẻ được 3 đến 4 tháng tuổi và kéo dài suốt đời. Tuy nhiên, cử động của mắt sẽ chậm dần khi về già và thường dễ nhận thấy hơn trong những thời điểm căng thẳng, tức giận hoặc mệt mỏi. Mắt có màu xanh lam khi mới sinh, có thể không thay đổi hoặc chuyển sang nâu hoặc hơi xanh lục nhạt. Thị lực dao động từ 20/100 đến 20/200 [59, 169]. Cả hai anh em người bệnh A1003 (27 tuổi) và A1004 (23 tuổi) đều mang các đặc điểm đặc trưng của OCA2 bao gồm da trắng, tóc vàng, mắt nâu, có biểu hiện rung giật nhãn cầu và suy giảm thị lực (nhược thị). Chẩn đoán lâm sàng kết hợp cùng với kết quả phân tích gen khẳng định hai người bệnh này thuộc nhóm OCA1B.

Trường hợp OCA2 duy nhất được phát hiện trong nghiên cứu này là người bệnh A1006, mang biến thể đồng hợp tử *OCA2* c.2323G>A (p.G775S). Đây là một biến thể đã biết và được tìm thấy trước đó trên một người bệnh Việt Nam cũng ở trạng thái

đồng hợp tử, trong nghiên cứu của Markus và cộng sự thuộc đại học Regensburg, Đức vào năm 2011. Tuy nhiên, Markus cho rằng c.2323G>A (p.G775S) là một biến thể lành tính và không phải là nguyên nhân chính gây nên ảnh hưởng có hại ở người bệnh mà là do biến thể đồng hợp tử c.1113T>C (p.G371=) có liên quan đến sự hình thành điểm cắt nối mới, được dự đoán bởi Splice Sequence Finder Server. Markus và cộng sự giải thích rằng, khi tiến hành phân tích *in silico* sử dụng SIFT và Polyphen-2 cho kết quả trái ngược nhau, do đó c.2323G>A (p.G775S) không được xem là nguyên nhân gây bệnh [171]. Tuy nhiên, khi tiến hành phân tích lại trên mô hình *in silico*, cả SIFT và Polyphen-2 đều đưa ra đánh giá là có khả năng gây hại đến protein được mã hóa (Bảng 3.7, trang 81). Mặt khác, cho đến hiện tại, c.1113T>C (p.G371=) đã được báo cáo là một biến thể lành tính trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000193573.7). Ngoài ra, tại vị trí codon 775 còn tồn tại hai biến đổi khác đã được tìm thấy trước đó ở những người bệnh OCA2 bao gồm c.2323G>C (p.G775R) [172] và c.2324G>A (p.G775D) [173]. Glycin ở vị trí codon 775 có tính bảo thủ cao, nằm trong vùng xuyên màng 11 trong tổng số 12 miền trên polypeptide P được mã hóa bởi gen *OCA2*. Do đó, sự thay thế G775 có thể ức chế sự gấp nếp của protein P và dẫn đến những hậu quả có hại. Dựa trên những đề xuất này, có thể xem xét *OCA2* c.2323G>A (p.G775S) như một biến thể “có khả năng gây bệnh” dựa theo hướng dẫn của ACMG (Bảng 3.7, trang 81) và cần được chứng minh chức năng trong các nghiên cứu xa hơn.

Các ảnh hưởng lâm sàng quan sát thấy ở người bệnh A1006 như da trắng, tóc và mắt màu nâu cũng tương đồng với các biểu hiện đặc trưng của *OCA2* bao gồm sắc tố của da và tóc biểu hiện ở mức tối thiểu cho đến gần như bình thường, màu móng mắt dao động từ xanh lam đến nâu [59, 169]. Trong nhóm *OCA2*, hầu hết trẻ sơ sinh có biểu hiện rung giật nhãn cầu trước 3-4 tháng tuổi, chuyển động mắt có thể nhanh khi mới bị nhưng thường chậm dần theo thời gian. Lác mắt và mất chú ý thị giác cũng xuất hiện trong sáu tháng đầu đời [59, 169]. Tuy nhiên các biểu hiện của rung giật nhãn cầu lại không được quan sát thấy ở người bệnh A1006. Thị lực của người trưởng thành thường dao động trong khoảng 20/60-2/100 và không xấu đi theo thời gian. So sánh các ảnh hưởng thị lực ở nhóm *OCA2* với *OCA1* đã được báo cáo thì đa số người bệnh *OCA2* có thị lực tốt hơn [59, 169], điều này cũng được chỉ ra trong nghiên cứu này, trong đó A1006 là người bệnh duy nhất không bị suy giảm thị lực trên tổng số 7 người bệnh bạch tạng tham gia nghiên cứu.

Một loại OCA khác, hội chứng Hermansky-Pudlak, là phân nhóm hiếm của bạch tạng cũng được quan sát trong nghiên cứu này ở trường hợp người bệnh A1007 mang biến thể đồng hợp tử c.972delC nằm trên gen *HPS1* (NM_000195), làm xuất hiện mã kết thúc sớm trên chuỗi polypeptide (p.M325fs*6), là nguyên nhân dẫn đến không hình thành hoặc hình thành một protein mất chức năng sau quá trình dịch mã [174]. p.M325fs*6 là kết quả cùng được tạo ra bởi hai sự kiện thêm (c.972insC) hoặc mất (c.972delC) nucleotide tại vị trí 972 trên trình tự nucleotide, được biết đến là biến thể phổ biến nhất ở nhóm người bệnh HPS người châu Âu [175]. Trong đó, c.972delC được quan sát thấy ở một số người bệnh người Puerto Rico [176], Mexico [177], Trung Quốc [178] và người Mỹ gốc Phi [179]; biến thể c.972insC được tìm thấy chủ yếu ở những người bệnh người Puerto Rico [175] và một số người bệnh người Nhật Bản [180]. Nucleotide C tại vị trí 972 được nhận diện như một biến thể “nóng” của gen *HPS1*.

Trong HPS, các đặc điểm lâm sàng bao gồm các biểu hiện đặc trưng của OCA kèm theo rối loạn chức năng tiểu cầu, rối loạn chảy máu và có thể phát triển u hạt (granulomatous), xơ phổi hoặc giảm bạch cầu trung tính trong một số trường hợp [66]. Tuy nhiên, ngoài những ảnh hưởng lâm sàng của OCA, các biểu hiện đặc trưng khác của HPS không tìm thấy ở người bệnh A1007. Vì lý do này, các xét nghiệm phân tử có thể cần thiết giúp phân loại cụ thể các phân nhóm bệnh bạch tạng. Biến thể gen phát hiện ở trường hợp HPS duy nhất trong nghiên cứu này nằm trên gen *HPS1* (NM_000195), là gen gây bệnh phổ biến nhất trong HPS, tương ứng với phân nhóm HPS loại 1 (HPS1).

Các thông tin di truyền được xác định ở gia đình những người bệnh bạch tạng trong nghiên cứu này thông qua giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa là nguồn dữ liệu hữu ích, bổ sung thêm vào cơ sở dữ liệu biến thể liên quan đến bạch tạng. Ngoài ra, đây cũng là cơ sở khoa học hỗ trợ công tác chẩn đoán, phân loại bệnh, đồng thời có ý nghĩa trong công tác tư vấn di truyền ở những gia đình có nguy cơ.

4.3. Yếu tố di truyền trong thiếu sản vành tai

Thiếu sản vành tai là một rối loạn phát triển có bằng chứng về căn nguyên di truyền bên cạnh các yếu tố môi trường khác. Các biểu hiện lâm sàng ở người bệnh thiếu sản vành tai là đa dạng và có liên quan đến rất nhiều các hội chứng di truyền

khác nhau. Do đó, có thể tồn tại rất nhiều gen liên quan cần được xác định. Một loạt các phương pháp di truyền đã được sử dụng để nghiên cứu thiếu sản vành tai, trong đó, bốn phương pháp phổ biến nhất bao gồm GWAS, WES, phân tích di truyền liên kết, và phân tích xác định số bản sao. Đặc biệt, WES được xem là một công cụ hữu ích trong nghiên cứu giúp phát hiện các biến thể hay các gen ứng viên mới liên quan đến bệnh tương đối đầy đủ và tối ưu.

Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích WES của 11 người bệnh thiếu sản vành tai chỉ ra 108 biến thể bao gồm 81 biến thể hiếm và 27 biến thể mới liên quan đến 74 gen ứng viên. Tất cả các biến thể này góp phần bổ sung vào cơ sở dữ liệu về các biến thể tiềm ẩn có thể là nguy cơ dẫn đến thiếu sản vành tai. Trong số đó, có 2 biến thể đã được báo cáo là gây bệnh/có thể gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar, bao gồm biến thể *EYAI* p.R308* (rs121909195, VCV000007929.6) phát hiện ở người bệnh Mi002 và biến thể *ABCC6* p.R1235W (rs63750402, VCV000433323.3) tìm thấy ở người bệnh Mi006. Tuy nhiên, khi căn cứ theo mô hình di truyền cũng như bệnh lý liên quan đến biến thể thì chỉ có *EYAI* p.R308* có thể là nguyên nhân dẫn đến kiểu hình bệnh ở trường hợp Mi002.

Biến thể *EYAI* p.R308* được báo cáo liên quan đến các trường hợp mắc hội chứng cung mang-tai-thận (branchiootorenal syndrome, BOR) [181-183] hoặc các trường hợp khác ngoài hội chứng cung mang-tai-thận nhưng có các biểu hiện lâm sàng tương tự [182, 184]. Hội chứng BOR là một rối loạn di truyền trội nhiễm sắc thể thường gây ra bởi các biến thể gây bệnh trên 3 gen *EYAI*, *SIX5* và *SIX1*, đặc trưng bởi các triệu chứng như mất thính giác, rò trước tai và cổ, hở trước não thất và các bất thường ở thận [185]. Người bệnh Mi002 được chẩn đoán thiếu sản vành tai phải độ I, trái độ II kèm với các dị tật khác gồm dò luân nhĩ hai bên, dò vùng cổ đã phẫu thuật và chỉ có một quả thận. Như vậy có thể thấy mối tương quan kiểu gen kiểu hình ở trường hợp người bệnh Mi002 với biến thể gây bệnh *EYAI* p.R308* được xác định, từ đó khẳng định độ chính xác và lợi ích của phân tích WES phát hiện căn nguyên dẫn đến hội chứng di truyền liên quan đến thiếu sản vành tai trong trường hợp này, đồng thời có thể có giá trị vận dụng trong tư vấn di truyền cho các gia đình có nguy cơ mắc các bệnh lý liên quan.

Mặc dù yếu tố di truyền trong thiếu sản vành tai đã được chỉ ra với rất nhiều bằng chứng, tuy nhiên chưa có một gen nào được báo cáo là nguyên nhân dẫn đến bệnh. Thêm vào đó, thiếu sản vành tai có thể tồn tại độc lập, cũng có thể là một phần trong các hội chứng khác, do đó, việc xác định yếu tố di truyền nguy cơ trở nên phức tạp với lượng lớn gen và biến thể liên quan có thể được xác định.

Trong nghiên cứu này, chỉ có duy nhất người bệnh Mi002 (1/11 người bệnh) có thể chỉ ra biến thể nguy cơ trên gen *EYA1*, là nguyên nhân dẫn đến hội chứng BOR. Còn lại, mười bệnh nhân thiếu sản vành tai chưa kết luận hay đưa ra được biến thể gen cụ thể nào có thể là yếu tố nguy cơ trực tiếp dẫn đến kiểu hình bệnh. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng đã chỉ ra 18 biến thể hiếm/mới có thể liên quan căn cứ theo mô hình di truyền cũng như qua phân tích chức năng *in silico* với dự đoán gây bệnh/có thể gây bệnh trên ít nhất năm công cụ dự đoán (Bảng 3.12, trang 97). Tất cả các biến thể này cần được quan tâm và nghiên cứu mở rộng trên lượng mẫu lớn hơn cũng như trong các nghiên cứu chức năng xa hơn trong tương lai.

Ngoài việc xác định các biến thể có thể là yếu tố nguy cơ dẫn đến thiếu sản vành tai, nghiên cứu thực hiện phân tích mạng lưới tương tác protein giúp phát hiện các protein chính đóng vai trò quan trọng trong mạng lưới cũng như xác định các manh mối tiềm năng phục vụ cho các nghiên cứu xa hơn. Phân tích PPI dựa trên 74 gen ứng viên chỉ ra BMP2 là một trong hai protein trung tâm có khả năng trao đổi thông tin tối đa với các protein khác, do đó protein này có thể đóng một vai trò quan trọng nào đó trong các con đường sinh học liên quan đến thiếu sản vành tai.

BMP2 (protein hình thái xương 2) được mã hóa bởi gen *BMP2*, là một phối tử nằm trong siêu họ yếu tố tăng trưởng β (TGF- β). Các phối tử nằm trong siêu họ này liên kết với các thụ thể TGF- β khác nhau để nhận và kích hoạt các chất dẫn truyền tín hiệu thuộc họ SMAD (small Mothers Against Decapentaplegic) trong điều hòa biểu hiện gen. Các tiền chất proprotein (preproprotein) này được xử lý và phân giải sau dịch mã tạo thành các cấu phần protein giống nhau trong một homodimer và được liên kết với nhau bằng cầu nối disulfide có vai trò trong quá trình phát triển xương và sụn [89, 186]. Do đó, các ảnh hưởng có hại lên BMP2 có thể được cân nhắc như một tác động tiêu cực trực tiếp hoặc gián tiếp đến quá trình hình thành xương và sụn, cụ thể ở đây là quá trình phát triển tai ngoài với thành phần chính là sụn. Gần đây, nghiên cứu của

Wei Liu và cộng sự đã báo cáo biến thể nằm trên exon 2 gen *BMP2* (c.G332T, p.S111I) có liên quan đến hai trường hợp bệnh nhi sinh đôi (2 tuổi) mắc thiếu sản vành tai với các bất thường hình dạng vành tai phải đi kèm không có ống tai ngoài và tai trái hình hạt đậu [187].

Các con đường tín hiệu liên quan đến thiếu sản vành tai được xác định thông qua phân tích làm giàu tập hợp 74 gen ứng viên. Kết quả chỉ ra có 6 con đường tín hiệu có thể xem xét liên quan, bao gồm: tương tác với thụ thể ECM, sự biệt hóa của tế bào xương, con đường lây nhiễm HPV, con đường tín hiệu MTOR, tiêu hóa và hấp thụ protein, và con đường lây nhiễm Amip. Trong đó, con đường tương tác với thụ thể ECM có thể đóng vai trò quan trọng nào đó trong sự phát triển của tai ngoài, do đã được báo cáo là có liên quan đến quá trình phá hủy sụn, là thành phần chính cấu tạo nên tai ngoài [188]. Thêm vào đó, con đường này kết nối với con đường tín hiệu Wnt đã được báo cáo là có liên quan đến sự phát triển của tai ngoài cùng với các protein hình thái xương [89].

Trong các con đường tín hiệu được chỉ ra thông qua phân tích làm giàu tập hợp gen KEGG, có 5/6 con đường có sự tham gia của gen *COL4A4*, bao gồm cả con đường tương tác với thụ thể ECM. Thêm vào đó, gen này cũng đã được đề xuất là một trong những gen ứng viên có thể liên quan đến thiếu sản vành tai trong nghiên cứu dựa trên 307 gen gây điếc ở 32 người bệnh thiếu sản vành tai [114]. Do đó, *COL4A4* có thể đóng một vai trò quan trọng nào đó trong cơ chế sinh bệnh của thiếu sản vành tai và cần được chú tâm phân tích tác động ảnh hưởng một cách chi tiết và đầy đủ trong các nghiên cứu xa hơn.

4.4. Ý nghĩa của chẩn đoán phân tử trong công tác tư vấn di truyền và quản lý bệnh hiếm

Theo thống kê mới nhất của tổ chức Global Genes trong năm 2022, khoảng 400 triệu người trên toàn thế giới bị ảnh hưởng bởi một trong số ~11.000 bệnh hiếm khác nhau (chính xác là 10.867 bệnh) với một nửa người bệnh là trẻ em và khoảng 3% là trẻ sơ sinh (<https://globalgenes.org/>). Trong số các bệnh hiếm đã được chỉ ra thì ít nhất 80% có nguồn gốc di truyền, gây ra bởi một hoặc nhiều gen liên quan hoặc do các bất thường trên nhiễm sắc thể [189, 190]. Tuy nhiên, do tính không đồng nhất về mặt di truyền (allelic và locus), đa dạng trong biểu hiện lâm sàng, tính thắm không hoàn toàn bên cạnh

sự biến đổi của gen và các yếu tố môi trường khác có thể làm phức tạp thêm quá trình tiến tới chẩn đoán cụ thể ở những trường hợp mắc các rối loạn hiếm gặp [191]. Điều này không chỉ gây căng thẳng và đau khổ về mặt tâm lý cho người bệnh cũng như gia đình họ mà còn là thách thức và gánh nặng đối với các hệ thống chăm sóc sức khỏe [191]. Hơn nữa, sự thiếu thông tin liên quan đến kiểu hình cũng như đặc điểm di truyền do thuộc nhóm các bệnh rất hiếm hoặc cực hiếm cũng là một thách thức lớn trong chẩn đoán các bệnh này. Do đó, chẩn đoán phân tử chính xác là cần thiết nhằm đưa ra các phương thức điều trị phù hợp và quản lý hiệu quả các bệnh hiếm gặp. Ngoài ra, các thông tin di truyền được sử dụng như một nguồn dữ liệu bổ trợ, góp phần xây dựng các hoạch định liên quan đến kế hoạch hóa gia đình trong tương lai và hình thành mạng lưới hỗ trợ các cá nhân và gia đình bị ảnh hưởng [191, 192]. Bên cạnh đó, chẩn đoán sớm và chính xác giúp giảm bớt các xét nghiệm xâm lấn không cần thiết, tiết kiệm chi phí cũng như giảm căng thẳng tâm lý liên quan nếu phải thực hiện các xét nghiệm phát sinh này [193, 194]. Ngoài ra, chẩn đoán di truyền không chỉ được quan tâm ở nhóm đối tượng có triệu chứng mà còn có thể có ích trong việc sàng lọc, xác định người mang mầm bệnh ở nhóm không có triệu chứng; do đó rất có ý nghĩa trong công tác phòng ngừa cấp II (secondary prevention) ở cả nhóm bệnh lành tính và ác tính [195].

Bệnh di truyền và dị tật là những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở trẻ sơ sinh theo báo cáo của đơn vị chăm sóc đặc biệt dành cho trẻ sơ sinh (NICU) [196]. Việc xác định các rối loạn hiếm gặp trong bối cảnh này là một thách thức đặc biệt vì một số lý do: chưa biểu hiện kiểu hình lâm sàng một cách hoàn chỉnh, các dấu hiệu lâm sàng có thể phức tạp hơn do sinh non và tính không đồng nhất về di truyền cơ bản có thể trì hoãn việc chẩn đoán thông qua phương pháp tiếp cận gen ứng viên hoặc sử dụng xét nghiệm trên một tập hợp gen. Do đó, nhiều người bệnh mắc các rối loạn di truyền đã được xuất viện hoặc tử vong trước khi chẩn đoán chính xác được đưa ra [197].

Sự ra đời của công nghệ giải trình tự thế hệ mới (NGS) đã nâng xét nghiệm di truyền lên một tầm cao mới, giúp nâng cao khả năng chẩn đoán kịp thời và chính xác [191, 193, 194]. Giải trình tự toàn bộ hệ gen/hệ gen mã hoá (WGS/WES) đã cho thấy khả năng chẩn đoán ấn tượng theo báo cáo của NICU. Các kết quả chẩn đoán này ngay lập tức ảnh hưởng đến công tác quản lý lâm sàng, cho phép thực hiện điều trị chính xác, bao gồm can thiệp trị liệu hoặc chăm sóc giảm nhẹ tùy chỉnh, cũng như tư vấn di truyền

phù hợp [197-202]. WGS/WES giúp NICU nhanh chóng chẩn đoán chính xác các trường hợp mắc bệnh chỉ trong khoảng 26 giờ [203]. Trong nghiên cứu của Willig và cộng sự vào năm 2015, hiệu quả chẩn đoán của WGS đã được chỉ ra trên 35 trẻ sơ sinh có các biểu hiện lâm sàng nặng với tỉ lệ chẩn đoán bệnh là 57% trong khi tỷ lệ này là 9% khi sử dụng các xét nghiệm di truyền thông thường khác [199]. Các nghiên cứu khác cho thấy tỷ lệ chẩn đoán là ~30%–60% [197, 204]. Ngoài ra, chẩn đoán kết hợp dựa trên WES, gene panel và phân tích microarray có thể mang lại hiệu quả chẩn đoán > 70%, ngay lập tức tác động mạnh mẽ đến khả năng quản lý y tế ở 83% bệnh nhân được chẩn đoán (ví dụ: tùy chỉnh thuốc chống co giật) [197].

Ứng dụng NGS trong chẩn đoán, xác định biến thể gây bệnh ở nhóm các người bệnh ly thượng bì bóng nước và bạch tạng cũng đã được thực hiện, đồng thời mang lại những giá trị cả về khoa học cũng như tinh thần của người bệnh và gia đình. Nghiên cứu của Takeichi và cộng sự vào năm 2015 đã đưa ra chẩn đoán chính xác cho 9 người bệnh mắc EB thông qua WES, trong khi trước đó không thể kết luận được dựa trên phân tích sinh thiết da cũng như giải trình tự Sanger [45]. Việc ứng dụng WES như một công cụ chẩn đoán đã được triển khai và thực hiện trong nhiều nghiên cứu về EB cho đến nay [205-208]. Một nghiên cứu khác của Okamura và cộng sự đã sử dụng NGS để tiến hành phân tích, đánh giá 54 người bệnh Nhật Bản, bao gồm 28 người bệnh chưa được chẩn đoán phân tử và 46 người bệnh có kết quả xét nghiệm âm tính với bạch tạng da và mắt (OCA) cũng như hội chứng Hermansky-Pudlak (HPS) dựa trên phân tích SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) trước đó. Kết quả cho thấy 18/46 người bệnh không chẩn đoán được bằng SSCP và 23/28 bệnh nhân mới đã xác định được các biến thể di truyền là nguyên nhân dẫn đến bạch tạng [209]. Ngoài ra, thông qua WES, ba người bệnh bạch tạng có các biểu hiện trùng lặp lần lượt được xác định mắc HPS4, HPS6 và HPS9 trong một nghiên cứu trước đó của Okamura và cộng sự [210].

Các bệnh hiếm gặp có tính đa hệ thống, phức tạp trong tự nhiên và chẩn đoán phân tử là cần thiết; tuy nhiên, các xét nghiệm di truyền này cần được tư vấn một cách đầy đủ trước khi thực hiện với sự đồng ý của người bệnh và gia đình bao gồm cả việc chia sẻ thông tin sau khi có kết quả xét nghiệm [193, 194]. Nếu người bệnh không hiểu đúng về kết quả di truyền nhận được sau khi thực hiện xét nghiệm, các phản ứng tiêu cực có thể xảy ra, chẳng hạn như lo lắng quá mức và thực hiện các biện pháp phòng

ngừa không cần thiết [195]. Kết quả xét nghiệm dương tính ở một cá nhân cũng có thể dự đoán thông tin di truyền của các thành viên gia đình/họ hàng không đồng ý tham gia thực hiện xét nghiệm. Điều này dẫn đến những thách thức trong công tác tư vấn, khiến chuyên gia y tế và người bệnh tiếp nhận xét nghiệm rơi vào tình huống khó xử [195]. Do đó, kinh nghiệm của bác sĩ tư vấn là rất quan trọng, đòi hỏi phải nắm và hiểu rõ các kiến thức về di truyền cũng như cập nhật liên tục để bắt kịp sự phát triển của công nghệ chẩn đoán. Đây cũng được coi là một hạn chế của công tác tư vấn khi các bác sĩ không chuyên (về mặt di truyền) tham gia vào các cuộc thảo luận chuyên môn liên quan đến các xét nghiệm di truyền.

Trong tư vấn di truyền, công tác thực hiện đòi hỏi sự đảm bảo đầy đủ thông tin về các yếu tố tiên quyết sau: (1) chẩn đoán chính xác; (2) tiền sử; (3) điều trị; (4) cơ chế di truyền; (5) nguy cơ tái phát/chẩn đoán trước sinh; và (6) các hướng dẫn sau này. Bệnh nhân thực sự ở trong các trường hợp này thực chất là cả một gia đình chứ không đơn thuần chỉ là cá nhân bị ảnh hưởng. Giống như các nhóm bệnh di truyền khác, tư vấn di truyền là một phần thiết yếu trong việc quản lý các gia đình có người mắc EB. Thật đáng tiếc khi bỏ qua việc thông báo về những nguy cơ cũng như rủi ro di truyền nếu có cho tất cả các thành viên liên quan ở những gia đình có nguy cơ. Tư vấn di truyền đáng tin cậy đòi hỏi chẩn đoán chính xác, do đó nếu nguyên tắc này không được thực hiện một cách thuần thực thì sẽ dẫn đến một số hậu quả đáng tiếc. Chẳng hạn, nếu một trẻ sơ sinh mắc một trong những dạng EB nghiêm trọng tử vong trước khi chẩn đoán chính xác được thiết lập thì khó có thể đưa ra lời khuyên đáng tin cậy cho cha mẹ cũng như gặp khó khăn/không thể thực hiện công tác chẩn đoán trước sinh ở lần mang thai tiếp theo. Theo báo cáo của Gabriela và cộng sự thuộc Dịch vụ y tế Quốc gia (NHS), Vương quốc Anh, số lượng người bệnh EB đăng ký tham gia vào hệ thống chăm sóc sức khỏe này từ năm 2002 đến 2021 là 2594 cá nhân, trong đó có 2361 người bệnh vẫn đang sống đến năm 2021. Trong năm 2002, tổng số 1200 trẻ sơ sinh mắc EB được sinh ra với tỷ lệ mắc trung bình trên một triệu ca sinh sống được báo cáo đối với các phân nhóm EBS, DEB, JEB và hội chứng Kindler lần lượt là 32,5; 26,1; 8,9 và 0,9. Tỷ lệ này giảm dần trong khoảng thời gian 19 năm (2002-2021) đối với một số phân nhóm như JEB thể nặng ($r = -0,56$) và DEB thể nặng ($r = -0,44$) cũng như một số phân nhóm nhẹ hơn của EB. Ngoài ra, nghiên cứu phát hiện tỷ lệ sống sót lâu hơn ở các trường hợp mắc JEB thể nặng trong khoảng thời gian này ($r^2 = 0,18$) và tỷ lệ sống sót trung bình là 12,7 tháng trong 5 năm

qua. Nhóm nghiên cứu của NHS tin rằng việc giảm tỷ lệ mắc các loại EB nghiêm trọng khi sinh quan sát được đã phản ánh công tác tư vấn di truyền được thực hiện một cách có hiệu quả [211].

Trong nghiên cứu này, ly thượng bì bóng nước và bạch tạng là hai bệnh di truyền đã biết nguyên nhân. Các kết quả xét nghiệm phân tử của những người bệnh thuộc hai nhóm bệnh này ngoài việc giúp chẩn đoán chính xác nhóm/phân nhóm bệnh còn rất có ý nghĩa trong tiên lượng bệnh cũng như tư vấn di truyền phù hợp trong tương lai. Cụ thể ở trường hợp gia đình có hai người con cùng mắc bệnh bạch tạng (A1001 và A1002), tư vấn di truyền được thực hiện với kết quả xét nghiệm mang gen (thể không gây bệnh) ở mẫu ối trong lần mang thai thứ ba của người mẹ. Em bé khi sinh ra hoàn toàn khỏe mạnh và không có biểu hiện bất thường nào liên quan đến OCA theo đúng như dự đoán dựa trên kết quả chẩn đoán phân tử. Như vậy, hiệu quả của chẩn đoán phân tử trong trường hợp này được thể hiện một cách rõ rệt. Ở những gia đình người bệnh khác, đặc biệt là những gia đình bố mẹ của người bệnh vẫn còn trẻ, công tác tư vấn di truyền liên quan đến chẩn đoán trước sinh và chẩn đoán tiền làm tổ nên được thực hiện. Đối với gia đình có hai người con cùng mắc RDEB thể nặng (EB004 và EB005) với hai biến thể gây bệnh trên gen *COL7A1* được xác định, tư vấn tiền làm tổ nên được thực hiện để giảm thiểu tối đa xác suất hình thành thai mang bệnh nếu gia đình mong muốn có thêm con. Tuy nhiên, cần giải thích rõ lợi ích và nguy cơ cũng như chi phí cao do phải thực hiện phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm. Do đó, vai trò của người tư vấn là hết sức quan trọng, đòi hỏi sự kết hợp chặt chẽ giữa các bác sĩ và các nhà di truyền học. Bên cạnh đó, tư vấn di truyền nên tiếp tục được thực hiện ở thế hệ sau nếu những người bệnh/người mang gen lập gia đình và sinh con trong tương lai.

Tiên lượng bệnh có thể được thực hiện dựa trên các thông tin di truyền liên quan đến tương quan kiểu gen-kiểu hình. Trong nhóm những người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước ở nghiên cứu này, sự hiện diện của ít nhất một biến thể dẫn đến tạo mã kết thúc sớm (PTC) gen *COL7A1* trên phân tử protein có thể liên quan đến các trường hợp thể nặng. Như vậy, nếu trẻ sinh ra nghi ngờ mắc EB, xét nghiệm phân tử chỉ ra có mang ít nhất một biến thể PTC gen *COL7A1* thì cần được quan tâm chăm sóc đặc biệt do khả năng trở nặng có thể tăng cao hơn các trường hợp khác. Ngoài ra, một trường hợp bệnh khác là người bệnh EB007 mang biến thể phát sinh mới *KRT5* p.E477K với biểu hiện

lâm sàng rất nặng khi mới sinh và cải thiện dần theo thời gian khi trẻ lớn lên. Thông tin này đặc biệt hữu ích cho các trường hợp EBS khác nếu xét nghiệm phân tử chỉ ra mang biến thể này. Mặc dù quá trình chăm sóc vết thương và tránh nhiễm trùng ở nhóm người bệnh EB rất phức tạp, khó khăn và tốn kém nhưng với thông tin có căn cứ khoa học có thể là nguồn nghị lực lớn lao cho cha mẹ của người bệnh trong quá trình chăm sóc trẻ.

Như vậy có thể thấy tầm quan trọng của chẩn đoán phân tử trong tư vấn di truyền cũng như đưa ra gợi ý, hình thành các phương thức quản lý bệnh. Tuy nhiên, chẩn đoán phân tử nên được cung cấp như một dịch vụ toàn diện bao gồm tư vấn trước và sau xét nghiệm. Các cố vấn di truyền trình độ cao là chìa khóa đảm bảo các gia đình người bệnh nhận được sự hỗ trợ phù hợp khi phát hiện các rối loạn di truyền.

❖ Những hạn chế trong nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện trên ba nhóm bệnh hiếm, có tỉ lệ rất thấp trong quần thể; đồng thời giới hạn về kinh phí cũng như thời gian thực hiện khiến cho nghiên cứu còn khiêm tốn về số lượng mẫu. Đặc biệt, thiếu sản vành tai là một trạng thái di truyền chưa rõ nguyên nhân, có thể tồn tại độc lập hoặc như một triệu chứng ở rất nhiều các hội chứng liên quan khác nhau nên rất khó khăn trong việc xác định các biến thể nguy cơ tiềm năng và cần tiếp tục triển khai trên một cỡ mẫu lớn hơn ở các nghiên cứu sau. Ngoài ra, việc không thu được mẫu các thành viên trong gia đình cũng như các hình ảnh lâm sàng liên quan ở nhóm người bệnh này cũng là một hạn chế. Tuy nhiên, bất kỳ thông tin hay giả thuyết nào được đưa ra cũng có thể là một nguồn dữ liệu để tham khảo, cùng với các nghiên cứu khác xây dựng các bằng chứng đủ lớn với mục tiêu tìm ra nguyên nhân cũng như cơ chế bệnh sinh của thiếu sản vành tai. Từ đó làm tiền đề cho các nghiên cứu chức năng xa hơn tiến đến mục tiêu thực hành lâm sàng trong tương lai.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

1. Đã giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa trên đối tượng người bệnh Việt Nam, gồm 8 người bệnh ly thượng bì bóng nước, 7 người bệnh bạch tạng và 11 người bệnh thiếu sản vành tai với kích thước trung bình mỗi bộ dữ liệu là 48 triệu đoạn đọc và Q30 đạt 94%.

2. Đã xác định được các biến thể có khả năng gây bệnh ở 7/8 người bệnh ly thượng bì bóng nước, 7/7 người bệnh bạch tạng và 1 biến thể nguy cơ ở 1/11 người bệnh thiếu sản vành tai, cụ thể như sau:

+ Đã xác định được 6 người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng mang các biến thể mới/hiếm gen *COL7A1* (c.8279G>A, c.4518+2delT, c.5821-2A>G/c.2858_2859delAG, c.5047C>T, c.6081delC, c.6205C>T và c.8233C>T) và 1 người bệnh ly thượng bì bóng nước đơn giản mang biến thể gen *KRT5* c.1429G>A (p.E477K).

+ Đã phân loại người bệnh bạch tạng thuộc 3 nhóm: bao gồm 5 người bệnh OCA1 (3 người bệnh OCA1A và 2 người bệnh OCA1B), 1 người bệnh OCA2 và 1 người bệnh mắc hội chứng Hermansky-Pudlak được xác định tương ứng với các biến thể trên gen *TYR* (c.346C>T, c.926insC, c.115T>C và c.559_560ins25), *OCA2* (c.2323G>A) và *HPS1* (c.972delC). Chẩn đoán trước sinh được thực hiện ở lần mang thai thứ ba trong gia đình có hai con đầu mắc OCA1A (A1001 và A1002) với em bé sinh ra hoàn toàn khỏe mạnh.

+ Đã xác định được 108 biến thể bao gồm 81 biến thể hiếm và 27 biến thể mới trên 74 gen ứng viên có thể liên quan đến thiếu sản vành tai ở 11 mẫu nghiên cứu. Trong đó, biến thể *EYA1* p.R308* có thể được xem là nguyên nhân gây bệnh ở trường hợp Mi002 liên quan đến hội chứng cung mang-tai-thận (BOR).

Kiến nghị:

Từ những kết quả đạt được trong nghiên cứu, chúng tôi xin đưa ra một số kiến nghị như sau:

1. Cần tiến hành các nghiên cứu phân tích chức năng sử dụng mô hình *in vitro* hoặc mô hình động vật phù hợp nhằm đánh giá tác động thực sự của các biến thể mới phát hiện ở nhóm người bệnh ly thượng bì bóng nước, từ đó làm rõ cơ chế bệnh sinh liên quan.

2. Cần khảo sát với số lượng mẫu lớn hơn để mở rộng quy mô phát hiện biến thể gây bệnh/biến thể nguy cơ, đặc biệt ở nhóm thiếu sản vành tai với cơ chế phân tử gây bệnh phức tạp chưa được làm rõ.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Ma THT**, Luong TLA, Hoang TL, Nguyen TTH, Vu TH, Tran VK, Nguyen DB, Trieu TS, Nguyen HH, Nong VH, Nguyen DT. Novel and very rare causative variants in the COL7A1 gene of Vietnamese patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa revealed by whole-exome sequencing. *Mol Genet Genomic Med.* 2021 Aug;9(8):e1748. doi: 10.1002/mgg3.1748.
2. **Thuong MTH**, Anh LTL, Nhung VP, Ngoc TTB, Lan HT, Phuong DK, Ha NH, Van Hai N, Ton ND. Genetic analyses of Vietnamese patients with oculocutaneous albinism. *J Clin Lab Anal.* 2022 Jul 23:e24625. doi: 10.1002/jcla.24625.
3. **Ma Thi Huyen Thuong**, Dang Tien Truong, Nguyen Hai Ha, Nguyen Dang Ton. Identification of a de novo mutation in KRT5 gene underlying epidermolysis bullosa simplex by whole exome sequencing in a Vietnamese patient. *Vietnam Journal of Biotechnology* 19(2): 223-228, 2021.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Bardhan, L. Bruckner-Tuderman, I.L.C. Chapple, J.D. Fine, N. Harper, C. Has, T.M. Magin, M.P. Marinkovich, J.F. Marshall, J.A. McGrath, J.E. Mellerio, R. Polson, and A.H. Heagerty, 2020, Epidermolysis bullosa, *Nat Rev Dis Primers*, 6(1), 78.
2. H. Vahidnezhad, L. Youssefian, A.H. Saeidian, and J. Uitto, 2019, Phenotypic Spectrum of Epidermolysis Bullosa: The Paradigm of Syndromic versus Non-Syndromic Skin Fragility Disorders, *J Invest Dermatol*, 139(3), 522-527.
3. J.D. Fine, 2016, Epidemiology of Inherited Epidermolysis Bullosa Based on Incidence and Prevalence Estimates From the National Epidermolysis Bullosa Registry, *JAMA Dermatol*, 152(11), 1231-1238.
4. Y.C. Kho, L.M. Rhodes, S.J. Robertson, J. Su, G. Varigos, I. Robertson, P. Hogan, D. Orchard, and D.F. Murrell, 2010, Epidemiology of epidermolysis bullosa in the antipodes: the Australasian Epidermolysis Bullosa Registry with a focus on Herlitz junctional epidermolysis bullosa, *Arch Dermatol*, 146(6), 635-40.
5. Z. Pavčić, P. Kmet-Vizintin, A. Kansky, and I. Dobrić, 1990, Occurrence of hereditary bullous epidermolyses in Croatia, *Pediatr Dermatol*, 7(2), 108-10.
6. S. Shinkuma, K. Natsuga, W. Nishie, and H. Shimizu, 2010, Epidermolysis bullosa in Japan, *Dermatol Clin*, 28(2), 431-2, xvi.
7. S. Dănescu, C. Has, S. Senila, L. Ungureanu, and R. Cosgarea, 2015, Epidemiology of inherited epidermolysis bullosa in Romania and genotype-phenotype correlations in patients with dystrophic epidermolysis bullosa, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 29(5), 899-903.
8. H.M. Horn, G.C. Priestley, R.A. Eady, and M.J. Tidman, 1997, The prevalence of epidermolysis bullosa in Scotland, *Br J Dermatol*, 136(4), 560-4.
9. W.Y. Yuen, H.H. Lemmink, K.K. van Dijk-Bos, R.J. Sinke, and M.F. Jonkman, 2011, Herlitz junctional epidermolysis bullosa: diagnostic features, mutational profile, incidence and population carrier frequency in the Netherlands, *Br J Dermatol*, 165(6), 1314-22.
10. A. Vahlquist and K. Tasanen, 2010, Epidermolysis bullosa care in Scandinavia, *Dermatol Clin*, 28(2), 425-7, xv.
11. D. Castiglia and G. Zambruno, 2010, Epidermolysis bullosa care in Italy, *Dermatol Clin*, 28(2), 407-9, xiv-xv.
12. J. Hammersen, C. Has, N. Naumann-Bartsch, D. Stachel, D. Kiritsi, S. Söder, M. Tardieu, M. Metzler, L. Bruckner-Tuderman, and H. Schneider, 2016, Genotype, Clinical Course, and Therapeutic Decision Making in 76 Infants with Severe Generalized Junctional Epidermolysis Bullosa, *J Invest Dermatol*, 136(11), 2150-2157.
13. I. Fuentes, M. Campos, G. Repetto, P. Morandé, M.J. Yubero, S. Gonzalez, A. Klausegger, P. Schnitzhofer, G. Pohla-Gubo, J. Bauer, and F. Palisson, 2017, Molecular epidemiology of junctional epidermolysis bullosa: discovery of

- novel and frequent LAMB3 mutations in Chilean patients with diagnostic significance, *Br J Dermatol*, 176(4), 1090-1092.
14. J. Abu Sa'd, M. Indelman, E. Pfindner, T.C. Falik-Zaccari, M. Mizrachi-Koren, S. Shalev, D. Ben Amitai, A. Raas-Rothschild, A. Adir-Shani, Z.U. Borochowitz, R. Gershoni-Baruch, M. Khayat, D. Landau, G. Richard, R. Bergman, J. Uitto, M. Kanaan, and E. Sprecher, 2006, Molecular epidemiology of hereditary epidermolysis bullosa in a Middle Eastern population, *J Invest Dermatol*, 126(4), 777-81.
 15. A.A. Abahusseini, A.A. al-Zayir, W.Z. Mostafa, and A.N. Okoro, 1993, Epidermolysis bullosa in the eastern province of Saudi Arabia, *Int J Dermatol*, 32(8), 579-81.
 16. J.D. Fine, L.B. Johnson, M. Weiner, K.P. Li, and C. Suchindran, 2009, Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: the National EB Registry experience, 1986-2006, *J Am Acad Dermatol*, 60(2), 203-11.
 17. J.-D.H.H. Fine, 2009, *Life with epidermolysis bullosa (EB) : etiology, diagnosis, multidisciplinary care and therapy*. Wien: Springer.
 18. C.R. UK. *Melanoma skin cancer incidence statistics*. 2019; Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancertype/skin-cancer/incidence#heading-Eleven>.
 19. M. Kim, M. Li, L.R.A. Intong-Wheeler, K. Tran, D. Marucci, and D.F. Murrell, 2018, Epidemiology and Outcome of Squamous Cell Carcinoma in Epidermolysis Bullosa in Australia and New Zealand, *Acta Derm Venereol*, 98(1), 70-76.
 20. J.E. Lai-Cheong, A. Tanaka, G. Hawche, P. Emanuel, C. Maari, M. Taskesen, S. Akdeniz, L. Liu, and J.A. McGrath, 2009, Kindler syndrome: a focal adhesion genodermatosis, *Br J Dermatol*, 160(2), 233-42.
 21. S. Guerrero-Aspizua, C.J. Conti, M.J. Escamez, D. Castiglia, G. Zambruno, L. Youssefian, H. Vahidnezhad, L. Requena, P. Itin, G. Tadini, I. Yordanova, L. Martin, J. Uitto, C. Has, and M. Del Rio, 2019, Assessment of the risk and characterization of non-melanoma skin cancer in Kindler syndrome: study of a series of 91 patients, *Orphanet J Rare Dis*, 14(1), 183.
 22. H. Mizutani, K. Masuda, N. Nakamura, H. Takenaka, D. Tsuruta, and N. Katoh, 2012, Cutaneous and laryngeal squamous cell carcinoma in mixed epidermolysis bullosa, kindler syndrome, *Case Rep Dermatol*, 4(2), 133-8.
 23. J.D. Fine, L.B. Johnson, M. Weiner, and C. Suchindran, 2008, Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa, *J Pediatr*, 152(2), 276-80.
 24. W.Y. Yuen, J.C. Duipmans, B. Molenbuur, I. Herpertz, J.M. Mandema, and M.F. Jonkman, 2012, Long-term follow-up of patients with Herlitz-type junctional epidermolysis bullosa, *Br J Dermatol*, 167(2), 374-82.
 25. J.D. Fine, M. Hall, M. Weiner, K.P. Li, and C. Suchindran, 2008, The risk of cardiomyopathy in inherited epidermolysis bullosa, *Br J Dermatol*, 159(3), 677-82.

26. J.D. Fine, L.B. Johnson, M. Weiner, A. Stein, S. Cash, J. DeLeoz, D.T. Devries, and C. Suchindran, 2004, Inherited epidermolysis bullosa and the risk of death from renal disease: experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry, *Am J Kidney Dis*, 44(4), 651-60.
27. J.D. Fine, L.B. Johnson, M. Weiner, A. Stein, S. Cash, J. DeLeoz, D.T. Devries, and C. Suchindran, 2004, Eye involvement in inherited epidermolysis bullosa: experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry, *Am J Ophthalmol*, 138(2), 254-62.
28. M. Homberg and T.M. Magin, 2014, Beyond expectations: novel insights into epidermal keratin function and regulation, *Int Rev Cell Mol Biol*, 311, 265-306.
29. P.A. Coulombe and C.H. Lee, 2012, Defining keratin protein function in skin epithelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath, *J Invest Dermatol*, 132(3 Pt 2), 763-75.
30. E. Pfendner and J. Uitto, 2005, Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia, *J Invest Dermatol*, 124(1), 111-115.
31. D. Sawamura, M. Goto, K. Sakai, H. Nakamura, J.R. McMillan, M. Akiyama, O. Shirado, N. Oyama, M. Satoh, F. Kaneko, T. Takahashi, H. Konno, and H. Shimizu, 2007, Possible involvement of exon 31 alternative splicing in phenotype and severity of epidermolysis bullosa caused by mutations in PLEC1, *J Invest Dermatol*, 127(6), 1537-40.
32. E. Georges-Labouesse, N. Messaddeq, G. Yehia, L. Cadalbert, A. Dierich, and M. Le Meur, 1996, Absence of integrin $\alpha 6$ leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice, *Nat Genet*, 13, 370.
33. F. Vidal, D. Aberdam, C. Miquel, A.M. Christiano, L. Pulkkinen, J. Uitto, J.P. Ortonne, and G. Meneguzzi, 1995, Integrin $\beta 4$ mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia, *Nat Genet*, 10, 229.
34. C. Has, G. Spartà, D. Kiritsi, L. Weibel, A. Moeller, V. Vega-Warner, A. Waters, Y. He, Y. Anikster, P. Esser, B.K. Straub, I. Hausser, D. Bockenhauer, B. Dekel, F. Hildebrandt, L. Bruckner-Tuderman, and G.F. Laube, 2012, Integrin $\alpha 3$ mutations with kidney, lung, and skin disease, *N Engl J Med*, 366(16), 1508-14.
35. C. Has and Y. He, 2017, Renal-skin syndromes, *Cell Tissue Res*, 369(1), 63-73.
36. J.K. Kroeger, S.C. Hofmann, J. Leppert, C. Has, and C.W. Franzke, 2017, Amino acid duplication in the coiled-coil structure of collagen XVII alters its maturation and trimerization causing mild junctional epidermolysis bullosa, *Hum Mol Genet*, 26(3), 479-488.
37. M. Laimer, C. Prodinger, and J.W. Bauer, 2015, Hereditary epidermolysis bullosa, *J Dtsch Dermatol Ges*, 13(11), 1125-1133.
38. J.-D. Fine, L. Bruckner-Tuderman, R.A.J. Eady, E.A. Bauer, J.W. Bauer, C. Has, A. Heagerty, H. Hintner, A. Hovnanian, M.F. Jonkman, I. Leigh, M.P. Marinkovich, A.E. Martinez, J.A. McGrath, J.E. Mellerio, C. Moss, D.F. Murrell, H. Shimizu, J. Uitto, D. Woodley, and G. Zambruno, 2014, Inherited

- epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification, *J Am Acad Dermatol*, 70(6), 1103-1126.
39. P.C. Van den Akker, M.F. Jonkman, T. Rengaw, L. Bruckner-Tuderman, C. Has, J.W. Bauer, A. Klausegger, G. Zambruno, D. Castiglia, and J.E. Mellerio, 2011, The international dystrophic epidermolysis bullosa patient registry: an online database of dystrophic epidermolysis bullosa patients and their COL7A1 mutations, *Hum Mutat*, 32(10), 1100-1107.
 40. A.M. Salo, H. Cox, P. Farndon, C. Moss, H. Grindulis, M. Risteli, S.P. Robins, and R. Myllylä, 2008, A connective tissue disorder caused by mutations of the lysyl hydroxylase 3 gene, *Am J Hum Genet*, 83(4), 495-503.
 41. H. Vahidnezhad, L. Youssefian, A.H. Saeidian, A. Touati, S. Pajouhanfar, T. Baghdadi, A.A. Shadmehri, C. Giunta, M. Kraenzlin, D. Syx, F. Malfait, C. Has, S.M. Lwin, R. Karamzadeh, L. Liu, A. Guy, M. Hamid, A. Kariminejad, S. Zeinali, J.A. McGrath, and J. Uitto, 2019, Mutations in PLOD3, encoding lysyl hydroxylase 3, cause a complex connective tissue disorder including recessive dystrophic epidermolysis bullosa-like blistering phenotype with abnormal anchoring fibrils and type VII collagen deficiency, *Matrix Biol*, 81, 91-106.
 42. S.A. Watt, J.H. Dayal, S. Wright, M. Riddle, C. Pourreynon, J.R. McMillan, R.M. Kimble, M. Prisco, U. Gartner, E. Warbrick, W.H. McLean, I.M. Leigh, J.A. McGrath, J.C. Salas-Alanis, J. Tolar, and A.P. South, 2015, Lysyl Hydroxylase 3 Localizes to Epidermal Basement Membrane and Is Reduced in Patients with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa, *PLoS One*, 10(9), e0137639.
 43. C. Has, D. Castiglia, M. del Rio, M.G. Diez, E. Piccinni, D. Kiritsi, J. Kohlhase, P. Itin, L. Martin, J. Fischer, G. Zambruno, and L. Bruckner-Tuderman, 2011, Kindler syndrome: extension of FERMT1 mutational spectrum and natural history, *Hum Mutat*, 32(11), 1204-12.
 44. C. Has, L. Liu, M.C. Bolling, A.V. Charlesworth, M. El Hachem, M.J. Escámez, I. Fuentes, S. Büchel, R. Hiremagalore, G. Pohla-Gubo, P.C. van den Akker, K. Wertheim-Tysarowska, and G. Zambruno, 2020, Clinical practice guidelines for laboratory diagnosis of epidermolysis bullosa, *Br J Dermatol*, 182(3), 574-592.
 45. T. Takeichi, L. Liu, K. Fong, L. Ozoemena, J.R. McMillan, A. Salam, P. Campbell, M. Akiyama, J.E. Mellerio, W.H. McLean, M.A. Simpson, and J.A. McGrath, 2015, Whole-exome sequencing improves mutation detection in a diagnostic epidermolysis bullosa laboratory, *Br J Dermatol*, 172(1), 94-100.
 46. E. Tenedini, L. Artuso, I. Bernardis, V. Artusi, A. Percesepe, L. De Rosa, R. Contin, R. Manfredini, G. Pellacani, A. Giannetti, J. Pagani, M. De Luca, and E. Tagliafico, 2015, Amplicon-based next-generation sequencing: an effective approach for the molecular diagnosis of epidermolysis bullosa, *Br J Dermatol*, 173(3), 731-8.
 47. H. Vahidnezhad, L. Youssefian, A.H. Saeidian, A. Touati, S. Sotoudeh, M. Abiri, M. Barzegar, N. Aghazadeh, H. Mahmoudi, S. Norouz-Zadeh, M.

- Hamid, M. Zahabiyon, H. Bagherian, S. Zeinali, P. Fortina, and J. Uitto, 2017, Multigene Next-Generation Sequencing Panel Identifies Pathogenic Variants in Patients with Unknown Subtype of Epidermolysis Bullosa: Subclassification with Prognostic Implications, *J Invest Dermatol*, 137(12), 2649-2652.
48. H. Vahidnezhad, L. Youssefian, S. Zeinali, A.H. Saeidian, S. Sotoudeh, N. Mozafari, M. Abiri, A.M. Kajbafzadeh, M. Barzegar, A. Ertel, P. Fortina, and J. Uitto, 2017, Dystrophic Epidermolysis Bullosa: COL7A1 Mutation Landscape in a Multi-Ethnic Cohort of 152 Extended Families with High Degree of Customary Consanguineous Marriages, *J Invest Dermatol*, 137(3), 660-669.
 49. J.W. Bauer, E.M. Muraier, V. Wally, and U. Koller, 2013, *RNA Trans-Splicing for Genodermatoses*, in *Molecular Dermatology: Methods and Protocols*, C. Has and C. Sitaru, Editors., Humana Press: Totowa, NJ. p. 441-455.
 50. S.M. Lwin, F. Syed, W.L. Di, T. Kadiyirire, L. Liu, A. Guy, A. Petrova, A. Abdul-Wahab, F. Reid, R. Phillips, M. Elstad, C. Georgiadis, S. Aristodemou, P.A. Lovell, J.R. McMillan, J. Mee, S. Miskinyte, M. Titeux, L. Ozoemena, R. Pramanik, S. Serrano, R. Rowles, C. Maurin, E. Orrin, M. Martinez-Queipo, E. Rashidghamat, C. Tziotzios, A. Onoufriadis, M. Chen, L. Chan, F. Farzaneh, M. Del Rio, J. Tolar, J.W. Bauer, F. Larcher, M.N. Antoniou, A. Hovnanian, A.J. Thrasher, J.E. Mellerio, W. Qasim, and J.A. McGrath, 2019, Safety and early efficacy outcomes for lentiviral fibroblast gene therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa, *JCI Insight*, 4(11).
 51. W.F. Yan and D.F. Murrell, 2010, Fibroblast-based cell therapy strategy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa, *Dermatologic Clinics*, 28(2), 367-370.
 52. J. Tolar, A. Ishida-Yamamoto, M.J. Riddle, R.T. McElmurry, M. Osborn, L. Xia, T. Lund, C. Slattery, J. Uitto, A.M. Christiano, J.E. Wagner, and B.R. Blazar, 2009, Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells, *Blood*, 113(5), 1167-1174.
 53. M. Kiuru, M. Itoh, M. S Cairo, and A. M Christiano, 2010, *Bone Marrow Stem Cell Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa*. Vol. 28. 371-82, xii.
 54. C.L. Ebens, J.A. McGrath, K. Tamai, A. Hovnanian, J.E. Wagner, M.J. Riddle, D.R. Keene, T.E. DeFor, R. Tryon, M. Chen, D.T. Woodley, K. Hook, and J. Tolar, 2019, Bone marrow transplant with post-transplant cyclophosphamide for recessive dystrophic epidermolysis bullosa expands the related donor pool and permits tolerance of nonhaematopoietic cellular grafts, *Br J Dermatol*, 181(6), 1238-1246.
 55. J.R. Federico and K. Krishnamurthy, 2021, *Albinism*, in StatPearls. StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
56. G. Garrido, A. Fernández, and L. Montoliu, 2021, HPS11 and OCA8: Two new types of albinism associated with mutations in BLOC1S5 and DCT genes, *Pigment Cell Melanoma Res*, 34(1), 10-12.

57. A. Gargiulo, F. Testa, S. Rossi, V. Di Iorio, S. Fecarotta, T. de Berardinis, A. Iovine, A. Magli, S. Signorini, and E. Fazzi, 2011, Molecular and clinical characterization of albinism in a large cohort of Italian patients, *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(3), 1281-1289.
58. M. Martínez-García and L. Montoliu, 2013, Albinism in Europe, *The Journal of dermatology*, 40(5), 319-324.
59. B. Kamaraj and R. Purohit, 2014, Mutational analysis of oculocutaneous albinism: a compact review, *BioMed research international*, 2014.
60. K. Grønskov, C.M. Dooley, E. Østergaard, R.N. Kelsh, L. Hansen, M.P. Levesque, K. Vilhelmsen, K. Møllgård, D.L. Stemple, and T. Rosenberg, 2013, Mutations in c10orf11, a melanocyte-differentiation gene, cause autosomal-recessive albinism, *Am J Hum Genet*, 92(3), 415-421.
61. T. Kausar, M. Bhatti, M. Ali, R. Shaikh, and Z. Ahmed, 2013, OCA5, a novel locus for non-syndromic oculocutaneous albinism, maps to chromosome 4q24, *Clinical genetics*, 84(1), 91-93.
62. A.H. Wei, D.J. Zang, Z. Zhang, X.Z. Liu, X. He, L. Yang, Y. Wang, Z.Y. Zhou, M.R. Zhang, L.L. Dai, X.M. Yang, and W. Li, 2013, Exome sequencing identifies SLC24A5 as a candidate gene for nonsyndromic oculocutaneous albinism, *J Invest Dermatol*, 133(7), 1834-40.
63. A. Fernández, M. Hayashi, G. Garrido, A. Montero, A. Guardia, T. Suzuki, and L. Montoliu, 2021, Genetics of non-syndromic and syndromic oculocutaneous albinism in human and mouse, *Pigment Cell Melanoma Res*, 34(4), 786-799.
64. P. Pennamen, A. Tingaud-Sequeira, I. Gazova, M. Keighren, L. McKie, S. Marlin, S. Gherbi Halem, J. Kaplan, C. Delevoye, D. Lacombe, C. Plaisant, V. Michaud, E. Lasseaux, S. Javerzat, I. Jackson, and B. Arveiler, 2021, Dopachrome tautomerase variants in patients with oculocutaneous albinism, *Genet Med*, 23(3), 479-487.
65. M. Prashiela, 2018, *Molecular Biology of Albinism*, in *Albinism in Africa: Historical, Geographic, Medical, Genetic, and Psychosocial Aspects*. p. 99-119.
66. B. Kamaraj and R. Purohit, 2014, Mutational analysis of oculocutaneous albinism: A compact review, *Biomed Res Int*, 2014.
67. Y. Tomita, A. Takeda, S. Okinaga, H. Tagami, and S. Shibahara, 1989, Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene, *Biochem Biophys Res Commun*, 164(3), 990-6.
68. S.T. Lee, R.D. Nicholls, M.T. Jong, K. Fukai, and R.A. Spritz, 1995, Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins, *Genomics*, 26(2), 354-63.
69. V. Nikolaou, A.J. Stratigos, and H. Tsao, 2012, Hereditary nonmelanoma skin cancer, *Semin Cutan Med Surg*, 31(4), 204-10.
70. J.E. Hawkes, P.B. Cassidy, P. Manga, R.E. Boissy, D. Goldgar, L. Cannon-Albright, S.R. Florell, and S.A. Leachman, 2013, Report of a novel OCA2 gene

- mutation and an investigation of OCA2 variants on melanoma risk in a familial melanoma pedigree, *J Dermatol Sci*, 69(1), 30-7.
71. H.C. de Vijlder, J.J. de Vijlder, and H.A. Neumann, 2013, Oculocutaneous albinism and skin cancer risk, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27(3), e433-4.
 72. R.E. Boissy, H. Zhao, W.S. Oetting, L.M. Austin, S.C. Wildenberg, Y.L. Boissy, Y. Zhao, R.A. Sturm, V.J. Hearing, R.A. King, and J.J. Nordlund, 1996, Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as "OCA3", *Am J Hum Genet*, 58(6), 1145-56.
 73. N.F. Box, J.R. Wyeth, C.J. Mayne, L.E. O'Gorman, N.G. Martin, and R.A. Sturm, 1998, Complete sequence and polymorphism study of the human TYRP1 gene encoding tyrosinase-related protein 1, *Mamm Genome*, 9(1), 50-3.
 74. C.R. Marçon and M. Maia, 2019, Albinism: epidemiology, genetics, cutaneous characterization, psychosocial factors, *An Bras Dermatol*, 94(5), 503-520.
 75. K. Grønskov, C.M. Dooley, E. Østergaard, R.N. Kelsh, L. Hansen, M.P. Levesque, K. Vilhelmsen, K. Møllgård, D.L. Stemple, and T. Rosenberg, 2013, Mutations in c10orf11, a melanocyte-differentiation gene, cause autosomal-recessive albinism, *The American Journal of Human Genetics*, 92(3), 415-421.
 76. M.T. Bassi, M.V. Schiaffino, A. Renieri, F. De Nigris, L. Galli, M. Bruttini, M. Gebbia, A.A. Bergen, R.A. Lewis, and A. Ballabio, 1995, Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome, *Nature genetics*, 10(1), 13.
 77. P. Falletta, P. Bagnato, M. Bono, M. Monticone, M.V. Schiaffino, D.C. Bennett, C.R. Goding, C. Tacchetti, and C. Valetti, 2014, Melanosome-autonomous regulation of size and number: the OA1 receptor sustains PMEL expression, *Pigment Cell Melanoma Res*, 27(4), 565-79.
 78. L. Montoliu, K. Grønskov, A.H. Wei, M. Martínez-García, A. Fernández, B. Arveiler, F. Morice-Picard, S. Riazuddin, T. Suzuki, Z.M. Ahmed, T. Rosenberg, and W. Li, 2014, Increasing the complexity: new genes and new types of albinism, *Pigment Cell Melanoma Res*, 27(1), 11-8.
 79. C.G. Summers, J.E. Connett, A.M. Holleschau, J.L. Anderson, I. De Becker, B.S. McKay, and M.H. Brilliant, 2014, Does levodopa improve vision in albinism? Results of a randomized, controlled clinical trial, *Clin Exp Ophthalmol*, 42(8), 713-21.
 80. E.M. Surace, L. Domenici, K. Cortese, G. Cotugno, U. Di Vicino, C. Venturi, A. Cellerino, V. Marigo, C. Tacchetti, A. Ballabio, and A. Auricchio, 2005, Amelioration of both functional and morphological abnormalities in the retina of a mouse model of ocular albinism following AAV-mediated gene transfer, *Mol Ther*, 12(4), 652-8.
 81. A. Gargiulo, C. Bonetti, S. Montefusco, S. Neglia, U. Di Vicino, E. Marrocco, M.D. Corte, L. Domenici, A. Auricchio, and E.M. Surace, 2009, AAV-

- mediated tyrosinase gene transfer restores melanogenesis and retinal function in a model of oculo-cutaneous albinism type I (OCA1), *Mol Ther*, 17(8), 1347-54.
82. I.F. Onojafe, D.R. Adams, D.R. Simeonov, J. Zhang, C.C. Chan, I.M. Bernardini, Y.V. Sergeev, M.B. Dolinska, R.P. Alur, M.H. Brilliant, W.A. Gahl, and B.P. Brooks, 2011, Nitisinone improves eye and skin pigmentation defects in a mouse model of oculocutaneous albinism, *J Clin Invest*, 121(10), 3914-23.
 83. D.R. Adams, S. Menezes, R. Jauregui, Z.M. Valivullah, B. Power, M. Abraham, B.G. Jeffrey, A. Garced, R.P. Alur, D. Cunningham, E. Wiggs, M.A. Merideth, P.W. Chiang, S. Bernstein, S. Ito, K. Wakamatsu, R.M. Jack, W.J. Introne, W.A. Gahl, and B.P. Brooks, 2019, One-year pilot study on the effects of nitisinone on melanin in patients with OCA-1B, *JCI Insight*, 4(2).
 84. F. Alasti and G. Van Camp, 2009, Genetics of microtia and associated syndromes, *J Med Genet*, 46(6), 361.
 85. J. Harris, B. Källén, and E. Robert, 1996, The epidemiology of anotia and microtia, *J Med Genet*, 33(10), 809-813.
 86. H. Okajima, Y. Takeichi, K. Umeda, and S. Baba, 1996, Clinical analysis of 592 patients with microtia, *Acta Otolaryngol Suppl*, 525, 18-24.
 87. R. Cabrejo, J. Persing, and M. Alperovich, 2019, Epidemiologic Assessment of Microtia in Over 23 Million Consecutive United States Births, *J Craniofac Surg*, 30(2), 342-346.
 88. D.V. Luquetti, E. Leoncini, and P. Mastroiacovo, 2011, Microtia-anotia: a global review of prevalence rates, *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 91(9), 813-22.
 89. D.V. Luquetti, C.L. Heike, A.V. Hing, M.L. Cunningham, and T.C. Cox, 2012, Microtia: epidemiology and genetics, *Am J Med Genet A*, 158A(1), 124-139.
 90. K. Deng, L. Dai, L. Yi, C. Deng, X. Li, and J. Zhu, 2016, Epidemiologic characteristics and time trend in the prevalence of anotia and microtia in China, *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 106(2), 88-94.
 91. M. Yamauchi, T. Yotsuyanagi, K. Ikeda, M. Yoshikawa, S. Urushidate, M. Mikami, and K. Kamo, 2012, Clinical and genetic analysis of microtia in Japan, *J Plast Surg Hand Surg*, 46(5), 330-4.
 92. D.C. Monks, A. Jahangir, A.L. Shanske, J. Samanich, B.E. Morrow, and M. Babcock, 2010, Mutational analysis of HOXA2 and SIX2 in a Bronx population with isolated microtia, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 74(8), 878-82.
 93. H. Marx, F. Henke, and O. Lubarsh, 1926, Handbuch der spez path anatomie histologie.
 94. Y. Meurman, 1957, Congenital microtia and meatal atresia; observations and aspects of treatment, *AMA Arch Otolaryngol*, 66(4), 443-63.
 95. C. Gendron, A. Schwentker, and J.A. van Aalst, 2016, Genetic Advances in the Understanding of Microtia, *J Pediatr Genet*, 5(4), 189-197.

96. R.C. Tanzer, 1975, The constricted (cup and lop) ear, *Plast Reconstr Surg*, 55(4), 406-15.
97. H. Weerda, 1988, Classification of congenital deformities of the auricle, *Facial Plast Surg*, 5(5), 385-8.
98. A. Hunter, J.L. Frias, G. Gillessen-Kaesbach, H. Hughes, K.L. Jones, and L. Wilson, 2009, Elements of morphology: standard terminology for the ear, *Am J Med Genet A*, 149a(1), 40-60.
99. G.M. Shaw, S.L. Carmichael, Z. Kaidarova, and J.A. Harris, 2004, Epidemiologic characteristics of anotia and microtia in California, 1989-1997, *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 70(7), 472-5.
100. M.B. Forrester and R.D. Merz, 2005, Descriptive epidemiology of anotia and microtia, Hawaii, 1986-2002, *Congenit Anom (Kyoto)*, 45(4), 119-24.
101. J.S. Lopez-Camelo and I.M. Orioli, 1996, Heterogeneous rates for birth defects in Latin America: hints on causality, *Genet Epidemiol*, 13(5), 469-81.
102. G.S. Ang, S.A. Simpson, and A.R. Reddy, 2008, Mycophenolate mofetil embryopathy may be dose and timing dependent, *Am J Med Genet A*, 146a(15), 1963-6.
103. M.T. Anderka, A.E. Lin, D.N. Abuelo, A.A. Mitchell, and S.A. Rasmussen, 2009, Reviewing the evidence for mycophenolate mofetil as a new teratogen: case report and review of the literature, *Am J Med Genet A*, 149a(6), 1241-8.
104. R.S. Stern, F. Rosa, and C. Baum, 1984, Isotretinoin and pregnancy, *J Am Acad Dermatol*, 10(5 Pt 1), 851-4.
105. J.S. Choi, G. Koren, and I. Nulman, 2013, Pregnancy and isotretinoin therapy, *Cmaj*, 185(5), 411-3.
106. D.V. Luquetti, T.C. Cox, J. Lopez-Camelo, G. Dutra Mda, M.L. Cunningham, and E.E. Castilla, 2013, Preferential associated anomalies in 818 cases of microtia in South America, *Am J Med Genet A*, 161a(5), 1051-7.
107. E. Giannatou, H. Leze, A. Katana, A. Kolialexi, A. Mavrou, E. Kanavakis, and S. Kitsiou-Tzeli, 2009, Unilateral microtia in an infant with trisomy 18 mosaicism, *J Genet Couns*, 20, 181-7.
108. C.B. Griffith, G.H. Vance, and D.D. Weaver, 2009, Phenotypic variability in trisomy 13 mosaicism: Two new patients and literature review, *Am J Med Genet A*, 149A(6), 1346-1358.
109. A.F. Davies, K. Imaizumi, G. Mirza, R.S. Stephens, Y. Kuroki, M. Matsuno, and J. Ragoussis, 1998, Further evidence for the involvement of human chromosome 6p24 in the aetiology of orofacial clefting, *J Med Genet*, 35(10), 857-861.
110. J.A. Veltman, Y. Jonkers, I. Nuijten, I. Janssen, W. van der Vliet, E. Huys, J. Vermeesch, G. Van Buggenhout, J.-P. Fryns, R. Admiraal, P. Terhal, D. Lacombe, A.G. van Kessel, D. Smeets, E.F.P.M. Schoenmakers, and C.M. van Ravenswaaij-Arts, 2003, Definition of a critical region on chromosome 18 for

- congenital aural atresia by arrayCGH, *American journal of human genetics*, 72(6), 1578-1584.
111. Q. Zhang, J. Zhang, and W. Yin, 2010, Pedigree and genetic study of a bilateral congenital microtia family, *Plast Reconstr Surg*, 125(3), 979-987.
 112. L. Lin, B. Pan, H.Y. Jiang, H.X. Zhuang, Y.Y. Zhao, Q.H. Yang, L.R. He, J. Han, and S.J. Wang, 2009, Study of methylation of promoter of EYA1 gene in microtia, *Chinese journal of plastic surgery*, 25, 436-9.
 113. S. Hao, L. Jin, C. Li, H. Wang, F. Zheng, D. Ma, and T. Zhang, 2016, Mutational analysis of GSC, HOXA2 and PRKRA in 106 Chinese patients with microtia, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 93.
 114. P. Wang, X. Fan, Y. Wang, Y. Fan, Y. Liu, S. Zhang, and X. Chen, 2017, Target sequencing of 307 deafness genes identifies candidate genes implicated in microtia, *Oncotarget*, 8(38), 63324-63332.
 115. R.D. Knight and T.F. Schilling, 2006, Cranial neural crest and development of the head skeleton, *Adv Exp Med Biol*, 589, 120-33.
 116. R.A. Bly, A.D. Bhrany, C.S. Murakami, and K.C. Sie, 2016, Microtia Reconstruction, *Facial Plast Surg Clin North Am*, 24(4), 577-591.
 117. H.T. Liao, R. Zheng, W. Liu, W.J. Zhang, Y. Cao, and G. Zhou, 2015, Prefabricated, ear-shaped cartilage tissue engineering by scaffold-free porcine chondrocyte membrane, *Plast Reconstr Surg*, 135(2), 313e-321e.
 118. B.P. Cohen, R.C. Hooper, J.L. Puetzer, R. Nordberg, O. Asanbe, K.A. Hernandez, J.A. Spector, and L.J. Bonassar, 2016, Long-Term Morphological and Microarchitectural Stability of Tissue-Engineered, Patient-Specific Auricles In Vivo, *Tissue Eng Part A*, 22(5-6), 461-8.
 119. G. Zhou, H. Jiang, Z. Yin, Y. Liu, Q. Zhang, C. Zhang, B. Pan, J. Zhou, X. Zhou, H. Sun, D. Li, A. He, Z. Zhang, W. Zhang, W. Liu, and Y. Cao, 2018, In Vitro Regeneration of Patient-specific Ear-shaped Cartilage and Its First Clinical Application for Auricular Reconstruction, *EBioMedicine*, 28, 287-302.
 120. O.Y. Joo, T.H. Kim, Y.S. Kim, T.S. Roh, E.J. Lee, J.H. Shim, H.W. Cho, and I.S. Yun, 2023, Fabrication of 3D-Printed Implant for Two-Stage Ear Reconstruction Surgery and Its Clinical Application, *Yonsei Med J*, 64(4), 291-296.
 121. B.P. Cohen, J.L. Bernstein, K.A. Morrison, J.A. Spector, and L.J. Bonassar, 2018, Tissue engineering the human auricle by auricular chondrocyte-mesenchymal stem cell co-implantation, *PLoS One*, 13(10), e0202356.
 122. A. Fernandez-Marmiesse, S. Gouveia, and M.L. Couce, 2018, NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research , Diagnosis and Treatment, *Curr Med Chem*, 25(3), 404-432.
 123. C.F. Wright, T.W. Fitzgerald, W.D. Jones, S. Clayton, J.F. McRae, M. van Kogelenberg, D.A. King, K. Ambridge, D.M. Barrett, T. Bayzatinova, A.P. Bevan, E. Bragin, E.A. Chatzimichali, S. Gribble, P. Jones, N. Krishnappa, L.E. Mason, R. Miller, K.I. Morley, V. Parthiban, E. Prigmore, D. Rajan, A. Sifrim,

- G.J. Swaminathan, A.R. Tivey, A. Middleton, M. Parker, N.P. Carter, J.C. Barrett, M.E. Hurles, D.R. FitzPatrick, and H.V. Firth, 2015, Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data, *Lancet*, 385(9975), 1305-14.
124. G. Baynam, N. Pachter, F. McKenzie, S. Townshend, J. Slee, C. Kiraly-Borri, A. Vasudevan, A. Hawkins, S. Broley, L. Schofield, H. Verhoef, C.E. Walker, C. Molster, J.M. Blackwell, S. Jamieson, D. Tang, T. Lassmann, K. Mina, J. Beilby, M. Davis, N. Laing, L. Murphy, T. Weeramanthri, H. Dawkins, and J. Goldblatt, 2016, The rare and undiagnosed diseases diagnostic service - application of massively parallel sequencing in a state-wide clinical service, *Orphanet J Rare Dis*, 11(1), 77.
125. C.M. Reuter, E. Brimble, C. DeFilippo, A.M. Dries, G.M. Enns, E.A. Ashley, J.A. Bernstein, P.G. Fisher, and M.T. Wheeler, 2018, A New Approach to Rare Diseases of Children: The Undiagnosed Diseases Network, *J Pediatr*, 196, 291-297.e2.
126. S. Marwaha, J.W. Knowles, and E.A. Ashley, 2022, A guide for the diagnosis of rare and undiagnosed disease: beyond the exome, *Genome Med*, 14(1), 23.
127. N.M. Thu and T.H. Khang, 2011, Nghiên cứu tình hình và biểu hiện lâm sàng bệnh ly thượng bì bóng nước bẩm sinh tại Bệnh viện Da liễu Trung ương 2007-2011, *Da liễu học*, 5, 10-15.
128. L.T.T. Hương, N.T. Liêm, T.T. Huyền, and H.N.T.v. CS, 2013, Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, biến chứng của bệnh ly thượng bì bóng nước bẩm sinh thể loạn dưỡng, *Tạp chí Y dược lâm sàng* 108, 8(2), 52-58.
129. N.T. Duong, L.T.L. Anh, N.H. Sau, N.B. Anh, N. Miyake, N. Van Hai, and N. Matsumoto, 2022, Correction: A rare homozygous missense mutation of COL7A1 in a Vietnamese family, *Hum Genome Var*, 9(1), 22.
130. N.T. Xuyên, T.H. Khang, and L.N. Khuê, 2015, *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh da liễu*, B.Y. tế, Editor. p. 244-249.
131. H. Li and R. Durbin, 2009, Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform, *bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.
132. K. Wang, M. Li, and H. Hakonarson, 2010, ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data, *Nucleic Acids Res*, 38(16), e164.
133. D. Szklarczyk, A.L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, N.T. Doncheva, J.H. Morris, P. Bork, L.J. Jensen, and C.V. Mering, 2019, STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D607-d613.
134. J. Yang, L. Chen, X. Kong, T. Huang, and Y.D. Cai, 2014, Analysis of tumor suppressor genes based on gene ontology and the KEGG pathway, *PLoS One*, 9(9), e107202.

135. Z. Li, B.Q. Li, M. Jiang, L. Chen, J. Zhang, L. Liu, and T. Huang, 2013, Prediction and analysis of retinoblastoma related genes through gene ontology and KEGG, *Biomed Res Int*, 2013, 304029.
136. L. Chen, Y.H. Zhang, M. Zheng, T. Huang, and Y.D. Cai, 2016, Identification of compound-protein interactions through the analysis of gene ontology, KEGG enrichment for proteins and molecular fragments of compounds, *Mol Genet Genomics*, 291(6), 2065-2079.
137. M. Kanehisa, M. Furumichi, M. Tanabe, Y. Sato, and K. Morishima, 2017, KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs, *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D353-d361.
138. S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, and H.L. Rehm, 2015, Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet Med*, 17(5), 405-24.
139. A.M. Christiano, J.A. McGrath, and J. Uitto, 1996, Influence of the second COL7A1 mutation in determining the phenotypic severity of recessive dystrophic epidermolysis bullosa, *J Invest Dermatol*, 106(4), 766-770.
140. J.S. Kern, J. Kohlhase, L. Bruckner-Tuderman, and C. Has, 2006, Expanding the COL7A1 mutation database: novel and recurrent mutations and unusual genotype-phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa, *J Invest Dermatol*, 126(5), 1006-1012.
141. N. Liu, X.D. Kong, H.R. Shi, Q.H. Wu, and M. Jiang, 2014, Tyrosinase gene mutations in the Chinese Han population with OCA1, *Genet Res (Camb)*, 96, e14.
142. Q. Yang, S. Yi, M. Li, B. Xie, J. Luo, J. Wang, X. Rong, Q. Zhang, Z. Qin, L. Hang, S. Feng, and X. Fan, 2019, Genetic analyses of oculocutaneous albinism types 1 and 2 with four novel mutations, *BMC Med Genet*, 20(1), 106.
143. K. Wertheim-Tysarowska, A. Sobczyńska-Tomaszewska, C. Kowalewski, M. Skroński, G. Świąćkowski, A. Kutkowska-Kaźmierczak, K. Woźniak, and J. Bal, 2012, The COL7A1 mutation database, *Hum Mutat*, 33(2), 327-331.
144. A.M. Christiano, S. Amano, L.F. Eichenfield, R.E. Burgeson, and J. Uitto, 1997, Premature termination codon mutations in the type VII collagen gene in recessive dystrophic epidermolysis bullosa result in nonsense-mediated mRNA decay and absence of functional protein, *J Invest Dermatol*, 109(3).
145. A.M. Christiano, J.A. McGrath, K.C. Tan, and J. Uitto, 1996, Glycine substitutions in the triple-helical region of type VII collagen result in a spectrum of dystrophic epidermolysis bullosa phenotypes and patterns of inheritance, *Am J Hum Genet*, 58(4), 671-81.
146. H. Shimizu, J.A. McGrath, A.M. Christiano, T. Nishikawa, and J. Uitto, 1996, Molecular basis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa:

- genotype/phenotype correlation in a case of moderate clinical severity, *J Invest Dermatol*, 106(1), 119-24.
147. J. Uitto, 2011, Glycine Substitution Mutations in the COL7A1 Gene: Implications for Inheritance of Dystrophic Epidermolysis Bullosa—Dominant vs. Recessive, *Acta Derm Venereol*, 91(3), 259-261.
 148. Y. Yan, Z. Meng, S. Hao, F. Wang, X. Jin, D. Sun, H. Gao, and X. Ma, 2018, Five Novel COL7A1 Gene Mutations in Three Chinese Patients with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa, *Ann Clin Lab Sci*, 48(1), 100-105.
 149. A. Abramowicz and M. Gos, 2018, Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation, *J Appl Genet*, 59(3), 253-268.
 150. T. Hamada, Y. Kawano, W. Szczecinska, K. Wozniak, S. Yasumoto, C. Kowalewski, and T. Hashimoto, 2005, Novel keratin 5 and 14 gene mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex from Poland, *Arch Dermatol Res*, 296(12), 577-9.
 151. H. Schumann, W. Roth, C. Has, A. Volz, C. Erfurt-Berge, T.M. Magin, and L. Bruckner-Tuderman, 2012, Verrucous carcinoma in epidermolysis bullosa simplex is possibly associated with a novel mutation in the keratin 5 gene, *Br J Dermatol*, 167(4), 929-36.
 152. K. Wertheim-Tysarowska, M. Ołdak, A. Giza, A. Kutkowska-Kaźmierczak, J. Sota, D. Przybylska, K. Woźniak, D. Śniegórska, K. Niepokój, A. Sobczyńska-Tomaszewska, A.M. Rygiel, R. Płoski, J. Bal, and C. Kowalewski, 2016, Novel sporadic and recurrent mutations in KRT5 and KRT14 genes in Polish epidermolysis bullosa simplex patients: further insights into epidemiology and genotype-phenotype correlation, *J Appl Genet*, 57(2), 175-81.
 153. F.B. Müller, I. Anton-Lamprecht, W. Küster, and B.P. Korge, 1999, A premature stop codon mutation in the 2B helix termination peptide of keratin 5 in a German epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara case, *J Invest Dermatol*, 112(6), 988-90.
 154. E.N. Kim, A.G. Harris, L.J. Bingham, W. Yan, J.C. Su, and D.F. Murrell, 2017, A Review of 52 Pedigrees with Epidermolysis Bullosa Simplex Identifying Ten Novel Mutations in KRT5 and KRT14 in Australia, *Acta Derm Venereol*, 97(9), 1114-1119.
 155. D. Sathishkumar, E. Orrin, A. Terron-Kwiatkowski, F. Browne, A.E. Martinez, J.E. Mellerio, M. Ogboli, S. Hoey, L. Ozoemena, L. Liu, D. Baty, J.A. McGrath, and C. Moss, 2016, The p.Glu477Lys Mutation in Keratin 5 Is Strongly Associated with Mortality in Generalized Severe Epidermolysis Bullosa Simplex, *J Invest Dermatol*, 136(3), 719-721.
 156. L. Lalor, M. Titeux, F. Palisson, I. Fuentes, M.J. Yubero, K. Tasanen, L. Huilaja, C. Has, G. Tadini, A.N. Haggstrom, A. Hovnanian, and A.W. Lucky, 2019, Epidermolysis bullosa simplex-generalized severe type due to keratin 5 p.Glu477Lys mutation: Genotype-phenotype correlation and in silico modeling analysis, *Pediatr Dermatol*, 36(1), 132-138.

157. T. Komori, T. Dainichi, Y. Masuno, A. Otsuka, H. Nakano, D. Sawamura, A. Ishida-Yamamoto, and K. Kabashima, 2018, p.Glu477Lys mutation in keratin 5 is not necessarily mortal in generalized severe epidermolysis bullosa simplex, *J Dermatol*, 45(8), e209-e210.
158. K. Stephens, P. Ehrlich, M. Weaver, R. Le, A. Spencer, and V.P. Sybert, 1997, Primers for exon-specific amplification of the KRT5 gene: identification of novel and recurrent mutations in epidermolysis bullosa simplex patients, *J Invest Dermatol*, 108(3), 349-53.
159. A. Mota, S. Fonseca, A. Carneiro, A. Magalhães, E. Brandão, and F. Falcão-Reis, 2012, Isolated foveal hypoplasia: Tomographic, angiographic and autofluorescence patterns, *Case Rep Ophthalmol Med*, 2012, 864958.
160. G. Querques, F. Prascina, C. Iaculli, and N. Delle Noci, 2009, Isolated foveal hypoplasia, *Int Ophthalmol*, 29(4), 271-4.
161. W.S. Oetting, J.P. Fryer, and R.A. King, 1998, Mutations of the human tyrosinase gene associated with tyrosinase related oculocutaneous albinism (OCA1). Mutations in brief no. 204. Online, *Hum Mutat*, 12(6), 433-4.
162. Y. Lin, X. Chen, Y. Yang, F. Che, S. Zhang, L. Yuan, and Y. Wu, 2019, Mutational analysis of TYR, OCA2, and SLC45A2 genes in Chinese families with oculocutaneous albinism, *Mol Genet Genomic Med*, 7(7), e00687.
163. Y. Wang, X. Guo, W. Li, and S. Lian, 2009, Four novel mutations of TYR gene in Chinese OCA1 patients, *J Dermatol Sci*, 53(1), 80-1.
164. A. Wei, Y. Wang, Y. Long, Y. Wang, X. Guo, Z. Zhou, W. Zhu, J. Liu, X. Bian, S. Lian, and W. Li, 2010, A comprehensive analysis reveals mutational spectra and common alleles in Chinese patients with oculocutaneous albinism, *J Invest Dermatol*, 130(3), 716-24.
165. Z. Zhong, L. Gu, X. Zheng, N. Ma, Z. Wu, J. Duan, J. Zhang, and J. Chen, 2019, Comprehensive analysis of spectral distribution of a large cohort of Chinese patients with non-syndromic oculocutaneous albinism facilitates genetic diagnosis, *Pigment Cell Melanoma Res*, 32(5), 672-686.
166. M. Goto, K.C. Sato-Matsumura, D. Sawamura, K. Yokota, H. Nakamura, and H. Shimizu, 2004, Tyrosinase gene analysis in Japanese patients with oculocutaneous albinism, *J Dermatol Sci*, 35(3), 215-20.
167. S.H. Park, H. Chae, Y. Kim, and M. Kim, 2012, Molecular analysis of Korean patients with oculocutaneous albinism, *Jpn J Ophthalmol*, 56(1), 98-103.
168. T. Suzuki and Y. Tomita, 2008, Recent advances in genetic analyses of oculocutaneous albinism types 2 and 4, *J Dermatol Sci*, 51(1), 1-9.
169. K. Grønskov, J. Ek, and K. Brøndum-Nielsen, 2007, Oculocutaneous albinism, *Orphanet journal of rare diseases*, 2(1), 43.
170. R.A. King, J. Pietsch, J.P. Fryer, S. Savage, M.J. Brott, I. Russell-Eggitt, C.G. Summers, and W.S. Oetting, 2003, Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism 1 (OCA1): Definition of the phenotype, *Hum Genet*, 113(6), 502-13.

171. M.N. Preising, H. Forster, M. Gonser, and B. Lorenz, 2011, Screening of TYR, OCA2, GPR143, and MC1R in patients with congenital nystagmus, macular hypoplasia, and fundus hypopigmentation indicating albinism, *Mol Vis*, 17, 939-48.
172. L. Hongyi, W. Haiyun, Z. Hui, W. Qing, D. Honglei, M. Shu, and J. Weiyang, 2007, Prenatal diagnosis of oculocutaneous albinism type II and novel mutations in two Chinese families, *Prenat Diagn*, 27(6), 502-6.
173. H.C. Johanson, W. Chen, C. Wicking, and R.A. Sturm, 2010, Inheritance of a novel mutated allele of the OCA2 gene associated with high incidence of oculocutaneous albinism in a Polynesian community, *J Hum Genet*, 55(2), 103-11.
174. V. Shotelersuk, S. Hazelwood, D. Larson, F. Iwata, M.I. Kaiser-Kupfer, E. Kuehl, I. Bernardini, and W.A. Gahl, 1998, Three new mutations in a gene causing Hermansky-Pudlak syndrome: Clinical correlations, *Mol Genet Metab*, 64(2), 99-107.
175. J. Oh, L. Ho, S. Ala-Mello, D. Amato, L. Armstrong, S. Bellucci, G. Carakushansky, J.P. Ellis, C.T. Fong, J.S. Green, E. Heon, E. Legius, A.V. Levin, H.K. Nieuwenhuis, A. Pinckers, N. Tamura, M.L. Whiteford, H. Yamasaki, and R.A. Spritz, 1998, Mutation analysis of patients with Hermansky-Pudlak syndrome: A frameshift hot spot in the HPS gene and apparent locus heterogeneity, *Am J Hum Genet*, 62(3), 593-8.
176. C. Carmona-Rivera, R.A. Hess, K. O'Brien, G. Golas, E. Tsilou, J.G. White, W.A. Gahl, and M. Huizing, 2011, Novel mutations in the HPS1 gene among Puerto Rican patients, *Clin Genet*, 79(6), 561-7.
177. C. Carmona-Rivera, G. Golas, R.A. Hess, N.D. Cardillo, E.H. Martin, K. O'Brien, E. Tsilou, B.R. Gochuico, J.G. White, M. Huizing, and W.A. Gahl, 2011, Clinical, molecular, and cellular features of non-Puerto Rican Hermansky-Pudlak syndrome patients of Hispanic descent, *J Invest Dermatol*, 131(12), 2394-400.
178. A. Wei, Y. Yuan, D. Bai, J. Ma, Z. Hao, Y. Zhang, J. Yu, Z. Zhou, L. Yang, X. Yang, L. Li, and W. Li, 2016, NGS-based 100-gene panel of hypopigmentation identifies mutations in Chinese Hermansky-Pudlak syndrome patients, *Pigment Cell Melanoma Res*, 29(6), 702-706.
179. M.A. Merideth, L.M. Vincent, S.E. Sparks, R.A. Hess, I. Manoli, K.J. O'Brien, E. Tsilou, J.G. White, M. Huizing, and W.A. Gahl, 2009, Hermansky-Pudlak syndrome in two African-American brothers, *Am J Med Genet A*, 149a(5), 987-92.
180. S. Ito, T. Suzuki, K. Inagaki, N. Suzuki, K. Takamori, T. Yamada, M. Nakazawa, M. Hatano, H. Takiwaki, Y. Kakuta, R.A. Spritz, and Y. Tomita, 2005, High frequency of Hermansky-Pudlak syndrome type 1 (HPS1) among Japanese albinism patients and functional analysis of HPS1 mutant protein, *J Invest Dermatol*, 125(4), 715-20.
181. H.Y. Xiong, B. Alipanahi, L.J. Lee, H. Bretschneider, D. Merico, R.K. Yuen, Y. Hua, S. Guerousov, H.S. Najafabadi, T.R. Hughes, Q. Morris, Y. Barash,

- A.R. Krainer, N. Jovic, S.W. Scherer, B.J. Blencowe, and B.J. Frey, 2015, RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease, *Science*, 347(6218), 1254806.
182. S. Abdelhak, V. Kalatzis, R. Heilig, S. Compain, D. Samson, C. Vincent, D. Weil, C. Cruaud, I. Sahly, M. Leibovici, M. Bitner-Glindzicz, M. Francis, D. Lacombe, J. Vigneron, R. Charachon, K. Boven, P. Bedbeder, N. Van Regemorter, J. Weissenbach, and C. Petit, 1997, A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family, *Nat Genet*, 15(2), 157-64.
 183. D.J. Orten, S.M. Fischer, J.L. Sorensen, U. Radhakrishna, C.W. Cremers, H.A. Marres, G. Van Camp, K.O. Welch, R.J. Smith, and W.J. Kimberling, 2008, Branchio-oto-renal syndrome (BOR): Novel mutations in the EYA1 gene, and a review of the mutational genetics of BOR, *Hum Mutat*, 29(4), 537-44.
 184. M.A. Mansilla, R.R. Sompallae, C.J. Nishimura, A.E. Kwitek, M.J. Kimble, M.E. Freese, C.A. Campbell, R.J. Smith, and C.P. Thomas, 2021, Targeted broad-based genetic testing by next-generation sequencing informs diagnosis and facilitates management in patients with kidney diseases, *Nephrol Dial Transplant*, 36(2), 295-305.
 185. E.H. Chang, M. Menezes, N.C. Meyer, R.A. Cucci, V.S. Vervoort, C.E. Schwartz, and R.J. Smith, 2004, Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences, *Hum Mutat*, 23(6), 582-9.
 186. K. Miyazono, Y. Kamiya, and M. Morikawa, 2010, Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction, *J Biochem*, 147(1), 35-51.
 187. W. Liu, Q. Wang, Y. Guo, L. Lin, Q. Yang, and H. Jiang, 2022, Whole-genome sequencing identifies two novel rare mutations in BMP5 and BMP2 in monozygotic twins with microtia, *J Craniofac Surg*, 33(2), e212-e217.
 188. W. Wang, Y. Liu, J. Hao, S. Zheng, Y. Wen, X. Xiao, A. He, Q. Fan, F. Zhang, and R. Liu, 2016, Comparative analysis of gene expression profiles of hip articular cartilage between non-traumatic necrosis and osteoarthritis, *Gene*, 591(1), 43-47.
 189. J.S. Amberger, C.A. Bocchini, A.F. Scott, and A. Hamosh, 2019, OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships, *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D1038-d1043.
 190. J.S. Amberger, C.A. Bocchini, F. Schiettecatte, A.F. Scott, and A. Hamosh, 2015, OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders, *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D789-98.
 191. C.F. Wright, D.R. FitzPatrick, and H.V. Firth, 2018, Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children, *Nat Rev Genet*, 19(5), 253-268.
 192. E. Union, 2008, "European Commission," in *Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions on Rare Diseases: Europe's Challenges*: <https://op.europa.eu/s/oL1S>.

193. Z. Liu, L. Zhu, R. Roberts, and W. Tong, 2019, Toward Clinical Implementation of Next-Generation Sequencing-Based Genetic Testing in Rare Diseases: Where Are We?, *Trends Genet*, 35(11), 852-867.
194. S.E. Soden, E.G. Farrow, C.J. Saunders, and J.D. Lantos, 2012, Genomic medicine: evolving science, evolving ethics, *Per Med*, 9(5), 523-528.
195. J. Kruse, R. Mueller, A.A. Aghdassi, M.M. Lerch, and S. Salloch, 2021, Genetic Testing for Rare Diseases: A Systematic Review of Ethical Aspects, *Front Genet*, 12, 701988.
196. J. Weiner, J. Sharma, J. Lantos, and H. Kilbride, 2011, How infants die in the neonatal intensive care unit: trends from 1999 through 2008, *Arch Pediatr Adolesc Med*, 165(7), 630-4.
197. A.M. Elliott, C. du Souich, A. Lehman, I. Guella, D.M. Evans, T. Candido, L. Tooman, L. Armstrong, L. Clarke, W. Gibson, H. Gill, P.M. Lavoie, S. Lewis, M.L. McKinnon, S.M. Nikkel, M. Patel, A. Solimano, A. Synnes, J. Ting, M. van Allen, J. Christilaw, M.J. Farrer, J.M. Friedman, and H. Osiovich, 2019, RAPIDOMICS: rapid genome-wide sequencing in a neonatal intensive care unit-successes and challenges, *Eur J Pediatr*, 178(8), 1207-1218.
198. C.J. Saunders, N.A. Miller, S.E. Soden, D.L. Dinwiddie, A. Noll, N.A. Alnadi, N. Andraws, M.L. Patterson, L.A. Krivohlavek, J. Fellis, S. Humphray, P. Saffrey, Z. Kingsbury, J.C. Weir, J. Betley, R.J. Grocock, E.H. Margulies, E.G. Farrow, M. Artman, N.P. Safina, J.E. Petrikin, K.P. Hall, and S.F. Kingsmore, 2012, Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units, *Sci Transl Med*, 4(154), 154ra135.
199. L.K. Willig, J.E. Petrikin, L.D. Smith, C.J. Saunders, I. Thiffault, N.A. Miller, S.E. Soden, J.A. Cakici, S.M. Herd, G. Twist, A. Noll, M. Creed, P.M. Alba, S.L. Carpenter, M.A. Clements, R.T. Fischer, J.A. Hays, H. Kilbride, R.J. McDonough, J.L. Rosterman, S.L. Tsai, L. Zellmer, E.G. Farrow, and S.F. Kingsmore, 2015, Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: a retrospective analysis of diagnostic and clinical findings, *Lancet Respir Med*, 3(5), 377-87.
200. S.C. Bowdin, 2016, The clinical utility of next-generation sequencing in the neonatal intensive care unit, *Cmaj*, 188(11), 786-787.
201. J.S. Berg, P.B. Agrawal, D.B. Bailey, Jr., A.H. Beggs, S.E. Brenner, A.M. Brower, J.A. Cakici, O. Ceyhan-Birsoy, K. Chan, F. Chen, R.J. Currier, D. Dukhovny, R.C. Green, J. Harris-Wai, I.A. Holm, B. Iglesias, G. Joseph, S.F. Kingsmore, B.A. Koenig, P.Y. Kwok, J. Lantos, S.J. Leeder, M.A. Lewis, A.L. McGuire, L.V. Milko, S.D. Mooney, R.B. Parad, S. Pereira, J. Petrikin, B.C. Powell, C.M. Powell, J.M. Puck, H.L. Rehm, N. Risch, M. Roche, J.T. Shieh, N. Veeraraghavan, M.S. Watson, L. Willig, T.W. Yu, T. Urv, and A.L. Wise, 2017, Newborn Sequencing in Genomic Medicine and Public Health, *Pediatrics*, 139(2).
202. J.E. Petrikin, J.A. Cakici, M.M. Clark, L.K. Willig, N.M. Sweeney, E.G. Farrow, C.J. Saunders, I. Thiffault, N.A. Miller, L. Zellmer, S.M. Herd, A.M. Holmes, S. Batalov, N. Veeraraghavan, L.D. Smith, D.P. Dimmock, J.S.

- Leeder, and S.F. Kingsmore, 2018, The NSIGHT1-randomized controlled trial: rapid whole-genome sequencing for accelerated etiologic diagnosis in critically ill infants, *NPJ Genom Med*, 3, 6.
203. J.E. Petrikin, L.K. Willig, L.D. Smith, and S.F. Kingsmore, 2015, Rapid whole genome sequencing and precision neonatology, *Semin Perinatol*, 39(8), 623-31.
204. L. Meng, M. Pammi, A. Saronwala, P. Magoulas, A.R. Ghazi, F. Vetrini, J. Zhang, W. He, A.V. Dharmadhikari, C. Qu, P. Ward, A. Braxton, S. Narayanan, X. Ge, M.J. Tokita, T. Santiago-Sim, H. Dai, T. Chiang, H. Smith, M.S. Azamian, L. Robak, B.L. Bostwick, C.P. Schaaf, L. Potocki, F. Scaglia, C.A. Bacino, N.A. Hanchard, M.F. Wangler, D. Scott, C. Brown, J. Hu, J.W. Belmont, L.C. Burrage, B.H. Graham, V.R. Sutton, W.J. Craigen, S.E. Plon, J.R. Lupski, A.L. Beaudet, R.A. Gibbs, D.M. Muzny, M.J. Miller, X. Wang, M.S. Leduc, R. Xiao, P. Liu, C. Shaw, M. Walkiewicz, W. Bi, F. Xia, B. Lee, C.M. Eng, Y. Yang, and S.R. Lalani, 2017, Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management, *JAMA Pediatr*, 171(12), e173438.
205. V.K. Yenamandra, S.K. Vellarikkal, M. Kumar, M.R. Chowdhury, R. Jayarajan, A. Verma, V. Scaria, S. Sivasubbu, S.B. Ray, A.K. Dinda, M. Kabra, P. Kaur, V.K. Sharma, and G. Sethuraman, 2017, Application of whole exome sequencing in elucidating the phenotype and genotype spectrum of junctional epidermolysis bullosa: A preliminary experience of a tertiary care centre in India, *J Dermatol Sci*, 86(1), 30-36.
206. V.K. Yenamandra, S.K. Vellarikkal, M.R. Chowdhury, R. Jayarajan, A. Verma, V. Scaria, S. Sivasubbu, S.B. Ray, A.K. Dinda, M. Kabra, V.K. Sharma, and G. Sethuraman, 2018, Genotype-Phenotype Correlations of Dystrophic Epidermolysis Bullosa in India: Experience from a Tertiary Care Centre, *Acta Derm Venereol*, 98(9), 873-879.
207. R. Mahajan, S.K. Vellarikkal, S. Handa, A. Verma, R. Jayarajan, A. Kumar, D. De, J. Kaur, I. Panigrahi, V.S. Vineeth, S. Sivasubbu, and V. Scaria, 2018, Utility of whole-exome sequencing in detecting novel compound heterozygous mutations in COL7A1 among families with severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa in India - implications on diagnosis, prognosis and prenatal testing, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 32(12), e433-e435.
208. L. Gong, C.C. Liu, Y.H. Li, and X.G. Xu, 2019, Whole exome sequencing identified two point mutations of COL7A1 and FLG in a Chinese family with dystrophic epidermolysis bullous pruriginosa and ichthyosis vulgaris, *J Dermatol*, 46(2), 158-160.
209. K. Okamura, M. Hayashi, Y. Abe, M. Kono, K. Nakajima, Y. Aoyama, C. Nishigori, H. Ishimoto, Y. Ishimatsu, M. Nakajima, Y. Hozumi, and T. Suzuki, 2019, NGS-based targeted resequencing identified rare subtypes of albinism: Providing accurate molecular diagnosis for Japanese patients with albinism, *Pigment Cell Melanoma Res*, 32(6), 848-853.

210. K. Okamura, Y. Abe, Y. Araki, K. Wakamatsu, M. Seishima, T. Umetsu, A. Kato, M. Kawaguchi, M. Hayashi, Y. Hozumi, and T. Suzuki, 2018, Characterization of melanosomes and melanin in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome types 1, 4, 6, and 9, *Pigment Cell Melanoma Res*, 31(2), 267-276.
211. G. Petrof, M. Papanikolaou, A.E. Martinez, J.E. Mellerio, J.A. McGrath, A. Bardhan, N. Harper, A. Heagerty, M. Ogboli, C. Chiswell, and C. Moss, 2022, The epidemiology of epidermolysis bullosa in England and Wales: data from the national epidermolysis bullosa database, *Br J Dermatol*, 186(5), 843-848.

PHỤ LỤC

MỤC LỤC

<i>Phụ lục 1. Biên bản bàn giao mẫu nghiên cứu.....</i>	<i>-1-</i>
<i>Phụ lục 2. Phân loại một vài phân nhóm EB theo lâm sàng</i>	<i>-5-</i>
<i>Phụ lục 3. Phân loại bạch tạng theo lâm sàng</i>	<i>-8-</i>
<i>Phụ lục 4. Các thông tin tiền sử gia đình người bệnh thiếu sản vành tai</i>	<i>-10-</i>
<i>Phụ lục 5. Ký hiệu, nồng độ DNA và độ tinh sạch (A260/280) của các mẫu nghiên cứu.....</i>	<i>-16-</i>
<i>Phụ lục 6. Trình tự môi PCR và giải trình tự ở nhóm người bệnh EB.....</i>	<i>-18-</i>
<i>Phụ lục 7. Trình tự môi PCR và giải trình tự ở nhóm người bệnh bạch tạng.....</i>	<i>-19-</i>
<i>Phụ lục 8. Danh sách gen sử dụng trong sàng lọc gen ứng viên liên quan đến thiếu sản vành tai. Bao gồm các gen biểu hiện trong cung mang hoặc ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh, di cư và biệt hóa của các tế bào mầm thần kinh sọ</i>	<i>-20-</i>
<i>Phụ lục 9. Danh sách biến thể phát hiện được ở các bệnh nhân thiếu sản vành tai.....</i>	<i>-22-</i>
<i>Phụ lục 10. Các con đường tín hiệu được chỉ ra qua phân tích làm giàu tập hợp gen theo KEGG trong các trường hợp thiếu sản vành tai</i>	<i>-29-</i>

Phụ lục 1. Biên bản bàn giao mẫu nghiên cứu

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BIÊN BẢN BÀN GIAO MẪU NGHIÊN CỨU

Căn cứ thỏa thuận phối hợp thực hiện đề tài được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và Công nghệ giữa nhóm nghiên cứu của TS. Nguyễn Đăng Tôn, Viện Nghiên cứu hệ gen và bà Lương Thị Lan Anh, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, ký ngày 01 tháng 10 năm 2019 trong việc thăm khám và thu thập mẫu bệnh nhân mắc các bệnh lý thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai cùng với các thành viên gia đình.

Hôm nay, ngày 14 tháng 02 năm 2020, bà Lương Thị Lan Anh, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội bàn giao 49 mẫu máu của 25 mẫu bệnh nhân và 24 mẫu thành viên gia đình người bệnh (có danh sách kèm theo) cho nhóm nghiên cứu của TS. Nguyễn Đăng Tôn, Viện Nghiên cứu hệ gen phục vụ mục đích nghiên cứu.

Hai bên cam kết thực hiện các điều khoản đã ký kết và tuân thủ quy định về Y đức trong nghiên cứu./.

Hà Nội, ngày 14 tháng 02 năm 2020

Đại diện bên giao

(ký, ghi rõ họ tên)



Lương Thị Lan Anh

Đại diện bên nhận

(ký, ghi rõ họ tên)



Nguyễn Đăng Tôn

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

DANH SÁCH MẪU NGHIÊN CỨU

(kèm Biên bản bàn giao mẫu nghiên cứu ngày 14 tháng 02 năm 2020)

STT	Họ và tên	Tuổi	Giới tính	Mối quan hệ
Ly thượng bì bóng nước				
1	Nguyễn V.B	4	Nam	Bệnh nhân
2	Nguyễn V.T	30	Nam	Bố bệnh nhân V.B
3	Trần T.H	26	Nữ	Mẹ bệnh nhân V.B
4	Phạm N.Q	8	Nam	Bệnh nhân
5	Phạm V.T	31	Nam	Bố bệnh nhân V.T
6	Nguyễn T.T	32	Nữ	Mẹ bệnh nhân V.T
7	Lê B.N	< 1	Nữ	Bệnh nhân
8	Lê Q.M	32	Nam	Bố bệnh nhân Q.M
9	Ngô M.T	31	Nam	Mẹ bệnh nhân Q.M
10	Vũ N.T	15	Nam	Bệnh nhân
11	Vũ N.T	7	Nam	Bệnh nhân
12	Vũ N.H	40	Nam	Bố 2 bệnh nhân N.T và N.T
13	Hoàng T.H	39	Nữ	Mẹ 2 bệnh nhân N.T và N.T
14	Phạm V.H	31	Nam	Bệnh nhân
15	Phạm Q.H	56	Nam	Bố bệnh nhân Q.H
16	Nguyễn T.L	55	Nữ	Mẹ bệnh nhân Q.H
17	Nguyễn V.H	13	Nam	Bệnh nhân
18	Nguyễn V.D	42	Nam	Bố bệnh nhân V.D
19	Trịnh T.M	42	Nữ	Mẹ bệnh nhân V.D
20	Nguyễn B.N	7	Nam	Em bệnh nhân V.D
Bạch tạng				
1	Trần Q.B	7	Nam	Bệnh nhân
2	Trần B.A	5	Nam	Bệnh nhân
3	Trần V.H	36	Nam	Bố 2 bệnh nhân Q.B và B.A
4	Nguyễn T.T.L	34	Nữ	Mẹ 2 bệnh nhân Q.B và B.A
5	Bàn A.T	5	Nam	Bệnh nhân
6	Bàn V.T	37	Nam	Bố bệnh nhân A.T
7	Chu T.P	38	Nữ	Mẹ bệnh nhân A.T
8	Bàn K.L	10	Nữ	Chị gái bệnh nhân A.T

CS

STT	Họ và tên	Tuổi	Giới tính	Mối quan hệ
9	Kim V.T	25	Nam	Bệnh nhân
10	Kim T.T.T	23	Nữ	Bệnh nhân
11	Kim V.C	51	Nam	Bố 2 bệnh nhân V.T và T.T
12	Kim T.H	47	Nữ	Mẹ 2 bệnh nhân V.T và T.T
13	Kim V.Đ	17	Nam	Em bệnh nhân V.T và T.T
14	Đào T.H	26	Nữ	Bệnh nhân
15	Đào V.N	49	Nam	Bố bệnh nhân T.H
16	Nguyễn T.N	48	Nữ	Mẹ bệnh nhân T.H
17	Đào T.K	-	Nam	Anh bệnh nhân T.H
18	Ngô V.T	63	Nam	Bệnh nhân
Thiếu sản vành tai				
1	Nguyễn T.T	13	Nam	Bệnh nhân
2	Phạm M.V	24	Nam	Bệnh nhân
3	Vương G.H	11	Nữ	Bệnh nhân
4	Bùi Q.H	14	Nam	Bệnh nhân
5	Đàm Q.A	12	Nam	Bệnh nhân
6	Trần M.L	28	Nữ	Bệnh nhân
7	Nguyễn K.A	14	Nam	Bệnh nhân
8	Văn T.Q.A	13	Nữ	Bệnh nhân
9	Phạm L.P	26	Nữ	Bệnh nhân
10	Lê T.T	21	Nữ	Bệnh nhân
11	Phan Đ.D	20	Nam	Bệnh nhân

Ước

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BIÊN BẢN BÀN GIAO MẪU NGHIÊN CỨU

Căn cứ thỏa thuận phối hợp thực hiện hướng nghiên cứu bệnh di truyền giữa nhóm nghiên cứu của TS. Nguyễn Đăng Tôn, Viện Nghiên cứu hệ gen và TS.BS. Đặng Tiến Trường, Học viện Quân Y.

Hôm nay, ngày ~~17~~ tháng ~~02~~ năm 2020, ông Đặng Tiến Trường, Học viện Quân Y bàn giao 03 mẫu máu của gia đình bệnh nhân ly thượng bì bóng nước (Danh sách kèm theo) cho nhóm nghiên cứu của TS. Nguyễn Đăng Tôn, Viện Nghiên cứu hệ gen phục vụ mục đích nghiên cứu.

Họ và tên	Năm sinh	Giới tính	Mối quan hệ	Số lượng
Nguyễn A.Q.T	2014	Nam	Bệnh nhân	2 ml máu
Nguyễn Q.T	1984	Nam	Bố	2 ml máu
An Đ.N.N	1988	Nữ	Mẹ	2 ml máu

Hai bên cam kết thực hiện các điều khoản đã ký kết và tuân thủ quy định về Y đức trong nghiên cứu./.

Hà Nội, ngày ~~17~~ tháng ~~02~~ năm 2020

Đại diện bên giao

(ký, ghi rõ họ tên)



Đặng Tiến Trường

Đại diện bên nhận

(ký, ghi rõ họ tên)



Nguyễn Đăng Tôn

Phụ lục 2. Phân loại một vài phân nhóm EB theo lâm sàng

Phân nhóm	Đặc điểm đặc trưng [1, 130]
Ly thượng bì bóng nước đơn giản (EBS)	
EBS thể khu trú	<ul style="list-style-type: none"> + Các bóng nước khu trú xuất hiện ở lòng bàn tay bàn chân ngay từ khi mới sinh hoặc trong giai đoạn sơ sinh. + Tăng tiết mồ hôi ở bàn tay bàn chân, hay có bội nhiễm ở bàn chân. + Các tổn thương khi lành không để lại sẹo, phát triển thành dày sừng lòng bàn tay, bàn chân (palmoplantar keratoderma). + Không có tổn thương ở niêm mạc và móng.
EBS thể lan tỏa	<ul style="list-style-type: none"> + Tổn thương xuất hiện ngay trong hoặc sau đẻ, trên phần khớp của bàn tay, khuỷu tay, đầu gối, bàn chân và các vị trí sang chấn lặp đi lặp lại. + Bọng nước lâu lành và lan tỏa, khi lành thường không để lại sẹo sâu. + Dấu hiệu Nikolsky âm tính. + Thường không có tổn thương móng, răng và niêm mạc (nếu có thì nhẹ hơn các phân nhóm EB khác). + Theo thời gian các bóng nước sẽ giảm dần.
EBS thể nặng	<ul style="list-style-type: none"> + Các bóng nước lan tỏa xuất hiện sớm hoặc ngay sau khi sinh và có thể đe dọa tính mạng trong năm đầu đời. + Có thể có những vùng bị lột da bẩm sinh. + Xuất hiện các mụn nước “herpetiform” sau sang chấn hoặc tự phát. + Phát triển dày sừng lòng bàn tay bàn chân và loạn dưỡng móng. + EBS thể nặng kèm teo môn vị: nặng hơn, phỏng rộp toàn thân lan tỏa hoặc không có da khi mới sinh, hẹp môn vị; tử vong sớm trong vòng vài tháng sau khi sinh.
EBS thể trung gian	<ul style="list-style-type: none"> + Tổn thương lan tỏa, nhẹ hơn EBS thể nặng. + Vết thương khi lành tạo thành vùng da loạn sắc tố và các vết sẹo giống như vết bỏng. + Dày sừng, dày móng, loạn dưỡng móng và có thể có nấm móng. + Các trường hợp đặc biệt có thể kèm các triệu chứng đặc trưng khác như: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Biểu hiện giãn cơ tim ở giai đoạn đầu của tuổi trưởng thành: EBS thể trung gian kèm bệnh cơ tim. ▪ Bệnh cơ khởi phát sớm, bao gồm cả bệnh cơ tim: EBS thể trung gian kèm loạn dưỡng cơ.
EBS thể trung gian	<ul style="list-style-type: none"> + Đặc trưng bởi các vết loét ở cẳng tay hoặc chân ngay từ khi sinh. + Vết thương khi lành tạo thành vùng da loạn sắc tố và các vết sẹo giống như vết bỏng. + Dày sừng, dày móng
Ly thượng bì bóng nước liên kết (JEB)	

Phân nhóm	Đặc điểm đặc trưng [1, 130]
JEB thể khu trú	<ul style="list-style-type: none"> + Biểu hiện ngay khi sinh, da mỏng manh, các bóng nước thường khu trú ở bàn tay, bàn chân, cẳng chân và mặt. + Loạn dưỡng móng hoặc không có móng. + Có thể có biểu hiện thiếu sản men răng và dễ sâu răng. + Tóc bình thường.
JEB thể nặng	<ul style="list-style-type: none"> + Các tổn thương xuất hiện ngay khi sinh và các bóng nước khu trú ở vùng quanh móng, móng và khuỷu tay. + Xuất hiện tổ chức hạt quá phát quanh hốc mắt, hốc mũi, miệng. + Rụng tóc và men răng kém (phổ biến). + Bệnh nhân thường có tiếng kêu khàn. + Thường tử vong trong vòng 2 năm đầu đời
JEB thể trung gian	<ul style="list-style-type: none"> + Ít nghiêm trọng hơn JEB thể nặng với sự giảm thiểu phát triển của tổ chức hạt quá phát. + Tăng nguy cơ mắc ung thư biểu mô tế bào gai (SCC) ở tuổi trưởng thành.
Ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng (DEB)	
DDEB thể khu trú	<ul style="list-style-type: none"> + Các tổn thương xuất hiện từ khi mới sinh hoặc trong giai đoạn sơ sinh. + Các bóng nước chủ yếu trên các khớp, đặc biệt là khớp ngón tay, ngón chân, đầu gối, khuỷu, mắt cá. + Hình thành sẹo và mụn hạt kê (milia). + Dấu hiệu Nikolsky dương tính + Loạn dưỡng móng và cuối cùng là rụng móng. + Đôi khi tổn thương ở mặt duỗi chi nhưng hiếm (pretibial form) (khởi phát muộn ở tuổi trưởng thành).
DDEB thể trung gian	<ul style="list-style-type: none"> + Tổn thương xuất hiện khi mới sinh hoặc trong giai đoạn sơ sinh. + Tổn thương lan tỏa, hình thành sẹo và mụn hạt kê (milia), nổi bật trên các khớp, khuỷu tay và đầu gối. + Dấu hiệu Nikolsky dương tính + Có thể có hiệu ứng của chứng miệng nhỏ (microstomia), cứng lưỡi (ankyloglossia) và hẹp thực quản (ít phổ biến hơn so với RDEB thể nặng)
DDEB thoáng qua ở trẻ sơ sinh	<ul style="list-style-type: none"> + Bóng nước xuất hiện ngay khi sinh hoặc sau bất cứ sự cọ sát hoặc sang chấn nhỏ nào, thường là ở các chi với biểu hiện thiếu da có thể xảy ra (chứng ngừng phát triển da bẩm sinh - aplasia cutis congenita). + Lành nhanh trong 4 tháng tuổi hoặc có thể kéo dài trong vòng 2 năm đầu đời. + Móng không có tổn thương.
RDEB thể khu trú	<ul style="list-style-type: none"> + Bóng nước xuất hiện ngay khi mới sinh hoặc trong giai đoạn sơ sinh,

Phân nhóm	Đặc điểm đặc trưng [1, 130]
	<p>khu trú ở các vị trí khớp bàn tay, bàn chân, hoặc đôi khi chỉ ở mặt dưới chi.</p> <p>+ Loạn dưỡng và rụng móng (phổ biến).</p>
RDEB thể nặng	<p>+ Bóng nước lan tỏa ngay từ khi sinh và hình thành sẹo trên khắp cơ thể.</p> <p>+ Có biểu hiện của chứng miệng nhỏ, cứng lưỡi, hẹp thực quản.</p> <p>+ Dính ngón, co rút các ngón thành một bọc, thường không có móng tay hoặc nếu có thì cũng sớm rụng móng.</p> <p>+ Có thể xuất hiện biến chứng mục răng lan tỏa không kiểm soát được</p> <p>+ Nguy cơ cao phát triển thành SCC.</p>
RDEB thể trung gian	<p>+ Các tổn thương cơ bản giống với DDEB thể trung gian nhưng nghiêm trọng hơn với biểu hiện co rút ngón, dị tật chi điển hình.</p> <p>+ Dày sừng dạng sọc (đôi lúc).</p>
RDEB thể đảo ngược	<p>+ Bóng nước lan tỏa ngay khi sinh, mức độ nghiêm trọng trung bình.</p> <p>+ Các tổn thương thường xuất hiện ở những vị trí như khuỷu tay, đầu gối và ít biến chứng.</p>
Hội chứng Kindler (Biểu hiện đa dạng và trộn lẫn giữa các phân nhóm)	
<p>+ Bóng nước toàn thân và da nhạy cảm với ánh sáng ngay từ khi sinh ra hoặc thời thơ ấu với niêm mạc mỏng manh.</p> <p>+ Khi lành phát triển thành tăng/giảm sắc tố kèm theo giãn mạch và teo da ở thượng bì (poikiloderma), rõ nhất là ở lưng, bàn tay và cổ.</p> <p>+ Có thể xảy ra dày sừng lòng bàn tay và không có vân tay.</p> <p>+ Viêm nước và bệnh răng miệng.</p> <p>+ Có thể xuất hiện hẹp thực quản và viêm đại tràng.</p> <p>+ Có thể phát triển thành SCC với tiên lượng kém.</p>	

Phụ lục 3. Phân loại bạch tạng theo lâm sàng

Phân nhóm	Đặc điểm đặc trưng [55]
Bạch tạng da và mắt (OCA)	
OCA1	<p>OCA1A: mắt hoàn toàn sắc tố trên da, tóc và mắt.</p> <ul style="list-style-type: none">+ Da, tóc, lông mày trắng; tròng mắt hồng cho đến đỏ và hoàn toàn trong mờ.+ Rung giật nhãn cầu có thể xuất hiện khi mới sinh hoặc trong giai đoạn sơ sinh.+ Sợ ánh sáng (phổ biến).+ Thị lực dao động từ 20/100 đến 20/400 và thường xuất hiện lác xen kẽ, có thể có biểu hiện của thiếu sản hoàng điểm. <p>OCA1B: “OCA vàng”</p> <ul style="list-style-type: none">+ Da trắng nhưng có thể kèm sạm da cùng nám và tàn nhang.+ Tóc trắng hoặc vàng nhạt khi mới sinh, sẫm dần theo thời gian (vàng hoặc nâu nhạt); lông mi sẫm màu hơn màu tóc và lông mày.+ Mắt màu xanh lam khi mới sinh, có thể chuyển sang nâu hoặc hơi xanh lục nhạt khi lớn lên.+ Rung giật nhãn cầu có thể xuất hiện khi mới sinh hoặc trong giai đoạn sơ sinh.+ Thị lực dao động từ 20/100 đến 20/200
OCA2	<ul style="list-style-type: none">+ Da trắng kem hoặc rám nắng, thường có nám và tàn nhang.+ Tóc và lông mày, lông mi có màu vàng hoặc nâu nhạt, mắt màu xanh lam đến nâu.+ Rung giật nhãn cầu (đa phần), có thể lác và mất chú ý thị giác.+ Thị lực dao động trong khoảng 20/60 - 20/100 và không xấu đi theo thời gian. <p>OCA2 nâu: da, tóc, mắt màu nâu nhưng có biểu hiện giảm sắc tố khi so sánh với các thành viên khác trong gia đình.</p> <p>OCA2 đỏ: tóc thường có màu đỏ, mắt sáng màu và đi kèm các vấn đề về thị lực.</p>
OCA3	<ul style="list-style-type: none">+ Chủ yếu ở người Châu Phi, da màu nâu, nâu đỏ, tóc đỏ hoặc vàng đỏ, mắt màu hạt dẻ hoặc nâu sáng.+ Có thể bị suy giảm thị lực nhưng rất khó phát hiện, thậm chí là không.
OCA4	<ul style="list-style-type: none">+ Da màu kem, rám nắng cho đến bình thường; tóc không bao giờ trắng hoàn toàn, có thể có màu trắng bạc, vàng nhạt đến nâu nhạt. Màu da và màu tóc thường tương quan với nhau.+ Mắt màu xanh lam, hạt dẻ đến nâu nhạt, thị lực dao động từ 20/30 đến 20/400, đa số là ở ngưỡng 20/100 đến 20/200.
OCA5	<ul style="list-style-type: none">+ Da trắng, tóc vàng.+ Có biểu hiện rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm, sợ ánh sáng và

Phân nhóm	Đặc điểm đặc trưng [55]
	suy giảm thị lực
OCA6	+ Khá giống OCA4 với da trắng, tóc màu sáng, sẫm dần khi lớn lên và già đi, mắt có màu nâu. + Rung giật nhãn cầu nhẹ, có biểu hiện của thiếu sản hoàng điểm, sợ ánh sáng ở mức độ nhẹ, thị lực thường là 20/100.
OCA7	+ Màu da của người bệnh thường chỉ nhạt hơn một chút khi so sánh với các thành viên trong gia đình, tóc màu vàng nhạt cho đến nâu sẫm. + Có biểu hiện của rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm và phân tán sắc tố mỏng mắt. + Thị lực dao động từ 20/30 đến 20/400.
OCA8 [56] (Phân nhóm mới)	+ Giảm sắc tố nhẹ ở da và tóc. + Có biểu hiện rung giật nhãn cầu, giảm thị lực, phân tán sắc tố mỏng mắt và giảm sắc tố võng mạc.
HPS	+ Bao gồm các đặc điểm suy giảm sắc tố trên da, tóc và mắt giống các phân nhóm OCA khác: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Da trắng đến ô liu (màu xanh lá cây ánh vàng xỉn), tóc từ trắng đến nâu, giảm sắc tố ở mắt. ▪ Có biểu hiện rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm và phân tán sắc tố mỏng mắt. ▪ Thị lực dao động từ 20/50 đến 20/400. + Có biểu hiện chảy máu nhẹ đến trung bình do rối loạn chức năng tiểu cầu và một số bất thường ở phổi hoặc thận do lắng đọng ceroid.
CHS	+ Bao gồm các đặc điểm suy giảm sắc tố trên da, tóc và mắt giống các phân nhóm OCA khác: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tóc xám hoặc ánh bạc. ▪ Có biểu hiện rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm và chứng sợ ánh sáng. + Dễ bị nhiễm trùng, giảm bạch cầu trung tính, suy thoái thần kinh và rối loạn đông máu nhẹ.
Bạch tạng mắt (OA)	
<p>+ Chỉ bị giảm sắc tố ở mắt.</p> <p>+ Khi so sánh với các thành viên trong gia đình thì da và mắt của bệnh nhân hơi nhạt hơn.</p> <p>+ Có thể có biểu hiện rung giật nhãn cầu, thiếu sản hoàng điểm và chứng sợ ánh sáng. Các bệnh nhân nữ hiếm khi bị rung giật nhãn cầu và suy giảm thị lực hơn so với nam giới.</p> <p>+ Thị lực dao động từ 20/100 đến 20/200.</p>	

Phụ lục 4. Các thông tin tiền sử gia đình người bệnh thiếu sản vành tai

1. **Bệnh nhân: Nguyễn T.T** Ngày sinh: 23/03/2007 Giới tính: Nam Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: BV Đa khoa Sơn Tây

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ thường, đủ tháng, nặng 2300 gr (con đầu).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai bên phải độ III, không có ống tai ngoài phải.

Các dị tật kèm theo khác: Không

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Phùng T.D	1986	2	2	không	Con thứ 2: Nụ thịt thừa trước tai	Không	Bình thường	Không	Không	Thuốc nhuộm tóc
Bố: Nguyễn V.T	1984	-		-	-	Không	Bình thường	Không	Có (ít)	Không

2. **Bệnh nhân: Phạm M.V** Ngày sinh: 15/10/1996 Giới tính: Nam Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: Hà Nội

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ thường, đủ tháng, nặng 2800 gr (con đầu).

Chẩn đoán: Dị tật tai phải độ I, tai trái độ II, không có biểu hiện tật, hẹp ống tai ngoài.

Các dị tật khác: Dò luân nhĩ 2 bên, dò vùng cổ (đã phẫu thuật), 1 quả thận.

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Nguyễn T.H	1968	7	2	Nạo thai 5 lần (2003, 2005, không nhớ)	Không	Không	Bình thường	Không	Không	Không
Bố: Phạm M.T	1962	-		-	-	Không	Bình thường	Thuốc lào, 1 gói/ tuần	Khoảng 500 ml/năm	Không

3. **Bệnh nhân: Vương G.H** Ngày sinh: 15/11/2009 Giới tính: Nữ Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: Hà Nội

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ mổ, đủ tháng, nặng 3700 gr (con thứ 2).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai phải độ III, trái độ I, hẹp ống tai ngoài trái.

Các dị tật khác: Không

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Ngô T.L.P	1979	3	2	Hút thai 1 lần (2015)	Không	Không	Bình thường	Không	Không	Không
Bố: Vương X.B	1977	-		-		Không	Bình thường	10 điếu/ngày	Có	Không

4. **Bệnh nhân: Bùi Q.H** Ngày sinh: 10/05/2006 Giới tính: Nam Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: Lạng Sơn

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ mổ, đủ tháng, nặng 3600 gr (con thứ 2).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai phải độ I, trái độ III, hẹp ống tai ngoài trái.

Các dị tật khác: Không

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Mạc T.D	1972	3	2 (1 con chết do viêm màng não)	Không	Không	U xơ tử cung	Bình thường	Không	Không	Không
Bố: Bùi V.N	1972	-		-		Không	Bình thường	10 điếu/ngày	Có (ít)	Không

5. **Bệnh nhân: Đàm Q.A** Ngày sinh: 10/02/2008 Giới tính: Nam Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: Sóc Sơn, Hà Nội

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ mổ, đủ tháng, nặng 3300 gr (con đầu)

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai phải độ II, trái độ III, hẹp ống tai ngoài phải.

Các dị tật khác: Không

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Phạm T.T	1980	2	2	Không	Không	Viêm gan B	Có bị sốt	Không	Không	Không
Bố: Đàm Q.H	1979	-		-		Không	Bình thường	10 điều/ngày	250 ml/tuần	Không

6. **Bệnh nhân: Trần M.L** Ngày sinh: 08/09/1992 Giới tính: Nữ Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: Hà Nội

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ thường, đủ tháng, nặng 3100 gr (con thứ 2).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai phải độ III, hẹp ống tai ngoài phải, tai trái bình thường.

Các dị tật khác: Không

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Nguyễn T.T.M	1962	2	2	Không	Không	Viêm mũi dị ứng	Bình thường (có dùng thuốc ở 3 tháng cuối thai kỳ)	Không	Không	Không
Bố: Trần V.P	1956	-		-		Đái tháo đường	Bình thường	4 điều/ngày	Không	Không

7. **Bệnh nhân: Nguyễn K.A** Ngày sinh: 12/01/2006 Giới tính: Nữ Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: BV Phụ sản Hà Nội

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ thường, thiếu tháng, nặng 2750 gr (con đầu).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai phải độ III, tai trái bình thường, không có biểu hiện tật, hẹp ống tai ngoài.

Các dị tật khác: Không

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Hoàng M.H	1985	1	1	Không	-	Bàng quang kích thích	Bình thường	Không	Không	Không
Bố: Nguyễn H.K	1984	-		-		Không	Bình thường	Không	Không	Không

8. **Bệnh nhân: Văn T.Q.A** Ngày sinh: 06/09/2007 Giới tính: Nữ Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: TP Vinh, Nghệ An

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ mổ, 41 tuần, nặng 3600 gr (con đầu).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai phải độ III, tai trái bình thường, không có biểu hiện tật, hẹp ống tai ngoài.

Các dị tật khác: Không

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Lê T.S	1979	2	2	Không	Không	Không	Bình thường	Không	Không	Không
Bố: Văn V.T	1976	-		-		Không	Bình thường	Không	Có (ít)	Không

9. **Bệnh nhân: Phạm L.P** Ngày sinh: 04/10/1994 Giới tính: Nữ Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: Hà Nội

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ thường, đủ tháng, nặng 3200 gr (con đầu).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai 2 bên độ III, không có ống tai ngoài.

Các dị tật khác: Thiếu sản xương hàm 2 bên, nụ thịt thừa trước tai phải.

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Nguyễn T.H	1971	3	3	Không	Không	Không	Bình thường (có dùng kháng sinh)	Thụ động	Không	Không
Bố: Phạm H.K	1970	-		-			Không	Bình thường	1 bao/ngày	Có (ít)

10. **Bệnh nhân: Lê T.T** Ngày sinh: 22/10/1999 Giới tính: Nữ Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: Kim Bảng, Hà Nam

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ thường, đủ tháng, nặng 2900 gr (con đầu).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai phải độ III, tịt ống tai ngoài phải, tai trái bình thường.

Các dị tật khác: Không

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Dương T.H	1974	2	2	Không	Không	Không	Bình thường	Thụ động	Không	Tiếp xúc với thuốc trừ sâu khi làm ruộng
Bố: Lê V.T	1976	-		-			Không	Bình thường	5-10 điếu/ngày	Có

11. **Bệnh nhân: Phan Đ.D** Ngày sinh: 28/08/2000 Giới tính: Nữ Dân tộc: Kinh

Nơi sinh: Hương Xuân, Hương Khê, Hà Tĩnh

Tình trạng lúc sinh: Đơn thai đẻ thường, đủ tháng, nặng 3800 gr (con thứ 2).

Chẩn đoán: Thiếu sản vành tai trái độ III, hẹp ống tai trái, tai phải bình thường.

Các dị tật khác: Thiếu sản xương hàm (đã mổ)

Khai thác thông tin liên quan đến sức khỏe của bố và mẹ bệnh nhân trong quá trình mang thai và các tác nhân:

Họ và tên	Năm sinh	Tiền sử sản khoa			Dị tật của con khác	Dị tật/bệnh đã mắc	Tình trạng sức khỏe khi (vợ) mang thai	Tiếp xúc với tác nhân độc hại		
		Số lần có thai	Số con sống	Xây/phá thai				Hút thuốc	Uống rượu	Tác nhân khác
Mẹ: Lê T.H	1969	2	2	Không	Không	Không	Bị viêm mũi và có dùng thuốc	Thụ động	Không	Không
Bố: Phan V.T	1964	-		-		-	Viêm mũi xoang mạn	Bình thường	Có (ít)	Có (ít)

Phụ lục 5. Ký hiệu, nồng độ DNA và độ tinh sạch (A260/280) của các mẫu nghiên cứu

STT	Mã mẫu (gal_)	Họ và tên	Tuổi	Giới tính	Mối quan hệ	Nồng độ DNA (ng/ μ l)	A260 / 280
Ly thượng bì bóng nước							
1	EB001	Nguyễn V.B	4	Nam	Bệnh nhân	20,1	1,82
2	EB001-B	Nguyễn V.T	30	Nam	Bố bệnh nhân EB001	35,2	1,9
3	EB001-M	Trần T.H	26	Nữ	Mẹ bệnh nhân EB001	22,2	1,8
4	EB002	Phạm N.Q	8	Nam	Bệnh nhân	61,3	1,86
5	EB002-B	Phạm V.T	31	Nam	Bố bệnh nhân EB002	23,5	1,84
6	EB002-M	Nguyễn T.T	32	Nữ	Mẹ bệnh nhân EB002	26,4	1,80
7	EB003	Lê B.N	< 1	Nữ	Bệnh nhân	25,5	1,85
8	EB003-B	Lê Q.M	32	Nam	Bố bệnh nhân EB003	19,2	1,95
9	EB003-M	Ngô M.T	31	Nam	Mẹ bệnh nhân EB003	50,2	1,83
10	EB004	Vũ N.T	15	Nam	Bệnh nhân	36,1	1,91
11	EB005	Vũ N.T	7	Nam	Bệnh nhân	34,2	1,90
12	EB004&5-B	Vũ N.H	40	Nam	Bố bệnh nhân EB004 & 5	30,6	1,87
13	EB004&5-M	Hoàng T.H	39	Nữ	Mẹ bệnh nhân EB004 & 5	20,7	1,81
14	EB006	Phạm V.H	31	Nam	Bệnh nhân	67,8	1,92
15	EB006-B	Phạm Q.H	56	Nam	Bố bệnh nhân EB006	35,5	1,89
16	EB006-M	Nguyễn T.L	55	Nữ	Mẹ bệnh nhân EB006	42,1	1,84
17	EB007	Nguyễn A.Q.T	3	Nam	Bệnh nhân	29,8	1,86
18	EB007-B	Nguyễn Q.T	33	Nam	Bố bệnh nhân EB007	86,6	1,82
19	EB007-M	An Đ.N.N	29	Nữ	Mẹ bệnh nhân EB007	32,1	1,91
20	EB008	Nguyễn V.H	13	Nam	Bệnh nhân	27,8	1,9
21	EB008-B	Nguyễn V.D	42	Nam	Bố bệnh nhân EB008	29,8	1,82
22	EB008-M	Trịnh T.M	42	Nữ	Mẹ bệnh nhân EB008	43,4	1,81
23	EB008-E	Nguyễn B.N	7	Nam	Em bệnh nhân EB008	36,6	1,83
Bạch tạng							
1	AI001	Trần Q.B	7	Nam	Bệnh nhân	23,2	1,84
2	AI002	Trần B.A	5	Nam	Bệnh nhân	24,5	1,92
3	AI001&2-B	Trần V.H	36	Nam	Bố bệnh nhân AI001 & 2	20,5	1,92
4	AI001&2-M	Nguyễn T.T.L	34	Nữ	Mẹ bệnh nhân AI001 & 2	29,1	1,83
5	AI003	Kim V.T	25	Nam	Bệnh nhân	25,2	1,87
6	AI004	Kim T.T.T	23	Nữ	Bệnh nhân	26,1	1,88
7	AI003&4-B	Kim V.C	51	Nam	Bố bệnh nhân AI003 & 4	46,1	1,81
8	AI003&4-M	Kim T.H	47	Nữ	Mẹ bệnh nhân AI003 & 4	18,6	2,01

STT	Mã mẫu (gal_)	Họ và tên	Tuổi	Giới tính	Mối quan hệ	Nồng độ DNA (ng/μl)	A260 / 280
9	AI003&4-E	Kim V.Đ	17	Nam	Em bệnh nhân AI003 & 4	45,5	1,84
10	AI005	Ngô V.T	63	Nam	Bệnh nhân	25,5	1,83
11	AI006	Đào T.H	26	Nữ	Bệnh nhân	24,2	1,89
12	AI006-B	Đào V.N	49	Nam	Bố bệnh nhân AI006	23	1,93
13	AI006-M	Nguyễn T.N	48	Nữ	Mẹ bệnh nhân AI006	35	1,89
14	AI006-A	Đào T.K	-	Nam	Anh bệnh nhân AI006	21	1,93
15	AI007	Bàn A.T	5	Nam	Bệnh nhân	35,4	1,81
16	AI007-B	Bàn V.T	37	Nam	Bố bệnh nhân AI007	29,4	1,86
17	AI007-M	Chu T.P	38	Nữ	Mẹ bệnh nhân AI007	33,8	1,85
18	AI007-C	Bàn K.L	10	Nữ	Chị gái bệnh nhân AI007	19,4	1,80
Thiếu sản vành tai							
1	Mi001	Nguyễn T.T	13	Nam	Bệnh nhân	34,8	1,84
2	Mi002	Phạm M.V	24	Nam	Bệnh nhân	22,6	1,82
3	Mi003	Vương G.H	11	Nữ	Bệnh nhân	33,3	1,85
4	Mi004	Bùi Q.H	14	Nam	Bệnh nhân	26,9	1,87
5	Mi005	Đàm Q.A	12	Nam	Bệnh nhân	47,8	1,88
6	Mi006	Trần M.L	28	Nữ	Bệnh nhân	28,5	1,88
7	Mi007	Nguyễn K.A	14	Nam	Bệnh nhân	28,1	1,81
8	Mi008	Văn T.Q.A	13	Nữ	Bệnh nhân	26,7	1,83
9	Mi009	Phạm L.P	26	Nữ	Bệnh nhân	26,9	1,82
10	Mi010	Lê T.T	21	Nữ	Bệnh nhân	35,6	1,84
11	Mi011	Phan Đ.D	20	Nam	Bệnh nhân	21,8	1,81

Phụ lục 6. Trình tự mỗi PCR và giải trình tự ở nhóm người bệnh EB

Mẫu	Tên mỗi	Trình tự mỗi (5' – 3')	Kích thước (bp)
Gia đình EB001	CO7A1-c.G8279A-F	ACCAGGCTGTGACCTCTGAC	308
	CO7A1-c.G8279A-R	TGACTCCTGATCCCTGAACC	
Gia đình EB002	CO7A1-c.2958_2859del-F	GCTTGAGATCCCTGGAAGTG	462
	CO7A1-c.2958_2859del-R	CTGATGACCCACCCTGACTT	
EB002	CO7A1-c.6081del-F	AAATGCAAATAGCGGGTGAG	461
	CO7A1-c.6081del-R	TCTGGTAGCTTCCTGCCTGT	
Gia đình EB003	<i>CO7A1-c.C6205T-F</i>	<i>CACTAGTCACAGGACTAAGG</i>	390
	<i>CO7A1-c.C6205T-R</i>	<i>AGCCTGGAAAGCCTGGTATT</i>	
EB003	CO7A1-c.C8233T-F	GAAGTCACCCGATCTCTGA	275
	CO7A1-c.C8233T-R	TGACTCCTGATCCCTGAACC	
Gia đình EB004	CO7A1-c.4518+2delT-F	GCAGGGTCAGAGGTTCAAAG	416
	CO7A1-c.4518+2delT-R	CTTGTCTGGGGTTTGACGTT	
& EB005	CO7A1-c.C5047T-F	GGGAATGTTGGTAGCCTTCA	324
	CO7A1-c.C5047T-R	TTGGAGTAATGGGGAACCTG	
Gia đình EB006	<i>CO7A1-c.C6205T-F</i>	<i>CACTAGTCACAGGACTAAGG</i>	390
	<i>CO7A1-c.C6205T-R</i>	<i>AGCCTGGAAAGCCTGGTATT</i>	
EB006	CO7A1-c.A5821-2G-F	GGACAGCAAGAGGTCAGAGG	247
	CO7A1-c.A5821-2G-R	AGGGAAAAGGGTGTGAAGG	
Gia đình EB007	KRT5-c.G1429A-F	CTGAGTTGCTCAGGTGCTTG	359
	KRT5-c.G1429A-R	AGAAGGCCAAGCAGGACAT	
Gia đình EB008	COL7A1-c.C1837T-F	TACCCTCATTGGTCCCTTTG	345
	COL7A1-c.C1837T-R	GGCTGGGCTTAGCTACACTG	
& EB008.E	COL7A1-c.G3830A-F	AACCTCGATGGTCTCCACAC	313
	COL7A1-c.G3830A-R	GGAACCTGGAGAGATGGTGA	

In nghiêng: thông tin giống nhau

Phụ lục 7. Trình tự mỗi PCR và giải trình tự ở nhóm người bệnh bạch tạng

Mẫu	Tên mỗi	Trình tự mỗi (5'-3')	Kích thước (bp)
Gia đình AI001 & AI002	TYR-c.346C>T-F	CAACTTCATGGGATTCAACT	259
	TYR-c.346C>T-R	CATCCAGACAAAGAGGTCAT	
Gia đình AI003 & AI004	TYR-c.115T>C-F	TGGTGGTGACAATTTGTTTA	238
	TYR-c.115T>C-R	CTGAAATTGGCAGCTTTATC	
AI005	TYR-c.559_560ins25-F	GATTTGAGTGCCCCAGAGAA	433
	TYR-c.559_560ins25-R	AGAATGATGCTGGGCTGAGT	
Gia đình AI006	OCA2-c.2251G>A-F	GAAGGAACGGAGTTGCTCTG	300
	OCA2-c.2251G>A-R	ACGTGGCATCAATGTCTCT	
Gia đình AI007	HPS1-c.972del-F	AACAATGGAGCTGAGGGACA	485
	HPS1-c.972del-R	CCTTGTGCCTGCCAACTTAG	

Phụ lục 8: Danh sách gen sử dụng trong sàng lọc gen ứng viên liên quan đến thiếu sản vành tai.

STT	Gen	STT	Gen	STT	Gen	STT	Gen	STT	Gen
1	<i>ABCC6</i>	46	<i>CDT1</i>	91	<i>CYP2R1</i>	136	<i>FGF10</i>	181	<i>HOXA2</i>
2	<i>ABCC9</i>	47	<i>CENPJ</i>	92	<i>DCHS1</i>	137	<i>FGF16</i>	182	<i>HOXB6</i>
3	<i>ABHD5</i>	48	<i>CEP120</i>	93	<i>DCR</i>	138	<i>FGF23</i>	183	<i>HOXD10</i>
4	<i>ACAN</i>	49	<i>CFAP410</i>	94	<i>DDR2</i>	139	<i>FGF3</i>	184	<i>HOXD13</i>
5	<i>ACVR1</i>	50	<i>CHD7</i>	95	<i>DFNB31</i>	140	<i>FGF8</i>	185	<i>HS6ST2</i>
6	<i>ADAMTS2</i>	51	<i>CHEK2</i>	96	<i>DGCR</i>	141	<i>FGF9</i>	186	<i>HSD17B4</i>
7	<i>ADAMTSL2</i>	52	<i>CHST14</i>	97	<i>DGCR6</i>	142	<i>FGFR1</i>	187	<i>HSPG2</i>
8	<i>ADGRV1</i>	53	<i>CHST3</i>	98	<i>DGCR8</i>	143	<i>FGFR2</i>	188	<i>IFITM5</i>
9	<i>AEBP1</i>	54	<i>CHUK</i>	99	<i>DHODH</i>	144	<i>FGFR3</i>	189	<i>IFT140</i>
10	<i>AGPAT2</i>	55	<i>CIB2</i>	100	<i>DLK1</i>	145	<i>FGFRL1</i>	190	<i>IFT172</i>
11	<i>AMER1</i>	56	<i>CIDEC</i>	101	<i>DLL3</i>	146	<i>FIG4</i>	191	<i>IFT43</i>
12	<i>ANKH</i>	57	<i>CIITA</i>	102	<i>DLX5</i>	147	<i>FKBP10</i>	192	<i>IFT80</i>
13	<i>ANKRD11</i>	58	<i>CLCN5</i>	103	<i>DIX6</i>	148	<i>FKRP</i>	193	<i>IFT81</i>
14	<i>ANO5</i>	59	<i>CLCN7</i>	104	<i>DMP1</i>	149	<i>FKTN</i>	194	<i>IHH</i>
15	<i>ANTXR2</i>	60	<i>CLPP</i>	105	<i>DNASE1</i>	150	<i>FLG</i>	195	<i>IL10</i>
16	<i>APIS3</i>	61	<i>CLRN1</i>	106	<i>DNASE1L3</i>	151	<i>FLNA</i>	196	<i>IL23R</i>
17	<i>ATP2C1</i>	62	<i>COG1</i>	107	<i>DUOX2</i>	152	<i>FLNB</i>	197	<i>IL36RN</i>
18	<i>ATRX</i>	63	<i>COG4</i>	108	<i>DUOXA2</i>	153	<i>FN1</i>	198	<i>IL6</i>
19	<i>B3GALT6</i>	64	<i>COL10A1</i>	109	<i>DYM</i>	154	<i>FOXI1</i>	199	<i>IRF6</i>
20	<i>B3GALTL</i>	65	<i>COL11A1</i>	110	<i>DYNC2H1</i>	155	<i>FOXP3</i>	200	<i>IRS4</i>
21	<i>B3GAT3</i>	66	<i>COL11A2</i>	111	<i>DYNC2I1</i>	156	<i>FRAS1</i>	201	<i>ISPD</i>
22	<i>B3GLCT</i>	67	<i>COL1A1</i>	112	<i>DYNC2I2</i>	157	<i>FREM2</i>	202	<i>IYD</i>
23	<i>B4GALT7</i>	68	<i>COL1A2</i>	113	<i>EDN1</i>	158	<i>FZD2</i>	203	<i>KAT6B</i>
24	<i>BGN</i>	69	<i>COL2A1</i>	114	<i>EDNRA</i>	159	<i>GABRD</i>	204	<i>KCNAB2</i>
25	<i>BMP1</i>	70	<i>COL3A1</i>	115	<i>EDNRB</i>	160	<i>GATA1</i>	205	<i>KCNJ10</i>
26	<i>BMP2</i>	71	<i>COL4A3</i>	116	<i>EFTUD2</i>	161	<i>GBA</i>	206	<i>KCTD1</i>
27	<i>BMP4</i>	72	<i>COL4A4</i>	117	<i>ENPP1</i>	162	<i>GDF3</i>	207	<i>KDELR2</i>
28	<i>BMP5</i>	73	<i>COL4A5</i>	118	<i>ERBB3</i>	163	<i>GDF5</i>	208	<i>KDM6A</i>
29	<i>BMPR1B</i>	74	<i>COL5A1</i>	119	<i>ERF</i>	164	<i>GDF6</i>	209	<i>KIAA0586</i>
30	<i>BPNT2</i>	75	<i>COL5A2</i>	120	<i>ESS2</i>	165	<i>GJA1</i>	210	<i>KIF22</i>
31	<i>BSCL2</i>	76	<i>COL9A1</i>	121	<i>EVC</i>	166	<i>GLE1</i>	211	<i>KMT2D</i>
32	<i>C1R</i>	77	<i>COL9A2</i>	122	<i>EVC2</i>	167	<i>GLI3</i>	212	<i>LARGE</i>
33	<i>C1S</i>	78	<i>COL9A3</i>	123	<i>EWSR1</i>	168	<i>GMNN</i>	213	<i>LARGE1</i>
34	<i>CA2</i>	79	<i>COMP</i>	124	<i>EXOC6B</i>	169	<i>GPC6</i>	214	<i>LARS2</i>
35	<i>CALCR</i>	80	<i>CPLX1</i>	125	<i>EXT1</i>	170	<i>GPR98</i>	215	<i>LAS1L</i>
36	<i>CANT1</i>	81	<i>CREB3L1</i>	126	<i>EXT2</i>	171	<i>GPX4</i>	216	<i>LETM1</i>
37	<i>CARD14</i>	82	<i>CRPPA</i>	127	<i>EYA1</i>	172	<i>GRIP1</i>	217	<i>LFNG</i>
38	<i>CASK</i>	83	<i>CRTAP</i>	128	<i>FAM111A</i>	173	<i>GSC</i>	218	<i>LIPE</i>
39	<i>CAVI</i>	84	<i>CTBP1</i>	129	<i>FANCF</i>	174	<i>HARS2</i>	219	<i>LMBR1</i>
40	<i>CAVIN1</i>	85	<i>CTLA4</i>	130	<i>FANCL</i>	175	<i>HES7</i>	220	<i>LMBRD1</i>
41	<i>CCBE1</i>	86	<i>CTSK</i>	131	<i>FAT4</i>	176	<i>HLA-B</i>	221	<i>LMNA</i>
42	<i>CCN6</i>	87	<i>CYBA</i>	132	<i>FBLN1</i>	177	<i>HLA-C</i>	222	<i>LRP4</i>
43	<i>CD244</i>	88	<i>CYBB</i>	133	<i>FBN1</i>	178	<i>HMX1</i>	223	<i>LRP5</i>
44	<i>CDC45</i>	89	<i>CYP26B1</i>	134	<i>FCGR2A</i>	179	<i>HOXA1</i>	224	<i>LTBP3</i>
45	<i>CDC6</i>	90	<i>CYP27B1</i>	135	<i>FCGR2B</i>	180	<i>HOXA13</i>	225	<i>MAF</i>

STT	Gen	STT	Gen	STT	Gen	STT	Gen	STT	Gen
226	<i>MAP2K1</i>	267	<i>ORC4</i>	308	<i>PRRX1</i>	349	<i>SLC2A10</i>	390	<i>TONSL</i>
227	<i>MAP3K7</i>	268	<i>ORC6</i>	309	<i>PRRX2</i>	350	<i>SLC2A9</i>	391	<i>TP53</i>
228	<i>MAPRE2</i>	269	<i>OSR1</i>	310	<i>PTH1R</i>	351	<i>SLC34A3</i>	392	<i>TP63</i>
229	<i>MATN3</i>	270	<i>OSTM1</i>	311	<i>PTHLH</i>	352	<i>SLC35D1</i>	393	<i>TPO</i>
230	<i>MBD5</i>	271	<i>P3H1</i>	312	<i>PTPN11</i>	353	<i>SLC39A13</i>	394	<i>TRAF3IP2</i>
231	<i>MBTPS1</i>	272	<i>P4HB</i>	313	<i>PTPN22</i>	354	<i>SLC5A5</i>	395	<i>TRAPPC2</i>
232	<i>MBTPS2</i>	273	<i>PAM16</i>	314	<i>RAB23</i>	355	<i>SMAD4</i>	396	<i>TREX1</i>
233	<i>MCM5</i>	274	<i>PAPSS2</i>	315	<i>RAB33B</i>	356	<i>SMARCAL1</i>	397	<i>TRHR</i>
234	<i>MED12</i>	275	<i>PAX3</i>	316	<i>RARA</i>	357	<i>SNAI2</i>	398	<i>TRIP11</i>
235	<i>MED14</i>	276	<i>PAX8</i>	317	<i>RB1</i>	358	<i>SNX10</i>	399	<i>TRPS1</i>
236	<i>MEG3</i>	277	<i>PCDH15</i>	318	<i>RBM10</i>	359	<i>SOST</i>	400	<i>TRPV4</i>
237	<i>MEGF8</i>	278	<i>PCNT</i>	319	<i>RECQL4</i>	360	<i>SOX8</i>	401	<i>TSHB</i>
238	<i>MEOX1</i>	279	<i>PCYT1A</i>	320	<i>RIPK4</i>	361	<i>SOX9</i>	402	<i>TSHR</i>
239	<i>MESD</i>	280	<i>PDE4D</i>	321	<i>RMRP</i>	362	<i>SP7</i>	403	<i>TSR2</i>
240	<i>MESP2</i>	281	<i>PDGFB</i>	322	<i>RNU4ATAC</i>	363	<i>SPARC</i>	404	<i>TTC21B</i>
241	<i>MIF</i>	282	<i>PDGFRB</i>	323	<i>ROR2</i>	364	<i>SQSTM1</i>	405	<i>TTC37</i>
242	<i>MIR140</i>	283	<i>PDLIM4</i>	324	<i>RPS26</i>	365	<i>SSX1</i>	406	<i>TWIST1</i>
243	<i>MITF</i>	284	<i>PDZD7</i>	325	<i>RPS28</i>	366	<i>SSX2</i>	407	<i>TWIST2</i>
244	<i>MMP13</i>	285	<i>PHEX</i>	326	<i>RTL1</i>	367	<i>STAG2</i>	408	<i>TWSG1</i>
245	<i>MSX2</i>	286	<i>PITX1</i>	327	<i>RUNX2</i>	368	<i>TAF15</i>	409	<i>UFSP2</i>
246	<i>MTAP</i>	287	<i>PLCB3</i>	328	<i>SALL1</i>	369	<i>TBCE</i>	410	<i>USH1C</i>
247	<i>MUC5B</i>	288	<i>PLEC</i>	329	<i>SEC24D</i>	370	<i>TBL1X</i>	411	<i>USH1G</i>
248	<i>MYO18B</i>	289	<i>PLEKHM1</i>	330	<i>SELENON</i>	371	<i>TBX1</i>	412	<i>USH2A</i>
249	<i>NANS</i>	290	<i>PLIN1</i>	331	<i>SEMA3E</i>	372	<i>TBX15</i>	413	<i>VDR</i>
250	<i>NCF1</i>	291	<i>PLOD1</i>	332	<i>SERPINF1</i>	373	<i>TBX4</i>	414	<i>VRK1</i>
251	<i>NCF2</i>	292	<i>POCIA</i>	333	<i>SERPINH1</i>	374	<i>TBX6</i>	415	<i>WAS</i>
252	<i>NCF4</i>	293	<i>POLA1</i>	334	<i>SF3B2</i>	375	<i>TCF12</i>	416	<i>WDR19</i>
253	<i>NDP</i>	294	<i>POLR1A</i>	335	<i>SF3B4</i>	376	<i>TCIRG1</i>	417	<i>WDR35</i>
254	<i>NEK1</i>	295	<i>POLR1C</i>	336	<i>SFTPA2</i>	377	<i>TCOF1</i>	418	<i>WFS1</i>
255	<i>NEPRO</i>	296	<i>POLR1D</i>	337	<i>SFTPC</i>	378	<i>TCTN3</i>	419	<i>WHCR</i>
256	<i>NFKBIL1</i>	297	<i>POMT1</i>	338	<i>SGMS2</i>	379	<i>TENT5A</i>	420	<i>WNT1</i>
257	<i>NIN</i>	298	<i>POMT2</i>	339	<i>SH3PXD2B</i>	380	<i>TERT</i>	421	<i>WNT10B</i>
258	<i>NKX2-5</i>	299	<i>POP1</i>	340	<i>SHOX</i>	381	<i>TFAP2A</i>	422	<i>WNT3</i>
259	<i>NKX3N/A2</i>	300	<i>POR</i>	341	<i>SIX1</i>	382	<i>TG</i>	423	<i>WNT5A</i>
260	<i>NOG</i>	301	<i>PPARG</i>	342	<i>SIX2</i>	383	<i>TGFB1</i>	424	<i>WNT7A</i>
261	<i>NOTCH2</i>	302	<i>PPIB</i>	343	<i>SIX4</i>	384	<i>THRA</i>	425	<i>XYLT1</i>
262	<i>NOTCH3</i>	303	<i>PRDM16</i>	344	<i>SIX5</i>	385	<i>TMEM38B</i>	426	<i>XYLT2</i>
263	<i>NPR2</i>	304	<i>PRDM5</i>	345	<i>SKI</i>	386	<i>TMEM53</i>	427	<i>ZNF469</i>
264	<i>NR4A3</i>	305	<i>PRKARIA</i>	346	<i>SLC22A4</i>	387	<i>TNFRSF11A</i>	428	<i>ZSWIM6</i>
265	<i>NSD2</i>	306	<i>PRKCZ</i>	347	<i>SLC26A2</i>	388	<i>TNFSF11</i>		
266	<i>ORC1</i>	307	<i>PRKRA</i>	348	<i>SLC26A4</i>	389	<i>TNXB</i>		

ST T	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta SVM	Meta LR
						1000g	ExAC												
19		KMT2D (NM_003482)	exon31	c.C7144T (p.P2382S)	nonsyn	0.025959	0.0121	rs3741626	het	D	P	B	N	D	N	D	D	T	T
20		NIN (NM_020921)	exon21	c.G4937A (p.R1646H)	nonsyn	0.005192	0.0019	rs149669464	het	T	B	B	N	N	N	T	N	T	T
21		CDC6 (NM_001254)	exon4	c.G487T (p.V163F)	nonsyn	.	8.24×10^{-6}	rs764916671	het	D	B	B	D	D	M	T	D	T	T
22		CIB2 (NM_001301224)	exon3	c.G199A (p.V67M)	nonsyn	.	4.98×10^{-5}	rs755699237	het	T	.	.	.	N	.	T	N	.	.
23		EVC (NM_001306090)	exon16	c.T2338C (p.Y780H)	nonsyn	.	8.27E-06	rs772327206	het	D	B	B	N	D	M	T	D	T	T
24		PCNT (NM_001315529)	exon30	c.A6137C (p.K2046T)	nonsyn	0.000399	4.12×10^{-5}	rs555273022	het	T	P	P	.	N	N	T	N	T	T
25		PLEC (NM_201378)	exon32	c.G10979A (p.R3660H)	nonsyn	.	5.98×10^{-5}	rs782720846	het	D	B	B	U	D	M	T	N	T	T
26			exon31	c.G5996A (p.R1999Q)	nonsyn	0.0002	0.0006	rs369708974	het	D	B	B	U	D	L	T	N	T	T
27			exon27	c.C3620T (p.A1207V)	nonsyn	.	.	.	het	T	B	B	U	N	N	T	N	T	T
28		PRRX2 (NM_016307)	exon4	c.C706T (p.R236C)	nonsyn	0.0002	0.0002	rs202233874	het	D	D	D	D	D	L	D	D	D	D
29		WFS1 (NM_001145853)	exon2	c.C173T (p.A58V)	nonsyn	.	0.0003	rs369671890	het	T	P	B	N	N	M	D	N	T	D
30		ACAN (NM_001135)	exon10	c.A1973G (p.N658S)	nonsyn	.	6.82×10^{-5}	rs370283261	het	D	D	D	N	D	M	T	D	T	T
31			exon12	c.A4207G (p.T1403A)^b	nonsyn	.	.	rs12899191	het	T	P	B	.	P	M	D	N	T	D
32		AEBP1 (NM_001129)	exon21	c.G3107A (p.R1036Q)	nonsyn	.	0.0001	rs200356275	het	D	B	B	N	N	M	D	N	D	D
33		COL3A1 (NM_000090)	exon24	c.C1697T (p.P566L)	nonsyn	0.001198	0.0003	rs150543864	het	T	D	D	N	D	M	D	D	D	D
34		LRP5 (NM_001291902)	exon11	c.C698T (p.A233V)	nonsyn	.	.	.	het	T	B	B	U	D	N	D	N	T	T
35		MEGF8 (NM_001410)	exon20	c.C3424T (p.R1142W)	nonsyn	0.002596	0.0011	rs372257661	het	D	D	P	N	D	M	T	D	T	T
36		MYO18B (NM_001318245)	exon7	c.C1769T (p.T590M)	nonsyn	.	9.98×10^{-5}	rs370187232	het	D	D	D	D	D	M	D	D	D	D
37		PLIN1 (NM_001145311)	exon9	c.A1550G (p.Q517R)	nonsyn	0.000599	0	rs547042988	het	D	P	B	N	N	M	T	N	T	T

ST T	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta SVM	Meta LR	
						1000g	ExAC													
38		POP1 (NM_001145860)	exon16	c.C2488T (p.R830W)	nonsyn	0.001597	0.0003	rs145798300	het	D	D	P	N	N	L	T	N	T	T	
39		SH3PXD2B (NM_001017995)	exon13	c.G1838A (p.R613Q)	nonsyn	.	8.27×10^{-6}	rs745393171	het	D	D	P	D	D	M	T	N	T	T	
40		TRPV4 (NM_147204)	exon4	c.G760C (p.V254L)	nonsyn	0.000399	0.0002	rs143548402	het	D	D	D	D	D	M	T	D	D	T	
41	Mi004	ADGRV1 (NM_032119)	exon23	c.C5072T (p.T1691M)	nonsyn	0.001398	0.0005	rs146954342	het	D	D	D	D	D	M	T	D	T	T	
42		EVC (NM_001306090)	exon14	c.G2041A (p.E681K)	nonsyn	0.001797	0.0001	rs201877358	het	D	D	P	D	D	M	T	N	T	T	
43		FAT4 (NM_001291285)	exon17	c.G13085T (p.G4362V)	nonsyn	0.001797	0.0006	rs199797338	het	T	D	D	U	D	L	D	N	D	D	
44			exon17	c.A13802G (p.H4601R)	nonsyn	0.0002	8.24×10^{-6}	rs201499023	het	T	B	B	U	D	N	T	N	T	T	
45		SOX8 (NM_014587)	exon3	c.A796G (p.I266V)	nonsyn	0.000399	7.64×10^{-5}	rs545677635	het	T	P	P	D	D	H	T	N	D	D	
46		ACAN (NM_0011135)	exon12	c.A4207G (p.T1403A)^b	nonsyn	.	.	rs12899191	hom	T	P	B	.	P	M	D	N	T	D	
47		ADAMTS2 (NM_014244)	exon6	c.G1031A (p.R344H)	nonsyn	0.000399	5.78×10^{-5}	rs201162234	het	T	B	B	D	D	L	T	D	T	T	
48		BMP2 (NM_001200)	exon3	c.T482C (p.L161S)	nonsyn	0.0002	6.61×10^{-5}	rs34183594	het	T	P	P	N	D	N	T	N	T	T	
49		EXOC6B (NM_001321734)	exon6	c.C449G (p.P150R)	nonsyn	.	4.15×10^{-5}	rs758788765	het	T	D	D	N	D	L	T	N	T	T	
50		LMNA (NM_170708)	exon10	c.C1628T (p.S543L)	nonsyn	.	0.0001	rs60890628	het	D	P	B	N	A	M	D	N	D	D	
51		SLC34A3 (NM_001177316)	exon5	c.A328G (p.K110E)	nonsyn	0.0002	5.87×10^{-5}	rs570711066	het	T	B	B	N	N	L	D	N	T	T	
52		TSHR (NM_000369)	exon10	c.G2272A (p.E758K)	nonsyn	.	4.12×10^{-5}	rs746522401	het	D	B	B	N	N	M	T	N	T	T	
53		Mi005	CHUK (NM_001278)	exon10	c.A1059C (p.E353D)	nonsyn	0.000599	0.0003	rs373772425	het	T	B	B	D	D	L	T	N	T	T
54			PCDH15 (NM_001142767)	exon31	c.5027delA (p.E1676Gfs*128)	FS del	.	.	.	het
55	exon3			c.A146G (p.E49G)	nonsyn	0.000599	0.0001	rs184026653	het	D	P	B	.	D	L	T	D	T	T	
56	PLEC (NM_201378)		exon32	c.G10879A (p.D3627N)^c	nonsyn	0.000399	0.0001	rs146233901	het	T	D	D	U	D	M	T	N	D	D	

ST T	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta SVM	Meta LR
						1000g	ExAC												
57			exon31	<i>c.A5210C (p.Q1737P)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	D	D	U	N	N	D	N	D	D
58		B4GALT7 (NM_007255)	exon3	<i>c.A589G (p.K197E)</i>	nonsyn	0.000799	0.0003	rs200732558	het	T	B	B	D	D	L	D	N	T	T
59		DUOX2 (NM_014080)	exon13	<i>c.T1556A (p.F519Y)</i>	nonsyn	.	.	.	het	T	P	P	D	D	L	T	N	T	T
60		ERBB3 (NM_001982)	exon8	<i>c.T881A (p.F294Y)</i>	nonsyn	.	.	.	het	T	P	P	D	D	L	T	N	T	T
61		FGFRL1 (NM_021923)	exon6	<i>c.G1387C (p.G463R)</i>	nonsyn	.	.	.	het	T	D	P	N	D	M	T	N	T	T
62		LRP5 (NM_001291902)	exon9	<i>c.G181A (p.V61M)</i>	nonsyn	.	1.65×10^{-5}	rs371615673	het	D	P	P	U	D	M	D	N	D	D
63		COL4A4 (NM_000092)	exon11	<i>c.C661T (p.P221S)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	B	B	.	N	M	D	D	D	D
64		KMT2D (NM_003482)	exon39	<i>c.C12329T (p.T4110I)</i>	nonsyn	.	4.73×10^{-5}	rs764450813	het	D	P	B	N	N	N	T	N	T	T
65			exon41	<i>c.C13723A (p.L4575I)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	P	B	N	D	L	T	N	T	T
66		ABCC6 (NM_001171)	exon26	<i>c.C3703T (p.R1235W)</i>	nonsyn	0.0002	8.26×10^{-6}	rs63750402	het	D	D	D	N	D	H	D	D	D	D
67		CENPJ (NM_018451)	exon5	<i>c.A879C (p.L293F)</i>	nonsyn	0.000799	9.07×10^{-5}	rs368354292	het	D	D	P	N	N	M	T	N	T	T
68	Mi006	CHITA (NM_000246)	exon1	<i>c.G5A (p.R2H)</i>	nonsyn	.	0.0001	rs755048657	het	D	D	D	.	N	L	T	N	T	T
69		FLG (NM_002016)	exon3	<i>c.G9809A (p.R3270H)</i>	nonsyn	0.004593	0.0008	rs147429418	het	D	D	P	.	N	N	T	N	T	T
70		MYO18B (NM_001318245)	exon16	<i>c.G3031T (p.V1011L)</i>	nonsyn	0.0002	1.66×10^{-5}	rs557607855	het	T	P	B	D	D	L	T	N	T	T
71		NCF1 (NM_000265)	exon4	<i>c.G269A (p.R90H)^a</i>	nonsyn	.	0.001	rs201802880	het	D	B	B	D	D	M	D	D	D	D
72		NOTCH3 (NM_000435)	exon33	<i>c.C6100G (p.P2034A)</i>	nonsyn	.	.	.	het	T	B	B	.	N	L	T	D	T	T
73		ZNF469 (NM_001127464)	exon2	<i>c.G4030A (p.G1344R)</i>	nonsyn	0.000399	5.21×10^{-5}	rs368674617	het	D	D	D	.	N	L	T	D	T	T
74	Mi007	PAX3 (NM_181459)	exon10	<i>c.C1465T (p.L489F)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	B	B	N	D	.	D	N	T	D
75		TTC37 (NM_014639)	exon13	<i>c.A1130T (p.D377V)</i>	nonsyn	0.000399	1.65×10^{-5}	rs553930070	het	T	B	B	N	D	M	T	N	T	T

ST T	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta SVM	Meta LR
						1000g	ExAC												
76		FLG (NM_002016)	exon3	<i>c.A8587T (p.T2863S)</i>	nonsyn	.	.	.	het	T	P	B	.	N	L	T	N	T	T
77		NCF1 (NM_000265)	exon4	<i>c.G269A (p.R90H)^a</i>	nonsyn	.	0.001	rs201802880	het	D	B	B	D	D	M	D	D	D	D
78		PTPN22 (NM_012411)	exon11	<i>c.T1071A (p.H357Q)</i>	nonsyn	.	.	rs1031818331	het	D	D	D	N	D	M	T	D	T	T
79		ZNF469 (NM_001127464)	exon2	<i>c.G11462A (p.R3821Q)</i>	nonsyn	.	5.18×10^{-5}	rs775672255	het	D	D	P	.	N	M	T	N	T	T
80	Mi008	FAT4 (NM_001291285)	exon16	<i>c.G12881C (p.R4294T)</i>	nonsyn	.	.	.	het	T	D	P	U	D	L	T	N	T	T
81		PCNT (NM_001315529)	exon28	<i>c.A5189G (p.E1730G)</i>	nonsyn	.	1.71×10^{-5}	rs201943167	het	D	D	P	N	N	M	T	D	T	T
82		DNASE1 (NM_005223)	exon5	<i>c.G343T (p.D115Y)</i>	nonsyn	.	2.05×10^{-5}	rs775559875	het	D	D	D	D	D	H	T	D	T	T
83		LRP5 (NM_001291902)	exon18	<i>c.G2158A (p.A720T)</i>	nonsyn	0.00119808	0.0002	rs149166384	het	T	B	B	U	N	N	D	N	T	D
84		MUC5B (NM_002458)	exon31	<i>c.C12272G (p.T4091R)</i>	nonsyn	.	0.0002	rs199736618	het	D	P	B	.	N	L	T	N	T	T
85		SF3B2 (NM_006842)	exon11	<i>c.C1219G (p.P407A)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	B	B	D	D	L	.	D	T	T
86		WNT7A (NM_004625)	exon3	<i>c.G400T (p.D134Y)</i>	nonsyn	0.000199681	.	rs546145028	het	D	D	D	D	D	H	T	D	D	D
87		CLRN1 (NM_001195794)	exon2	<i>c.T382C (p.F128L)</i>	nonsyn	.	.	.	het	T	B	B	D	D	.	T	D	T	T
88	PCNT (NM_001315529)	exon10	<i>c.G1150A (p.E384K)</i>	nonsyn	.	.	.	het	T	P	B	.	N	M	T	D	T	T	
89	SLC26A4 (NM_000441)	exon13	<i>c.C1486T (p.L496F)</i>	nonsyn	.	.	.	het	D	D	P	N	D	M	D	D	D	D	
90	Mi009	USH2A (NM_206933)	exon52	<i>c.G10274T (p.C3425F)</i>	nonsyn	.	8.25×10^{-3}	rs200328442	het	D	D	D	D	D	M	T	D	T	T
91		COG4 (NM_001195139)	exon12	<i>c.G1624T (p.D542Y)</i>	nonsyn	.	1.65×10^{-2}	rs777169655	het	D	D	P	D	D	M	T	D	T	T
92		FLNB (NM_001164317)	exon21	<i>c.G3430C (p.E1144Q)</i>	nonsyn	0.00139776	0.0005	rs199959926	het	T	B	B	N	D	M	D	N	D	D
93		FN1 (NM_001306131)	exon32	<i>c.T5078C (p.M1693T)</i>	nonsyn	0.000199681	6.59×10^{-2}	rs199684110	het	T	P	D	D	D	L	T	D	T	T
94		LRP5 (NM_001291902)	exon23	<i>c.G2900T (p.C967F)</i>	nonsyn	0.000399361	0.0003	rs147618989	het	D	D	D	U	D	M	D	D	T	T

ST T	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta SVM	Meta LR
						1000g	ExAC												
95		SLC26A2 (NM_000112)	exon3	c.G844C (p.G282R)	nonsyn	0.000199681	4.12×10 ⁻²	rs571410872	het	D	D	D	D	D	H	D	D	D	D
96	Mi010	PDZD7 (NM_001195263)	exon10	c.C1538T (p.P513L)	nonsyn	0.000199681	0.0001	rs572462059	het	T	T
97		CANT1 (NM_138793)	exon3	c.775dupC (p.H259Pfs*25)	FS ins	.	.	.	het
98		COL3A1 (NM_000090)	exon43	c.G3133A (p.A1045T)	nonsyn	0.00179712	0.0006	rs149722210	het	T	D	P	N	D	L	D	N	D	D
99		IFT172 (NM_015662)	exon15	c.C1513T (p.R505W)	nonsyn	.	4.94×10 ⁻²	rs779152335	het	D	D	P	D	D	L	T	D	T	T
100		MUC5B (NM_002458)	exon30	c.C3926T (p.T1309M)	nonsyn	0.000798722	0.0004	rs200226020	het	D	D	B	.	N	M	T	D	T	T
101		PPIB (NM_000942)	exon1	c.G85A (p.G29R)	nonsyn	0.00159744	0.0007	rs200307684	het	T	P	B	D	D	L	T	N	T	T
102		COL11A1 (NM_080630)	exon58	c.C4147T (p.P1383S)	nonsyn	0.000199681	9.91×10 ⁻²	rs199952288	het	D	D	D	D	D	L	D	D	D	D
103	Mi011	FREM2 (NM_207361)	exon16	c.C7873A (p.R2625S)	nonsyn	0.000199681	0.0002	rs115492820	het	D	D	D	D	D	L	T	D	T	T
104		MITF (NM_000248)	exon3	c.C332T (p.A111V)	nonsyn	.	2.51×10 ⁻²	rs182533927	het	D	D	P	D	D	L	T	N	T	T
105		PCDH15 (NM_001142767)	exon13	c.G1615A (p.G539R)	nonsyn	.	.	.	het	T	D	D	.	D	N	T	D	T	T
106		PCNT (NM_001315529)	exon6	c.G625C (p.E209Q)	nonsyn	0.00179712	0.0005	rs575720246	het	D	D	P	N	N	M	T	N	T	T
107		PLEC (NM_201378)	exon26	c.C3244T (p.R1082C)	nonsyn	0.000599042	0.0003	rs533410461	het	D	D	D	U	D	M	T	D	T	T
108			exon32	c.G10879A (p.D3627N)^c	nonsyn	0.000399361	0.0001	rs146233901	het	T	D	D	U	D	M	T	N	D	D
109			exon31	c.G6929A (p.R2310Q)	nonsyn	0.000798722	0.0005	rs561571844	het	T	B	B	U	D	L	D	N	T	T
110		ACAN (NM_001135)	exon12	c.A4207G (p.T1403A)^b	nonsyn	.	.	rs12899191	het	T	P	B	.	P	M	D	N	T	D
111		CCBE1 (NM_133459)	exon11	c.T1142C (p.M381T)	nonsyn	0.000199681	1.65×10 ⁻²	rs548559412	het	T	B	B	N	N	L	D	N	T	T
112		GJA1 (NM_000165)	exon2	c.A875T (p.D292V)	nonsyn	.	.	.	het	D	B	B	D	D	L	D	N	T	T
113		MEGF8 (NM_001410)	exon33	c.G5657A (p.R1886H)	nonsyn	.	4.13×10 ⁻²	rs771233244	het	D	D	P	D	D	N	T	N	T	T

ST T	Mã số mẫu	Gen	Exon	Biến thể	Loại biến thể	Tần số		avsnp150	Kiểu gen	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	MuTast	MuAss	FATH	PRO	Meta SVM	Meta LR
						1000g	ExAC												
114		MYO18B (NM_001318245)	exon43	c.C7228T (p.R2410C)	nonsyn	.	8.28×10^{-3}	rs763160003	het	D	D	D	N	D	L	D	D	D	D
115		SH3PXD2B (NM_001017995)	exon10	c.C970T (p.R324W)	nonsyn	0.00199681	0.0005	rs199739437	het	D	D	P	N	N	M	T	D	T	T
116		WNT1 (NM_005430)	exon4	<i>c.A1075T</i> (<i>p.N359Y</i>)	nonsyn	.	.	.	het	T	D	P	D	D	L	T	N	T	T
117		ZNF469 (NM_001127464)	exon2	c.G3466A (p.A1156T)	nonsyn	.	.	rs553460850	het	T	P	B	.	N	N	T	N	T	T

Mi: thiếu sản vành tai; nonsyn: biến thể thay thế; FS ins: biến thể dịch khung dạng chèn nucleotide; FS del: biến thể dịch khung dạng mất nucleotide; het: dị hợp tử; MuTast: Mutation Taster; MuAss: Mutation Assessor; FATH: FATHMM; PRO: PROVEAN; D/P: có hại, B/N/T: lành tính/trung tính; L: độ ảnh hưởng thấp.

In đậm, các biến thể được phát hiện ít nhất ở 2 bệnh nhân trở lên.

In nghiêng đậm, các biến thể mới.

^{a,a} chỉ các biến thể phát hiện ở 3 bệnh nhân.

^c chỉ các biến thể phát hiện ở 2 bệnh nhân.

Phụ lục 10. Các con đường tín hiệu được chỉ ra qua phân tích làm giàu tập hợp gen theo KEGG trong các trường hợp thiếu sản vành tai

PATHWAY	SL gen liên quan đến PATHWAY	SL gen tìm thấy	FDR	Mức độ làm giàu	Các gen phát hiện trong nghiên cứu này
Các con đường dẫn đến ung thư	530	10	0.0012	5.73	<i>NOTCH3 EDN1 COL4A4 FN1 WNT1 BMP2 WNT7A LRP5 MITF CHUK</i>
Ứng suất cắt (shear stress) chất lỏng và xơ vữa động mạch	138	5	0.0061	11.01	<i>EDN1 TRPV4 NCF2 NCF1 CHUK</i>
Tương tác với thụ thể ECM	88	4	0.0089	13.82	<i>COL4A4 FN1 FRAS1 FREM2</i>
Quá trình hình thành sắc tố	101	4	0.0091	12.04	<i>EDN1 WNT1 WNT7A MITF</i>
Tương tác AGE-RAGE trong các biến chứng tiểu đường	100	4	0.0091	12.16	<i>EDN1 COL4A4 FN1 COL3A1</i>
Proteoglycan trong tế bào ung thư	202	5	0.0118	7.52	<i>ERBB3 FN1 WNT1 FLNB WNT7A</i>
Sự biệt hóa của tế bào xương	126	4	0.0131	9.65	<i>NCF2 NCF1 MITF CHUK</i>
Con đường lây nhiễm HPV ở người	331	6	0.0131	5.51	<i>NOTCH3 COL4A4 FN1 WNT1 WNT7A CHUK</i>
Ung thư biểu mô tế bào đáy	63	3	0.0172	14.47	<i>WNT1 BMP2 WNT7A</i>
Ung thư vú	147	4	0.0185	8.27	<i>NOTCH3 WNT1 WNT7A LRP5</i>
Đường dẫn tín hiệu MTOR	154	4	0.0200	7.89	<i>WNT1 WNT7A LRP5 CHUK</i>
Tổng hợp hormone tuyến giáp	75	3	0.0213	12.16	<i>SLC26A4 DUOX2 TSHR</i>
Ung thư phổi tế bào nhỏ	92	3	0.0351	9.91	<i>COL4A4 FN1 CHUK</i>
Tiêu hóa và hấp thụ protein	103	3	0.0417	8.85	<i>COL11A1 COL4A4 COL3A1</i>
Con đường lây nhiễm Amip	102	3	0.0417	8.94	<i>COL4A4 FN1 COL3A1</i>
Chất gây ung thư hóa học	223	4	0.0516	5.45	<i>NCF2 SLC26A2 NCF1 CHUK</i>
Con đường tín hiệu Relaxin	129	3	0.0685	7.07	<i>EDN1 COL4A4 COL3A1</i>
Con đường tín hiệu Hedgehog	56	2	0.0898	10.86	<i>EVC MEGF8</i>
Con đường tín hiệu Hippo	157	3	0.0898	5.81	<i>WNT1 BMP2 WNT7A</i>
Quy định phân giải lipid trong tế bào mỡ	56	2	0.0898	10.86	<i>TSHR PLIN1</i>
Hội chứng Cushing	155	3	0.0898	5.88	<i>WNT1 WNT7A KMT2D</i>
Ung thư dạ dày	148	3	0.0898	6.16	<i>WNT1 WNT7A LRP5</i>
Con đường tín hiệu Wnt	166	3	0.0969	5.49	<i>WNT1 WNT7A LRP5</i>
Ung thư biểu mô tế bào gan	167	3	0.0969	5.46	<i>WNT1 WNT7A LRP5</i>
Con đường tín hiệu PI3K-Akt	354	4	0.1285	3.43	<i>ERBB3 COL4A4 FN1 CHUK</i>
Độ bám dính tiêu điểm	200	3	0.1285	4.56	<i>COL4A4 FN1 FLNB</i>
Bệnh do Leishmaniasis	76	2	0.1285	8.00	<i>NCF2 NCF1</i>
Điều chỉnh sai phiên mã trong ung thư	192	3	0.1285	4.75	<i>EYA1 PAX3 MITF</i>

PATHWAY	SL gen liên quan đến PATHWAY	SL gen tìm thấy	FDR	Mức độ làm giàu	Các gen phát hiện trong nghiên cứu này
Bệnh cơ tim loạn nhịp thất phải	77	2	0.1285	7.89	<i>GJA1 LMNA</i>
Bệnh cơ tim do tiểu đường	203	3	0.1285	4.49	<i>NCF2 NCF1 COL3A1</i>
Con đường tín hiệu IL-17	93	2	0.1411	6.54	<i>MUC5B CHUK</i>
Sự biệt hóa tế bào Th1 và Th2	92	2	0.1411	6.61	<i>NOTCH3 CHUK</i>
Bệnh Alzheimer	383	4	0.1411	3.17	<i>WNT1 WNT7A LRP5 CHUK</i>
Bệnh cơ tim phì đại	90	2	0.1411	6.75	<i>EDN1 LMNA</i>
Xơ vữa động mạch	214	3	0.1411	4.26	<i>NCF2 NCF1 CHUK</i>
Tổng hợp, bài tiết và hoạt động của hormone tuyến cận giáp	106	2	0.1737	5.73	<i>LRP5 SLC34A3</i>
Con đường tín hiệu TNF	112	2	0.1815	5.43	<i>EDN1 CHUK</i>
Bệnh do Toxoplasmosis	112	2	0.1815	5.43	<i>CIITA CHUK</i>
Di chuyển nội mô bạch cầu	114	2	0.1825	5.33	<i>NCF2 NCF1</i>