

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Hữu Dũng

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH BIẾN ĐỔI GEN
Ở MỘT SỐ BỆNH NHÂN THÔNG LIÊN NHĨ BẰNG CÔNG NGHỆ
GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Hữu Dũng

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH BIẾN ĐỔI GEN
Ở MỘT SỐ BỆNH NHÂN THÔNG LIÊN NHĨ BẰNG CÔNG NGHỆ
GIẢI TRÌNH TỰ GEN THẾ HỆ MỚI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

2. TS. Nguyễn Thị Kim Liên

Two handwritten signatures in blue ink are present. The first signature is above the second one, and both appear to be in cursive script.

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Người làm luận văn



Đỗ Hữu Dũng

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và nghiên cứu, ngoài sự nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ tận tình của các thầy, cô giáo, bạn bè và người thân. Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới: ban Lãnh đạo, tập thể các cán bộ Học viện Khoa học và Công nghệ và Viện nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tạo điều kiện cho tôi học tập trong thời gian qua.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng, TS. Nguyễn Thị Kim Liên và các anh chị đang làm việc tại phòng Hệ gen học chức năng, Viện nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hết lòng giúp đỡ, hướng dẫn tôi trên con đường học tập và nghiên cứu khoa học. Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô trong Hội đồng đã đóng góp cho tôi những ý kiến quý báu để tôi có thể thực hiện và hoàn thành luận văn tốt nghiệp này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban giám đốc, các khoa, các phòng của Bệnh viện Đa khoa Hồng Ngọc, và các anh chị, các bạn đồng nghiệp đã tạo mọi điều kiện, dạy dỗ và dìu dắt tôi từng bước đầu tiên trên con đường học tập và chinh phục chuyên ngành mình đã chọn.

Và những lời yêu thương nhất, tôi xin dành cho bố mẹ, gia đình, bạn bè, các anh chị em và những người đồng nghiệp đáng kính đã dành những tình cảm và đồng hành cùng tôi trải qua những điều tốt đẹp và cả những cung bậc thăng trầm trên suốt chặng đường này.

Người làm luận văn



Đỗ Hữu Dũng

MỤC LỤC

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT.....	i
DANH MỤC BẢNG.....	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	iii
MỞ ĐẦU	1
PHẦN 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1 Bệnh thông liên nhĩ.....	3
1.1.1 Khái niệm bệnh thông liên nhĩ.....	3
1.1.2 Triệu chứng của bệnh thông liên nhĩ	3
1.1.3 Phân loại bệnh.....	5
1.1.4 Dịch tễ học	5
1.2 Nguyên nhân gây bệnh thông liên nhĩ.....	7
1.3 Tình hình nghiên cứu trong nước và quốc tế.....	11
1.3.1 Tình hình nghiên cứu trên thế giới	11
<i>Gen NKX2-5</i>	<i>11</i>
<i>Gen KMT2D</i>	<i>12</i>
<i>Gen TBX5</i>	<i>13</i>
<i>Gen NOTCH2</i>	<i>14</i>
1.3.2 Tình hình nghiên cứu trong nước	15
1.4 Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới	16
PHẦN 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1 Đối tượng, vật liệu nghiên cứu	18
2.1.1 <i>Đối tượng nghiên cứu</i>	<i>18</i>
2.1.2 <i>Hóa chất và thiết bị.....</i>	<i>18</i>
Hóa chất	18
Thiết bị	18
2.2 Phương pháp nghiên cứu	20
<i>Phương pháp thu mẫu.....</i>	<i>21</i>
<i>Tách chiết DNA tổng số</i>	<i>21</i>
<i>Tạo thư viện và giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa</i>	<i>22</i>
2.2.1 <i>Xác định và sàng lọc biến thể liên quan đến bệnh thông liên nhĩ.....</i>	<i>22</i>
<i>Xác định và chú giải biến thể.....</i>	<i>22</i>
<i>Sàng lọc các biến thể liên quan đến bệnh thông liên nhĩ</i>	<i>23</i>

2.2.2	<i>Kiểm chứng đột biến bằng giải trình tự Sanger</i>	22
	<i>Khuếch đại đoạn gen chứa đột biến bằng phản ứng PCR</i>	23
	<i>Giải trình tự Sanger mẫu bệnh nhân và thành viên trong gia đình</i>	25
2.2.3	<i>Điện di trên gel agarose</i>	26
	<i>Chuẩn bị gel agarose</i>	26
	<i>Tra mẫu DNA</i>	26
	<i>Nhuộm bản gel điện di bằng EtBr</i>	26
	PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	28
3.1	<i>Thu thập mẫu</i>	28
3.2	<i>Tách chiết DNA tổng số</i>	28
3.3	<i>Tạo thư viện và giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa</i>	30
3.4	<i>Xác định và sàng lọc biến thể</i>	34
3.5	<i>Kết quả kiểm chứng biến thể</i>	43
3.6	<i>Thảo luận</i>	48
	PHẦN 4. KẾT LUẬN	51
1.	<i>Kết luận</i>	51
2.	<i>Kiến nghị</i>	51

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ASD	Atrial Septal Defects	Thông liên nhĩ
NGS	Next Generation Sequencing	Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
EtBr	Ethidium Bromide	
WES	Whole Exome Sequencing	Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa
NST	Chromosome	Nhiễm sắc thể
TAE	Tris – Acetate - EDTA	
RNA	Ribonucleic Acid	
DNA	Deoxyribonucleic Acid	
AW	Wash Buffer	Dung dịch đệm rửa
AL	Lysis Buffer	Dung dịch đệm giải
ECG	Electrocardiogram	Điện tâm đồ
MRI	Magnetic Resonance Imaging	Chụp cộng hưởng từ

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1: Thành phần phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen.....	24
Bảng 2. Thông tin bệnh nhân và các thành viên trong gia đình.....	28
Bảng 3. Kết quả đo nồng độ DNA và độ tinh sạch.....	30
Bảng 4. Kết quả chất lượng đọc trình tự.....	31
Bảng 5. Kết quả giống hàng dữ liệu của bệnh nhân với hệ gen tham chiếu.....	34
Bảng 6. Kết quả xác định số lượng các biến thể của từng loại đột biến.....	35
Bảng 7. Các gen liên quan tới bệnh thông liên nhĩ.....	36
Bảng 8. Kết quả sàng lọc biến thể trong gen liên quan đến bệnh thông liên nhĩ của bệnh nhân HN51, HN56 và HN48.....	37
Bảng 9. Kết quả đánh giá đột biến trên phần mềm tin sinh.....	40

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1. So sánh tim bình thường và tim mắc bệnh thông liên nhĩ.....	4
Hình 2. Các biến thể đột biến trên gen <i>NKX2-5</i> [22]	12
Hình 3. <i>KMT2D</i> và quá trình Methyl hóa[23]	13
Hình 4. Các đột biến trên gen <i>TBX5</i> gây hội chứng Holt-Oram [27].....	14
Hình 5. Quy trình nghiên cứu.....	19
Hình 6. Phản ứng PCR	23
Hình 7. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen <i>KTM2D</i> và <i>NOTCH2</i>	25
Hình 8. Điện di đồ DNA tách chiết từ bệnh nhân (A) HN48, (B) HN51, (C) HN56 và bố mẹ bệnh nhân.....	29
Hình 9. Kết quả tạo thư viện của 3 bệnh nhân (A) HN48, (B) HN51, (C) HN56.....	30
Hình 10. Khoảng bao phủ giải trình tự vùng mã hóa của bệnh nhân HN48	32
Hình 11. Tỷ lệ kích thước đoạn đọc và số lượng đoạn WES đọc của bệnh nhân HN48	32
Hình 12. Khoảng bao phủ giải trình tự vùng mã hóa của bệnh nhân HN51	32
Hình 13. Tỷ lệ kích thước đoạn đọc và số lượng đoạn WES đọc của bệnh nhân HN51	33
Hình 14. Khoảng bao phủ giải trình tự vùng mã hóa của bệnh nhân HN56	33
Hình 15. Tỷ lệ kích thước đoạn đọc và số lượng đoạn WES đọc của bệnh nhân HN56	34
Hình 16. Kết quả đánh giá gây bệnh của đột biến <i>NOTCH2</i>	41
Hình 17. Kết quả đánh giá gây bệnh của đột biến <i>KMT2D</i>	42
Hình 18. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen <i>NOTCH2</i> của bệnh nhân HN56 chứa đột biến.....	43
Hình 19. Phân tích di truyền đột biến ở bệnh nhân và gia đình. (A) Gen <i>NOTCH2</i> nằm ở vị trí 1p12 trên cánh tay ngắn của nhiễm sắc thể số 1. (B) Sơ đồ phả hệ và trình tự đột biến c.137A>G (p.Asn46Ser) trong gia đình bệnh nhân.....	46
Hình 20. Kết quả giống hàng đoạn trình tự axit amin protein NOTCH2 của các loài khác nhau	47
Hình 21. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen <i>KMT2D</i> của bệnh nhân HN48 chứa đột biến.....	45
Hình 22. Phân tích di truyền đột biến ở bệnh nhân và gia đình. (A) Gen <i>KMT2D</i> nằm ở vị trí 12q13.12 trên cánh tay dài của nhiễm sắc thể số 12. (B) Sơ đồ phả hệ và trình tự đột biến c.12566G>C (p.Gly4189Ala) trong gia đình bệnh nhân.....	44
Hình 23. Kết quả giống hàng đoạn trình tự axit amin protein KMT2D của các loài khác nhau	44

MỞ ĐẦU

Thông liên nhĩ (Atrial Septal Defects) là bệnh lý tim bẩm sinh khá phổ biến, xảy ra ở khoảng 25% trẻ em mắc bệnh tim. Tỷ lệ mắc các bệnh về tim bẩm sinh và đặc biệt là thông liên nhĩ đã tăng lên trong 50 năm. Vào những năm 1930, bệnh tim bẩm sinh được chẩn đoán với tỷ lệ dưới 1 trên 1000 ca sinh sống. Trong những năm gần đây, bệnh tim bẩm sinh được chẩn đoán với tỷ lệ 9 trên 1000 ca sinh sống. Các khuyết tật vách liên nhĩ được phát hiện trong khoảng thời gian từ năm 1945 đến năm 1949 với tỷ lệ dưới 0,5 ca trên 1000 ca sinh sống. Dữ liệu dịch tễ học gần đây cho thấy thông liên nhĩ xảy ra với tỷ lệ 1,6 trên 1000 ca sinh sống. Sự gia tăng đáng chú ý về tỷ lệ mắc bệnh có lẽ không phải do bệnh gia tăng mà là do những cải tiến trong phương thức chuẩn đoán bằng hình ảnh và nâng cao trình độ của y, bác sĩ. Một số yếu tố có liên quan đến tỷ lệ mắc bệnh tim bẩm sinh gia tăng bao gồm cả tuổi mẹ cao. Bệnh tim bẩm sinh được chẩn đoán phổ biến hơn ở những bệnh nhân ở các nước phát triển có thu nhập cao hơn [1].

Khuyết tật vách liên nhĩ xảy ra khi xuất hiện một lỗ thủng trên vách liên nhĩ giữa tâm nhĩ phải và tâm nhĩ trái. Nó bao gồm các khuyết tật liên quan đến cả màng vách ngăn và các khuyết tật khác cho phép thông giữa hai tâm nhĩ. Có bốn loại khuyết tật vách liên nhĩ, từ phổ biến nhất đến ít phổ biến nhất: Thông liên nhĩ lỗ nguyên phát (15-20%), thông liên nhĩ lỗ thứ phát (75%), thông liên nhĩ xoang tĩnh mạch (5-10%) và thông liên nhĩ xoang vành [1], [2]. Các khuyết tật vách liên nhĩ nhỏ thường tự đóng ở trẻ em. Các khuyết tật lớn không tự đóng có thể cần can thiệp hoặc phẫu thuật để ngăn ngừa các biến chứng khác như đột quy, loạn nhịp tim và tăng huyết áp [3]. Mặc dù các khiếm khuyết vách ngăn nhĩ xảy ra như các khiếm khuyết riêng lẻ, tuy nhiên thông liên nhĩ có liên quan đến di truyền Mendel, lệch bội, lỗi phiên mã, đột biến và di truyền từ mẹ. Các khiếm khuyết vách ngăn nhĩ được ghi nhận ở những bệnh nhân mắc hội chứng Down, hội chứng Treacher-Collins, hội chứng giảm tiểu cầu vô nhân, hội chứng Turner và hội chứng Noonan, các hội chứng này xảy ra do di truyền Mendel [4], [5]. Ngoài ra mẹ mắc Rubella hoặc sử dụng các chất kích thích, chẳng hạn như cocaine và rượu cũng có thể khiến thai nhi chưa chào đời dễ mắc thông liên nhĩ. Ngoài ra, thông liên nhĩ có liên quan đến các rối loạn di truyền gia đình và khiếm khuyết dẫn truyền. Các yếu tố phiên mã đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành vách ngăn nhĩ bao gồm *GATA4*, *NKX2-5* và *TBX5*

[5], [6]. Hội chứng Holt-Oram thường được đặc trưng bởi khuyết tật tim bẩm sinh (thông liên nhĩ chiếm 58% bệnh nhân hoặc thông liên thất chiếm 28% bệnh nhân), loạn nhịp tim và dị tật chi trên thường liên quan đến đột biến gen *TBX5*. Các đột biến trong gen *NKX2-5* có liên quan đến bệnh tim bẩm sinh (thông liên nhĩ và Tứ chứng Fallot), làm gián đoạn dẫn truyền tâm thất và tử vong đột ngột do tim ở trẻ vị thành niên [7], [8].

Hiện nay, tại Việt Nam vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của di truyền học với bệnh thông liên nhĩ. Ngoài ra các bệnh về tim bẩm sinh cũng không được nhắc quá nhiều trong các thống kê và các cơ sở dữ liệu của Việt Nam. Do vậy đề tài “**Nghiên cứu xác định biến đổi gen ở một số bệnh nhân thông liên nhĩ bằng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới**” được tiến hành với mục đích giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của 3 bệnh nhân mắc bệnh thông liên nhĩ. Xác định được các biến thể gen trong vùng exon của bệnh nhân, từ đó sàng lọc và tìm ra biến thể gây bệnh.

Các nội dung nghiên cứu chính gồm: Thu thập mẫu máu và dữ liệu lâm sàng của bệnh nhân và các thành viên gia đình (nếu có); Tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu; Phát hiện biến thể gen gây bệnh có khả năng gây bệnh ở các mẫu bệnh nhân bằng phương pháp giải trình tự hệ gen mã hóa (Whole Exome Sequencing - WES); Xác định và chú giải biến thể, sàng lọc biến thể liên quan đến bệnh bằng các công cụ tin sinh; Kiểm tra biến thể đã phát hiện ở bệnh nhân và các thành viên gia đình bệnh nhân bằng phương pháp giải trình tự Sanger; Phân tích mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình ở bệnh nhân mắc thông liên nhĩ.

Kết quả của nghiên cứu này cung cấp dữ liệu có giá trị về các biến thể gen gây bệnh thông liên nhĩ ở người Việt Nam. Đồng thời, cung cấp các thông tin có giá trị trong việc chẩn đoán, điều trị bệnh và tư vấn di truyền.

PHẦN 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1 Bệnh thông liên nhĩ

Trong quá trình phát triển của phôi thai, sự hình thành thông liên nhĩ xảy ra ở ba tháng đầu thai kì. Bình thường tim sẽ có 4 buồng, gồm hai tâm nhĩ được ngăn cách bởi vách liên nhĩ và hai tâm thất được ngăn cách nhau bởi vách liên thất, 2 tâm nhĩ và 2 tâm thất được ngăn cách với nhau bởi 2 vòng van nhĩ thất. Nếu sự hình thành vách liên nhĩ bị khiếm khuyết sẽ dẫn đến bệnh thông liên nhĩ.

1.1.1 Khái niệm bệnh thông liên nhĩ

Thông liên nhĩ (Atrial Septal Defect - ASD) là một dị tật tim bẩm sinh, đặc trưng bởi sự xuất hiện của một lỗ thông trên vách ngăn giữa hai buồng tâm nhĩ trái và phải của tim. Vách ngăn này, gọi là vách liên nhĩ (Atrial septum), có nhiệm vụ ngăn cách hoàn toàn hai buồng tâm nhĩ để máu giàu oxy từ phổi chỉ được đưa về tâm nhĩ trái và sau đó đến các cơ quan trong cơ thể. Khi có lỗ thông liên nhĩ, máu giàu oxy từ tâm nhĩ trái có thể chảy ngược vào tâm nhĩ phải, dẫn đến trộn lẫn giữa máu giàu oxy và máu nghèo oxy, gây ra nhiều vấn đề cho hệ thống tuần hoàn của tim [9], [10].

1.1.2 Triệu chứng của bệnh thông liên nhĩ

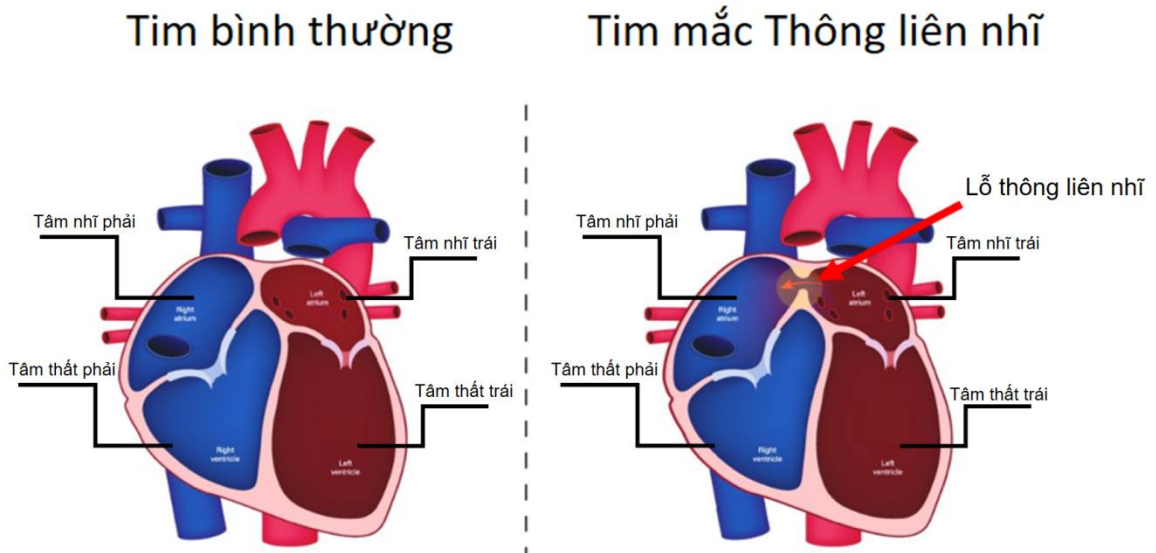
Thông liên nhĩ thường là do sự bất thường trong quá trình phát triển của tim trong giai đoạn bào thai. Một số yếu tố nguy cơ có thể bao gồm di truyền và các tác động từ môi trường như nhiễm trùng hoặc tiếp xúc với các chất độc hại trong thai kỳ [11]. Đa phần trẻ em có khiếm khuyết vách ngăn liên nhĩ thường không có triệu chứng và thường khỏe mạnh, hoạt động bình thường. Nhiều trường hợp thông liên nhĩ có thể không biểu hiện triệu chứng rõ ràng trong thời gian dài, thậm chí có thể không được phát hiện cho đến khi trưởng thành [12], [13]. Khi triệu chứng xuất hiện, chúng có thể bao gồm:

Khó thở, đặc biệt khi gắng sức, khi tham gia các hoạt động thể lực. Lúc này áp lực động mạch phổi tăng kéo dài khiến tâm thất phải dần yếu đi và mất khả năng bơm máu hiệu quả, dẫn đến suy tim phải. Đây là nguyên nhân chính gây ra tình trạng khó thở ở những trường hợp thông liên nhĩ nặng. Dù hiếm gặp, một số bệnh nhân có thể phát triển tình trạng tắc nghẽn đường thở do sự phì đại của cơ tim hoặc các cấu trúc khác gây áp lực lên đường thở [14].

Mệt mỏi, khi có lỗ thông liên nhĩ, máu giàu oxy từ tâm nhĩ trái chảy sang tâm nhĩ phải, gây quá tải cho tâm thất phải và dẫn đến việc bơm máu kém hiệu quả. Điều này khiến cơ thể không nhận đủ oxy cần thiết, gây ra cảm giác mệt mỏi, đặc biệt khi hoạt động thể lực. Sự suy giảm hiệu quả bơm máu từ tim phải và sự quá tải của phổi làm giảm lượng oxy được cung cấp cho các cơ quan và mô trong cơ thể, gây ra tình trạng mệt mỏi kéo dài [15]. Nếu không được điều trị, thông liên nhĩ có thể dẫn đến suy tim phải. Khi tim không thể bơm máu hiệu quả, các cơ quan không nhận được đủ oxy, gây ra tình trạng mệt mỏi mạn tính. Tình trạng tăng áp động mạch phổi do shunt trái-phải kéo dài có thể làm tăng sức cản mạch máu phổi, làm suy giảm chức năng tim và gây mệt mỏi [9].

Tim đập nhanh hoặc không đều khi quá tải thể tích tim phải, máu từ tâm nhĩ trái chảy sang tâm nhĩ phải, gây ra một lượng máu dư thừa chảy qua tâm nhĩ và tâm thất phải, làm tăng gánh nặng lên tim phải và có thể dẫn đến các rối loạn nhịp tim như nhịp tim nhanh (Tachycardia) hoặc rung nhĩ (Atrial fibrillation - AFib). Rung nhĩ là trạng thái trong đó các xung điện diễn ra bất thường trong tâm nhĩ khiến chúng co bóp không đều và nhanh. Rung nhĩ có thể xảy ra do sự giãn nở của tâm nhĩ phải và sự biến đổi cấu trúc của các tế bào cơ tim, gây ra nhịp tim không đều và thường rất nhanh. Nhịp tim nhanh (Tachycardia): ngoài rung nhĩ, bệnh nhân mắc thông liên nhĩ có thể gặp các dạng nhịp tim nhanh khác như nhịp nhanh trên thất (Supraventricular tachycardia - SVT), do tăng áp lực và căng thẳng trong tim phải gây ra các tín hiệu điện bất thường [16].

Theo thời gian, tâm thất phải ở bệnh nhân thông liên nhĩ phải làm việc nhiều hơn để bơm máu qua phổi, dẫn đến suy tim phải. Khi tim phải suy yếu, khả năng bơm máu hiệu quả giảm, gây ra ứ đọng máu ở các tĩnh mạch ngoại biên, từ đó gây ra phù nề, thường xuất hiện ở chân, mắt cá chân, và bụng. Sự căng thẳng liên tục lên tâm thất phải do quá tải thể tích có thể làm giãn cơ tim và giảm khả năng co bóp của tim. Ngoài ra khi suy tim phải tiến triển, lưu lượng máu đến thận bị giảm, làm suy giảm chức năng lọc máu và loại bỏ chất lỏng dư thừa khỏi cơ thể và khi tim phải không bơm máu hiệu quả, máu có xu hướng ứ đọng trong các tĩnh mạch, đặc biệt là ở phần dưới của cơ thể do lực hấp dẫn. Áp lực tăng cao trong tĩnh mạch dẫn đến thoát dịch từ lòng mạch vào các mô xung quanh cũng là nguyên nhân gây ra phù nề [17].



Hình 1. So sánh tim bình thường và tim mắc bệnh thông liên nhĩ

1.1.3 Phân loại bệnh

Thông liên nhĩ có thể được phân loại dựa trên vị trí của lỗ thông trên vách liên nhĩ [9], bao gồm:

- Thông liên nhĩ lỗ thứ phát (Secundum ASD): Đây là loại phổ biến nhất, lỗ thông nằm ở vị trí trung tâm của vách liên nhĩ, thường ở vùng lỗ bầu dục (foramen ovale), một cấu trúc bình thường tồn tại trong thai kỳ và thường đóng lại sau khi sinh.
- Thông liên nhĩ lỗ nguyên phát (Primum ASD): Lỗ thông nằm gần van nhĩ thất, thường liên quan đến các dị tật khác của van tim.
- Thông liên nhĩ thể xoang tĩnh mạch (Sinus Venosus ASD): Lỗ thông nằm gần nơi tĩnh mạch chủ trên hoặc tĩnh mạch phổi đổ vào tâm nhĩ phải.
- Thông liên nhĩ thể xoang vành (Coronary Sinus ASD): Đây là dạng hiếm gặp, nơi lỗ thông xảy ra ở vùng xoang vành.

1.1.4 Dịch tễ học

Thông liên nhĩ là một trong những dị tật tim bẩm sinh phổ biến nhất trên thế giới, ảnh hưởng đến nhiều trẻ em ở mọi quốc gia. Theo các thống kê, tỷ lệ mắc thông liên nhĩ trung bình là khoảng 1,6 trên 1.000 trẻ sinh ra sống. Tỷ lệ này khá đồng nhất trên toàn cầu, mặc dù có sự khác biệt nhẹ giữa các khu vực và chủng tộc. Một điểm đáng chú ý là tỷ lệ mắc bệnh ở nữ giới cao hơn so với nam giới, với tỷ lệ nữ mắc thông liên nhĩ gấp khoảng 2 lần so với nam giới. Lý

do cho sự chênh lệch này chưa được hiểu rõ hoàn toàn, nhưng có thể liên quan đến các yếu tố di truyền và nội tiết tố [16].

Tại các quốc gia châu Á như Trung Quốc và Ấn Độ, tỷ lệ mắc thông liên nhĩ tương tự như ở Châu Âu và Bắc Mỹ. Tuy nhiên, sự chênh lệch lớn về tiếp cận y tế dẫn đến tỷ lệ tử vong và biến chứng cao hơn ở những quốc gia này. Trong khi đó, tại Nhật Bản, tỷ lệ mắc thông liên nhĩ khoảng 1,3 trên 1.000 trẻ sinh ra sống, và tỷ lệ phát hiện sớm ngày càng tăng nhờ các chương trình sàng lọc rộng rãi và ý thức cộng đồng về tầm quan trọng của việc chăm sóc sức khỏe trước sinh [1].

Ở Châu Âu và Bắc Mỹ, tỷ lệ mắc thông liên nhĩ ở trẻ sơ sinh thường nằm trong khoảng 1-2 trên 1.000 trẻ sinh ra sống. Nhờ hệ thống y tế phát triển và các chương trình sàng lọc trước sinh, phần lớn các trường hợp thông liên nhĩ được phát hiện sớm thông qua siêu âm tim hoặc các biện pháp chẩn đoán hiện đại khác. Tại Hoa Kỳ, theo số liệu của Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh (CDC), mỗi năm có khoảng 1.000 trẻ sinh ra mắc thông liên nhĩ. Việc phát hiện sớm và can thiệp kịp thời giúp giảm thiểu đáng kể các biến chứng và tăng khả năng sống sót cho bệnh nhân [18], [19].

Ở Châu Phi và Mỹ Latinh, thống kê về tỷ lệ mắc Thông liên nhĩ có thể không chính xác do hạn chế về hệ thống y tế và cơ sở hạ tầng chẩn đoán. Tuy nhiên, các nghiên cứu nhỏ lẻ chỉ ra rằng tỷ lệ mắc có thể tương tự như ở các khu vực khác, nhưng tỷ lệ tử vong và biến chứng lại cao hơn do thiếu khả năng tiếp cận các phương pháp điều trị hiệu quả. Nhiều trường hợp chỉ được phát hiện khi bệnh đã tiến triển nghiêm trọng, dẫn đến tỷ lệ phẫu thuật thành công và sống sót sau điều trị thấp hơn so với các khu vực khác [1].

Thông liên nhĩ là một trong những dị tật tim bẩm sinh khá phổ biến, tuy nhiên thống kê chính xác về số lượng ca mắc thông liên nhĩ tại Việt Nam chưa được công bố rộng rãi. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc các bệnh tim bẩm sinh dao động khoảng từ 7 đến 9 ca trên mỗi 1.000 trẻ sinh ra [20]. Trong số các dị tật tim bẩm sinh, thông liên nhĩ chiếm một tỷ lệ đáng kể. Việc phát hiện và chẩn đoán thông liên nhĩ tại Việt Nam thường gặp khó khăn, đặc biệt ở những vùng nông thôn, nơi cơ sở y tế và trang thiết bị chẩn đoán còn hạn chế. Nhiều trường hợp chỉ được phát hiện khi bệnh đã tiến triển nặng, hoặc thông qua các chương trình sàng lọc dị tật tim bẩm sinh ở trẻ em. Ở Việt Nam, việc điều trị thông liên nhĩ chủ yếu dựa vào các bệnh viện lớn có chuyên khoa tim mạch. Phương pháp

điều trị thông liên nhĩ phổ biến là phẫu thuật hoặc can thiệp nội mạch để đóng lỗ thông. Trong những năm gần đây, công nghệ và kỹ thuật điều trị bệnh tim bẩm sinh đã được cải thiện đáng kể, giúp tăng cơ hội sống sót và cải thiện chất lượng cuộc sống cho các bệnh nhân. Một trong những thách thức lớn nhất trong việc điều trị thông liên nhĩ tại Việt Nam là chi phí phẫu thuật cao, đặc biệt là đối với các gia đình có hoàn cảnh kinh tế khó khăn. Tuy nhiên, một số chương trình hỗ trợ từ các tổ chức xã hội và từ thiện đã giúp nhiều trẻ em được phẫu thuật miễn phí hoặc với chi phí thấp. Việc nâng cao nhận thức về các dị tật tim bẩm sinh, bao gồm thông liên nhĩ, đang ngày càng được chú trọng tại Việt Nam. Các chiến dịch giáo dục sức khỏe và sàng lọc sớm được đẩy mạnh để phát hiện và can thiệp kịp thời.

1.2 Nguyên nhân gây bệnh thông liên nhĩ

Thông liên nhĩ thường là do sự bất thường trong quá trình phát triển của tim trong giai đoạn bào thai. Một số yếu tố nguy cơ có thể bao gồm di truyền và các tác động từ môi trường như nhiễm trùng hoặc tiếp xúc với các chất độc hại trong thai kỳ [11]. Một số yếu tố môi trường và sinh hoạt của mẹ trong quá trình mang thai có thể tăng nguy cơ mắc bệnh tim bẩm sinh cho thai nhi, bao gồm:

- Nhiễm trùng trong thai kỳ

Các nhiễm trùng trong giai đoạn mang thai có thể ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của thai nhi và gây ra các dị tật bẩm sinh, bao gồm bệnh thông liên nhĩ [21].

Rubella: Rubella là một trong những nguyên nhân phổ biến nhất gây dị tật tim bẩm sinh, đặc biệt là khi mẹ bị nhiễm trong 3 tháng đầu của thai kỳ. Rubella có thể làm giảm khả năng phát triển bình thường của tim và dẫn đến các khiếm khuyết bẩm sinh, trong đó có thông liên nhĩ.

Cytomegalovirus: Là một loại virus có thể gây ra các vấn đề nghiêm trọng đối với thai nhi, bao gồm các khuyết tật tim. Mẹ bị nhiễm CMV trong thai kỳ có thể tăng nguy cơ dị tật tim, mặc dù virus này không gây ra các triệu chứng rõ ràng ở mẹ.

Toxoplasmosis: Đây là một bệnh nhiễm trùng do ký sinh trùng *Toxoplasma gondii* gây ra. Mẹ mắc bệnh Toxoplasmosis trong thai kỳ có thể tăng nguy cơ dị tật bẩm sinh, bao gồm bệnh thông liên nhĩ.

Herpes simplex và nhiễm trùng khác: Một số loại virus và vi khuẩn khác như herpes simplex cũng có thể làm tăng nguy cơ dị tật tim nếu mẹ bị nhiễm trong thai kỳ.

- Thuốc và chất độc hại

Các loại thuốc và chất độc hại mà bà mẹ tiếp xúc trong thời kỳ mang thai có thể làm thay đổi sự phát triển của thai nhi và dẫn đến các khuyết tật bẩm sinh, bao gồm thông liên nhĩ [21].

Thuốc chống động kinh (anticonvulsants): Một số loại thuốc dùng để điều trị động kinh, chẳng hạn như phenytoin và valproate, đã được chứng minh là có liên quan đến tăng nguy cơ dị tật tim bẩm sinh, bao gồm thông liên nhĩ. Phenytoin, đặc biệt, có thể làm thay đổi sự phát triển của tim, dẫn đến các khiếm khuyết.

Thuốc kháng vitamin A (Isotretinoin): Isotretinoin, một loại thuốc điều trị mụn trứng cá nặng, có thể gây ra các dị tật bẩm sinh nghiêm trọng, bao gồm dị tật tim. Nó có thể làm giảm khả năng phát triển bình thường của tim và các cơ quan khác trong thai nhi.

Rượu: Tiếp xúc với rượu trong thai kỳ (ngay cả khi uống một lượng nhỏ) có thể gây ra hội chứng rượu bào thai (FAS), một nhóm các vấn đề liên quan đến sự phát triển của thai nhi, bao gồm các dị tật bẩm sinh về tim như thông liên nhĩ.

Thuốc lá: Hút thuốc trong khi mang thai có thể gây ra các vấn đề về sự phát triển của thai nhi, bao gồm sự phát triển bất thường của tim. Thuốc lá có thể làm giảm cung cấp oxy và dưỡng chất cho thai nhi, gây ra các dị tật tim.

Ma túy: Sử dụng ma túy trong thai kỳ, chẳng hạn như cocaine và heroin, có thể làm tăng nguy cơ dị tật bẩm sinh.

- Ô nhiễm môi trường và hóa chất

Tiếp xúc với các hóa chất độc hại và ô nhiễm không khí có thể tác động đến sức khỏe của thai nhi và làm tăng nguy cơ các dị tật bẩm sinh, bao gồm bệnh thông liên nhĩ [21].

Ô nhiễm không khí: Các chất ô nhiễm như bụi mịn (PM2.5), Oxit nito (NOx) và các hợp chất hữu cơ bay hơi có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe của thai nhi. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng việc mẹ tiếp xúc với mức ô nhiễm không khí cao trong thai kỳ có thể làm tăng nguy cơ sinh con mắc phải các dị tật bẩm sinh, bao gồm các khiếm khuyết về tim.

Hóa chất công nghiệp: Tiếp xúc với các hóa chất độc hại trong môi trường làm việc hoặc sinh hoạt (như hóa chất trong nông nghiệp, thuốc trừ sâu, dung môi công nghiệp) có thể làm tăng nguy cơ dị tật tim bẩm sinh. Các hóa chất này có thể ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của tim trong giai đoạn đầu thai kỳ.

Chất phóng xạ: Tiếp xúc với chất phóng xạ trong thời kỳ mang thai có thể gây ra đột biến và dị tật bẩm sinh, trong đó có các vấn đề liên quan đến tim. Các bà mẹ làm việc trong môi trường có mức phóng xạ cao có thể đối mặt với nguy cơ sinh con mắc phải các khiếm khuyết tim bẩm sinh.

- Chế độ dinh dưỡng kém trong thai kỳ

Chế độ ăn uống không đầy đủ hoặc không cân đối trong thời kỳ mang thai có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của thai nhi, bao gồm sự phát triển của hệ tim mạch [22].

Thiếu acid folic: Folic acid (vitamin B9) đóng vai trò quan trọng trong việc phòng ngừa các dị tật bẩm sinh, đặc biệt là các vấn đề liên quan đến hệ thần kinh và tim. Thiếu folate trong chế độ ăn uống của mẹ có thể làm tăng nguy cơ dị tật tim bẩm sinh, bao gồm thông liên nhĩ.

Thiếu các vitamin và khoáng chất khác: Thiếu vitamin A, vitamin D, sắt hoặc kẽm cũng có thể ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của thai nhi và làm tăng nguy cơ các dị tật bẩm sinh.

Thừa vitamin A: Mặc dù vitamin A rất cần thiết cho sự phát triển của thai nhi, nhưng nếu bà mẹ tiêu thụ quá nhiều vitamin A trong thai kỳ (thông qua chế độ ăn uống hoặc bổ sung vitamin), có thể gây ra dị tật bẩm sinh.

- Tuổi mẹ và tình trạng sức khỏe

Các yếu tố như tuổi mẹ cao, bệnh lý mãn tính hoặc tình trạng sức khỏe của mẹ cũng có thể tác động đến sự phát triển của thai nhi và làm tăng nguy cơ mắc bệnh thông liên nhĩ [22].

Tuổi mẹ cao: Phụ nữ mang thai ở độ tuổi cao (trên 35) có nguy cơ cao hơn gặp phải các vấn đề về dị tật bẩm sinh, bao gồm các dị tật tim như thông liên nhĩ. Điều này có thể liên quan đến sự thay đổi trong quá trình phân chia tế bào và các yếu tố di truyền.

Bệnh tiểu đường và huyết áp cao: Các bệnh lý như tiểu đường và cao huyết áp nếu không được kiểm soát tốt trong thai kỳ có thể làm tăng nguy cơ dị tật bẩm sinh.

Mặc dù nguyên nhân chính xác của thông liên nhĩ vẫn chưa được xác định, nhưng những yếu tố này có thể đóng vai trò trong việc tạo ra môi trường dễ phát triển bệnh tim bẩm sinh ở thai nhi.

Ngoài yếu tố môi trường và thói quen sinh hoạt của người mẹ khi mang thai, bệnh thông liên nhĩ có thể xuất hiện do đột biến trong các gen liên quan đến sự phát triển tim mạch trong giai đoạn phôi thai. Một số gen đã được xác định có liên quan đến thông liên nhĩ, bao gồm như: *NKX2-5*, *GATA4*, *TBX5*, và *MYH6*. Những gen này đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành và phát triển của vách ngăn tim (septum), nơi xuất hiện lỗ thông liên nhĩ nếu quá trình phát triển này bị gián đoạn. Ngoài ra thông liên nhĩ có thể di truyền theo cách thức di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường (autosomal dominant), có nghĩa là chỉ cần một bản sao của gen đột biến từ cha hoặc mẹ cũng có thể gây ra bệnh. Tuy nhiên, thông liên nhĩ cũng có thể xuất hiện mà không có tiền sử gia đình rõ ràng, do các đột biến mới (*de novo*) hoặc các yếu tố môi trường [23].

Một số hội chứng di truyền liên quan: Hội chứng Holt-Oram: Đột biến trong gen *TBX5* gây ra hội chứng Holt-Oram, đặc trưng bởi dị tật tim (bao gồm ASD) và bất thường ở chi trên. Hội chứng này là một ví dụ điển hình của sự liên quan giữa ASD và yếu tố di truyền. Hội chứng Noonan: Hội chứng này liên quan đến đột biến trong gen *PTPN11*, *SOS1*, và các gen khác. Nó có thể gây ra nhiều dị tật tim bẩm sinh, bao gồm thông liên nhĩ, kèm theo các đặc điểm khác như tầm vóc nhỏ, khuôn mặt điển hình, và các bất thường ở da [8], [23].

Ngoài các đột biến đơn gen ở một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng các đa hình gen (polymorphisms) trong các gen liên quan đến yếu tố phát triển tim có thể làm tăng nguy cơ mắc thông liên nhĩ. Những đa hình này không trực tiếp gây ra bệnh nhưng có thể làm tăng tính nhạy cảm của cá nhân đối với việc phát triển bệnh thông liên nhĩ. Một số trường hợp thông liên nhĩ có thể liên quan đến di truyền phức tạp, không tuân theo quy luật di truyền của Mendel. Những trường hợp này có thể do tương tác giữa nhiều gen và yếu tố môi trường, chẳng hạn như nhiễm trùng trong thai kỳ, sử dụng thuốc, hoặc phơi nhiễm với các chất độc hại. Người có tiền sử gia đình mắc thông liên nhĩ có nguy cơ cao hơn sinh con mắc bệnh này. Tỷ lệ di truyền của thông liên nhĩ khi một trong hai cha mẹ mắc bệnh có thể dao động từ 5-10%, tùy thuộc vào các yếu tố di truyền cụ thể và môi trường.

1.3 Tình hình nghiên cứu trong nước và quốc tế

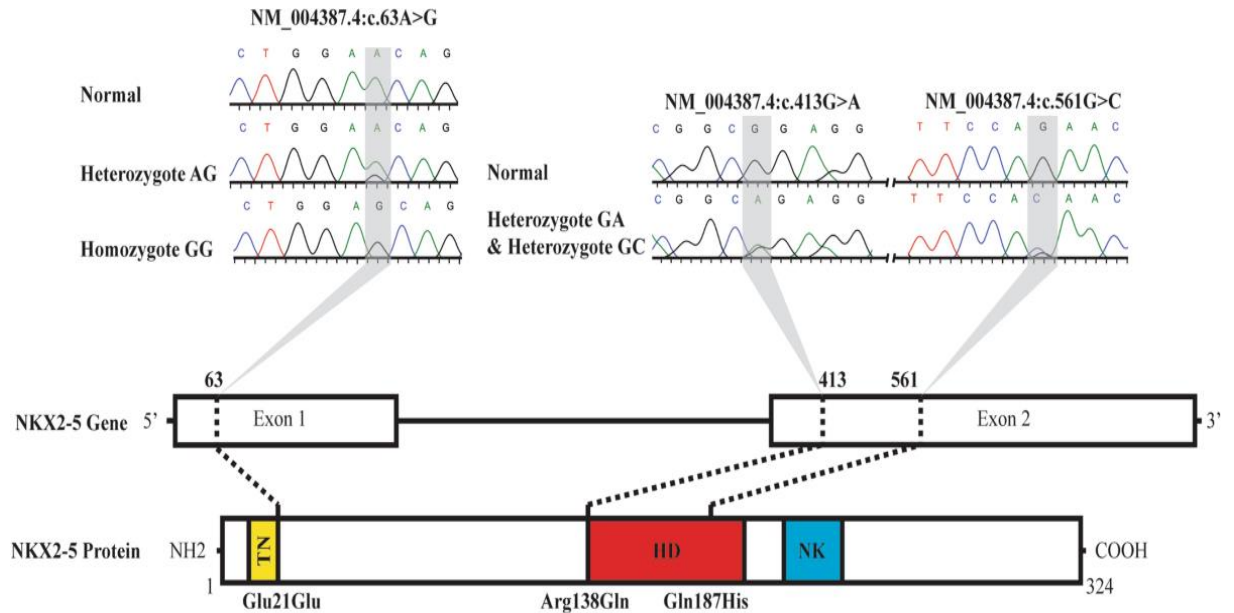
1.3.1 Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Trên thế giới nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc xác định các yếu tố di truyền và môi trường gây ra bệnh thông liên nhĩ. Các nghiên cứu về gen đã phát hiện ra nhiều đột biến gen liên quan đến thông liên nhĩ, chẳng hạn như các gen *NKX2-5*, *GATA4*, và *TBX5* [23]. Các nghiên cứu này đã giúp làm rõ vai trò của yếu tố di truyền trong sự phát triển của thông liên nhĩ và các phương pháp chẩn đoán sớm bằng cách phân tích các đột biến gen. Các tiến bộ trong kỹ thuật chẩn đoán, như siêu âm tim 3D và MRI tim, đã được nghiên cứu và áp dụng rộng rãi trong việc phát hiện sớm bệnh. Các nghiên cứu này cho thấy rằng can thiệp sớm có thể ngăn ngừa các biến chứng nặng như tăng áp lực động mạch phổi và suy tim.

Gen *NKX2-5*

NKX2-5 nằm trên nhiễm sắc thể số 5, gen này là thành viên của họ gen NK homeobox factor – đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của tim. Các đột biến ở *NKX2-5* ở người có liên quan tới các khuyết tật vách ngăn nhĩ và rối loạn dẫn truyền nhĩ thất. Biến thể *NKX2-5* ở bệnh nhân khuyết vách ngăn nhĩ đã được báo cáo có liên quan tới bệnh thông liên nhĩ. Tuy nhiên, nó vẫn chưa được mô tả nhiều. Royhan Rozqie và các cộng sự năm 2022 đã nghiên cứu về gen *NKX2-5* ở quần thể người vùng Đông Nam Á. Bài báo đã xác định được ba biến thể của *NKX2-5*: NM_004387.4 (c.63A>G) ở exon 1, NM_004387.4 (c.413G>A) và NM_004387.4 (c.561G>C) ở exon 2. Biến thể đầu tiên thường được tìm thấy trên hầu hết các đối tượng (85,6%) và lành tính. Hai biến thể cuối cùng là dị hợp tử ở cùng một vị trí, các biến thể này hiếm gặp (3,1%) và mới. Điều thú vị là các biến thể này được phát hiện trong các thành viên bị khuyết tật vách liên nhĩ trong cùng gia đình với phổ loạn nhịp tim và tăng huyết áp phổi nặng. Đối với biến thể c.413G>A, việc thay thế nucleotide guanine bằng adenine làm thay đổi axit amin arginine (Arg) thành glutamine (Gln). Trong khi đó, đối với biến thể c.561G>C, việc thay thế guanine bằng cytosine làm thay đổi axit amin glutamine (Gln) thành histidine (His). Các biến thể này làm thay đổi trình tự axit amin và do đó làm thay đổi cấu trúc protein, có thể ảnh hưởng đến chức năng của protein *NKX2-5* như một yếu tố phiên mã. Các biến thể của c.413G>A và c.561G>C nằm trong các axit amin ở vị trí 138 và 187,

thuộc cấu trúc của homeodomain protein. Các biến thể thay đổi sự sắp xếp axit amin trong homeodomain, đây là một miền quan trọng vì nó liên kết trực tiếp với DNA cụ thể. Một số nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng các đột biến sai nghĩa trong homeodomain có thể gây ra thông liên nhĩ thứ phát và các rối loạn dẫn truyền [24].



Hình 2. Các biến thể đột biến trên gen NKX2-5 [22]

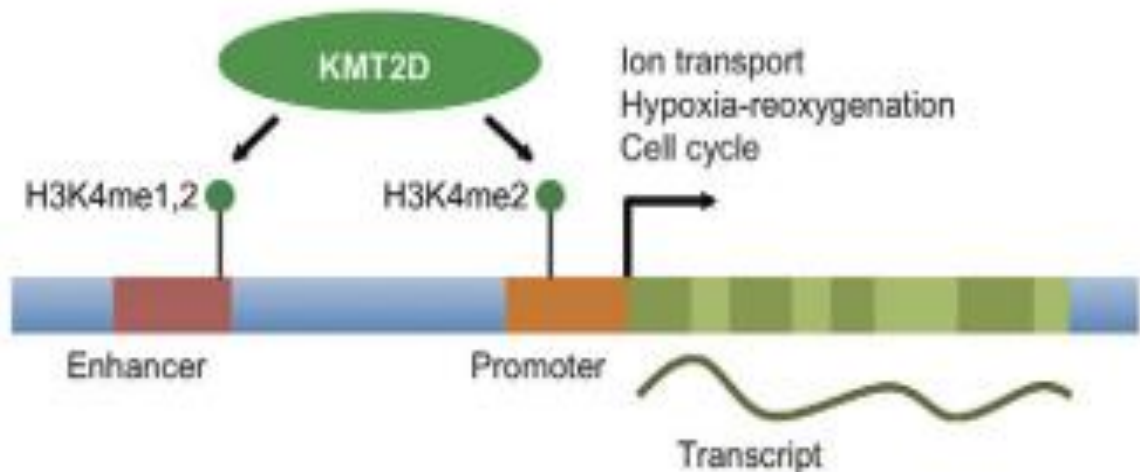
Gen *KMT2D*

KMT2D nằm trên nhiễm sắc thể số 12, gen này đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong quá trình phôi thai, chức năng của gen *KMT2D* ảnh hưởng trực tiếp tới sự hình thành tim, cấu trúc sọ mặt và các cơ quan khác. Gen *KMT2D* đóng vai trò điều chỉnh chính của nhiều con đường liên quan đến sự biệt hóa, tăng sinh và apoptosis của tế bào, giải thích những tác động nghiêm trọng của đột biến trên *KMT2D* [25]. Trong quá trình phát triển tim, *KMT2D* điều chỉnh sự phân hóa tế bào kênh nhĩ thất, tạo thành các van nhĩ thất và phần dưới của vách liên nhĩ. Đột biến gen *KMT2D* ảnh hưởng đến khiếm khuyết của vách ngăn cách giữa tâm nhĩ và tâm thất, tạo ra một buồng lớn duy nhất thay vì các ngăn tâm nhĩ và tâm thất riêng biệt. Sự bất thường của van nhĩ thất, dẫn đến chức năng van và khả năng điều hòa lưu lượng máu giữa các buồng tim không bình thường.

Các nghiên cứu tập trung trên mô hình động vật và di truyền học ở người đã chỉ ra rằng việc thiếu protein *KMT2D* chức năng dẫn đến sự phát triển không

hoàn chỉnh của các cấu trúc này, trực tiếp gây ra các bệnh về tim bẩm sinh. Ngoài ra, các tế bào tim dựa vào *KMT2D* để tiếp cận chromatin có thể không biểu hiện đúng các gen phát triển quan trọng như *NOTCH1* và *TBX5*, cũng tham gia vào quá trình hình thành vách ngăn và van tim. *KMT2D* chịu trách nhiệm cho quá trình methyl hóa histone, một quá trình kích hoạt hoặc làm im lặng biểu hiện gen cần thiết cho quá trình hình thành cơ quan. Khi chức năng *KMT2D* bị suy yếu do đột biến, các gen hướng dẫn quá trình hình thành cấu trúc vách ngăn và van tim có thể không được biểu hiện đúng cách. Sự điều hòa không phù hợp này có thể dẫn đến các dị tật về cấu trúc tim như thông liên nhĩ, trong đó có sự tách biệt không hoàn toàn giữa tâm nhĩ và tâm thất, ảnh hưởng đến cả vách ngăn [25].

Ở những người mắc Hội chứng Kabuki, có tới 40-50% có thể biểu hiện dị tật tim bẩm sinh, trong đó thông liên nhĩ thất là một trong những dị tật được quan sát thấy cùng với các dị tật khác như thông liên nhĩ (ASD) và thông liên thất (VSD) [25].

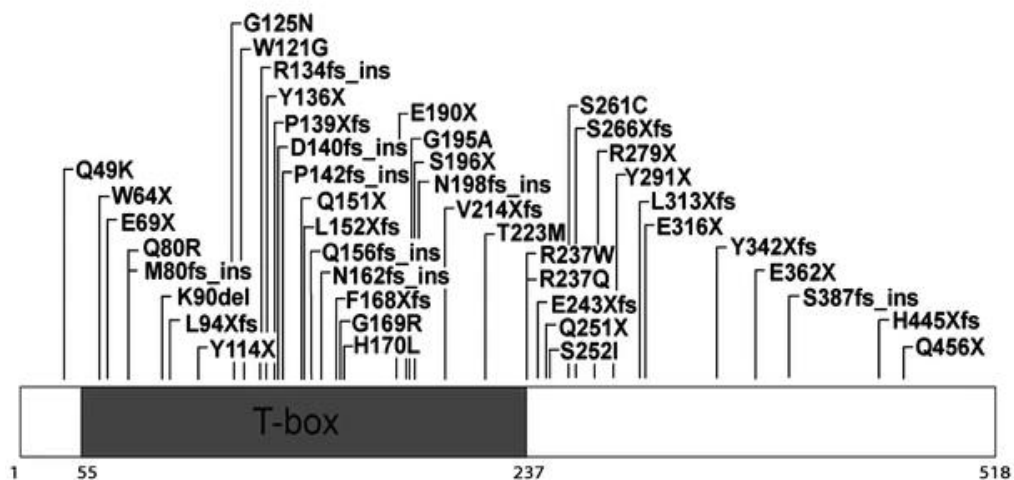


Hình 3. *KMT2D* và quá trình Methyl hóa[23]

Gen *TBX5*

TBX5 là gen nằm trên nhiễm sắc thể số 12, chứa 9 exon và trải dài hơn 47 kb. Có hộp GC, các yếu tố liên kết T-BOX và vị trí liên kết NKX2-5 trong vùng khởi động gen *TBX5* của con người. Gen *TBX5* có khả năng tự điều hòa ở cấp độ phiên mã. Một vùng tăng cường nằm ở khoảng 90 kb trên vùng hạ lưu của gen *TBX5* đã được xác định. MicroRNA (miR-10a và miR-10b) ức chế biểu

hiện gen *TBX5* và làm giảm mức biểu hiện của gen này bằng cách nhắm vào vùng 3' không dịch mã. Trong nghiên cứu của Shui Wang và các cộng sự năm 2019, các biến thể mới trong vùng khởi động gen *TBX5* có chức năng sinh học tác động đến các vị trí liên kết đối với các yếu tố phiên mã. Các cơ chế phân tử để các biến thể này ảnh hưởng đến biểu hiện gen *TBX5* đang được nghiên cứu và làm sáng tỏ thêm. Một số gen mục tiêu và các biến thể liên quan và tương tác với *TBX5* đã được báo cáo. Trong quá trình phát triển tim, *TBX5* điều chỉnh *NKX2-5* ảnh hưởng tới vách ngăn nhĩ và các gen cấu trúc tim. *TBX5* điều hòa biểu hiện gen *SRF* bằng cách liên kết với vùng không dịch mã 3' của nó. Các gen liên quan của *TBX5* bao gồm *GATA4*, *GATA5*, *MEF2C*, *NKX2-5* và các yếu tố phiên mã tim khác, các yếu tố phiên mã này tạo thành một mạng lưới điều hòa tim phức tạp để phối hợp kiểm soát biểu hiện gen tim. Do đó, mức biểu hiện của *TBX5* thay đổi có thể làm gián đoạn mạng lưới điều hòa gen tim, góp phần vào sự phát triển của của nhồi máu cơ tim cấp làm ảnh hưởng đến chức năng tim và ảnh hưởng đến mạch máu và động mạch vành [27].



Hình 4. Các đột biến trên gen *TBX5* gây hội chứng Holt-Oram [27]

Gen *NOTCH2*

Gen *NOTCH2* là một yếu tố thiết yếu trong con đường truyền tín hiệu *NOTCH*, điều chỉnh nhiều quá trình phát triển khác nhau trong phôi. Nằm trên nhiễm sắc thể 1 ở vị trí 1p13.1, *NOTCH2* mã hóa một thụ thể tương tác với các phối tử trên các tế bào lân cận để khởi tạo một loạt các sự kiện nội bào [26]. Cơ chế truyền tín hiệu này rất quan trọng để duy trì các quyết định về số phận tế bào thích hợp trong quá trình hình thành cơ quan, bao gồm cả sự phát triển của

tim. Tín hiệu *NOTCH2* là một phần không thể thiếu trong quá trình phát triển các cấu trúc tim. Nó ảnh hưởng đến sự biệt hóa của các tế bào tiền thân tim thành các tế bào tim trưởng thành và điều chỉnh sự hình thành các cấu trúc quan trọng, chẳng hạn như vách ngăn nhĩ thất và đệm nội tâm mạc, cần thiết cho sự tách biệt buồng tim thích hợp. *NOTCH2* không hoạt động riêng lẻ, nó tương tác với các con đường truyền tín hiệu khác, bao gồm protein hình thái xương (BMP) và tín hiệu Wnt. Những tương tác này giúp điều phối các quá trình phức tạp của sự phát triển tế bào, di chuyển và biệt hóa cần thiết cho tính toàn vẹn của cấu trúc tim. Ví dụ, tín hiệu BMP được biết là thúc đẩy sự phát triển của các tế bào góp phần hình thành đệm nội tâm mạc, trong khi *NOTCH2* đảm bảo rằng các tế bào này phản ứng đúng với tín hiệu BMP.

Đột biến ở gen *NOTCH2* có thể dẫn đến nhiều khuyết tật tim bẩm sinh, bao gồm khuyết tật vách ngăn nhĩ (ASD). Những khuyết tật này xảy ra khi có sự cố trong quá trình hình thành vách ngăn ngăn cách tâm nhĩ trái và phải, dẫn đến liên thông giữa hai buồng. Sự điều hòa không đúng cách của *NOTCH2* có thể phá vỡ sự cân bằng giữa sự tăng sinh và biệt hóa tế bào, dẫn đến sự phân chia vách ngăn không hoàn chỉnh [27].

Một số nghiên cứu đã xác định được các đột biến sai nghĩa và đột biến dịch khung cụ thể trong gen *NOTCH2* làm gián đoạn chức năng bình thường của nó. Những đột biến này có thể can thiệp vào khả năng của thụ thể tham gia vào các con đường truyền tín hiệu điều chỉnh sự phát triển của tim. Một số nghiên cứu đã ghi nhận các biến thể như c.4360C>T (p.R1454C) và c.4346A>G (p.D1449G), được tìm thấy ở những bệnh nhân mắc thông liên nhĩ. Những biến thể này có thể dẫn đến những thay đổi trong cấu trúc protein, ảnh hưởng đến chức năng của nó và dẫn đến các khiếm khuyết về phát triển.

1.3.2 Tình hình nghiên cứu trong nước

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về dịch tễ học về thông liên nhĩ còn hạn chế nhưng đang ngày càng được chú trọng. Các bệnh viện lớn như Bệnh viện Nhi Trung ương và Viện Tim mạch Quốc gia đã tiến hành một số nghiên cứu nhằm xác định tỷ lệ mắc và các yếu tố nguy cơ liên quan đến thông liên nhĩ trong cộng đồng. Kết quả ban đầu cho thấy tỷ lệ mắc thông liên nhĩ tại Việt Nam tương đương với tỷ lệ ở các nước khác trong khu vực. Việt Nam đã ứng dụng thành công các kỹ thuật tiên tiến như siêu âm tim để chẩn đoán sớm thông liên

nhĩ. Nhiều bệnh viện lớn trong nước đã triển khai các chương trình sàng lọc tim bẩm sinh, giúp phát hiện sớm và điều trị kịp thời các trường hợp mắc bệnh. Các trung tâm tim mạch lớn tại Việt Nam, như Viện Tim mạch Quốc gia, đã thực hiện nhiều nghiên cứu về hiệu quả của các phương pháp can thiệp, bao gồm phẫu thuật và sử dụng dụng cụ đóng lỗ thông qua catheter. Những nghiên cứu này đã giúp cải thiện chất lượng điều trị cho bệnh nhân mắc thông liên nhĩ tại Việt Nam. Nước ta cũng đã hợp tác với nhiều tổ chức y tế quốc tế để nghiên cứu và phát triển các phương pháp điều trị thông liên nhĩ. Các chương trình hợp tác này đã giúp nâng cao trình độ chuyên môn của các bác sĩ Việt Nam và cải thiện chất lượng chăm sóc y tế cho bệnh nhân mắc bệnh.

Nghiên cứu của Hồ Xuân Tuấn và các cộng sự năm 2020 là nghiên cứu đầu tiên được tiến hành tại Việt Nam đánh giá tỷ lệ mắc thông liên nhĩ ở những bệnh nhân tim bẩm sinh đã được điều trị bằng phẫu thuật hoặc can thiệp đóng ống thông [28]. Trong nghiên cứu này, phát hiện thấy sự thay đổi về tỷ lệ mắc thông liên nhĩ theo từng năm từ năm 2010 đến năm 2015. Tỷ lệ mắc thông liên nhĩ thấp nhất vào năm 2012 và đạt mức cao nhất vào năm 2014, sau đó có vẻ như lại giảm. Ngoài ra, nghiên cứu cho thấy giới tính và nhóm tuổi có liên quan đến tỷ lệ mắc thông liên nhĩ. Tỷ lệ lưu hành thông liên nhĩ trong số tim bẩm sinh ở các quốc gia Đông Nam Á khác đã được báo cáo. Tỷ lệ mắc thông liên nhĩ trong nghiên cứu dao động từ 15,0% đến 31,9% trong sáu năm, vì vậy những kết quả này phù hợp với tỷ lệ mắc bệnh được tìm thấy ở các quốc gia Đông Nam Á khác [26]. Tuy nhiên, chúng cao hơn một chút so với tỷ lệ mắc thông liên nhĩ trên toàn thế giới ở bệnh nhân tim bẩm sinh, ước tính là 15,4% [26]. Hiện tại không có nghiên cứu nào về các vấn đề di truyền ảnh hưởng đến nguy cơ mắc tim bẩm sinh tại Việt Nam. Do đó, cần thực hiện một nghiên cứu trong tương lai về vấn đề này để hiểu rõ hơn về những biến động liên quan đến tim bẩm sinh bao gồm cả thông liên nhĩ.

1.4 Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới

Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới (Next-generation sequencing - NGS) là một công nghệ tiên tiến cho phép giải mã toàn bộ hoặc một phần lớn bộ gen với tốc độ nhanh và độ chính xác cao. Công nghệ này đã cách mạng hóa lĩnh vực y học cá nhân hóa điều trị, đặc biệt trong việc phát hiện sớm các bệnh di truyền, bao gồm bệnh tim bẩm sinh như thông liên nhĩ. Giải trình tự gen thế

hệ mới hoạt động bằng cách phân tích hàng triệu đoạn DNA nhỏ song song, sau đó ghép các đoạn này lại để tạo thành một trình tự DNA hoàn chỉnh. Quá trình này giúp phát hiện ra các đột biến gen và các biến thể di truyền có thể gây ra hoặc liên quan đến bệnh. Ứng dụng giải trình tự gen thế hệ mới trong phát hiện sớm bệnh cho phép phát hiện các đột biến hoặc biến thể trong các gen như *NKX2-5*, *GATA4*, *TBX5*, và *MYH6* liên quan đến sự phát triển của thông liên nhĩ. Những đột biến này có thể không được phát hiện bằng các phương pháp truyền thống, nhưng với công nghệ này việc phát hiện trở nên khả thi ngay từ giai đoạn phôi thai. Giải trình tự gen thế hệ mới được ứng dụng rộng rãi trong sàng lọc trước sinh để phát hiện các dị tật tim bẩm sinh, bao gồm cả thông liên nhĩ [29].

Giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequencing - WGS) và giải trình tự hệ gen mã hóa (Whole Exome Sequencing - WES) có thể được sử dụng để phân tích toàn bộ gen hoặc chỉ phần exome (phần mã hóa protein của gen), giúp xác định các đột biến hiếm gặp liên quan đến thông liên nhĩ [30], [31]. WGS và WES đều đã chứng minh được hiệu quả trong việc phát hiện những đột biến gây bệnh, mở ra cơ hội cho các can thiệp y học cá nhân hóa.

Lợi ích của áp dụng giải trình tự gen thế hệ mới như cung cấp khả năng chẩn đoán chính xác hơn so với các phương pháp truyền thống, cho phép phát hiện các biến thể di truyền phức tạp mà có thể bị bỏ sót. Điều này rất quan trọng trong việc xác định nguyên nhân di truyền của thông liên nhĩ và định hướng điều trị. Tiết kiệm thời gian và chi phí, so với các phương pháp giải trình tự gen trước đây, công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới nhanh hơn và chi phí thấp hơn khi áp dụng trên quy mô lớn. Điều này giúp mở rộng khả năng tiếp cận công nghệ này cho nhiều bệnh nhân hơn, đặc biệt là trong các chương trình sàng lọc cộng đồng. Dự phòng và quản lý bệnh, phát hiện sớm các đột biến gen liên quan đến thông liên nhĩ bằng giải trình tự gen thế hệ mới có thể giúp lập kế hoạch dự phòng và quản lý bệnh từ sớm, giảm thiểu các biến chứng nghiêm trọng và cải thiện chất lượng cuộc sống của bệnh nhân.

PHẦN 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân mắc bệnh thông liên nhĩ được chẩn đoán và thu thập tại Trung tâm tim mạch, Bệnh viện tim Hà Nội, các bệnh nhân đều tự nguyện cung cấp đầy đủ thông tin để phục vụ quá trình nghiên cứu.

Thông tin bệnh nhân tham gia nghiên cứu được mã hóa theo ký hiệu sau: HN48, HN51 và HN56.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc bệnh thông liên nhĩ dựa trên kết quả mô bệnh học theo tiêu chuẩn của hiệp hội tim mạch Hoa Kỳ [32].

Mục tiêu nghiên cứu được cung cấp đầy đủ đến người tham gia nghiên cứu tự nguyện theo đúng quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của tổ chức trong nước và trên thế giới.

Nghiên cứu này được sự đồng ý từ gia đình bệnh nhân và đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Viện Nghiên cứu hệ gen thông qua theo quyết định số 02-2012/QĐ-HĐĐĐ ngày 29 tháng 10 năm 2021.

Bệnh nhân và các thành viên trong gia đình tham gia nghiên cứu được lấy 2 ml máu toàn phần. Mẫu máu được bảo quản trong ống chống đông EDTA ở nhiệt độ -20°C .

2.1.2 Hóa chất và thiết bị

Hóa chất

- Kit tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Đức)
- Bộ kit tạo thư viện giải trình tự gen thế hệ mới Kit Agilent SureSelect Target Enrichment (Agilent, Mỹ)
- Nhóm hóa chất dùng cho phản ứng PCR: Master Mix (Thermo Fisher ScientificTM), Marker DNA 1kb (Thermo Fisher ScientificTM), Agarose (Merk, Mỹ).

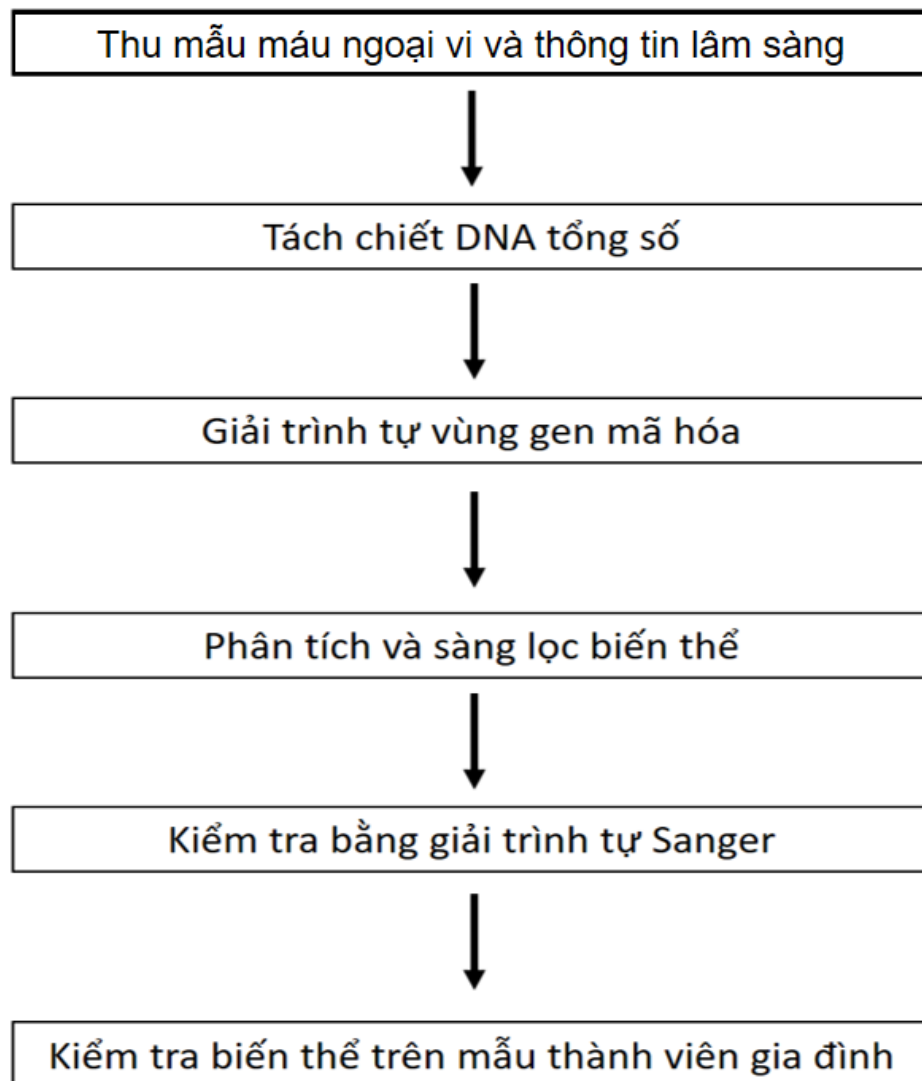
Thiết bị

- Máy giải trình tự gen thế hệ mới NextSeq 500 (Illumina, Mỹ)

- Máy giải trình tự ABI3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)
- Máy ly tâm (Eppendorf, Đức)
- Máy soi gel và chụp ảnh DigiDoc-It® Imaging System (Ultra-violet production, Mỹ)
- Máy PCR (Eppendorf, Đức)
- Máy đo huỳnh quang Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện quy trình ở Hình 5:



Hình 5. Quy trình nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu bao gồm các bước sau: thu thập mẫu máu của bệnh nhân, tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu của bệnh nhân sau khi thu nhận, giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa, phân tích số liệu thu được và sàng lọc ra các biến thể đột biến có khả năng gây bệnh, kiểm chứng lại kết quả thu được bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

Phương pháp thu mẫu

Phương pháp thu mẫu máu từ tĩnh mạch là phương pháp phổ biến nhất và được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu phân tích gen và các xét nghiệm di truyền. Mẫu máu này thường được thu thập trong các ống nghiệm chứa chất bảo quản để đảm bảo chất lượng DNA.

Quy trình thu mẫu:

- Dụng cụ: Kim tiêm, ống nghiệm chứa chất chống đông (EDTA, heparin) hoặc chất bảo quản DNA (ví dụ, Acid citrate dextrose - ACD).
- Vị trí lấy mẫu: Mẫu máu thường được lấy từ tĩnh mạch của cánh tay (thường là tĩnh mạch ở khuỷu tay).
- Cách thực hiện: Sau khi sát khuẩn vùng tiêm, kim tiêm được đưa vào tĩnh mạch để lấy mẫu máu. Lượng máu cần thiết có thể thay đổi tùy theo mục đích nghiên cứu, nhưng thường dao động từ 3 đến 10 mL.
- Bảo quản mẫu: Máu lấy ra thường được chuyển ngay vào các ống nghiệm chứa chất chống đông (thường là EDTA hoặc heparin) để ngăn ngừa máu đông lại. Sau khi thu thập, mẫu máu cần được bảo quản trong điều kiện lạnh (4°C) nếu chưa thể tách DNA ngay lập tức.

Tách chiết DNA tổng số

DNA của bệnh nhân và thành viên gia đình được tách chiết từ mẫu máu bằng kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Đức) theo quy trình như sau:

Bước 1: Cho 20µl proteinase K vào mỗi ống eppendorf.

Bước 2: Bổ sung 200µl mẫu máu.

Bước 3: Thêm 200µl AL, rồi vortex và ly tâm nhẹ.

Bước 5: Ủ ở 56°C, và lắc 400 vòng/phút (từ 30 phút – 45 phút).

Bước 6: Cho mẫu sau khi ủ và lắc lên cột rồi ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút.

Bước 7: Bổ sung 500µl AW₁ rồi tiếp tục ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút.

Bước 8: Cho thêm 500µl AW₂ rồi ly tâm ở 14000 vòng/phút trong 3 phút.

Bước 9: Mẫu sau khi ly tâm sẽ tiếp tục ly tâm khan ở 14000 vòng/phút trong 1 phút để lượng DNA còn trong ống kết tủa.

Bước 10: Hòa tan lượng DNA đã kết tủa bằng 200µl AE và bảo quản mẫu ở nhiệt độ -20°C.

DNA tổng số được điện di kiểm tra chất lượng trên gel agarose 1% và đo quang phổ để xác định nồng độ và độ tinh sạch, mẫu DNA sau đó sẽ được bảo quản ở -20°C.

Tạo thư viện và Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa

Thư viện DNA được tạo bằng bộ kit Sureselect Target Enrichment (Aligent). Quá trình giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của bệnh nhân được thực hiện trên máy Illumina của hãng Illumina (Hoa Kỳ).

Các bước thực hiện như sau:

- Bước 1: Phân tích dữ liệu giải trình tự để xác định biến đổi di truyền.
- Bước 2: Tạo thư viện bằng SureSelect All Exon V6. DNA tổng số sau khi được phân mảnh, lai và tinh sạch bằng SureSelect All Exon V6 để gắn được tất cả các exome đã biết theo hướng dẫn của nhà sản xuất Illumina.
- Bước 3: Giải trình tự thế hệ mới Illumina.

Lưu ý:

- Lượng DNA tối thiểu: 1 µg (tối ưu 1-3 µg).
- Nồng độ DNA: Tối thiểu 50 ng/µl.
- Độ tinh sạch: Tỷ lệ $A260/A280 = 1.8-2.0$, $A260/A230 > 2.0$.

Thư viện lai exome sau khi được xử lý, được tiến hành giải trình tự trên máy giải trình tự thế hệ mới Illumina. Kiểm định chất lượng đọc ban đầu bằng phần mềm FastQC.

2.2.1 Xác định và sàng lọc biến thể liên quan đến bệnh thông liên nhi

Xác định và chú giải biến thể

Dữ liệu trình tự được sắp xếp và so sánh với trình tự hệ gen tham chiếu Hg19 bằng phần mềm BWA 0.7.10 [33]. Công cụ Picard được sử dụng để xử lý dữ liệu sau khi giống hàng. Phần mềm Genome Analysis Toolkit v3.4 được sử dụng để phát hiện các biến thể [34]. Ảnh hưởng của biến thể được xác định

bằng phần mềm SnpEff v4.1 [35]. Đây là công cụ chú thích và dự báo ảnh hưởng của các biến thể gen (như thay đổi axit amin). Dữ liệu đầu vào của công cụ này là các biến thể được dự đoán (SNPs, chèn, xóa và MNPs), là kết quả của giải trình tự, và có định dạng VCF (Variant Call Format).

Mức độ ảnh hưởng của các biến thể đến protein và khả năng gây hại sẽ được đánh giá bằng các phần mềm Sift [36], Polyphen2 [37], Mutation Taster [38].

Sàng lọc các biến thể liên quan đến bệnh thông liên nhi

Các biến thể liên quan đến bệnh thông liên nhi được sàng lọc theo các tiêu chí:

- Các biến thể nằm trên gen đã được công bố là liên quan đến bệnh thông liên nhi.
- Biến thể có tần số alen MAF thấp hơn 1%. Tần số alen MAF được dựa trên bộ cơ sở dữ liệu 1000 hệ gen người (1000 GenomesProject).
- Lọc các biến thể dự đoán là có ảnh hưởng đến chức năng của protein.
- Những đột biến được báo cáo là lành tính trên cơ sở dữ liệu ClinVar bị loại bỏ.
- Các đột biến dạng synonymous, đa hình bị loại bỏ.
- Biến thể được các phần mềm Sift, Polyphen2 và Mutation Taster đánh giá là “gây bệnh” hoặc “có thể gây bệnh”.

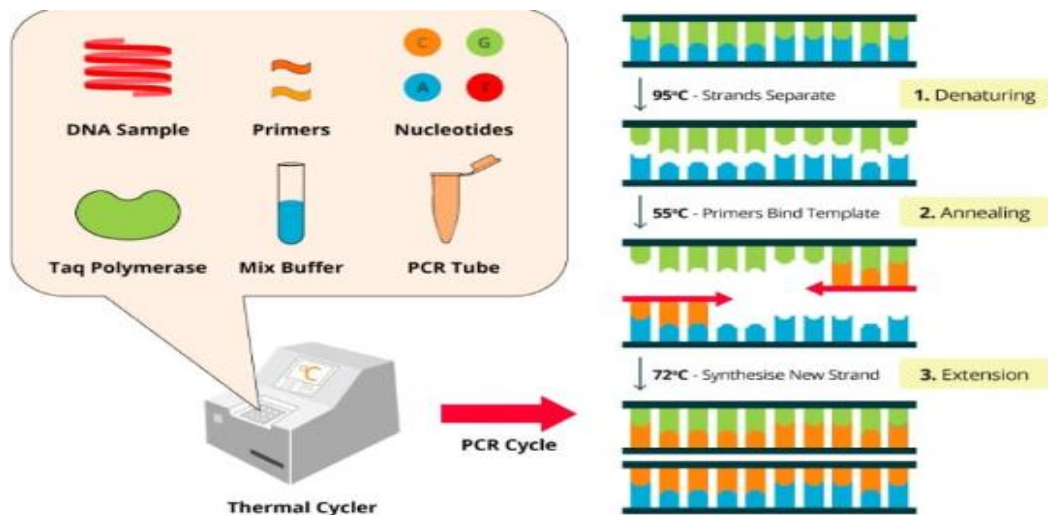
Các đột biến thêm bộ ba mã hóa kết thúc dẫn đến cắt ngắn protein, mất bộ ba mã hóa kết thúc dẫn đến kéo dài protein, thêm và mất nucleotide dẫn đến dịch khung protein và thay đổi vị trí trượt gen có ảnh hưởng lớn đến chức năng của protein được lựa chọn. Các đột biến sai nghĩa được đánh giá sơ bộ khả năng gây hại đến chức năng protein qua chỉ số SIFT và PolyPhen-2 hoặc phần mềm Mutation Taster. Chỉ số SIFT < 0,05 được gọi là “gây bệnh” và ngược lại. Đối với chỉ số PolyPhen-2 gần với mức 1 thì coi là “gây bệnh”. Các đột biến có điểm đánh giá PolyPhen-2 trong khoảng 0,957 đến 1 được cho là có gây bệnh (Dprobably damaging); thang điểm trong khoảng 0,453 - 0,956 là có thể gây bệnh (P – possibly damaging) và các đột biến có điểm đánh giá trong khoảng 0 - 0,452 là lành tính (B – benign) [33].

2.2.2 Kiểm chứng đột biến bằng giải trình tự Sanger

Các đột biến tiềm năng gây bệnh được kiểm chứng bằng phương pháp giải trình tự Sanger trên cả bệnh nhân và gia đình nhằm xây dựng phả hệ và nghiên cứu cơ chế di truyền của bệnh.

Khuếch đại đoạn gen chứa đột biến bằng phản ứng PCR

Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) là một kỹ thuật khuếch đại acid nucleic, được sử dụng để biến tính và cải tạo các đoạn ngắn của chuỗi acid deoxyribonucleic (DNA) hoặc acid ribonucleic (RNA) bằng cách sử dụng TaqDNA polymerase. Phản ứng PCR hoạt động dựa trên nguyên lý sau: tổng hợp DNA dựa trên mạch khuôn là một trình tự DNA ban đầu, sau đó khuếch đại số lượng bản sao của mạch khuôn này thành hàng triệu bản sao thông qua hoạt động của enzyme polymerase và một cặp mồi đặc hiệu cho đoạn DNA này. Phản ứng PCR bao gồm nhiều chu kỳ và các chu kỳ được lặp lại liên tiếp nhau.



Hình 6. Phản ứng PCR

Đoạn mồi sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen mang biến thể gây bệnh được thiết kế trên phần mềm Primer Blast dựa trên các tiêu chí sau. [39]

- Độ dài: từ 15-30 bp.
- Nhiệt độ gắn mồi từ 50-65°C. Nhiệt độ gắn mồi của mồi xuôi và mồi ngược không được chênh lệch quá 5°C.
- Tỷ lệ GC nằm trong khoảng 50-60%.

Cặp mồi khuếch đại gen được thiết kế bằng công cụ Primer-Blast.

Đoạn gen *KTM2D* có kích thước 604 bp chứa đột biến c.12566G>C, được khuếch đại bằng cặp mồi dưới đây:

- Mồi xuôi: CTTTGGCTCTTGAGGGCTGG.
- Mồi ngược: GCAGCTAGGCAGTGGATCAT

Đoạn gen *NOTCH2* có kích thước 418 bp chứa đột biến c.137A>G, được khuếch đại bằng cặp mồi dưới đây:

- Mồi xuôi: CTGGCATCCACATCCTTCCA
- Mồi ngược: GTTTTGGGATGGGCTTCTGT

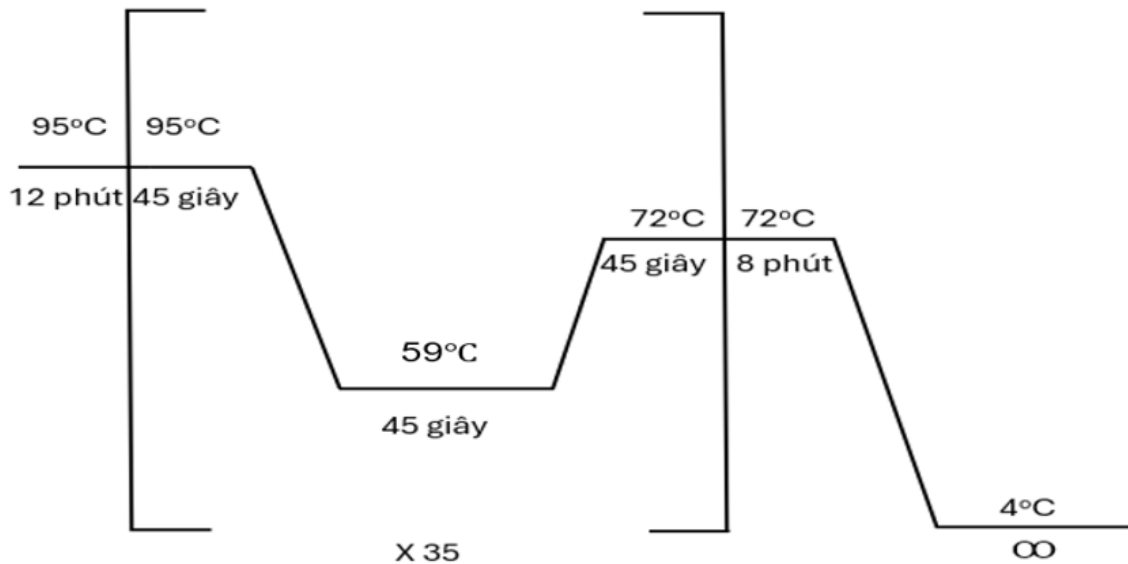
Thành phần phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen chứa đột biến được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Thành phần phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen

Thành phần	Thể tích
dH ₂ O	7 μ l
Master Mix	10 μ l
Mồi xuôi	1 μ l
Mồi ngược	1 μ l
DNA	1 μ l
Tổng	20μl

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được dùng để khuếch đại đoạn gen *KTM2D* và *NOTCH2*:

- Giai đoạn 1: biến tính, tháo xoắn DNA ở 95°C trong 12 phút.
- Giai đoạn 2: khuếch đại DNA qua 3 bước: biến tính DNA ở 95°C trong 45 giây, sau đó gắn mồi ở 59°C trong 45 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 45 giây. Lặp lại các bước theo thứ tự này 35 lần.
- Giai đoạn 3: tổng hợp chuỗi DNA mới ở 72°C trong 8 phút, sau đó mẫu được bảo quản ở 4°C.



Hình 7. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen *KTM2D* và *NOTCH2*

Giải trình tự Sanger mẫu bệnh nhân và thành viên trong gia đình

Đoạn gen mang đột biến gây bệnh ở bệnh nhân và thành viên trong gia đình bệnh nhân sẽ được kiểm chứng bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

Phương pháp giải trình tự Sanger được ra đời bởi sự nghiên cứu của Frederick Sanger và các đồng nghiệp năm 1970. Cơ chế hoạt động của phương pháp này được dựa trên việc sao chép DNA trong một phản ứng PCR nhỏ, với việc sử dụng ddNTPs (dideoxyribonucleotides) không thể tiếp tục tiến hành chuỗi, cùng với đó là dNTPs thông thường. Khi một ddNTP được thêm vào chuỗi, sẽ xảy ra hiện tượng ddNTP đó ngăn chặn quá trình sao chép tiếp theo. Tiếp đó, các đoạn DNA khác nhau với độ dài khác nhau được tạo ra và phân tách bằng phương pháp gel electrophoresis dựa trên kích thước của đoạn này. Và đích đến của phương pháp này là một chuỗi các đoạn DNA có độ dài khác nhau, từ đó cho phép việc xác định được chuỗi nucleotide của DNA gốc.

Trình tự các đoạn gen chứa đột biến được xác định bằng máy giải trình tự ABI 3500 sử dụng bộ kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

Phương pháp giải trình tự Sanger bao gồm 6 bước:

- DNA sợi kép (dsDNA) được biến tính thành DNA hai sợi đơn (ssDNA).
- Một đoạn mồi tương ứng với một đầu của dây được gắn vào.
- Bốn dung dịch polymerase có bốn loại dNTP nhưng chỉ có một loại ddNTP được thêm vào.

- Phản ứng tổng hợp DNA bắt đầu và chuỗi kéo dài cho đến khi một nucleotide kết thúc được kết hợp ngẫu nhiên.
- Các đoạn DNA tạo thành được biến tính thành ssDNA.
- Các mảnh biến tính được phân tách bằng điện di trên gel và trình tự được xác định.

2.2.3 Điện di trên gel agarose

Trong nghiên cứu này, DNA tổng số sau khi tách chiết và đoạn gen chứa đột biến sau khi khuếch đại sẽ được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose. Quy trình này được thực hiện với các bước chính như sau:

Chuẩn bị gel agarose

- Hòa tan 1g agarose trong 100 ml dung dịch TAE 1X.
- Làm nóng dung dịch trong lò vi sóng khoảng 1-2 phút cho đến khi dung dịch trong suốt và gel được tan hoàn toàn.
- Để nguội dung dịch khoảng 50°C rồi đổ dung dịch vào khay điện di đã gắn sẵn lược.
- Đợi gel đông hoàn toàn trong khoảng 20-30 phút, gỡ lược ra rồi đặt bản gel vào bể điện di. Thêm dung dịch TAE 1X cho đến khi dung dịch ngập bề mặt gel khoảng 1-2 mm.

Tra mẫu DNA

- Sử dụng 3-5µl DNA trộn đều với 1-3µl đệm màu loading dye và tra vào các giếng trong bản gel.
- Sử dụng marker 1 kb để làm thang DNA chuẩn.
- Điện di bản gel ở hiệu điện thế 100 vol trong 30 phút. Trong quá trình này, DNA sẽ di chuyển từ cực âm sang cực dương. Quan sát sự di chuyển của màu bromophenol blue để biết khi nào dừng điện di.

Nhuộm bản gel điện di bằng EtBr

- Lấy bản gel ra khỏi khuôn và ngâm vào trong dung dịch Ethidium Bromide nồng độ 2 µl/mL trong khoảng từ 5-10 phút.
- Sau khi đã ngâm xong bản gel sẽ được đem đi rửa trong nước sạch từ 3-5 phút.

- Sau đó, chụp ảnh bản gel dưới tác động của tia tử ngoại của máy soi chụp gel (Bio -Rad).

PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thu thập mẫu

Thu thập mẫu máu của 3 bệnh nhân (HN48, HN51, HN56) và các thành viên trong gia đình bao gồm bố và mẹ.

Bảng 2. Thông tin bệnh nhân và các thành viên trong gia đình

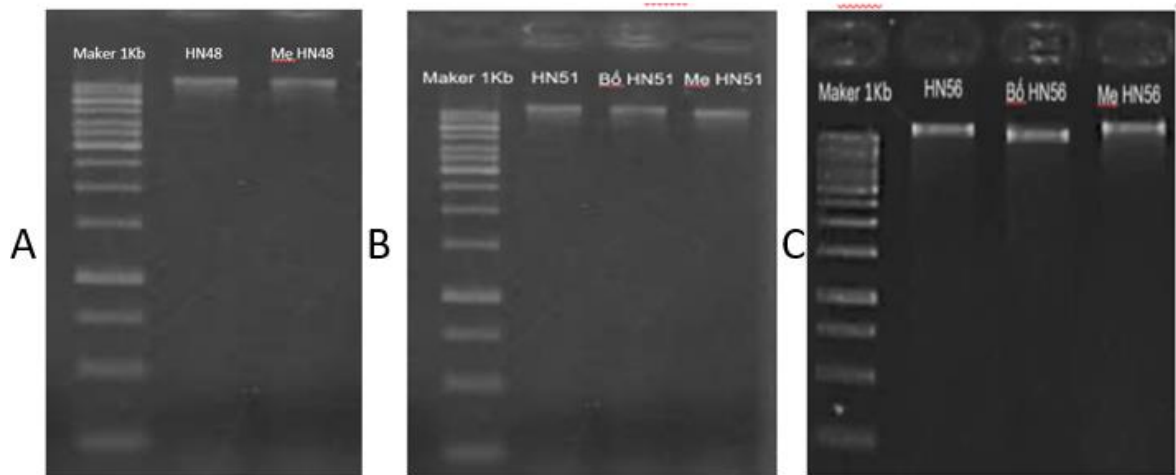
STT	Họ tên bệnh nhân (Kí hiệu)	Họ và tên bố mẹ bệnh nhân	Giới tính/Năm sinh bệnh nhân	Thời điểm lấy mẫu (năm)
1	Lê Bá P (HN48)	Mẹ: Đặng Thị M	Nam/2020	2022
2	Trịnh Phương V (HN51)	Bố: Trịnh Minh Q Mẹ: Vũ Thị Anh T	Nữ/2020	2022
3	Hoàng Bảo A (HN56)	Bố: Hoàng Kỳ T Mẹ: Trịnh Thị Tuyết N	Nữ/2018	2022

Bố mẹ của bệnh nhân đều bình thường, bệnh nhân được chẩn đoán mắc thông liên nhĩ. Mỗi bệnh nhân và thành viên trong gia đình được lấy 2 ml máu toàn phần và được bảo quản trong ống chống đông EDTA ở nhiệt độ -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Do yếu tố khách quan về hoàn cảnh gia đình bệnh nhân HN48 nên chưa thu thập được mẫu máu của bố bệnh nhân HN48.

3.2 Tách chiết DNA tổng số

Mẫu máu của 3 bệnh nhân và mẫu bố mẹ sẽ được tiến hành tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Mini kit. Sản phẩm DNA tổng số của các mẫu được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di được thể hiện ở Hình 8.



Hình 8. Điện di đồ DNA tách chiết từ bệnh nhân (A) HN48, (B) HN51, (C) HN56 và bố mẹ bệnh nhân

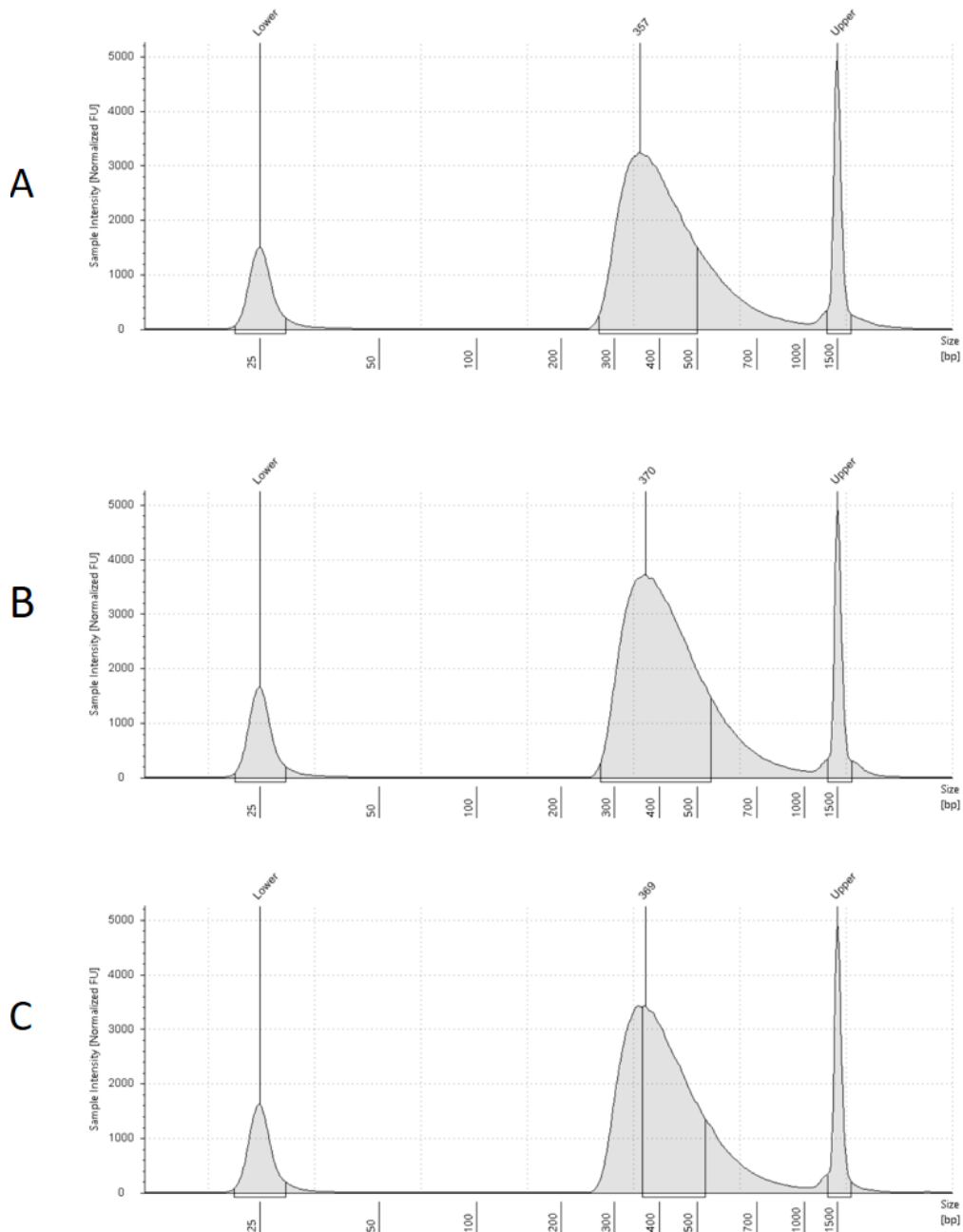
Hình ảnh trên điện di cho thấy DNA tổng số tách từ mẫu máu bệnh nhân và các thành viên trong gia đình có chất lượng tốt, nồng độ DNA từ khoảng 20-30 ng/ μ l, hiện băng rõ ràng, không bị đứt gãy và không lẫn tạp chất. DNA tổng số được lưu giữ và bảo quản trong ở nhiệt độ -20° C. Sau khi tiến hành điện di kiểm tra, mẫu DNA tổng số được đo OD ở bước sóng 260 nm và 280 nm để xác định nồng độ DNA và kiểm tra độ tinh sạch. Kết quả cho thấy mẫu DNA tổng số có tỷ số A_{260} nm/ A_{280} nm nằm trong khoảng 1,8 – 2,0 chứng tỏ các mẫu DNA này có độ tinh sạch cao đủ điều kiện để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 3. Kết quả đo nồng độ DNA và độ tinh sạch

Mẫu	Nồng độ (ng/ μ l)	A_{260}/A_{280}
HN48	22,47	1,90
Mẹ HN48	23,34	1,95
HN51	20,15	1,87
Bố HN51	21,85	1,90
Mẹ HN51	22,21	1,89
HN56	24,2	1,88
Bố HN56	21,65	1,91
Mẹ HN56	23,12	1,93

3.3 Tạo thư viện và giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa

Thư viện DNA được tạo bằng kit SureSelect All Exon V6 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để kiểm tra kích thước của mảnh PCR khuếch đại, chúng tôi kiểm tra sự phân bố kích thước mẫu bằng cách chạy mẫu trên máy Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer sử dụng một chip DNA 1000. Thư viện DNA tạo ra có kích thước 357 bp đối với bệnh nhân HN48, 370 bp đối với bệnh nhân HN51 và 369 bp đối với bệnh nhân HN56 (Hình 9).



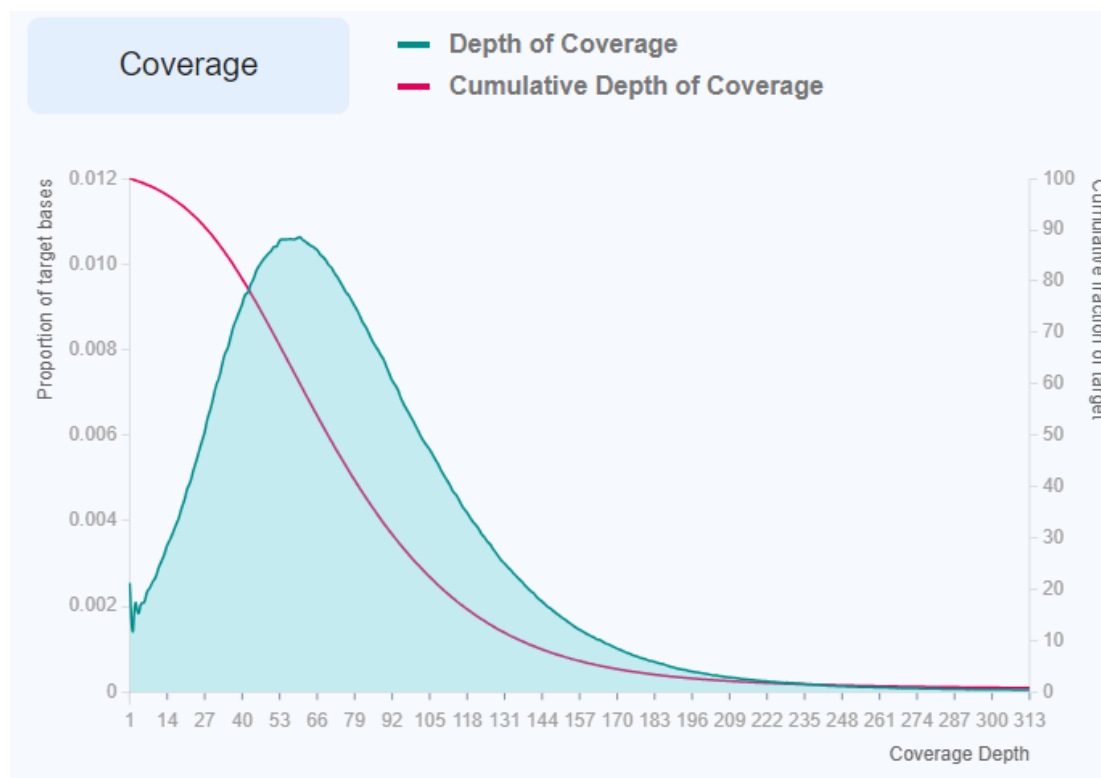
Hình 9: Kết quả tạo thư viện của 3 bệnh nhân (A) HN48, (B) HN51, (C) HN56

Kết quả kiểm định chất lượng đọc trình tự bằng phần mềm FastQC cho thấy mẫu thu được có số lượng trình tự đọc lớn và kết quả như Bảng 4.

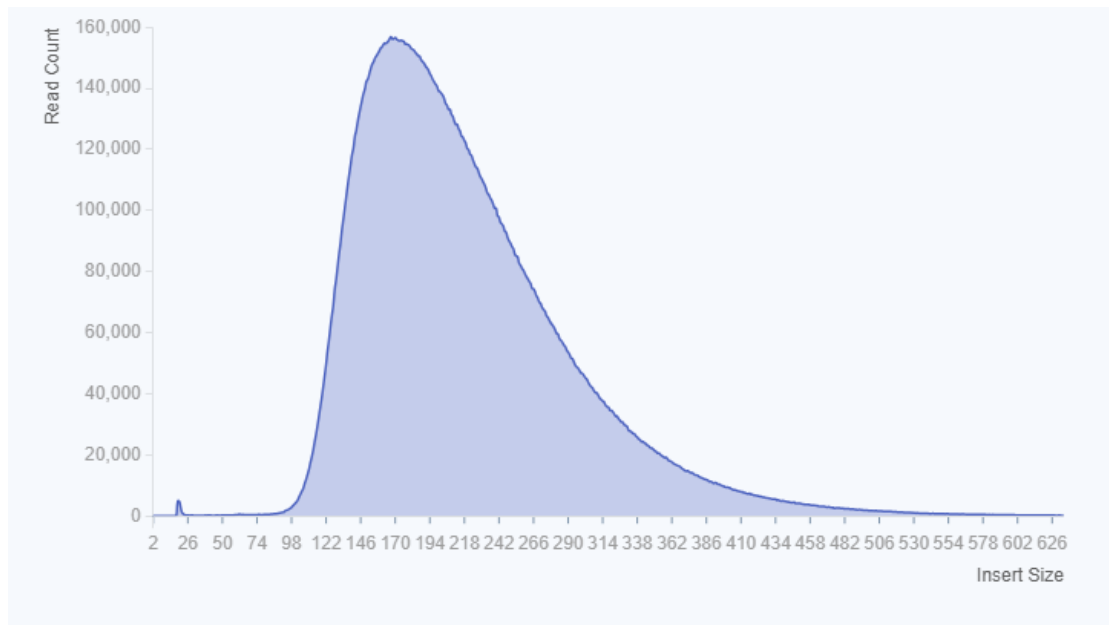
Bảng 4. Kết quả chất lượng đọc trình tự

	HN48	HN51	HN56
Tổng số Nucleotide	7,502,631,602	6,692,458,014	6,707,894,442
Tổng số đoạn trình tự	49,686,302	44,320,914	44,423,142
Tỉ lệ GC (%)	49,6	49,6	49,5
Q20 (%)	97,2	97,1	97,3
Q30 (%)	92,7	92,6	92,8

Giải trình tự vùng gen mã hóa của bệnh nhân HN48 thu được 49,684,274 đoạn đọc. Trung vị độ sâu bao phủ vùng quan tâm của các mẫu là 149X. Tỷ lệ phần trăm với độ sâu bao phủ lớn hơn 20X của các mẫu là 94,1%. Tỉ lệ nucleotide có điểm chất lượng trên 30 (Q30) là 92,7% và trên 20 (Q20) là 97,2% (Hình 10, Hình 11).

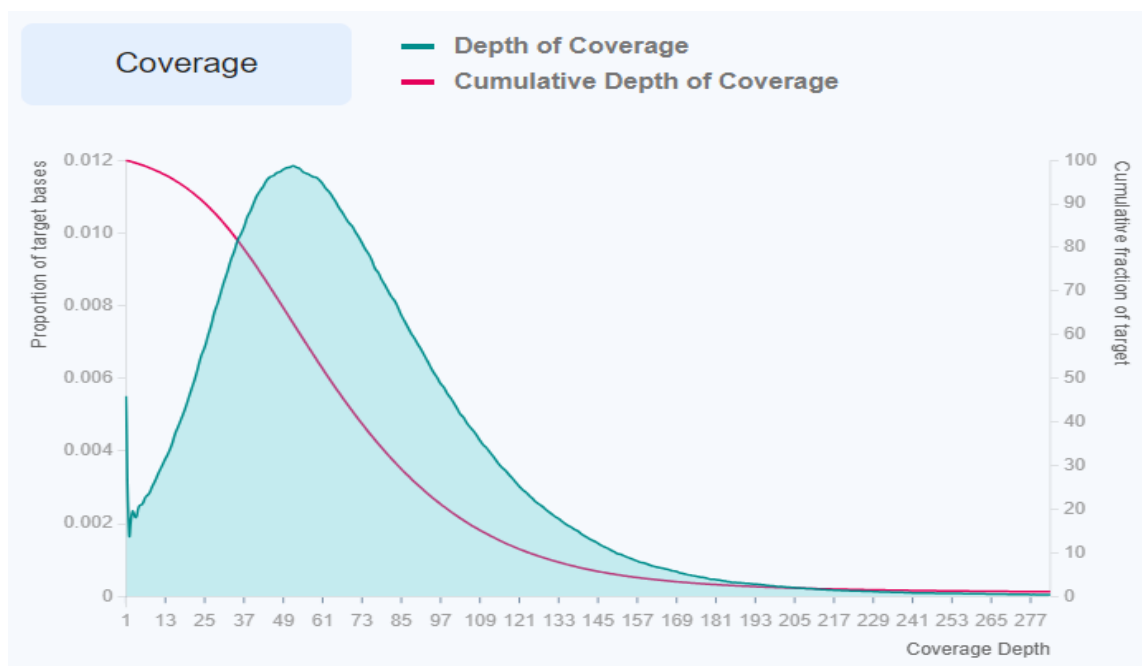


Hình 10. Khoảng bao phủ giải trình tự vùng mã hóa của bệnh nhân HN48

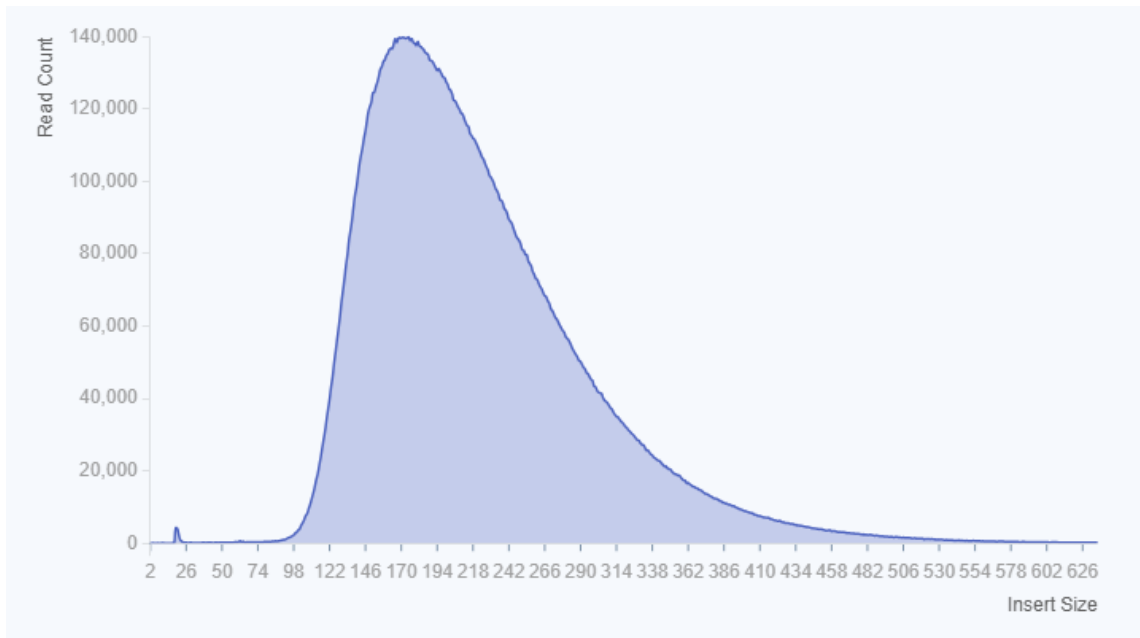


Hình 11. Tỷ lệ kích thước đoạn đọc và số lượng đoạn WES đọc của bệnh nhân HN48

Đối với bệnh nhân HN51 thu được 44,320,914 đoạn đọc trình tự. Trung vị độ sâu bao phủ vùng quan tâm của các mẫu là 134X. Tỷ lệ phần trăm với độ sâu bao phủ lớn hơn 20X của các mẫu là 92,7%. Tỷ lệ nucleotide có điểm chất lượng trên 30 (Q30) là 92,6% và trên 20 (Q20) là 97,1% (Hình 12, Hình 13).

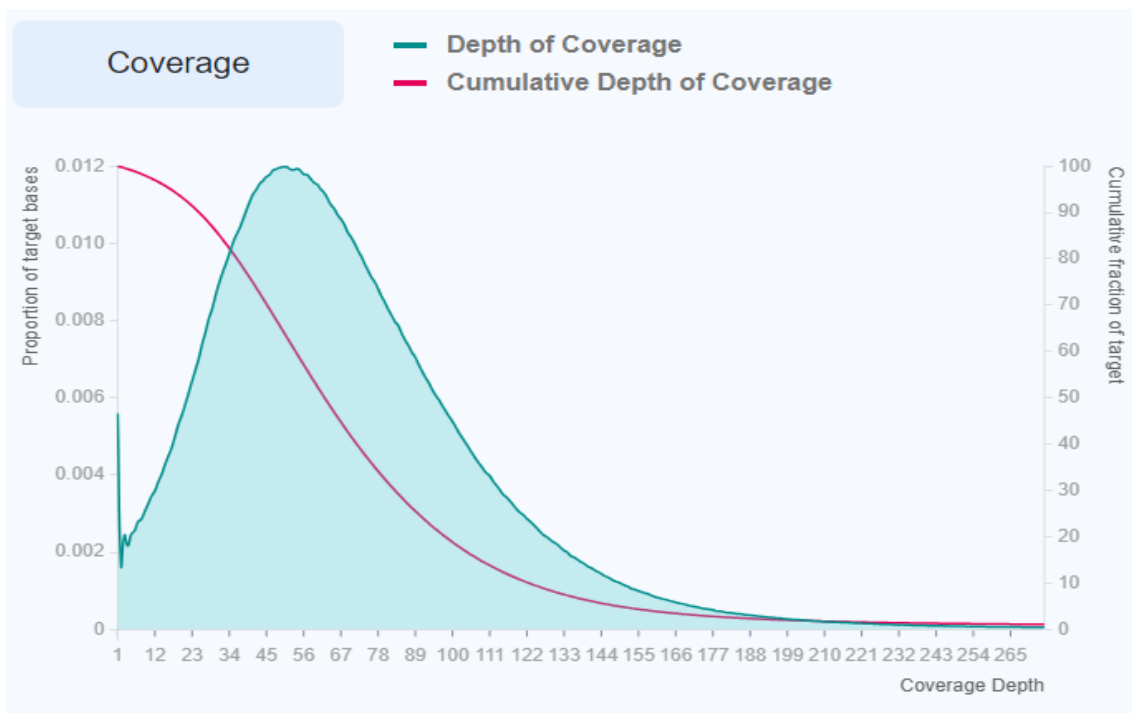


Hình 12. Khoảng bao phủ giải trình tự vùng mã hóa của bệnh nhân HN51

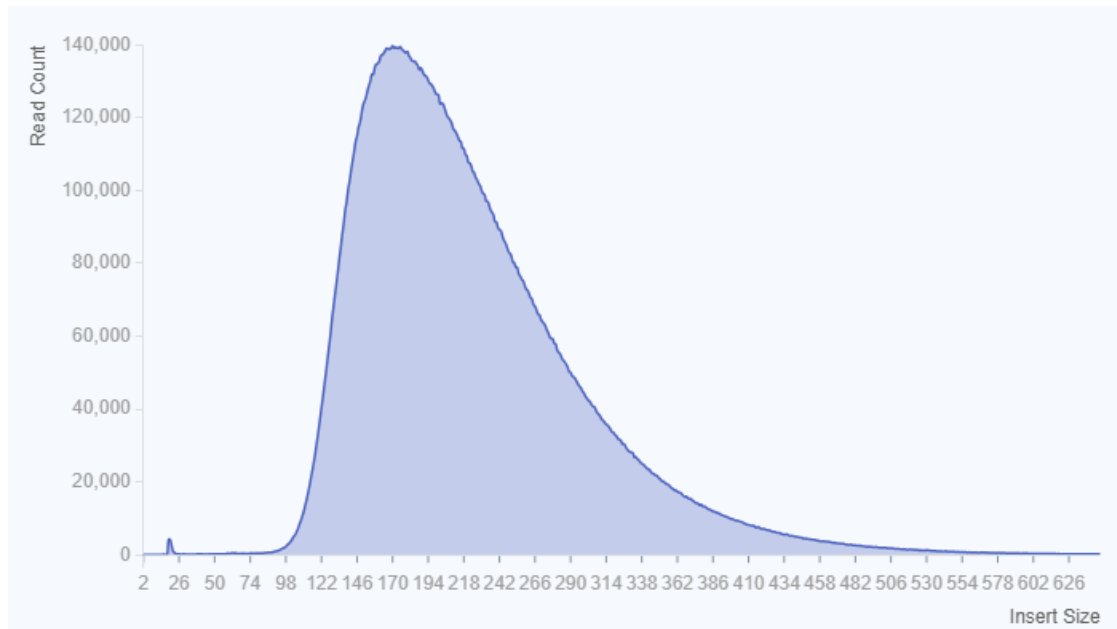


Hình 13. Tỷ lệ kích thước đoạn đọc và số lượng đoạn WES đọc của bệnh nhân HN51

Bệnh nhân HN56 thu được 44,423,142 đoạn đọc. Trung vị độ sâu bao phủ vùng quan tâm của các mẫu là 134X. Tỷ lệ phần trăm với độ sâu bao phủ lớn hơn 20X của các mẫu là 92,6%. Tỷ lệ nucleotide có điểm chất lượng trên 30 (Q30) là 92,8% và trên 20 (Q20) là 97,3% (Hình 14, Hình 15).



Hình 14. Khoảng bao phủ giải trình tự vùng mã hóa của bệnh nhân HN56



Hình 15. Tỷ lệ kích thước đoạn đọc và số lượng đoạn WES đọc của bệnh nhân HN56

Các kết quả đó cho thấy các đoạn trình tự thu được là đáng tin cậy với tỉ lệ Q20 và Q30 đều trên 90%. Các kết quả trên cho thấy các trình tự thu được là đáng tin cậy.

3.4 Xác định và sàng lọc biến thể

Dữ liệu giải trình tự sau đó sẽ được giống hàng với hệ gen tham chiếu Hg19 để xác định được các biến thể bằng công cụ BWA và Picard. Kết quả như Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả giống hàng dữ liệu của bệnh nhân với hệ gen tham chiếu

	HN48	HN51	HN56
Số đoạn trình tự giống hàng (%)	99,8	99,8	99,8
Số đoạn trình tự giống hàng sau khi loại bỏ trùng lặp (%)	92,9	94	94
Số đoạn trình tự được đối chiếu vào vùng gen quan tâm (%)	70,9	70,5	69,5

Sau khi phân tích, một số lượng lớn các biến thể trên hệ gen của bệnh nhân được phát hiện trong dữ liệu giải trình tự WES. Các biến thể được chia thành các nhóm theo mức độ ảnh hưởng chức năng như: biến thể đồng nghĩa, biến thể sai nghĩa, biến thể dịch khung, ... Kết quả xác định số lượng các biến thể như (Bảng 6).

Bảng 6. Kết quả xác định số lượng các biến thể của từng loại đột biến

	HN48	HN51	HN56
Tổng SNP	82,407	82,350	82,283
Biến thể đồng nghĩa	12,155	12,225	12,207
Biến thể sai nghĩa	11,747	11,728	11,787
Thêm bộ mã hóa kết thúc	116	114	118
Mất bộ ba mã kết thúc	49	41	40
Tổng số biến thể Indel	11,202	10,719	10,790
Biến thể dịch khung	375	355	349
Thêm bộ ba mã hóa	192	199	193
Mất bộ ba mã hóa	215	222	221
Đã được báo cáo trên dbSNP151 (%)	99	99	99

Kết quả xác định số lượng biến thể của 3 bệnh nhân HN48, HN51 và HN56 đã xác định được tổng số hơn 80 nghìn biến thể, trong đó có hơn 12

ngàn biến thể đồng nghĩa, 11 ngàn biến thể sai nghĩa, từ 40 đến 400 biến thể thêm bộ mã hóa kết thúc, mất bộ ba mã kết thúc, biến thể dịch khung, thêm bộ ba mã hóa, mất bộ ba mã hóa và 99% các biến thể được báo cáo trên dbSNP151.

Các biến thể tiếp tục được đánh giá và sàng lọc để sàng lọc các gen liên quan tới bệnh thông liên nhĩ.

Sau khi đánh giá và sàng lọc các gen của liên quan tới bệnh đã xác định được 50 gen liên quan đến bệnh thông liên nhĩ được phân tích và sàng lọc theo các tiêu chí đã nêu ở phần phương pháp (Bảng 7).

Bảng 7. Các gen liên quan tới bệnh thông liên nhĩ

Chromosome	Gen liên quan tới thông liên nhĩ
Chr 1	<i>NOTCH2, RIT1, USH2A,</i>
Chr 2	<i>SOS1, LBX2, ZEB2, CCDC141</i>
Chr 3	<i>CRELD1, RAF1, SCAP</i>
Chr 4	<i>EVC2, EVC, PITX2, TLL1</i>
Chr 5	<i>HAND1, NKX2-5</i>
Chr 7	<i>WIP12, DNAH11, TBX20, SEMA3E, BRAF</i>
Chr 8	<i>GATA4, CHD7</i>
Chr 9	<i>NOTCH1</i>
Chr 10	<i>MMP21, SHOC2, HRAS</i>
Chr 11	<i>MYBPC3, DHCR7, CBL</i>
Chr 12	<i>KRAS, SMC02, KMT2D, PTPN11, TBX5</i>
Chr 14	<i>MYH6, MYH7, BMP4</i>
Chr 15	<i>ACTC1, TPM1, MAP2K1, STRA6</i>
Chr 16	<i>SRCAP</i>
Chr 17	<i>MYH3, NF1</i>
Chr 18	<i>GATA6</i>
Chr 19	<i>MAP2K2</i>

Chr 20	<i>JAG1</i>
Chr 22	<i>TBX1</i>
Chr X	<i>KDM6A</i>

Biến thể đã được báo cáo là lành tính trên cơ sở dữ liệu ClinVar được loại bỏ. Các biến thể trong các gen liên quan đến bệnh thông liên nhĩ, có tần số alen thấp <1% trong cơ sở dữ liệu 1000Genomes được trình bày ở Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả sàng lọc biến thể trong gen liên quan đến bệnh thông liên nhĩ của bệnh nhân HN51, HN56 và HN48

ST T	Gen (Bệnh nhân)	Di truyền	Ảnh hưởng	Exon	Thay đổi DNA	Thay đổi protein
1	<i>NOTCH2</i> (HN56)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	2/34	c.137A>G	p.Asn46Ser
2	<i>NOTCH2</i> (HN56)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	2/34	c.112G>A	p.Glu38Lys
3	<i>NOTCH2</i> (HN56)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	1/34	c.57C>G	p.Cys19Trp
4	<i>USH2A</i> (HN56)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	58/7 2	c.11233T>C	p.Tyr3745 His

5	<i>MYH3</i> (HN56)	Dị hợp tử	Dịch khung	7/41	c.605_606in sCCCTCCT GGCCCC GGCGGAG GCCCAGG CCCAGGC ATCAGCC CTAACAC TCCCTTCT TGCCAGC AGGAGTT CTGTTACG AGATCAA GCA	p.Gly203fs
6	<i>NF1</i> (HN56)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	17/5 8	c.1933A>G	p.Met645Val
7	<i>NOTCH2</i> (HN48)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	28/3 4	c.5065A>T	p.Ile1689Phe
8	<i>EVC2</i> (HN48)	Dị hợp tử	Sai Nghĩa	10/2 2	c.1168C>T	p.Arg390Trp
9	<i>KMT2D</i> (HN48)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	39/5 4	c.12566G>C	p.Gly4189Ala
10	<i>NOTCH2</i> (HN51)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	28/3 4	c.5065A>T	p.Ile1689.Phe
11	<i>DNAH11</i> (HN51)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	57/8 2	c.9449G>A	p.Arg3150Gln
12	<i>MAP2K2</i> (HN51)	Dị hợp tử	Sai nghĩa	7/11	c.893C>T	p.Pro298Leu

Tất cả các đột biến trên được đánh giá bằng các phần mềm tin sinh như: Mutation Taster, SIFT, Polyphen2, ClinVar nhằm xác định mức độ gây bệnh. Kết quả được trình bày ở Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả đánh giá đột biến trên phần mềm tin sinh

STT	Gen (Bệnh nhân)	Thay đổi DNA	Polyphen-2	Mutation Taster	SIFT	ClinVar
1	<i>NOTCH2</i> (HN56)	c.137A>G	D 0,713	D 0,86	D 0	D
2	<i>NOTCH2</i> (HN56)	c.112G>A	B 0,001	B 0	B 0,99	B
3	<i>NOTCH2</i> (HN56)	c.57C>G	B 0,001	B 0	D 0,001	B
4	<i>USH2A</i> (HN56)	c.11233T >C	D 0,99	B 0,001	NA	NA
5	<i>MYH3</i> (HN56)	c.137A>G	B 0,0012	B 0	B 0,98	B
6	<i>NF1</i> (HN56)	c.1933A> G	B 0,001	D 0,99	B 0,99	B
7	<i>NOTCH2</i> (HN48)	c.5065A> T	NA	D 0,99	B 0,99	B
8	<i>EVC2</i> (HN48)	c.1168C> T	D 0,99	NA	D 0,97	NA
9	<i>KMT2D</i> (HN48)	c.12566G >C	D 0,998	D 0,99	D 0	D

10	<i>NOTCH2</i> (HN51)	c.5065A> T	NA	D 0,99	B 0,99	B
11	<i>DNAH11</i> (HN51)	c.9449G> A	NA	D 1	B 0.98	NA
12	<i>MAP2K2</i> (HN51)	c.893C>T	NA	D 1	D 0	B

B: Benign – lành tính; D: Deleterious – Gây bệnh

NA: Chưa có báo cáo

Dựa trên kết quả phân tích, các đột biến *NOTCH2* c.5065A>T, *DNAH11* c.9449G>A, *MAP2K2* c.893C>T được đánh giá là lành tính và chưa có thông tin trên các công cụ tin sinh như Polyphen-2, MutationTaster, SIFT hay ClinVar. Nên chưa xác định được nguyên nhân gây bệnh thông liên nhĩ của bệnh nhân HN51.

Đột biến *NOTCH2* c.137A>G được xác định là nguyên nhân gây bệnh thông liên nhĩ ở bệnh nhân HN56 (Hình 16) và được lựa chọn để giải trình tự Sanger. Đột biến này đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNP với mã số rs141882865 và được cơ sở dữ liệu ClinVar đánh giá là gây bệnh (Pathogenic).

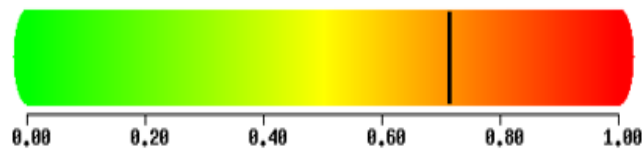
Prediction disease causing

Summary

- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr1:120612104A>CN/A show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	NOTCH2
Ensembl transcript ID	ENST00000256646
Genbank transcript ID	NM_024408

This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of 0.713 (sensitivity: 0.86; specificity: 0.92)



Hình 16. Kết quả đánh giá gây bệnh của đột biến *NOTCH2*

Đột biến *NOTCH2* c.137A>G được phần mềm tin sinh MutationTaster đánh giá là gây bệnh (disease causing) và phần mềm Polyphen đánh giá là gây bệnh (Possibly Damaging).

Đột biến *KMT2D* c.12566G>C cũng được xác định là nguyên nhân gây bệnh thông liên nhi ở bệnh nhân HN48 (Hình 17) và được lựa chọn để giải trình tự Sanger. Đột biến này đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNP với mã số rs532360713 và được cơ sở dữ liệu ClinVar đánh giá là gây bệnh.

Prediction

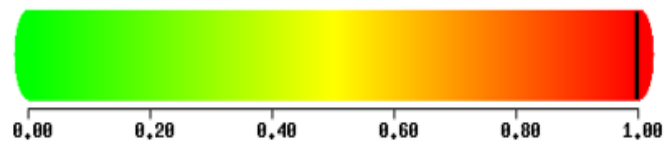
disease causing

Summary

- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr12:49425922C>GN/A show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	KMT2D
Ensembl transcript ID	ENST00000301067
Genbank transcript ID	NM_003482

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **0.998** (sensitivity: **0.27**; specificity: **0.99**)



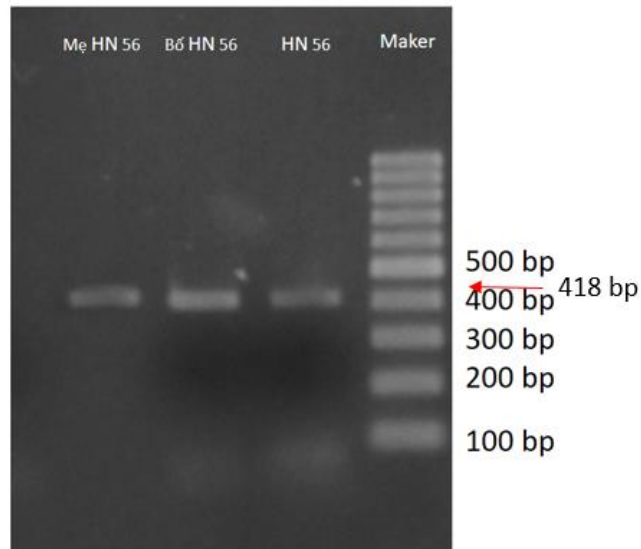
Hình 17. Kết quả đánh giá gây bệnh của đột biến *KMT2D*

Đột biến *KMT2D* c.12566G>C được phần mềm tin sinh MutationTaster đánh giá là gây bệnh (disease causing) và phần mềm Polyphen đánh giá là gây bệnh (Possibly Damaging).

3.5. Kết quả kiểm chứng biến thể

3.5.1 Kết quả kiểm chứng biến thể trên bệnh nhân HN56

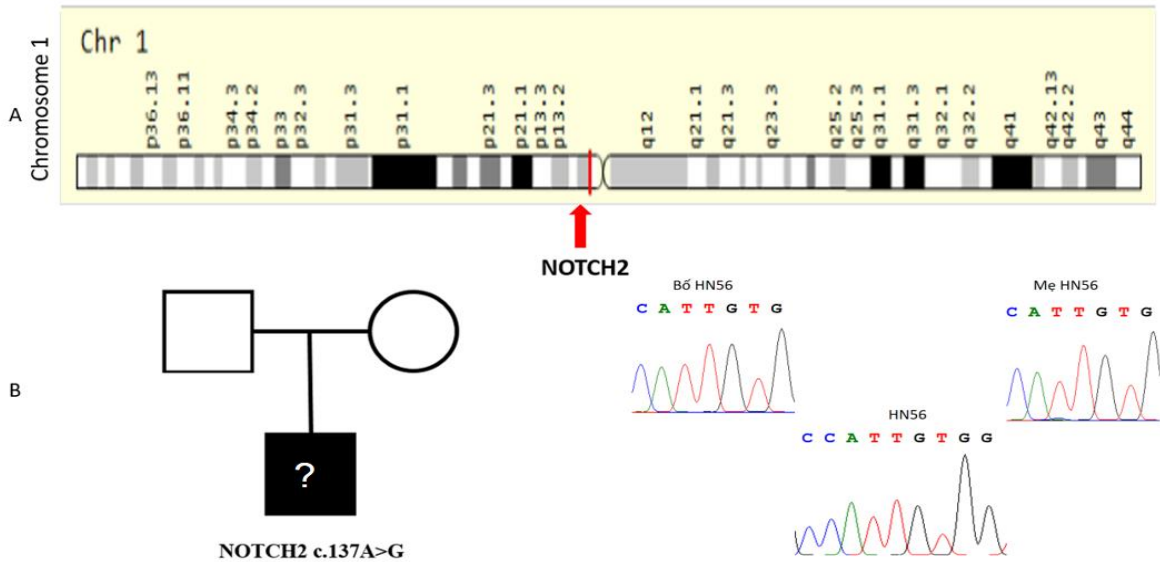
Sau khi sàng lọc và xác định, đoạn gen mang các biến thể *NOTCH2* trên bệnh nhân HN56 được khuếch đại bằng phương pháp PCR và kết quả được đánh giá bằng hình ảnh điện di. Các đoạn gen có kích thước 418 bp chứa đột biến c.137A>G trên gen *NOTCH2* được khuếch đại đặc hiệu bằng phản ứng PCR. Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR không có băng phụ, kích thước sản phẩm phù hợp với thiết kế ban đầu (Hình 18).



Hình 18. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen NOTCH2 của bệnh nhân HN56 chứa đột biến

Sản phẩm PCR của bệnh nhân HN56 và gia đình là 418 bp đúng với chiều dài của thiết kế ban đầu. Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *NOTCH2* có chứa đột biến ở cả bệnh nhân và các thành viên trong gia đình được giải trình tự Sanger nhằm xác định cơ chế di truyền của đột biến.

Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy bệnh nhân không mang đột biến c.137A>G trên gen *NOTCH2*. Bố và mẹ bệnh nhân không mang đột biến gây bệnh. Kết quả giải trình tự Sanger kiểu gen của bố mẹ giống với kiểu gen của bệnh nhân. Vì vậy chưa xác định được nguyên nhân gây bệnh và không xác định được nguyên nhân gây bệnh liên quan tới di truyền từ bố và mẹ (Hình 19).



Hình 19. Phân tích di truyền đột biến ở bệnh nhân và gia đình. (A) Gen *NOTCH2* nằm ở vị trí 1p12 trên cánh tay ngắn của nhiễm sắc thể số 1. (B) Sơ đồ phả hệ và trình tự đột biến c.137A>G (p.Asn46Ser) trong gia đình bệnh nhân.

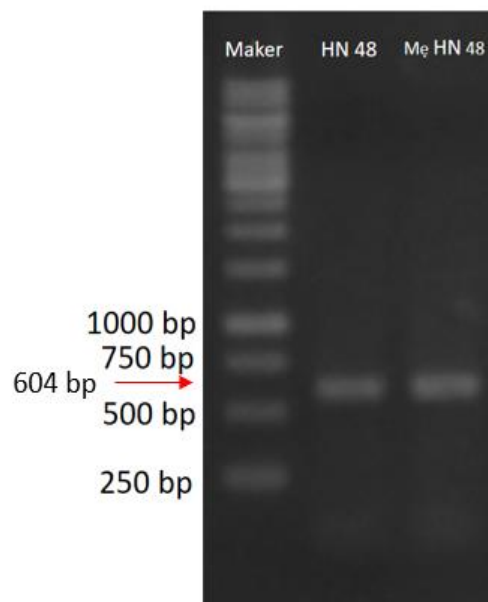
Kết quả phân tích ảnh hưởng của đột biến c.137A>G (p.Asn46Ser) trên gen *NOTCH2* tới khả năng gây bệnh bằng công cụ SIFT cho thấy đột biến có ảnh hưởng lớn tới chức năng của protein với điểm SIFT là 0. Đột biến này được dự đoán bởi phần mềm Mutation Taster là gây bệnh với điểm 0.86 và phần mềm Polyphen2 đánh giá đây là đột biến gây bệnh với mức điểm là 0.713. Đột biến p.Asn46Ser có thể sẽ ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein.

Người bình thường (<i>Human</i>)	CVNEGMC VTYHNGTGYCKCPEGFL
Người đột biến (<i>Mutated</i>)	CVNEGMC VTYHSGTGYCKCPEGF
Khỉ vàng (<i>Mmulatta</i>)	CVNEGMC VTYHNGTGYCKCPEGF
Chuột (<i>Mmusculus</i>)	CVNEGTC VTYHNGTGFCRCPEGF
Gà (<i>Ggallus</i>)	CVNEGKC IPYQNGTGYCKCREGY
Cá nóc (<i>Trubripes</i>)	CANRGIC TLLPFDKYKCECARGW
Cá (<i>Drerio</i>)	CVN-GTC VISSNGTHYCRCPGF

Hình 20. Kết quả giống hàng đoạn trình tự axit amin protein *NOTCH2* của các loài khác nhau

3.5.2 Kết quả kiểm chứng biến thể trên bệnh nhân HN48

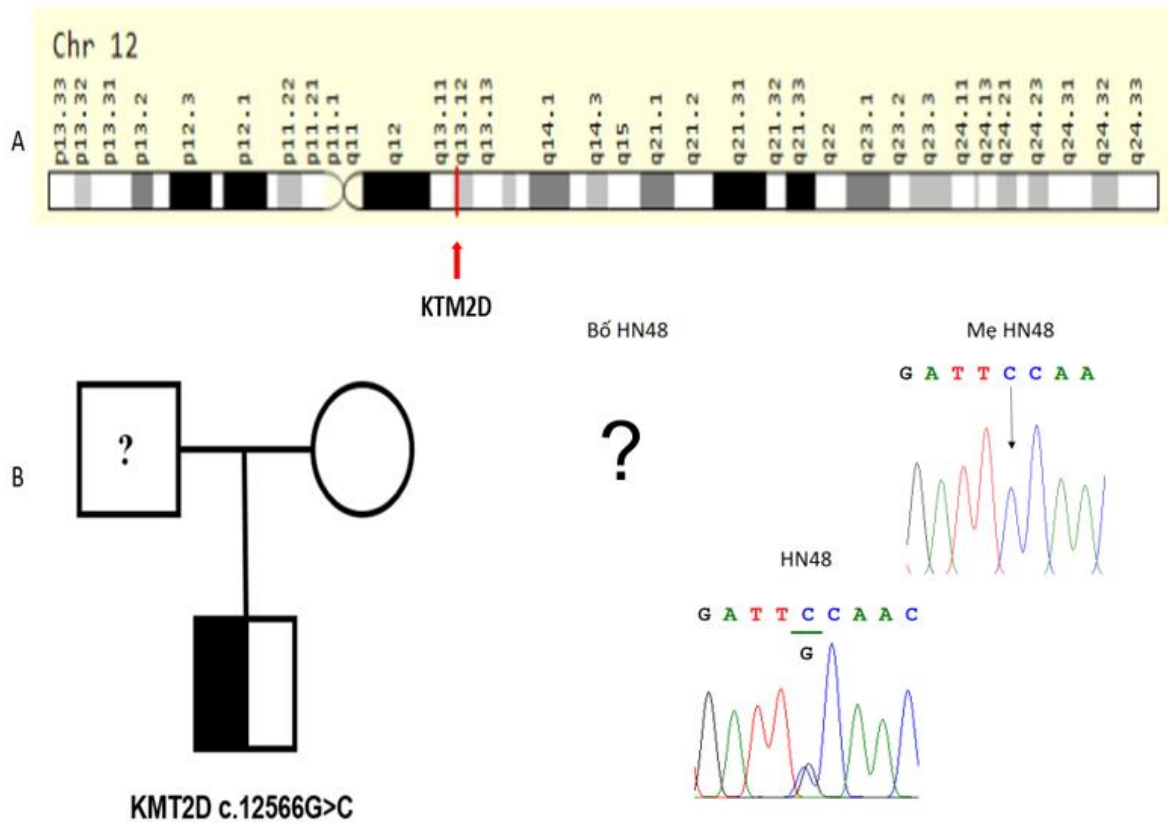
Kết quả sàng lọc và xác định đoạn gen mang các biến thể trên gen *KMT2D* của bệnh nhân HN48 được khuếch đại bằng phương pháp PCR và kết quả được đánh giá bằng hình ảnh điện di. Các đoạn gen có kích thước 604 bp chứa đột biến c.12566G>C trên gen *KMT2D* được khuếch đại đặc hiệu bằng phản ứng PCR. Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR không có băng phụ, kích thước sản phẩm phù hợp với thiết kế ban đầu (Hình 21).



Hình 21. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *KMT2D* của bệnh nhân HN48 chứa đột biến

Sản phẩm PCR của mẫu bệnh nhân HN48 và gia đình có độ dài 604 bp đúng với chiều dài của thiết kế ban đầu.

Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *KMT2D* có chứa đột biến ở cả bệnh nhân và các thành viên trong gia đình được giải trình tự Sanger nhằm xác định cơ chế di truyền của đột biến. Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy bệnh nhân HN48 mang kiểu gen dị hợp tử, mẹ bệnh nhân không mang đột biến gây bệnh. Do đó, bệnh nhân có thể mang đột biến *de novo*, không được di truyền biến thể này từ bố mẹ. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, chúng tôi không thu được mẫu của người bố để phân tích nên chưa thể khẳng định chính xác về di truyền của biến thể này (Hình 22).



Hình 22. Phân tích di truyền đột biến ở bệnh nhân và gia đình. (A) Gen *KMT2D* nằm ở vị trí 12q13.12 trên cánh tay dài của nhiễm sắc thể số 12. (B) Sơ đồ phả hệ và trình tự đột biến c.12566G>C (p.Gly4189Ala) trong gia đình bệnh nhân.

Ảnh hưởng của đột biến c.12566G>C (p.Gly4189Ala) trên gen *KMT2D* tới khả năng gây bệnh được đánh giá bằng công cụ SIFT cho thấy đây là loại đột biến có ảnh hưởng lớn tới chức năng của protein với điểm SIFT là 0. Đột biến này được dự đoán bởi phần mềm Mutation Taster là gây bệnh với điểm 0.99 và phần mềm Polyphen2 đánh giá đây là đột biến gây bệnh với mức điểm là 0.998. Với việc amino acid Glycine có tính bảo tồn cao giữa các loài, vì vậy, đột biến p.Gly4189Ala có thể sẽ ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein (Hình 23).

Người bình thường (<i>Human</i>)	VLQSGQGL	PGV	GIMPTVGQLRAQL
Người đột biến (<i>Mutated</i>)	VLQSGQGL	PGV	AIMPTVGQLRAQ
Chuột (<i>Mmusculus</i>)	APQSGQGP	PGA	GVMPTVGQLRAQ
Cá nóc (<i>Trubripes</i>)	QHQQQAM	MGIIRAQQQGIT	
Ếch (<i>Xtropicalis</i>)	EHSTGTQV	AGC	GAVQS

Hình 23. Kết quả giống hàng đoạn trình tự axit amin protein *KMT2D* của các loài khác nhau

3.6. Thảo luận

Bệnh nhân HN48 có các triệu chứng của bệnh thông liên nhĩ như mệt mỏi, khó thở, nhịp tim không đều, bị phù nề ở chân và vùng bụng được chuẩn đoán là mắc bệnh thông liên nhĩ. Để xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh thông liên nhĩ trên bệnh nhân, chúng tôi tiến hành giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa ở bệnh nhân HN48. Kết quả cho thấy một biến thể sai nghĩa c.12566G>C (p.Gly4189Ala) trên gen *KMT2D* có tiềm năng gây bệnh được tìm thấy ở bệnh nhân HN48. Đối với bệnh nhân HN48 có thể đây là đột biến de novo hoặc có thể là đột biến di truyền từ bố. Tuy nhiên trong nghiên cứu này của chúng tôi chưa thu thập được mẫu của bố do yếu tố khách quan, nên chưa thể xác định chính xác con đường di truyền của biến thể này.

Biến thể c.12566G>C (p.Gly4189Ala) trên gen *KMT2D* là đột biến thay thế nucleotide Guanine thành nucleotide Cytosine ở vị trí số 12566 trên cDNA làm thay đổi amino acid thứ 4189 được mã hóa từ Glycine thành Alanine. Glycine là một loại acid amin nhỏ, linh hoạt, thường đóng vai trò quan trọng trong cấu trúc protein, đặc biệt là trong việc duy trì tính linh hoạt của một số vùng nhất định. Việc thay thế nó bằng Alanine, một loại acid amin lớn hơn và kém linh hoạt hơn, có thể làm rối loạn cấu trúc hoặc chức năng của protein. *KMT2D* là một Histone Methyltransferase tham gia vào việc điều chỉnh biểu hiện gen bằng cách sửa đổi cấu trúc chromatin. Sự gián đoạn trong miền này có thể làm suy yếu quá trình methyl hóa histone H3 tại lysine 4 (H3K4), dẫn đến điều hòa không đúng cách biểu hiện gen [40].

Bệnh nhân HN51 được chuẩn đoán là mắc bệnh thông liên nhĩ, tuy nhiên các biến thể liên quan tới bệnh thông liên nhĩ trên bệnh nhân HN51 đều được đánh giá lành tính và không gây bệnh. Vì vậy nguyên nhân mắc thông liên nhĩ của bệnh nhân HN51 có thể do yếu tố môi trường hoặc đột biến mất đoạn lớn

mà giải trình tự vùng mã hóa (WES) không phát hiện được. Giải trình tự vùng mã hóa chỉ giải trình tự các exon, tức là phần mã hóa protein trong gen. Tuy nhiên, việc phát hiện các mất đoạn lớn (từ vài kilobase trở lên) có thể gặp khó khăn trong phương pháp WES, đặc biệt là khi những mất đoạn này không ảnh hưởng trực tiếp đến các vùng exon mà được đặt trong các vùng không mã hóa hoặc các vùng không được giải trình tự đầy đủ trong quá trình WES [41].

Bệnh nhân HN56, kết quả giải trình tự vùng gen mã hóa (WES) có mang biến thể c.137A>G (p.Asn46Ser) trên gen *NOTCH2*. Tuy nhiên kiểm chứng lại bằng giải trình tự Sanger bệnh nhân HN56 và các thành viên trong gia đình không mang biến thể c.137A>G trên gen *NOTCH2*. Nguyên nhân của kết quả này có thể do *NOTCH2* có gen giả là một loại DNA mà có sự tương đồng với các gen mã hóa protein nhưng không có khả năng mã hóa cho protein chức năng hoặc có thể bị bất hoạt do đột biến hoặc thiếu các yếu tố cần thiết để thực hiện chức năng mã hóa. Hoặc sai sót trong quá trình giải trình tự vùng gen mã hóa (WES) và sai sót trong quá phân tích tin sinh liên quan tới bệnh thông liên nhĩ [42].

Bệnh thông liên nhĩ có thể được gây ra bởi sự kết hợp của các yếu tố di truyền và môi trường. Yếu tố di truyền bao gồm các đột biến gen và các hội chứng di truyền có liên quan, trong khi các yếu tố môi trường như bệnh lý của mẹ, thuốc, hút thuốc, uống rượu, hoặc dinh dưỡng kém trong thai kỳ cũng có thể làm tăng nguy cơ. Sự tương tác giữa di truyền và môi trường càng làm phức tạp thêm nguyên nhân gây ra bệnh thông liên nhĩ.

PHẦN 4. KẾT LUẬN

1. Kết luận

Đề tài đã thu thập mẫu máu và hồ sơ 03 bệnh nhân mắc dị tật thông liên nhĩ ở Việt Nam và các thành viên trong gia đình bệnh nhân.

Đề tài đã tách chiết DNA tổng số của bệnh nhân và các thành viên trong gia đình, đồng thời giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của 3 bệnh nhân.

Kết quả phân tích, xác định và sàng lọc biến thể cho thấy bệnh nhân HN48 mang 1 đột biến gây bệnh c.12566G>C (p.Gly4189Ala) trên gen *KMT2D*. Bệnh nhân HN51 chưa xác định được đột biến gây bệnh thông liên nhĩ. Bệnh nhân HN56 không mang đột biến c.137A>G (p.Asn46Ser) trên gen *NOTCH2*, chưa xác định được nguyên nhân gây bệnh thông liên nhĩ.

2. Kiến nghị

Với đề tài nghiên cứu này tôi kiến nghị cần:

- Tăng số lượng mẫu nghiên cứu để có thể hiểu biết rõ ràng hơn về cơ chế gây bệnh đối với bệnh thông liên nhĩ.
- Tiến hành thực hiện thí nghiệm chứng minh ảnh hưởng của các biến thể đến chức năng của protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Liu Y., Chen S., Zühlke L. và cộng sự. (2019). Global birth prevalence of congenital heart defects 1970–2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol*, 48(2), 455–463.
2. Kendall S., Karamichalis J., Karamlou T. và cộng sự. (2014). Atrial Septal Defect. *Pediatric and Congenital Cardiology, Cardiac Surgery and Intensive Care*. Springer London, London, 1439–1454.
3. Liava'a M K.D. (2018). Surgical closure of atrial septal defects. .
4. Suluba E., Shuwei L., Xia Q. và cộng sự. (2020). Congenital heart diseases: genetics, non-inherited risk factors, and signaling pathways. *Egypt J Med Hum Genet*, 21(1), 11.
5. Santoro S.L. và Steffensen E.H. (2021). Congenital heart disease in Down syndrome – A review of temporal changes. *J Congenit Cardiol*, 5(1), 1.
6. Ono R, Okada S, Kondo Y, Kobayashi Y (2021). Heart-hand Syndrome. *Intern Med*, 60(10):1651-1652.
7. McDermott DA, Fong JC, Basson CT (2004). Holt-Oram Syndrome. GeneReviews®.
8. Goldfarb CA, Wall LB (2014). Holt-Oram syndrome. 39(8):1646-1648.
9. Bradley EA, Zaidi AN (2020). Atrial Septal Defect. 38(3):317-324.
10. Kendall S., Karamichalis J., Karamlou T. và cộng sự. (2014). Atrial Septal Defect. *Pediatric and Congenital Cardiology, Cardiac Surgery and Intensive Care*. Springer London, London, 1439–1454.
11. Magnan RA, Kang L, Degenhardt KR, Anderson RH, Jay PY (2024). Molecular Pathways and Animal Models of Atrial Septal Defect. 441:481-493.
12. Brida M, Chessa M, Celermajer D, et al. (2022). Atrial septal defect in adulthood: a new paradigm for congenital heart disease. 43(28):2660-2671.
13. Rosas M, Attie F. (2007). Atrial septal defect in adults. *Timely Top Med Cardiovasc Dis*. 11:E34.
14. Brown KN, Kanmanthareddy A (2023). Catheter Management of Atrial Septal Defect. .
15. Ahmed Kheiwa MD, Pawan Hari MD, Pranav Madabhushi, Padmini Varadarajan MD, FACC (2020). Patent foramen ovale and atrial septal defect. .

16. Naksuk N, Asirvatham SJ (2019). Iatrogenic atrial septal defect: reassurance or inquisitiveness [published correction appears in *J Interv Card Electrophysiol*. 76(2):175-182.
17. Schiff GA, Simpson JI. (1991). Unilateral pulmonary edema after atrial septal defect repair. 74(4):785-786.
18. Gurvitz M, Dunn JE, Bhatt A, et al. (2020). Characteristics of Adults With Congenital Heart Defects in the United States. 76(2):175-182.
19. Reller MD, Strickland MJ, Riehle-Colarusso T, Mahle WT, Correa A. (1998). Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta. 153(6):807-813.
20. Lajos PS, Carpentier AF (2016). Viện Tim Institut du Coeur: Success of a Congenital Heart Disease Center in a Developing Country. 82(4):621-624.
21. Lage K, Greenway SC, Rosenfeld JA, Wakimoto H, Gorham JM, Segrè AV, Roberts AE, Smoot LB, Pu WT, Pereira AC, Mesquita SM, Tommerup N, Brunak S, Ballif BC, Shaffer LG, Donahoe PK, Daly MJ, Seidman JG, Seidman CE, Larsen LA (2012). Genetic and environmental risk factors in congenital heart disease functionally converge in protein networks driving heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 28;109(35):14035-40.
22. Huhta J, Linask KK. (2013). Environmental origins of congenital heart disease: the heart-placenta connection. 18(5):245-50.
23. Larsen L.A. và Hitz M.-P. (2024). Human Genetics of Atrial Septal Defect. *Congenital Heart Diseases: The Broken Heart: Clinical Features, Human Genetics and Molecular Pathways*. Springer International Publishing, Cham, 467–480.
24. Rozqie R., Satwiko M.G., Anggrahini D.W. và cộng sự. (2022). NKX2-5 variants screening in patients with atrial septal defect in Indonesia. *BMC Med Genomics*, 15(1), 91.
25. Van Laarhoven P.M., Neitzel L.R., Quintana A.M. và cộng sự. (2015). Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. *Hum Mol Genet*, 24(15), 4443–4453.

26. Fukushima H., Shimizu K., Watahiki A. và cộng sự. (2017). NOTCH2 Hajdu-Cheney Mutations Escape SCFFBW7-Dependent Proteolysis to Promote Osteoporosis. *Mol Cell*, 68(4), 645-658.e5.
27. Lin X., Wang S., Sun M. và cộng sự. (2023). Retraction Note: miR-195-5p/NOTCH2-mediated EMT modulates IL-4 secretion in colorectal cancer to affect M2-like TAM polarization. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*, 16(1), 41.
28. Xuan Tuan H., The Phuoc Long P., Duy Kien V. và cộng sự. (2020). Trends in the Prevalence of Atrial Septal Defect and Its Associated Factors among Congenital Heart Disease Patients in Vietnam. *J Cardiovasc Dev Dis*, 7(1).
29. Goodwin S., McPherson J.D., và McCombie W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 17(6), 333–351.
30. Lappalainen T., Scott A.J., Brandt M. và cộng sự. (2019). Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell*, 177(1), 70–84.
31. Jelin A.C. và Vora N. (2018). Whole Exome Sequencing: Applications in Prenatal Genetics. *Reprod Genet*, 45(1), 69–81.
32. Stout K.K., Daniels C.J., Aboulhosn J.A. và cộng sự. (2019). 2018 AHA/ACC Guideline for the Management of Adults With Congenital Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 139(14), e698–e800.
33. Li H. and Durbin R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. 25(14), 1754–1760.
34. McKenna A., Hanna M., Banks E., et al (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. 20(9), 1297-1303.
35. Cingolani P., Platts A., Wang L.L., et al (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. (2), 80-92.
36. P. C. Ng and S. Henikoff, (2003). “SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function,”. vol 31, số p.h 13, tr 3812–3814.

37. I. Adzhubei, D. M. Jordan, and S. R. Sunyaev (2013). "Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2,". vol 07, tr Unit7.20,.
38. R. Steinhaus, S. Proft, M. Schuelke, D. N. Cooper, J. M. Schwarz, and D. Seelow (2021). "MutationTaster2021,". vol 49, số p.h W1, tr W446-W451,.
39. J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction,. vol 13, số p.h 1, tr 134, Jun. 2012, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
40. Froimchuk E., Jang Y., và Ge K. (2017). Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene*, 627, 337–342.
41. Meynert AM, Ansari M, FitzPatrick DR, Taylor MS (2014). Variant detection sensitivity and biases in whole genome and exome sequencing. 15(1):247.
42. Barbitoff YA, Polev DE, Glotov AS, Serebryakova EA, Shcherbakova IV, Kiselev AM, Kostareva AA, Glotov OS, Predeus AV. (2020). Systematic dissection of biases in whole-exome and whole-genome sequencing reveals major determinants of coding sequence coverage. .

PHỤ LỤC

1. Quyết định chấp thuận cầu hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN NGHIÊN CỨU HỆ GEN

Số: 02-2021/NCHG-HDDĐ
Vv: Chấp thuận ĐĐNCYSH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – tự do – hạnh phúc

Hà Nội, ngày 29 tháng 10 năm 2021

CHỨNG NHẬN CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC

Căn cứ Quyết định số 115/QĐ-NCHG ngày 04 tháng 06 năm 2021 của Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen về việc thành lập Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học cấp cơ sở.

Căn cứ biên bản họp ngày 29 tháng 10 năm 2021 của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Nghiên cứu hệ gen (IGR IBR) và kiến nghị phê duyệt của chủ nhiệm đề tài về các vấn đề đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học.

HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC VIỆN NGHIÊN CỨU HỆ GEN

Chấp thuận về các khía cạnh đạo đức đối với đề tài:

Tên đề tài: Nghiên cứu ứng dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới trong xây dựng cơ sở dữ liệu hệ gen người Việt Nam mắc bệnh tim bẩm sinh phục vụ cho chẩn đoán và dự phòng

- Chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Minh Đức
- Cơ quan: Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN.
- Thời gian nghiên cứu: 09/2021 – 09/2024
- Ngày chấp thuận: Ngày 29 tháng 10 năm 2021

PHÓ CHỦ TỊCH



GS. TS. Nguyễn Duy Bắc

VIỆN TRƯỞNG
VIỆN NGHIÊN CỨU HỆ GEN



PGS. TS. Nguyễn Huy Hoàng