

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lương Thị Thanh Hà

**XÁC ĐỊNH BIẾN THỂ DI TRUYỀN LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH CƠ TIM
GIÃN Ở MỘT SỐ BỆNH NHÂN BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ
TOÀN BỘ VÙNG GEN MÃ HÓA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – Năm 2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



LƯƠNG THỊ THANH HÀ

**XÁC ĐỊNH BIẾN THỂ LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH CƠ TIM GIẢN Ở
MỘT SỐ BỆNH NHÂN BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ
TOÀN BỘ VÙNG GEN MÃ HÓA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng
2. TS. Nguyễn Thị Kim Liên

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam kết rằng đề tài nghiên cứu trong luận văn này là kết quả từ quá trình tìm hiểu và nghiên cứu của riêng tôi, dựa trên những tài liệu và số liệu do tôi tự thu thập và phân tích. Tôi đảm bảo rằng các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận văn là khách quan và trung thực. Đồng thời, công trình này là duy nhất và chưa từng được công bố trong bất kỳ nghiên cứu nào trước đây. Tôi chịu hoàn toàn trách nhiệm trước pháp luật nếu có bất kỳ sai sót nào liên quan đến tính trung thực của số liệu và kết quả nghiên cứu.

Tác giả luận văn**Lương Thị Thanh Hà**

LỜI CẢM ƠN

Em muốn bày tỏ lòng biết ơn đặc biệt đến người hướng dẫn của em, GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng và TS. Nguyễn Thị Kim Liên, thầy và cô là những người đã luôn bên cạnh để tận tâm hỗ trợ, hướng dẫn và động viên em trong suốt thời gian thực tập với sự kiên nhẫn, nhiệt huyết, kiến thức sâu rộng và những góp ý quý báu giúp em hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn đến TS. Nguyễn Văn Tụng vì những lời khuyên, sự hướng dẫn, hỗ trợ và tạo điều kiện thuận lợi cho em trong suốt quá trình thực tập.

Em cũng xin bày tỏ lòng biết ơn của em đến các thầy cô tại Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những người đã dạy bảo và chỉ dẫn em trong suốt quá trình học tập.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến tất cả các anh chị tại Viện Nghiên cứu hệ Gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những người đã hỗ trợ em rất nhiều trong thời gian thực hiện đề tài và tạo ra một môi trường làm việc tuyệt vời.

Cuối cùng, em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến bố mẹ và bạn bè của em, những người đã luôn động viên và quan tâm em trong suốt quá trình học tập.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC BẢNG.....	vi
MỞ ĐẦU	1
1. Tổng quan tình hình nghiên cứu và lý do lựa chọn đề tài.....	1
2. Sự cấp thiết của tiến hành nghiên cứu	1
3. Tính thực tiễn của đề tài:	2
4. Mục tiêu của đề tài.....	2
5. Nội dung nghiên cứu.....	3
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Khái niệm bệnh cơ tim giãn.....	4
1.2. Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới và phương pháp WES trong nghiên cứu bệnh cơ tim.....	10
1.3. Tình hình nghiên cứu biến đổi gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn.....	10
1.3.1. Gen <i>TTN</i>	13
1.3.2. Gen <i>MYL3</i>	13
1.3.3. Gen <i>MYH7</i>	11
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU	15
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	15
2.2. HÓA CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ	16
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.3.1. Thu thập và tách chiết DNA	17
2.3.2. Giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (Whole Exome Sequencing).....	18
2.3.3. Phân tích kết quả giải trình tự WES để xác định các biến đổi gen trên các gen liên quan ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn	18
2.3.4. Phân tích dữ liệu và sàng lọc biến thể trên các gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn	19
2.3.5. PCR (Phản ứng chuỗi polymerase)	20
2.3.6. Giải trình tự sản phẩm PCR bằng phương pháp Sanger	21
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	23
3.1. Thu thập mẫu máu và tách chiết DNA tổng số	23
3.2. Kết quả giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa	24
3.2.1. Kết quả tạo thư viện DNA.....	24

3.2.2. Kết quả giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa.....	25
3.3. Kết quả xử lý số liệu và chú giải biến thể.....	26
3.3.1. Dóng hàng dữ liệu với hệ gen tham chiếu	26
3.3.2. Chú giải biến thể và xác định biến thể	27
3.4 Kiểm chứng biến thể bằng Sanger Sequencing	34
3.4.1. Bệnh nhân HN28	34
3.4.2. Bệnh nhân HN59	35
3.4.3. Bệnh nhân HN89	37
4. Thảo luận	38
4.1. Bệnh nhân HN28	38
4.2. Bệnh nhân HN59	40
4.3. Bệnh nhân HN89	42
4.4. Những đóng góp của nghiên cứu cho việc chẩn đoán bệnh cơ tim giãn	43
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	46
KẾT LUẬN:.....	46
KIẾN NGHỊ:.....	46
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	47
PHỤ LỤC.....	52

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
DCM	Dilated Cardiomyopathy	Bệnh cơ tim giãn
dbSNP	The single nucleotide polymorphism database	Cơ sở dữ liệu đa hình đơn nucleotide
HCM	Hypertrophic Cardiomyopathy	Bệnh cơ tim phì đại
NGS	Next generation sequencing	Giải trình tự thế hệ mới
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RCM	Restrictive Cardiomyopathy	Bệnh cơ tim hạn chế
SNP	Single nucleotide polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
WES	Whole exome sequencing	Giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa
WGS	Whole genome sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 2.1. Thông tin 3 bệnh nhân và các thành viên trong gia đình.....</i>	<i>15</i>
<i>Bảng 2.2: Thông tin các cặp môi được sử dụng trong nghiên cứu.....</i>	<i>21</i>
<i>Bảng 3.1. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA</i>	<i>24</i>
<i>Bảng 3.2. Kích thước và nồng độ thư viện DNA.....</i>	<i>24</i>
<i>Bảng 3.3. Thông tin đọc trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của 3 bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn.....</i>	<i>26</i>
<i>Bảng 3.4. Kết quả sắp hàng các mẫu giải trình tự với hệ gen tham chiếu.....</i>	<i>27</i>
<i>Bảng 3.5. Kết quả phân tích và dự đoán biến thể trong vùng gen mã hóa của 3 bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn</i>	<i>28</i>
<i>Bảng 3.6. Kết quả sàng lọc biến thể trong những gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn.....</i>	<i>29</i>
<i>Bảng 3.7. Danh sách các biến thể trên vùng exon của những gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn ở 3 bệnh nhân.....</i>	<i>29</i>
<i>Bảng 3.8. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các biến thể ở bệnh nhân HN28, HN59 và HN89 bằng các công cụ tin sinh</i>	<i>30</i>
<i>Bảng 3.9. Danh sách biến thể của 3 bệnh nhân HN28, HN59, HN89.....</i>	<i>34</i>

DANH MỤC HÌNH

<i>Hình 1.1. Tỷ lệ tử vong do mắc bệnh cơ tim phân bố theo vị trí địa lý thay đổi hàng năm từ năm 1990 đến 2017.....</i>	<i>6</i>
<i>Hình 1.2. Hình ảnh siêu âm tim của bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn cho thấy sự giãn nở lớn ở tâm nhĩ.....</i>	<i>8</i>
<i>Hình 2.1. Các bước chung trong quá trình nghiên cứu.....</i>	<i>17</i>
<i>Hình 3.1: Ảnh chụp kết quả chạy điện di DNA tổng số.....</i>	<i>23</i>
<i>Hình 3.2. Kết quả kiểm tra chất lượng thư viện của các bệnh nhân.....</i>	<i>25</i>
<i>Hình 3.3: Kết quả khuếch đại đoạn gen TTN và MYL3 trên gia đình bệnh nhân HN28.....</i>	<i>34</i>
<i>Hình 3.4. Kết quả giải trình tự Sanger 2 gen MYL3 và TTN của bệnh nhân và các thành viên trong gia đình HN28.....</i>	<i>35</i>
<i>Hình 3.5: Kết quả khuếch đại đoạn gen MYH7 trên gia đình bệnh nhân HN59.....</i>	<i>36</i>
<i>Hình 3.6. Kết quả giải trình tự Sanger trên gen MYH7 của bệnh nhân HN59 và mẹ.....</i>	<i>36</i>
<i>Hình 3.7: Kết quả khuếch đại 2 đoạn gen TTN trên gia đình bệnh nhân HN89.....</i>	<i>37</i>
<i>Hình 3.8. Phả hệ của gia đình bệnh nhân HN89 bao gồm bố mẹ và bệnh nhân và kết quả giải trình tự Sanger.....</i>	<i>38</i>
<i>Hình 3.9. Sắp hàng nhiều trình tự protein TTN từ người và các loài khác bằng Clustal-X2. Sắp hàng nhiều trình tự của protein TTN tại vị trí xảy ra biến thể. Sắp hàng trình tự axit amin của TTN từ các loài khác nhau, bao gồm Homo sapiens (người), Pan troglodytes (tinh tinh), Macaca mulatta (khỉ rhesus), Felis catus (mèo nhà) và Mus musculus (chuột nhà).....</i>	<i>43</i>

MỞ ĐẦU

1. Tổng quan tình hình nghiên cứu và lý do lựa chọn đề tài

Bệnh cơ tim giãn (Dilated Cardiomyopathy - DCM) là một dạng bệnh lý của cơ tim đặc trưng bởi sự giãn bất thường của tâm thất trái hoặc cả hai tâm thất, dẫn đến suy giảm chức năng bơm máu của tim. Bệnh có thể gây suy tim tiến triển và làm tăng nguy cơ loạn nhịp tim, đột quỵ hoặc tử vong do tim. Sự giãn nở bất thường của buồng tim làm suy giảm khả năng co bóp của cơ tim, dẫn đến giảm cung lượng tim. Căn bệnh này xảy ra do đột biến tại các gen đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì cấu trúc và chức năng của cơ tim, bao gồm tính đàn hồi, ổn định cơ học và điều hòa tín hiệu nội bào.

Ở Việt Nam, phương pháp chữa bệnh chủ yếu hiện tại là ghép tim, đối với những bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn khi được ghép tim tỷ lệ sống sót 1 năm là 90% và trên 50% sống sót hơn 20 năm. Đây được xem là phương pháp chữa trị hiệu quả nhất cho đến hiện tại. Ngoài ra, cấy ghép tế bào gốc cơ tim được xem là phương pháp đầy triển vọng nhưng kỹ thuật này vẫn còn cần nghiên cứu và ít được áp dụng trong lâm sàng.

Do đó, đề tài "Xác định biến thể di truyền liên quan đến bệnh cơ tim giãn ở một số bệnh nhân bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa" được thực hiện nhằm xác định các biến thể gen tiềm năng có liên quan đến bệnh cơ tim giãn ở bệnh nhân Việt Nam. Hiện tại, các nghiên cứu về mặt di truyền liên quan đến bệnh cơ tim giãn còn hạn chế. Nghiên cứu này sẽ cung cấp thêm số liệu về mặt di truyền liên quan đến bệnh cơ tim giãn, hỗ trợ để phát triển phương pháp chẩn đoán sớm và điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh này.

2. Sự cấp thiết của tiến hành nghiên cứu

Nghiên cứu giải trình tự gen ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn giúp xác định các biến thể di truyền gây ra hoặc góp phần gây ra bệnh. Điều này đặc biệt quan trọng vì bệnh cơ tim giãn có thể do nhiều yếu tố di truyền khác nhau gây ra. Việc hiểu rõ các biến thể này có thể giúp phân loại bệnh nhân chính xác hơn và từ đó đưa ra các liệu pháp điều trị cụ thể và hiệu quả hơn.

Khi biết rõ nguyên nhân di truyền của bệnh, các bác sĩ có thể triển khai các kế hoạch điều trị cá nhân hóa phù hợp với từng bệnh nhân. Ví dụ như sử dụng thuốc điều trị đặc hiệu, liệu pháp gen hoặc các biện pháp can thiệp khác nhằm giảm thiểu triệu chứng và ngăn chặn sự tiến triển của bệnh.

Giải trình tự gen cũng có thể giúp phát hiện hoặc sàng lọc sớm các dấu hiệu di truyền của bệnh ở các thành viên gia đình ngay cả khi chưa có bất kỳ triệu chứng

nào. Từ đó có thể có biện pháp phòng ngừa và theo dõi sức khỏe chặt chẽ, giảm nguy cơ phát triển bệnh.

Nghiên cứu này xác định các biến thể có liên quan cũng như dự đoán mức độ ảnh hưởng của biến thể đến bệnh cơ tim giãn, bao gồm cách các biến thể gen ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của cơ tim. Hiểu biết về các biến thể có khả năng gây bệnh không chỉ giúp cải thiện chẩn đoán và điều trị mà còn mở ra cơ hội phát triển các liệu pháp mới.

Việc tích hợp nghiên cứu giải trình tự gen vào quy trình chăm sóc bệnh nhân góp phần nâng cao chất lượng của nghiên cứu y học và chăm sóc y tế. Các dữ liệu từ nghiên cứu gen có thể được sử dụng để xây dựng các cơ sở dữ liệu, hỗ trợ các nghiên cứu dịch tễ học và phát triển các chính sách y tế phù hợp.

Chẩn đoán chính xác và điều trị hiệu quả giúp giảm bớt gánh nặng tài chính và nguồn lực y tế. Điều này đặc biệt quan trọng đối với các bệnh mạn tính như cơ tim giãn, nơi mà việc quản lý bệnh kéo dài và tốn kém.

3. Tính thực tiễn của đề tài

Nghiên cứu giải trình tự gen thế hệ mới (whole exome sequencing - WES) ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn nhằm xác định các biến thể có khả năng gây bệnh trên các gen liên quan là rất cần thiết để cải thiện chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa bệnh, từ đó nâng cao chất lượng cuộc sống của bệnh nhân và tối ưu hóa sử dụng nguồn lực y tế. Xuất phát từ những thực tiễn đó, đề tài “Xác định biến thể di truyền liên quan đến bệnh cơ tim giãn ở một số bệnh nhân bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa” được thực hiện nhằm xác định các biến đổi di truyền trên các gen liên quan đến bệnh.

Trong nghiên cứu này, biến thể ở 3 bệnh nhân người Việt Nam mắc bệnh cơ tim giãn đã được xác định bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (Whole Exome Sequencing - WES). Phân tích in-silico bằng các phần mềm tin sinh học để xác nhận tác động gây hại của biến thể này đối với chức năng của protein. Kết quả này đã góp phần mở rộng hiểu biết về các biến thể của các gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn và cung cấp dữ liệu di truyền phục vụ nghiên cứu sâu hơn về bệnh cơ tim giãn tại Việt Nam.

4. Mục tiêu của đề tài

Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của một số bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn để xác định được các biến thể gen trên các gen liên quan đến bệnh ở bệnh nhân, từ đó sàng lọc và tìm ra biến thể có khả năng gây ra bệnh cơ tim giãn.

5. Nội dung nghiên cứu

Các nội dung nghiên cứu trong luận văn:

- Nội dung 1: Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa và chú giải biến thể

Để chuẩn bị cho quá trình giải trình tự gen, cần thu thập mẫu và tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh cơ tim giãn và các thành viên trong gia đình (nếu có) tại Bệnh viện Tim Hà Nội.

- Nội dung 2: Sàng lọc biến thể liên quan đến bệnh theo các tiêu chí sau:

- Biến thể xảy ra trên các gen đã được công bố là liên quan đến bệnh
- Sự thay đổi với tần suất xuất hiện <1%
- Biến thể được dự đoán sẽ ảnh hưởng đến chức năng protein
- Các biến thể không gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar bị loại bỏ.

- Nội dung 3 : Kiểm chứng lại các biến thể

Các biến thể có khả năng gây bệnh được xác định và kiểm chứng bằng phương pháp giải trình tự Sanger trên cả bệnh nhân và các thành viên trong gia đình, giúp xây dựng phả hệ và nghiên cứu cơ chế di truyền của bệnh. Trước khi sử dụng phương pháp Sanger cần sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại vùng gen mong muốn.

Đoạn gen khuếch đại được giải trình tự trên máy giải trình tự ABI 3500 Bio System bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự được phân tích trên phần mềm Clustal X2 và BioEdit để phát hiện biến thể khi so sánh với trình tự gen tham chiếu.

- Những đóng góp của luận văn: Đã phát hiện tổng cộng 5 biến thể trên các gen khác nhau ở 3 bệnh nhân người Việt Nam mắc bệnh cơ tim giãn bẩm sinh. Cụ thể là 2 biến thể dạng dị hợp tử là c.62969T>A trên gen *TTN* và c.413G>A trên gen *MYL3* ở bệnh nhân HN28, 1 biến thể dạng dị hợp tử là c.4304C>G trên gen *MYH7* ở bệnh nhân HN59 và 2 biến thể dạng dị hợp tử là c.46489G>T và c.58037T>C trên cùng 1 gen *TTN* ở bệnh nhân HN89.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1. Tổng quan về bệnh cơ tim giãn

1.1. Khái niệm bệnh cơ tim giãn

Bệnh cơ tim giãn (hay còn gọi là bệnh cơ tim tăng kích thước) là một trong những vấn đề tim mạch phổ biến, ảnh hưởng đến hàng triệu người trên khắp thế giới. Tình trạng này xảy ra khi cơ tim trở nên lớn hơn và yếu hơn so với bình thường, dẫn đến khả năng bơm máu không hiệu quả. Bệnh cơ tim giãn được đặc trưng bởi sự phình to và/hoặc giảm chức năng của một hoặc cả hai tâm thất, đây là một căn bệnh phổ biến trên phạm vi toàn cầu [1].

Các phân nhóm bệnh cơ tim, bao gồm bệnh cơ tim phì đại (hypertrophic cardiomyopathy - HCM), bệnh cơ tim giãn (dilated cardiomyopathy - DCM), bệnh cơ tim loạn nhịp (arrhythmogenic cardiomyopathy - ACM) và bệnh cơ tim hạn chế (restrictive cardiomyopathy - RCM), được xác định dựa trên đặc điểm hình thái và đều có thể xuất phát từ yếu tố di truyền. Bệnh cơ tim giãn đặc trưng bởi sự giãn nở và giảm co bóp của tâm thất trái, có thể do các nguyên nhân di truyền hoặc không di truyền như tăng huyết áp, bệnh van tim, nhiễm trùng/viêm, và tiếp xúc với chất độc [1]. Mức độ suy giảm chức năng tâm thu của tâm thất trái rất đa dạng và thường có xu hướng tiến triển. Bệnh cơ tim giãn là một yếu tố nguy cơ chính dẫn đến suy tim, vì sự suy giảm chức năng tâm thu không luôn biểu hiện triệu chứng. Đáng chú ý, bệnh cơ tim giãn thường liên quan đến nguy cơ cao mắc rối loạn loạn nhịp nghiêm trọng do sự ảnh hưởng của bệnh lý lên hệ thống dẫn truyền tim [2].

Bệnh cơ tim giãn có thể xuất hiện ở mọi lứa tuổi nhưng phổ biến hơn ở người trưởng thành dưới 50 tuổi. Trong một số trường hợp, bệnh lý cơ tim giãn khởi phát với viêm cơ tim cấp tính, thường do virus. Tiếp theo là giai đoạn tiềm ẩn, trong đó các tế bào cơ tim bị hoại tử lan rộng do phản ứng tự miễn nhằm vào những tế bào đã bị virus làm biến đổi. Cuối cùng, quá trình này dẫn đến xơ hóa mạn tính của tế bào cơ tim. Sau giai đoạn khởi phát bệnh, cơ tim dần trở nên giãn, mỏng và phì đại để bù đắp, thường dẫn đến hở van hai lá chức năng và/hoặc hở van ba lá, cùng với giãn tâm nhĩ. Huyết khối bám thành có thể hình thành do ứ máu khi buồng tim giãn và chức năng suy giảm. Các rối loạn nhịp tim nhanh thường xảy ra trong giai đoạn cấp tính của viêm cơ tim, trong khi các rối loạn nhịp tim chậm như block nhĩ thất xuất hiện trong giai đoạn muộn của DCM. Rung nhĩ thường gặp khi tâm nhĩ trái bị giãn nhiều [1].

Tại Hoa Kỳ vào năm 2022, tỷ lệ mắc bệnh cơ tim giãn là khoảng 0,6 - 1,3 triệu người, số liệu này tương đương với tỉ lệ người mắc bệnh là 1:250 đến 1:500.

Các ước tính hiện tại về tỷ lệ mắc bệnh do di truyền cũng có thể chưa đầy đủ do những hạn chế trong chẩn đoán bệnh và xét nghiệm di truyền. Các tiêu chí và định nghĩa hiện tại về chẩn đoán vẫn chưa rõ ràng, dẫn đến việc tầm soát di truyền còn bị hạn chế [1].

Theo Hiệp hội Tim mạch Hoa Kỳ (American Heart Association), bệnh cơ tim giãn được phân thành các nhóm di truyền, hỗn hợp hoặc không do di truyền. Trong khi đó, Hiệp hội Tim mạch Châu Âu (European Society of Cardiology) phân loại bệnh cơ tim thành hai dạng: di truyền và không di truyền. Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization) xếp bệnh cơ tim giãn vào nhóm bệnh tim nghiêm trọng, trong đó các tổn thương về cấu trúc hoặc chức năng của cơ tim có thể dẫn đến tỷ lệ mắc bệnh và tử vong cao, gây suy tim và rối loạn nhịp tim [1].

Một số nghiên cứu khác phân loại các bệnh cơ tim thành hai nhóm chính dựa trên cơ quan bị ảnh hưởng chủ yếu. Trong đó, bệnh cơ tim nguyên phát (gồm di truyền, không di truyền và mắc phải) là những bệnh chỉ ảnh hưởng hoặc chủ yếu ảnh hưởng đến cơ tim, và số lượng các bệnh thuộc nhóm này tương đối ít. Bệnh cơ tim thứ phát là tình trạng tổn thương cơ tim xảy ra như một phần của các bệnh hệ thống lan tỏa (ảnh hưởng đa cơ quan). Tần suất và mức độ tổn thương cơ tim thứ phát rất khác nhau giữa các bệnh lý, một số bệnh cực kỳ hiếm gặp và chỉ có ít báo cáo ghi nhận tổn thương cơ tim. Vì nhiều bệnh cơ tim tuy ảnh hưởng chủ yếu đến tim nhưng không hoàn toàn khu trú ở cơ quan này, nên sự phân chia giữa bệnh cơ tim nguyên phát và thứ phát phần nào mang tính tương đối, và thường phụ thuộc vào đánh giá lâm sàng về tầm quan trọng và hậu quả của tổn thương cơ tim đó. Các chuyên gia khuyến nghị phân chia bệnh cơ tim thành nhóm nguyên phát (bao gồm ba nhóm nhỏ là di truyền, hỗn hợp (vừa di truyền vừa không di truyền), và mắc phải [3]

Về mặt lâm sàng, bệnh nhân thường có biểu hiện khó thở khi gắng sức, sau đó là khó thở thường xuyên và liên tục, khó thở khi nằm và có thể kèm theo cơn khó thở kịch phát về đêm. Ngoài ra, các triệu chứng như mệt mỏi kéo dài, giảm khả năng gắng sức, phù chân, cổ chướng, gan to và tiểu ít cũng là những dấu hiệu phổ biến. Nhiều bệnh nhân có thể xuất hiện loạn nhịp như rung nhĩ, ngoại tâm thu thất hoặc nhịp nhanh thất, làm tăng nguy cơ đột tử. Ngất có thể xảy ra do rối loạn nhịp hoặc giảm tưới máu não. Ở bệnh nhân mắc bệnh này, có thể phát hiện mạch nhanh, huyết áp thấp, tiếng tim mờ, tiếng thổi tâm thu do hở van hai lá cơ năng và các dấu hiệu sung huyết phổi. Ở trẻ em, triệu chứng có thể biểu hiện bằng khó thở khi bú, không tăng cân, đổ mồ hôi nhiều khi ăn, co kéo cơ hô hấp và gan to... Bệnh cơ tim

giãn tiến triển mạn tính nếu không được điều trị hiệu quả có thể dẫn đến suy tim giai đoạn cuối, cần ghép tim [4].

Tỷ lệ mắc cơ tim giãn có thể có sự thay đổi, điều này phản ánh sự khác biệt về mặt địa lý và sắc tộc, cũng như các phương pháp thống kê của từng nghiên cứu. Một số nghiên cứu khác thống kê được tỉ lệ mắc bệnh cơ tim giãn ở Anh (8,3/100.000), Ý (7,0/100.000) và Nhật Bản (14/100.000) đều báo cáo tỷ lệ mắc bệnh tương tự [4][5][6]. Tuy nhiên, phương pháp thống kê tỉ lệ mắc bệnh cơ tim giãn vẫn còn cần nghiên cứu thêm vì chưa có nghiên cứu nào được thực hiện trên phạm vi toàn cầu, các nghiên cứu đã có hầu hết đưa ra tỉ lệ mắc bệnh này trên quy mô dân số nhỏ và theo vùng miền.

Vào năm 2010, tỷ lệ tử vong ước tính do bệnh cơ tim là 5,9 trên 100.000 dân số toàn cầu, tương ứng với khoảng 403.000 ca tử vong. Biểu đồ Hình 1.1 thể hiện sự thay đổi hàng năm về tỷ lệ tử vong do bệnh cơ tim phân bố ở các khu vực khác nhau từ năm 1990 đến 2017 [1].



Hình 1.1. Tỷ lệ tử vong do mắc bệnh cơ tim phân bố theo vị trí địa lý thay đổi hàng năm từ năm 1990 đến 2017 [1].

Các nghiên cứu về nguyên nhân của bệnh cơ tim giãn đã được thực hiện qua rất nhiều năm và đã được làm sáng tỏ, bao gồm đột biến di truyền, nhiễm trùng, viêm nhiễm, bệnh tự miễn, tiếp xúc với độc tố và các nguyên nhân nội tiết hoặc thần kinh [1]. Trong đó yếu tố về di truyền được cho là nguyên nhân phổ biến nhất của căn bệnh này. Bên cạnh đó, các yếu tố như sự khác biệt về giới tính, tuổi khởi phát bệnh, tốc độ tiến triển của bệnh, nguy cơ phát triển suy tim và xác suất tử vong đột ngột cũng góp phần làm phức tạp thêm biểu hiện lâm sàng không đồng nhất của bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn [2]. Cả khuynh hướng di truyền và các yếu tố môi trường đều đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phát triển bệnh.

Ở những bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn di truyền từ gia đình, chỉ khoảng

40% số ca xác định được nguyên nhân. Ngoài ra, ở các bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn không do di truyền từ gia đình, một số nghiên cứu cũng đã xác định được các biến đổi về gen gây bệnh, tuy nhiên tần suất của các biến đổi gen này vẫn chưa hoàn toàn rõ ràng [7].

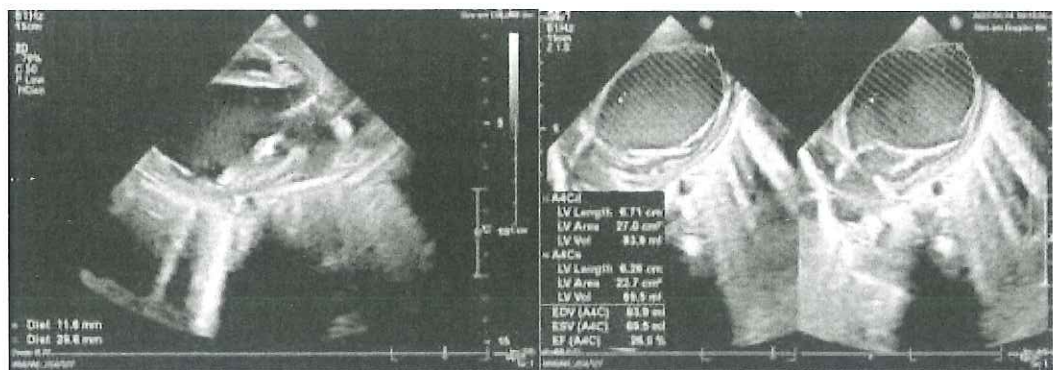
Nguyên nhân gây bệnh có thể do căng thẳng kéo dài hoặc áp lực lớn mà tim phải chịu đựng, chẳng hạn như tăng huyết áp, bệnh van tim hoặc các bệnh lý tim mạch khác. Đây là nguyên nhân gây rối loạn cơ tim nguyên phát, xảy ra khi không có bệnh động mạch vành nghiêm trọng hoặc các tình trạng liên quan đến tăng áp lực trong buồng tim, dẫn đến quá tải thể tích thất (như tăng huyết áp, bệnh van tim). Bên cạnh đó, nhiều tác nhân gây bệnh đã được xác định trong đó viêm là một yếu tố đóng góp vào sự phát triển của bệnh cơ tim giãn, với vai trò của chúng dao động từ việc gây viêm cơ tim trực tiếp đến việc kích hoạt tổn thương trung gian miễn dịch trong mô tim. Tác động của các nhiễm trùng khác nhau gây ra bệnh cơ tim giãn như virus, vi khuẩn, động vật nguyên sinh, giun sán và nấm đối với bệnh cơ tim giãn đã và đang tiếp tục là một chủ đề nghiên cứu tích cực, với nhiều nghiên cứu trên toàn thế giới đang giải quyết lĩnh vực quan trọng này [3] [8]. Nguyên nhân cụ thể của bệnh cơ tim giãn vẫn chưa được xác định chính xác. Nhiều nghiên cứu khác cho thấy nguyên nhân có thể phát sinh từ sự kết hợp của nhiều yếu tố, bao gồm các bệnh tự miễn [9], tiếp xúc với độc tố [1], rối loạn chuyển hóa hoặc nội tiết [10], bệnh lý thần kinh cơ [11], và bệnh cơ tim liên quan đến thai kỳ hoặc cơ tim sau sinh [12].

Các phương pháp chẩn đoán cơ tim giãn hiện nay có thể kể đến:

- MRI tim – Chụp cộng hưởng từ tim
- ECG – Điện tim đồ
- X-quang ngực
- Siêu âm tim
- Sinh thiết nội mạc cơ tim

Chẩn đoán chính xác yêu cầu một loạt các xét nghiệm chuyên sâu để xác định nguyên nhân cơ bản và hướng dẫn các chiến lược điều trị hiệu quả. Bệnh cơ tim giãn có thể được xác định thông qua siêu âm tim, với các tiêu chí chẩn đoán bao gồm thể tích cuối tâm trương của tâm thất trái lớn hơn 2 độ lệch chuẩn so với mức bình thường, phân suất tống máu dưới 50% và được điều chỉnh theo tuổi cũng như diện tích bề mặt cơ thể. Thông tim có thể giúp loại trừ bệnh động mạch vành, trong khi chụp cộng hưởng từ có thể phát hiện sự giãn nở, phù nề và xơ hóa và xác định tình trạng viêm. Điện tâm đồ của bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn có thể không cho thấy sự bất thường nhưng một số trường hợp cũng có thể cho thấy những bất thường như thay đổi sóng T hoặc block nhánh [13]. Chụp X-

quang và siêu âm tim (siêu âm M-mode và siêu âm 2D) thường được sử dụng để đo kích thước bên trong của tâm thất trong thì tâm thu và tâm trương. Ban đầu, người ta cho rằng sự giãn nở tâm thất xảy ra để đáp ứng với sự suy giảm chức năng. Tuy nhiên, đối với bệnh cơ tim giãn, sự gia tăng kích thước tâm thất thường xảy ra trước khi có thể phát hiện sự suy giảm chức năng. Trạng thái giãn nở tâm thất này được coi là giai đoạn tiền lâm sàng của bệnh cơ tim giãn. Hiện nay có thể sử dụng các phương pháp chẩn đoán hình ảnh tim mạch để xác định sớm các dấu hiệu của bệnh ở những cá nhân mang đột biến gen ngay cả khi chưa có biểu hiện bệnh. Các nghiên cứu chuyên sâu về sự tiến triển của bệnh cần được thực hiện trong nhiều năm. Các kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh đã xác định được kích thước buồng tim, bất thường về biến dạng cơ tim và sự tăng cường tín hiệu tương phản đều là những đặc điểm của giai đoạn sớm của bệnh [14]. Hình ảnh siêu âm tim thường cho thấy thất trái giãn lớn, chức năng thất giảm, và nhĩ trái cũng giãn.



Hình 1.2. Hình ảnh siêu âm tim của bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn cho thấy sự giãn nở lớn ở tâm nhĩ.

Sinh thiết nội mạc cơ tim là một phương pháp được sử dụng để xác định nguyên nhân gây ra một số dạng bệnh cơ tim giãn. Trong một số trường hợp nhất định, chẳng hạn như tình trạng bệnh nhân quá tải sắt, bệnh amyloidosis và các bệnh lý thâm nhiễm khác, sinh thiết cơ tim đóng vai trò quan trọng trong việc xác định chẩn đoán. Phương pháp này thường được áp dụng trong đánh giá viêm cơ tim hoặc khi bệnh nhân có tình trạng suy tim không rõ nguyên nhân. Tỷ lệ gặp biến chứng khi thực hiện sinh thiết nội mạc cơ tim dao động từ một đến ba phần trăm, trong đó có những biến chứng nghiêm trọng như thủng tim và chèn ép tim với tỷ lệ khoảng không phải năm phần trăm. Tuy nhiên, do tính chất không đồng nhất của các bệnh lý thâm nhiễm, độ nhạy của sinh thiết cơ tim bị hạn chế vì vị trí lấy mẫu sinh thiết chủ yếu từ vách liên thất bên phải, có thể không phản ánh đầy đủ tổn thương ở những vùng khác của cơ tim. Phương pháp này không chỉ được áp dụng để chẩn đoán bệnh cơ tim giãn mà còn là phương pháp chẩn đoán những bệnh tim khác như

bệnh loạn sản thất phải gây loạn nhịp, tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy có thể sử dụng các loại tế bào khác để tiếp cận hơn để chẩn đoán bệnh này, giúp hạn chế thực hiện sinh thiết cơ tim [14] [15].

Để xác định chính xác nguyên nhân của bệnh cơ tim giãn, cần thực hiện một loạt các xét nghiệm không xâm lấn và xâm lấn cùng với các xét nghiệm về mặt di truyền. Sự phát triển vượt bậc trong nghiên cứu giải trình tự gen và các phương pháp phân tử đang hỗ trợ hiệu quả cho các bác sĩ lâm sàng trong quá trình xác định nguồn gốc của bệnh và chẩn đoán chính xác, cải thiện việc điều trị cho bệnh nhân và có thể ngăn chặn sự tiến triển của bệnh [16]. Bên cạnh đó, các phương pháp di truyền (giải trình tự toàn bộ gen, giải trình tự toàn bộ vùng exon, xét nghiệm đa hình đơn nucleotide) ngày nay cũng đang được nghiên cứu và áp dụng để hỗ trợ chẩn đoán bệnh cơ tim giãn. Một số gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn đã được nghiên cứu và xác định bằng phương pháp giải trình tự Sanger, các gen này chủ yếu liên quan đến cấu trúc và chức năng của cơ tim. Tuy nhiên, phương pháp giải trình tự Sanger chỉ có khả năng phân tích các biến đổi gen trên từng gen đơn lẻ, đòi hỏi nhiều thời gian, nguồn lực và chi phí lớn, trong khi hiệu suất thu được lại không cao, gây hạn chế đáng kể trong việc nghiên cứu và chẩn đoán các bệnh lý di truyền một cách toàn diện.

Bên cạnh đó, do sự khác biệt về năng lực chẩn đoán và mức độ tiếp cận các xét nghiệm hiện đại giữa các khu vực trên thế giới, nhiều trường hợp bệnh cơ tim giãn được phân loại là vô căn, mặc dù thực tế có thể do các yếu tố tiềm ẩn chưa được xác định đầy đủ thông qua các xét nghiệm toàn diện. Đối với các trường hợp mắc bệnh cơ tim giãn nhưng chưa xác định được nguyên nhân, cần thận trọng xem xét tiền sử gia đình để phát hiện các thành viên có nguy cơ mắc bệnh tim khởi phát sớm, suy tim hoặc đột tử [4]. Những tiến bộ liên tục trong giải trình tự gen và kỹ thuật phân tử đang mở rộng các nguồn lực sẵn có cho các bác sĩ lâm sàng, giúp họ xác định chính xác hơn các nguyên nhân cơ bản của bệnh và cung cấp phân tầng nguy cơ và điều trị cá nhân hóa. Những tiến bộ này không chỉ nâng cao chất lượng chăm sóc bệnh nhân mà còn có tiềm năng làm chậm hoặc thậm chí đảo ngược quá trình tiến triển của bệnh. Từ cuối những năm 1990, đã có những bước tiến đáng kể trong giải trình tự gen, giúp hiểu rõ hơn về cách các biến thể di truyền ảnh hưởng đến bệnh cơ tim. Bệnh cơ tim giãn có thể phát sinh từ nhiều biến thể di truyền liên quan đến các quá trình tế bào khác nhau, bao gồm các gen liên quan đến tạo lực co bóp, tín hiệu, vận chuyển protein, cân bằng điện giải, cấu trúc tế bào, điều hòa năng lượng và biểu hiện gen [17]. Hiện nay, các đột biến trong hơn 250 gen đã được xác định có liên quan đến bệnh cơ tim giãn [17].

1.2. Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới và phương pháp WES trong nghiên cứu bệnh cơ tim

Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới đã mang lại một cuộc cách mạng trong lĩnh vực nghiên cứu di truyền, nhờ khả năng xử lý với tốc độ nhanh, thông lượng cao và độ chính xác vượt trội trong phân tích dữ liệu di truyền. Không chỉ giúp xác định chính xác các biến đổi gen mà còn cung cấp thông tin toàn diện về bộ gen, phương pháp này ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu và chẩn đoán các bệnh di truyền. Đặc biệt, phương pháp WES đang dần khẳng định vai trò quan trọng của mình và được kỳ vọng sẽ trở thành công cụ chủ đạo trong việc phát hiện và xác định các gen gây bệnh trong tương lai, mở ra nhiều hướng đi mới trong y học chính xác và điều trị cá nhân hóa.

Phương pháp WES (Whole Exome Sequencing) là một kỹ thuật giải trình tự gen hiện đại, tập trung vào việc phân tích toàn bộ vùng mã hóa (exome) của bộ gen người. Exome bao gồm tất cả các exon – những đoạn DNA chịu trách nhiệm mã hóa cho protein – và mặc dù chỉ chiếm khoảng 1–2% tổng chiều dài bộ gen, exome lại chứa tới khoảng 85% các biến thể di truyền liên quan đến bệnh lý đã được xác định. Chính vì vậy, WES được xem là một phương pháp có tính ứng dụng cao, đặc biệt trong chẩn đoán các bệnh di truyền hiếm gặp hoặc bệnh có biểu hiện phức tạp, không rõ nguyên nhân.

Ưu điểm nổi bật của WES là giúp phát hiện được các đột biến hiếm, mới hoặc chưa từng ghi nhận trước đây, và giúp chẩn đoán chính xác trong những trường hợp lâm sàng phức tạp, khi các xét nghiệm thông thường không đủ khả năng xác định nguyên nhân di truyền, từ đó hỗ trợ chẩn đoán bệnh, nghiên cứu cơ chế bệnh học và xác định các đột biến liên quan đến bệnh lý như bệnh cơ tim, ung thư, rối loạn thần kinh và nhiều bệnh di truyền khác [18]. So với giải trình tự toàn bộ bộ gen (whole genome sequencing - WGS), WES có chi phí thấp hơn và tập trung vào các vùng có ý nghĩa sinh học cao, giúp tối ưu hóa việc phân tích dữ liệu di truyền. Giải trình tự WES là công cụ quan trọng trong nghiên cứu và điều trị bệnh cơ tim giãn nhờ khả năng phát hiện các đột biến gen liên quan như *TTN*, *MYH7*, *MYL3*, ... những gen có vai trò quan trọng trong cấu trúc và chức năng cơ tim. WES giúp chẩn đoán chính xác DCM, đặc biệt ở những bệnh nhân có tiền sử gia đình hoặc biểu hiện lâm sàng không điển hình, từ đó hỗ trợ cá nhân hóa điều trị và đưa ra các quyết định lâm sàng phù hợp hơn. Việc xác định đột biến qua WES giúp tiên lượng bệnh, đánh giá nguy cơ suy tim tiến triển, loạn nhịp hoặc đột tử, đồng thời hỗ trợ tư vấn di truyền, giúp sàng lọc và quản lý nguy cơ trong gia đình bệnh nhân.

Ngoài giá trị chẩn đoán, WES còn mở rộng hiểu biết về cơ chế bệnh học của DCM bằng cách phát hiện các biến thể mới, đánh giá tác động của các biến thể di truyền lên chức năng protein, từ đó góp phần phát triển các liệu pháp điều trị nhắm mục tiêu. WES cũng hỗ trợ nghiên cứu mối liên hệ giữa di truyền và đáp ứng điều trị, giúp các bác sĩ đưa phác đồ điều trị phù hợp cho từng bệnh nhân, từ đó bệnh nhân có thể được hưởng lợi từ các liệu pháp cụ thể như thuốc chẹn beta, điều hòa canxi hoặc cấy máy hỗ trợ tim. Nhờ khả năng phân tích toàn diện và độ chính xác cao, WES ngày càng trở thành công cụ quan trọng trong nghiên cứu và điều trị DCM, góp phần cải thiện tiên lượng và chất lượng sống của bệnh nhân.

1.3. Tình hình nghiên cứu biến đổi gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn

Hơn 250 gen mang đột biến di truyền đã được xác định có liên quan đến bệnh cơ tim giãn, trong đó các yếu tố di truyền chiếm khoảng 40% số ca mắc bệnh. Trong đó, các gen *MYH7*, *ACTC*, *TNNI3*, *TNNC1*, *TNNC2*, *TNNT2*, *SCN5A*, *SGCD*, *PLN*, *MYH6*, *TPM1*, *MYL1*, *MYL2*, *MYBPC3*, *TTN*, *TCAP*, *CSRP3*, *DES*, *DMD*, *LMNA*, *ANKRD1*, *SAGD*, *ACTN2*, *LDB3*, *PLB*, *ABCC9*, *SCN5A*, *CRYAB*, *FHL2*, *LMNA4*, *MYPN*, *RBM20*, *MEXN*, *BAG3*, *EMD*, *TAZ*, *FKTN*, *DSP*, *JUP*, *NBLT*, *NRAP* được xác định có vai trò chính [19]. Các gen *GATA4*, *GATA5*, *GATA6*, *TBX5*, *TBX20* cũng được một số nghiên cứu cho thấy có liên quan đến các bệnh cơ tim giãn, rối loạn nhịp tim [20].

Gen *ACTC1* mã hóa α -actin tim (cardiac α -actin), một protein cấu trúc quan trọng kết hợp với tropomyosin và ba loại troponin (C, I, và T) để tạo thành sợi mỏng cơ, kết nối đĩa Z của tế bào cơ tim với sợi dày myosin. *ACTC1* là gen gây bệnh đầu tiên được mô tả liên quan đến bệnh cơ tim giãn không hội chứng, di truyền theo kiểu trội trên nhiễm sắc thể thường và dẫn đến suy tim. Tuy nhiên, cho đến nay, chỉ một số ít đột biến *ACTC1* đã được công bố, chủ yếu nằm ở tiểu vùng 3 của protein [21]. Do gen *ACTC1* đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì tính toàn vẹn cấu trúc và chức năng của tế bào cơ tim, việc mở rộng hiểu biết về sự rối loạn do đột biến *ACTC1* gây ra trong dị tật vách liên nhĩ (ASD - Atrial Septal Defect), suy tim hoặc bệnh tim bẩm sinh có ý nghĩa quan trọng cả về mặt nghiên cứu lẫn lâm sàng.

Đột biến missense và đột biến mất đoạn trên gen *LMNA* chiếm khoảng 5–8% các trường hợp bệnh cơ tim giãn di truyền. Giống như *TTN*, các đột biến *LMNA* được di truyền theo kiểu trội trên nhiễm sắc thể thường. Gen *LMNA* mã hóa hai protein lamin A và lamin C, trong đó sự cắt nối khác biệt (differential splicing) ở đầu 3' tạo ra hai protein có 566 axit amin đầu tiên giống hệt nhau. Đột biến trên *LMNA* có thể gây ra nhiều bệnh lý khác nhau, từ lão hóa sớm, loạn dưỡng cơ và

bệnh cơ tim giãn Các đột biến *LMNA* liên quan đến bệnh cơ tim giãn trội trên nhiễm sắc thể thường bao gồm cả đột biến missense và frameshift, xuất hiện trên toàn bộ vùng mã hóa của gen. Cơ chế chính gây bệnh DCM do đột biến *LMNA* có thể bao gồm sự mất chức năng trội (dominant-negative effect) hoặc giảm một nửa chức năng protein (haploinsufficiency). Các protein lamin A và C đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình tế bào, bao gồm điều hòa biểu hiện gen, cảm nhận cơ học (mechanosensing), nhân đôi DNA, và vận chuyển giữa nhân và bào tương [14]

Gen *PLN* mã hóa phospholamban, một protein xuyên màng gồm 52 axit amin, có chức năng ức chế enzym SERCA (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) khi ở trạng thái chưa được phosphoryl hóa. Nhiều đột biến trội trên gen *PLN* đã được xác định có liên quan đến bệnh cơ tim giãn, trong đó đáng chú ý là đột biến R14del. Kiểu hình lâm sàng của bệnh nhân mang đột biến *PLN* có sự biến đổi đa dạng. Một số trường hợp khởi phát bệnh sớm kèm rối loạn nhịp thất nguy hiểm có thể gây tử vong đã được ghi nhận. Tuy nhiên, nhiều trường hợp mắc bệnh và có mang đột biến này lại biểu hiện kiểu hình nhẹ hơn. Việc cùng một đột biến có thể dẫn đến nhiều kiểu hình bệnh khác nhau tùy thuộc vào bối cảnh di truyền của từng cá nhân, điều này cho thấy các yếu tố di truyền khác có thể ảnh hưởng đến mức độ nghiêm trọng của bệnh do đột biến *PLN* [21][22]

1.3.1. Gen *TTN*

Mặc dù nhiều gen gây bệnh đã được xác định trong hai thập kỷ đầu tiên của kỷ nguyên di truyền, nhưng hiệu suất chẩn đoán của xét nghiệm di truyền lâm sàng đối với bệnh cơ tim giãn vẫn ở mức khá thấp, chỉ khoảng 10%. Tuy nhiên, vào đầu thế kỷ 21 đã đánh dấu một bước ngoặt quan trọng, dẫn đến việc xác định *TTN* là gen có liên quan nhiều nhất đến bệnh cơ tim giãn [23]. Gen Titin, mã hóa cho loại protein lớn nhất trong cơ thể người, có ý nghĩa đặc biệt trong bệnh cơ tim do tần suất đột biến cao và vai trò thiết yếu của nó trong việc duy trì tính toàn vẹn cấu trúc, chức năng cơ học và các quá trình điều hòa của sarcomere trong cơ vân [24].

Gen *TTN*, nằm trên nhiễm sắc thể 2q31, bao gồm 364 exon và mã hóa một protein có khối lượng lên đến 4.200 kDa, gồm khoảng 38.000 axit amin. Kích thước và độ phức tạp cấu trúc của protein *TTN* đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp hỗ trợ kiến trúc cho các sarcomere, đảm bảo sự tổ chức của chúng trong quá trình co cơ và đóng góp vào lực căng thụ động khi cơ bị kéo giãn. Ngoài ra, *TTN* còn có chức năng cảm biến và truyền tín hiệu thông qua sự tương tác với nhiều protein liên kết *TTN*, tập trung tại các điểm tín hiệu chuyên biệt [25].

Ngoài bệnh cơ tim giãn, đột biến trên gen *TTN* còn liên quan đến nhiều rối loạn tim mạch khác, bao gồm bệnh cơ tim chu sản (Peripartum Cardiomyopathy),

một hội chứng không đồng nhất với cơ chế bệnh sinh phức tạp [26]. Gen *TTN* có tỷ lệ cao các đột biến sai nghĩa, từ hiếm gặp đến phổ biến, khiến việc xác định tác động bệnh lý trở nên thách thức. Đặc biệt, các đột biến sai nghĩa trên *TTN* đã được chứng minh có liên quan đến bệnh cơ tim thất phải gây loạn nhịp (Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy), góp phần làm sáng tỏ vai trò quan trọng của *TTN* trong sinh lý bệnh tim mạch [27]. Ngoài ra, các đột biến *TTN* sai nghĩa cũng đã được phát hiện trong bệnh lý cơ xương, bao gồm bệnh loạn dưỡng cơ chày phổ biến [28]. Số lượng đột biến sai nghĩa trên gen *TTN* là rất lớn, khiến cho việc giải thích ý nghĩa bệnh lý của chúng trở nên vô cùng phức tạp, đặc biệt trong bối cảnh xét nghiệm di truyền trên diện rộng ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn.

1.3.2. Gen *MYL3*

Bên cạnh *TTN*, nhiều nghiên cứu cũng tìm ra đột biến trên gen *MYL3* có liên quan trong nhiều trường hợp bệnh nhân mắc bệnh cơ tim. Gen *MYL3* mã hóa myosin light chain 3 (MLC-3), một loại chuỗi nhẹ của myosin thuộc hệ thống cơ cơ. Gen *MYL3* nằm trên nhiễm sắc thể 3p21.31, chiều dài gen khoảng 11,5 kb, đột biến trên *MYL3* đã được xác định là nguyên nhân chính gây bệnh cơ tim phì đại [29] và có liên quan đến một số rối loạn cơ tim khác như bệnh cơ tim hạn chế và bệnh cơ tim giãn [30]. Biến thể của gen *MYL3* được đặc trưng bởi sự thay thế axit amin không bảo toàn, do đó có khả năng ảnh hưởng đến các tính chất như độ phân cực, kích thước và điện tích của cấu trúc protein bậc hai.

Hơn nữa, sự thay thế axit amin xảy ra tại miền liên kết canxi EF-hand, một vùng được bảo tồn cao giữa các loài, dẫn đến thay đổi cấu trúc protein cũng đã được báo cáo [31]. Đột biến trên gen *MYL3* có thể làm thay đổi cấu trúc hoặc chức năng của MLC-3, dẫn đến rối loạn co bóp và gây bệnh cơ tim phì đại hoặc bệnh cơ tim giãn [32]. Nghiên cứu của tác giả Poetter và nhóm cộng sự đã xác định được các đột biến sai nghĩa trên gen *MYL3* gây ra sự giãn nở của tâm thất, đồng thời gây ra bất thường ở cơ xương [31]. Tác giả Olson và nhóm cộng sự cũng tìm ra một biến thể tương tự trên gen *MYL3* ở nhiều thành viên trong cùng một gia đình có tiền sử mắc bệnh cơ tim hạn chế. Biến thể này gây ra sự phì đại thành tâm thất trái tại khoang giữa, kèm theo tắc nghẽn nhẹ trong thì tâm thu và một số đặc điểm khác liên quan đến sinh lý hạn chế [15]. Cho đến hiện tại, hầu hết trong các nghiên cứu về đột biến trên gen *MYL3* đều liên quan đến bệnh cơ tim hạn chế, nghiên cứu này sẽ bổ sung thông tin về sự liên quan giữa đột biến trên gen *MYL3* đến bệnh cơ tim giãn.

1.3.3. Gen *MYH7*

Gen *MYH7*, nằm trên nhiễm sắc thể 14, mã hóa chuỗi nặng β -myosin, một protein quan trọng trong cấu trúc và chức năng co bóp của cơ tim. Mỗi phân tử

myosin loại II trong cơ tim bao gồm hai chuỗi nặng myosin (được mã hóa bởi *MYH7*) và hai cặp chuỗi nhẹ điều hòa (được mã hóa bởi các gen khác). Protein MYH7 có hai vùng chính: vùng đầu (myosin motor domain) và vùng đuôi. Vùng đầu có vai trò quan trọng trong hoạt động co rút của protein, vì nó tương tác trực tiếp với actin và ATP, quyết định chức năng vận động của myosin. Đây cũng là khu vực chứa phần lớn các đột biến, có thể ảnh hưởng đến vị trí liên kết với actin, làm suy giảm chức năng co bóp của cơ tim. Trong khi đó, vùng đuôi của MYH7 chịu trách nhiệm tương tác với các protein khác, bao gồm các vùng đuôi của protein myosin khác. Sự phân bố đột biến chủ yếu trong vùng đầu cho thấy tác động trực tiếp đến hoạt động của myosin, góp phần vào sự phát triển của các bệnh cơ tim di truyền [33]. Đột biến trên gen *MYH7* rất phổ biến ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim phì đại, chiếm khoảng 15% số đột biến được xác định. Ngoài ra, đột biến *MYH7* cũng được báo cáo ở 7% bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn, với hơn 15 đột biến sai nghĩa (missense mutations) đã được xác định là nguyên nhân gây ra bệnh cơ tim giãn [34]. Nhiều nghiên cứu gần đây nhấn mạnh về tần suất xuất hiện đột biến gen *MYH7*, đột biến trên gen *MYH7* là một trong những đột biến phổ biến nhất liên quan tới các rối loạn cơ tim, đột biến *MYH7* chiếm 48% các đột biến gen sarcomere [35]. Nguyên nhân di truyền phổ biến nhất của các rối loạn về tim trong đó có bệnh cơ tim giãn là các đột biến trên các gen sarcomere và một trong số các gen liên quan bao gồm gen *MYH7* được di truyền theo kiểu trội trên nhiễm sắc thể thường [36].

Các biến thể gây bệnh của gen *MYH7* được xem là nguyên nhân di truyền phổ biến thứ hai của bệnh cơ tim phì đại và nguyên nhân di truyền phổ biến thứ ba của bệnh cơ tim giãn [37]. Các biến thể này chủ yếu thuộc loại biến thể sai nghĩa (missense variants) và được di truyền trội, một số biến thể đã được báo cáo là biến thể de novo [38]. Khoảng 2.205 biến thể sai nghĩa của *MYH7* đã được ghi nhận trong cơ sở dữ liệu ClinVar, trong đó có 372 biến thể được xác định là gây bệnh, còn 1.833 biến thể được phân loại là biến thể có ý nghĩa chưa xác định (VUS - Variant of Uncertain Significance) hoặc có kết quả đánh giá mâu thuẫn về khả năng gây bệnh [39][40].

Nghiên cứu này sẽ góp phần cung cấp số liệu có giá trị về các biến thể gen và các gen tiềm năng có thể là nguyên nhân gây bệnh. Sự kết hợp của các phương pháp trên giúp các nhà nghiên cứu và bác sĩ hiểu rõ hơn về nguyên nhân di truyền của bệnh cơ tim giãn, cung cấp thông tin quan trọng để chẩn đoán, điều trị và dự phòng bệnh.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Các bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh cơ tim giãn được thu thập 2 ml mẫu máu ngoại vi tại Bệnh viện Tim Hà Nội. Mẫu máu sau đó được bảo quản trong ống chống đông EDTA và lưu ở -20 độ C.

Thông tin chi tiết của 3 bệnh nhân và người nhà được thể hiện ở Bảng 2.1

Bảng 2.1. Thông tin 3 bệnh nhân và các thành viên trong gia đình.

Thông tin bệnh nhân/ gia đình bệnh nhân	Ký hiệu	Tuổi	Giới tính	Thông tin bệnh nhân
Bệnh nhân 28	HN28	2	Nam	Bệnh nhân nặng 11 kg, là con thứ 2 trong gia đình. Triệu chứng bao gồm khó thở, mệt mỏi kéo dài, rối loạn nhịp nhanh thất, nhịp nhanh trên thất. Buồng thất trái giãn hình cầu, chức năng thất trái giảm 53%, giãn võng van, động mạch vành xuất phát bình thường.
Mẹ bệnh nhân 28	M-HN28		Nữ	Thu thập được mẫu máu ngoại vi, không biểu hiện bệnh
Bố bệnh nhân 28	B-HN28		Nam	Không thu thập được mẫu máu ngoại vi, không biểu hiện bệnh.
Bệnh nhân 59	HN59	15	Nữ	Bệnh nhân nặng 40 kg, gan to, khó thở, suy tim độ 2, buồng tim trái giãn 34%, giãn buồng thất phải, nhĩ 2 bên, hở van 2 lá và van 3 lá nặng.
Mẹ bệnh nhân 59	M-HN59		Nữ	Thu thập được mẫu máu ngoại vi, không biểu hiện bệnh
Bố bệnh nhân 59	B-HN59		Nam	Không thu thập được mẫu máu ngoại vi, không biểu hiện bệnh.
Bệnh nhân 89	HN89	Dưới 1 tuổi	Nam	Buồng tim trái giãn, thành thất trái mỏng, giãn 17%, hở $\frac{3}{4}$ van 2 lá, bệnh nhân chưa biết lẫy. Bệnh nhân khó thở, bú kém và mệt mỏi kéo dài.
Mẹ bệnh nhân 89	M-HN89		Nữ	Thu thập được mẫu máu ngoại vi, không biểu hiện bệnh
Bố bệnh nhân 89	B-HN89		Nam	Thu thập được mẫu máu ngoại vi, không biểu hiện bệnh.

Tất cả bệnh nhân và thành viên gia đình tham gia nghiên cứu đều tự nguyện cung cấp đầy đủ thông tin nhằm hỗ trợ quá trình nghiên cứu. Mục tiêu nghiên cứu đã được truyền đạt rõ ràng đến người tham gia, đảm bảo tuân thủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học theo tiêu chuẩn trong nước và quốc tế. Nghiên cứu này đã nhận được sự đồng ý từ gia đình bệnh nhân và được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, Viện Nghiên cứu Hệ gen, phê duyệt theo Quyết định số 02-2021/NCHG-HĐĐĐ ngày 29/10/2021.

2.2. HÓA CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ

Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Kit tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Đức), bộ kit tạo thư viện giải trình tự gen thế hệ mới Kit Agilent SureSelect XT (Agilent, Mỹ), kit giải trình tự Next Seq 500/550 (Agilent, Mỹ), Tag DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific™), dNTP 10X mix (Thermo Fisher Scientific™), marker DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific™), agarose (Merk, Mỹ), marker DNA 1000 bp (Thermo Fisher Scientific™).

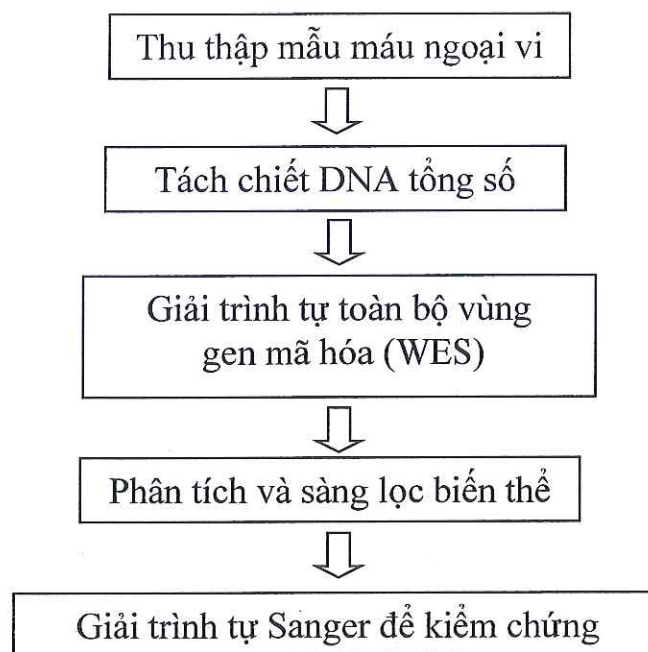
Các thiết bị chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Máy giải trình tự gen thế hệ mới NextSeq 500 (Illumina, Mỹ), máy giải trình tự ABI3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), Máy soi gel và chụp ảnh DigiDoc-It® Imaging System (Ultra-violet production, Mỹ), máy PCR (Eppendorf, Đức), máy ly tâm (Eppendorf, Đức), máy đo huỳnh quang Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), cân kỹ thuật (Ohaus, Mỹ).

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Quá trình tiến hành nghiên cứu sẽ diễn ra theo thứ tự sau:

- Thu thập mẫu máu và tách chiết DNA
- Giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (Whole Exome Sequencing)
- Phân tích kết quả giải trình tự WES để xác định các biến đổi gen trên các gen liên quan ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn
 - Phân tích dữ liệu và sàng lọc biến thể trên các gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn
- Giải trình tự sản phẩm PCR bằng phương pháp Sanger

Các bước trên được mô tả trong Hình 2.1.



Hình 2.1. Các bước chung trong quá trình nghiên cứu

2.3.1. Thu thập mẫu máu và tách chiết DNA

Phương pháp tách chiết DNA và kiểm tra chất lượng các mẫu DNA tổng số thu được từ mẫu máu: DNA tổng số từ các mẫu máu của bệnh nhân và các thành viên trong gia đình được tách chiết bằng bộ kit của QIAGEN, các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu DNA sau đó được kiểm tra chất lượng và đo nồng độ đảm bảo đạt tiêu chuẩn cho giải trình tự WES. DNA sau khi tách chiết được đo nồng độ và kiểm tra chất lượng trước khi bảo quản ở -20°C

Bước 1: Lấy 20 μl QIAGEN Protease (hoặc proteinase K) vào đáy của ống ly tâm 1.5 ml.

Bước 2: Thêm 200 μl mẫu máu toàn phần vào ống ly tâm.

Bước 3: Thêm 200 μl Buffer AL vào ống mẫu. Trộn đều bằng máy vortex trong 15 giây.

Bước 4: Ủ ở 56°C trong 10 phút.

Bước 5: Ly tâm ống mẫu để loại bỏ các giọt chất lỏng bám trên nắp.

Bước 6: Thêm 200 μl ethanol (96–100%) vào ống mẫu và trộn đều lại bằng máy vortex trong 15 giây. Sau khi trộn, ly tâm ống mẫu để loại bỏ chất lỏng bám trên nắp.

Bước 7: Cẩn thận cho hỗn hợp trên vào cột ly tâm QIAamp Mini (trong ống thu 2 ml). Đóng nắp lại và ly tâm ở $6000 \times g$ (8000 rpm) trong 1 phút. Đặt cột ly tâm QIAamp Mini vào ống thu 2 ml sạch (được cung cấp) và loại bỏ ống chứa dịch lọc.

Bước 8: Mở cẩn thận cột ly tâm QIAamp Mini và thêm 500 µl Buffer AW1. Đóng nắp lại và ly tâm ở 6000 x g (8000 rpm) trong 1 phút.

Bước 9: Đặt cột ly tâm QIAamp Mini vào ống thu 2 ml sạch và loại bỏ ống thu chứa dịch lọc.

Bước 10: Mở cẩn thận cột ly tâm QIAamp Mini và thêm 500 µl Buffer AW2. Đóng nắp lại và ly tâm ở tốc độ tối đa (14000 rpm) trong 3 phút.

Bước 11: Đặt cột ly tâm QIAamp Mini vào ống thu 2 ml mới và loại bỏ ống thu cũ với dịch lọc. Ly tâm ở tốc độ tối đa trong 1 phút.

Bước 12: Đặt cột ly tâm QIAamp Mini vào ống vi ly tâm 1.5 ml sạch và loại bỏ ống thu chứa dịch lọc. Mở cẩn thận cột ly tâm QIAamp Mini và thêm 200 µl Buffer AE hoặc nước cất. Ủ ở nhiệt độ phòng (15–25°C) trong 1 phút, sau đó ly tâm ở 6000 x g (8000 rpm) trong 1 phút.

Sau khi có mẫu DNA, mẫu DNA sẽ được điện di. Mẫu được điện di cùng với Marker DNA 100 bp. Mẫu được nhuộm màu trong 3 đến 5 phút và rửa trong 2 đến 3 phút. Cuối cùng, gel được chiếu sáng dưới ánh sáng UV.

2.3.2. Giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (Whole Exome Sequencing)

Xây dựng và kiểm tra chất lượng của thư viện DNA cho giải trình tự WES: Thư viện DNA của bệnh nhân được chuẩn bị bằng cách sử dụng bộ kit Agilent SureSelect XT. Thư viện này đã được kiểm tra đánh giá chất lượng đạt yêu cầu cho giải trình tự WES trước khi tiến hành nghiên cứu. Quá trình giải trình tự được thực hiện với bộ kit Next Seq 500/550 trên hệ thống máy giải trình tự của Illumina.

2.3.3. Phân tích kết quả giải trình tự WES để xác định các biến đổi gen trên các gen liên quan ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn

Kiểm định chất lượng đọc là một bước quan trọng nhằm đảm bảo độ chính xác cho các phân tích tiếp theo. Điểm chất lượng (Phred quality score) phản ánh mức độ tin cậy của mỗi nucleotide, tỷ lệ Q30 phải duy trì trên 80% và tỷ lệ Q20 phải trên 95%, được tính theo công thức:

$$Q = -10 \log_{10}(\text{tỷ lệ lỗi})$$

Trong đó

- Q10: Độ chính xác gọi tên nucleotide đạt 90%
- Q20: Độ chính xác gọi tên nucleotide đạt 99%
- Q30: Độ chính xác gọi tên nucleotide đạt 99,9%

Xử lý dữ liệu: Sau khi giải trình tự trên hệ thống máy Illumina, chất lượng dữ liệu thô được kiểm tra bằng phần mềm FastQC. Các đoạn đọc paired-end được căn chỉnh với bộ gen tham chiếu của người (GRCh37/hg19) sử dụng phần mềm BWA 0.7.10.

Kiểm định chất lượng: Quá trình phân tích dữ liệu bắt đầu bằng việc gióng hàng (alignment) các đoạn đọc ngắn (reads) với hệ gen tham chiếu. Trong trường hợp này, bộ gen tham chiếu được sử dụng là hg19, phiên bản bộ gen người được công bố bởi UCSC Genome Browser. Một trong những công cụ phổ biến nhất để thực hiện nhiệm vụ này là BWA (Burrows-Wheeler Aligner). Việc sử dụng công cụ này giúp xác định vị trí của các đoạn đọc trên bộ gen tham chiếu hg19, từ đó tạo ra một tệp SAM/BAM, giúp so sánh và phân tích biến thể di truyền.

Sau khi các đoạn đọc (reads) từ WES được gióng hàng với bộ gen tham chiếu bằng BWA, dữ liệu đầu ra thường ở định dạng SAM/BAM. Trước khi tiếp tục với phân tích biến thể, dữ liệu này cần được làm sạch và tối ưu hóa bằng phần mềm Picard. Những thao tác này giúp đảm bảo dữ liệu sạch, chính xác, nâng cao chất lượng phát hiện đột biến và tối ưu hóa kết quả nghiên cứu.

Bên cạnh đó, công cụ Genome Analysis Toolkit (GATK) đã được sử dụng, đây là một bộ công cụ phần mềm được phát triển tại Viện Broad để phân tích dữ liệu sequencing thông số cao. Bộ công cụ này cung cấp một loạt các công cụ đa dạng, tập trung chủ yếu vào việc khám phá biến thể.

SnEff là một công cụ được sử dụng để chú thích và dự đoán tác động của các biến thể di truyền. Phần mềm này có khả năng phân loại các biến đổi gen theo mức độ ảnh hưởng đến chức năng của chúng, từ đó đánh giá tác động tiềm tàng lên hệ gen. Đặc biệt, SnEff hỗ trợ phân tích sự thay đổi của axit amin trong protein, giúp xác định các biến thể có thể ảnh hưởng đến hoạt động sinh học của gen. Khi sử dụng SnEff, hệ thống có thể tạo ra các kết quả sau:

- Các gen và các transcripts bị ảnh hưởng bởi biến thể
- Vị trí của các biến thể
- Cách biến thể ảnh hưởng đến tổng hợp protein (ví dụ: tạo ra một mã stop)
- So sánh với các cơ sở dữ liệu khác để tìm các biến thể đã biết có sẵn

2.3.4. Sàng lọc biến thể trên các gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn

Sau khi phân tích, các biến thể được sàng lọc theo các tiêu chí sau:

- Biến thể xảy ra trên các gen được xác định là có liên quan đến bệnh cơ tim giãn
- Biến thể có tần suất xuất hiện <1%;

- Dự đoán biến thể ảnh hưởng đến chức năng protein
- Các biến thể được báo cáo là không có hại trên cơ sở dữ liệu ClinVar được loại bỏ
- Tổng số gene được sàng lọc thể hiện tại Phụ lục

2.3.5. PCR (Phản ứng chuỗi polymerase)

Thiết kế môi để khuếch đại đoạn DNA chứa điểm biến đổi gen trên công cụ Primer-BLAST. Các primer này có chiều dài khoảng 20 nucleotides.

DNA tổng số được sử dụng làm khuôn cho PCR với các cặp môi đã thiết kế và tổng hợp. PCR được tiến hành thực hiện trong tổng thể tích 50 μ l bao gồm 1x Dream Taq Buffer, 10 mM dNTP, 10 pmol mỗi môi, 0.5U Dream Taq DNA polymerase và 40 - 100 ng DNA khuôn. Nhiệt độ gắn môi tùy thuộc vào cặp môi tương ứng.

Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt sau:

95°C	12 phút	} 35 chu kỳ
95°C	45 giây	
Tm (tùy thuộc từng cặp môi)	45 giây	
72°C	45 giây	
72°C	8 phút	

Sau khi PCR, sản phẩm sẽ được điện di trên gel agarose với DNA Marker 1kb để kiểm tra chất lượng và độ đặc hiệu. Bản gel được nhuộm trong 10 phút và rửa trong 5 phút. Cuối cùng, gel sẽ được chiếu sáng dưới ánh sáng UV để hiện band. Sản phẩm PCR đạt chất lượng được lưu trữ ở nhiệt độ -20°C sử dụng cho giải trình tự Sanger.

Các cặp môi cho phản ứng được thiết kế bằng phần mềm Primer Blast với trình tự và thông tin được trình bày ở Bảng 2.2.

Bảng 2.2: Thông tin các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Bệnh nhân	Mồi	Trình tự	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	T _m (°C)
HN89	TTN_250	F: 5'- TGTGGGTAGGGCTTGCTAGA - 3'	545	60
		R: 5'- GTGAATATGCTTGCGGGGT - 3'		
	TTN_296	F: 5'- CTGAGTAACGGCCAGTGAGG - 3'	615	57
		R: 5'- GCTATTTATGGGAGCAGAGAGT - 3'		
HN59	MYH7	F: 5'- TCCGACTGCGACTCCTCATA - 3'	450	60
		R: 5'- TTCCTCTTGTCCCCATCCAC - 3'		
HN28	TTN	F: 5' – TTGTTGACAGGGACCCATCG – 3'	515	60
		R: 5' – GTTACGGCAACTAACACGGC – 3'		
	MYL3	F: 5' – GATGTCCCTGGAAGGAGTTGG – 3'	352	59
		R: 5' – ACTGCTGTGAGAACTGGTGTAG – 3'		

2.3.6. Giải trình tự sản phẩm PCR bằng phương pháp Sanger

Trình tự DNA của các đoạn gen được xác định bằng máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3500, sử dụng bộ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Kết quả giải trình tự được phân tích trên phần mềm Clustal X2 và BioEdit 7.0 để phát hiện các biến thể so với trình tự gen tham chiếu. Chuẩn bị phản ứng PCR đọc trình tự: Phản ứng khuếch đại được thiết lập trong tổng thể tích 10 µl, bao gồm:

- 3,2 pmol mồi (primer)
- 50 ng DNA khuôn
- BigDye Terminator v3.1
- Đệm phản ứng tương ứng

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng phương pháp rửa Ethanol/EDTA như sau:

- Thêm 5 µl EDTA 125 mM và 60 µl Ethanol 100%, ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút.
 - Ly tâm ở 12.000 rpm trong 15 phút để thu rửa DNA.
 - Rửa rửa DNA bằng 60 µl Ethanol 70%, sau đó ly tâm 10.000 rpm trong 10 phút.
 - Loại bỏ Ethanol và làm khô rửa DNA.
- Xử lý mẫu trước khi điện di mao quản:
- Hòa tan rửa DNA trong 10 µl Hi-di Formamide.

- Biến tính DNA ở 95°C trong 5 phút, sau đó làm lạnh nhanh.
- Nạp mẫu vào giếng trên khay đựng mẫu.

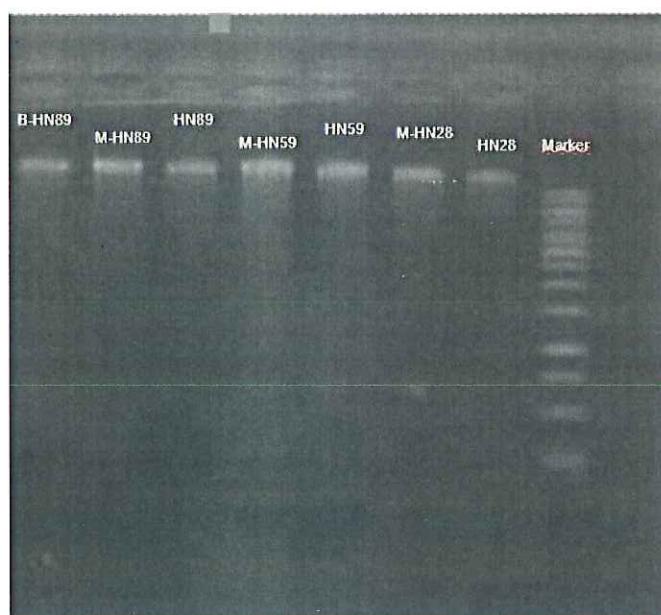
Điện di mao quản và đọc trình tự: Điện di được thực hiện trên hệ thống ABI PRISM 3500 với ống mao quản 50 cm x 50 μ m, sử dụng polymer POP-7 làm dung dịch điện di. Trình tự nucleotide của mỗi mẫu được xác định theo cả hai chiều (xuôi và ngược) để đảm bảo độ chính xác.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu thập mẫu máu và tách chiết DNA tổng số

Đề tài đã thu thập mẫu máu của 3 bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn bẩm sinh và các thành viên trong gia đình bệnh nhân bao gồm bố và mẹ của bệnh nhân.

Mẫu máu thu thập từ các bệnh nhân và thành viên trong gia đình được xử lý để tách chiết DNA bằng bộ kit QIAamp DNA, một phương pháp hiệu quả giúp thu được DNA có chất lượng cao. Quá trình tách chiết được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất để đảm bảo thu nhận được DNA tổng số với độ tinh sạch và nồng độ phù hợp cho các phân tích di truyền tiếp theo. Sản phẩm DNA tổng số của các mẫu được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra chất lượng và độ tinh sạch cần thiết cho giải trình tự WES và Sanger. Kết quả chạy điện di DNA tổng số được thể hiện trong Hình 3.1.



Hình 3.1: Ảnh chụp kết quả chạy điện di DNA tổng số.

DNA tổng số được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose và đo OD ở bước sóng 260 và 280 nm để xác định nồng độ và độ tinh sạch. DNA tổng số thu được đều có nồng độ cao, nguyên vẹn và có độ tinh sạch cao thể hiện qua các dải band sáng rõ. Nồng độ các mẫu đều lớn hơn 20 ng/μl và giá trị A260/280 của các mẫu đo bằng máy Qubit 2.0 Fluorometer đều nằm trong khoảng 1,8 – 2. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được thể hiện ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA

Mẫu	Nồng độ (ng/μl)	A260/A280
HN28	30,12	1,95
HN59	29,64	1,88
HN89	36,43	1,87

3.2. Kết quả giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa

3.2.1. Kết quả tạo thư viện DNA

Quá trình chuẩn bị thư viện DNA với các mảnh DNA đã được gắn adapter là bước đầu tiên và cũng là một trong những giai đoạn quan trọng nhất trong quy trình giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS). Đây là bước quyết định sự thành công của thí nghiệm cũng như ảnh hưởng trực tiếp đến độ tin cậy của kết quả thu được. Một thư viện DNA đạt chuẩn cần đảm bảo hai yếu tố quan trọng:

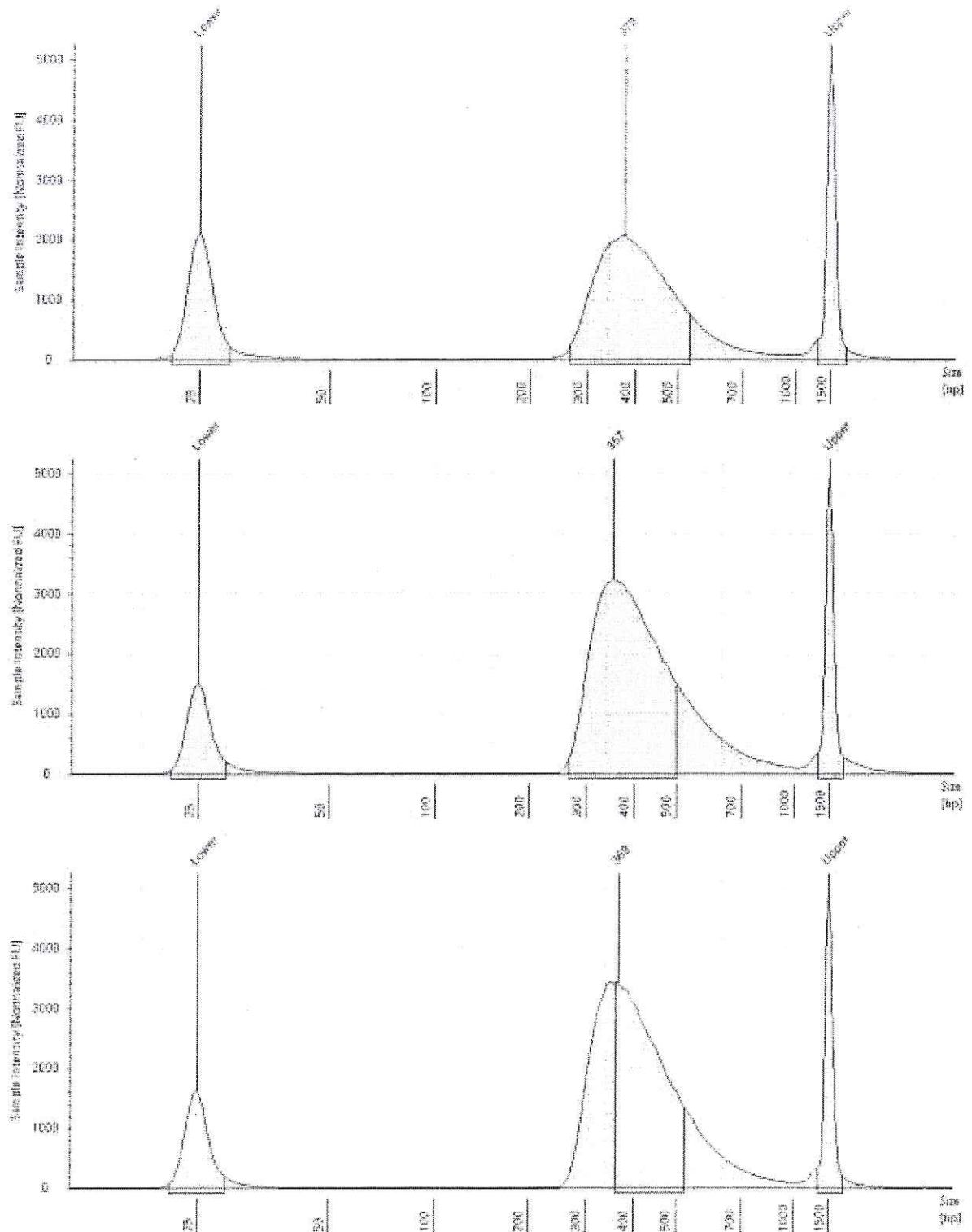
- Nồng độ DNA cao, đủ để đáp ứng yêu cầu của hệ thống giải trình tự.
- Phân bố kích thước của các mảnh DNA nằm trong khoảng phù hợp, tránh tình trạng các đoạn quá dài hoặc quá ngắn, có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của quá trình giải trình tự.

Trong nghiên cứu này, nồng độ của các mảnh DNA sau khi chuẩn bị thư viện đã được kiểm tra chất lượng và thể hiện chi tiết trong Bảng 3.2, Hình 3.2. Dữ liệu này giúp đánh giá chất lượng thư viện trước khi tiến hành các bước tiếp theo, đảm bảo mẫu đạt tiêu chuẩn cho quá trình giải trình tự với độ chính xác và hiệu quả cao nhất.

Bảng 3.2. Kích thước và nồng độ thư viện DNA

Mẫu	Nồng độ (ng/μl)	Kích thước (bp)
HN28	30,909	379
HN59	32,109	357
HN89	28,093	369

Như vậy, thư viện DNA tạo ra có nồng độ cao đạt chất lượng tốt, kích thước thư viện phù hợp với yêu cầu của thiết bị giải trình tự với các đoạn DNA sau khi được phân mảnh có kích thước nằm trong khoảng từ 250 – 500 bp.



Hình 3.2. Kết quả kiểm tra chất lượng thư viện của các bệnh nhân

3.2.2. Kết quả giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa

Trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của 03 bệnh nhân đã được xác định bằng hệ thống giải trình tự Illumina NextSeq 500. Chất lượng dữ liệu sau giải trình tự được đánh giá kỹ lưỡng bằng phần mềm FastQC, đảm bảo độ tin cậy trước khi tiến hành phân tích tiếp theo.

Dữ liệu thu được từ hệ thống giải trình tự thế hệ mới có dung lượng lớn, đảm bảo độ dài đồng đều của các đoạn đọc (~150 bp mỗi đoạn) và đạt độ sâu bao phủ cao (>150X cho mỗi mẫu), giúp tăng độ chính xác trong phân tích. Chất lượng dữ liệu giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa được đánh giá ở mức tốt, với tỷ lệ nucleotide có điểm chất lượng cao đạt mức tối ưu:

- Q20 > 96%, cho thấy hơn 96% nucleotide có xác suất chính xác $\geq 99\%$.
- Q30 > 91%, đảm bảo hơn 91% nucleotide có độ chính xác $\geq 99.9\%$, đáp ứng tiêu chuẩn nghiêm ngặt trong phân tích di truyền.

Các thông số chi tiết về chất lượng giải trình tự của bệnh nhân mắc bệnh được thống kê cụ thể trong Bảng 3.3, cung cấp thông tin trực quan về mức độ tin cậy của dữ liệu thu được.

Bảng 3.3. Thông tin đọc trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của 3 bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn

	HN28	HN59	HN89
Tổng số đoạn đọc	44.511.740	50.822.084	44.228.690
Tổng số nucleotide (bp)	6.600.583.864	7.559.812.848	6.597.351.011
%GC	49,7	49,4	49,2
Q20 (%)	97,5	96,8	96,6
Q30 (%)	93,3	91,7	91,2
Độ dài đoạn đọc trung bình (bp)	150	148,75	150

Kết quả ở Bảng 3.3 cho thấy dữ liệu được tạo ra từ máy giải trình tự thế hệ mới có dung lượng cao, chất lượng tốt, tỉ lệ nucleotide có điểm chất lượng lớn hơn 20 cao (Q20 > 96%, Q30 > 91%).

3.3. Kết quả xử lý số liệu và chú giải biến thể

3.3.1. Dóng hàng dữ liệu với hệ gen tham chiếu

Trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của 3 bệnh nhân cơ tim giãn được căn chỉnh với hệ gen tham chiếu GRCh37 bằng công cụ BWA (Burrows-Wheeler Aligner). Kết quả phân tích đã phát hiện một số lượng lớn các biến thể trên các gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn trong dữ liệu WES.

Các biến thể được phân loại theo mức độ ảnh hưởng chức năng, bao gồm:

- Biến thể đồng nghĩa (không làm thay đổi trình tự axit amin),
- Biến thể sai nghĩa (dẫn đến thay đổi axit amin trong protein),

- Biến thể thêm/mất một bộ ba mã hóa kết thúc,
- Biến thể dịch khung (frameshift) gây thay đổi tất cả trình tự protein,
- Biến thể thêm/mất bộ ba mã hóa ảnh hưởng đến độ dài và cấu trúc protein

Để đánh giá tác động của các đột biến, các phần mềm dự đoán ảnh hưởng biến thể đã được sử dụng, bao gồm MutationTaster, Provean, SIFT, PolyPhen-2... Các công cụ tin sinh học này phân tích từng đột biến và cung cấp điểm đánh giá nhằm dự đoán khả năng gây bệnh của các biến thể, từ đó hỗ trợ quá trình nhận diện các đột biến có ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng của protein. Kết quả phân tích căn chỉnh dữ liệu được trình bày trong Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả sắp hàng các mẫu giải trình tự với hệ gen tham chiếu

	HN28	HN59	HN89
Số đoạn trình tự sắp hàng thành công	44.463.727 (99,8%)	50.740.232 (99,8%)	44.163.896 (99,8%)
Số đoạn trình tự được sắp hàng vào vùng mã hóa	28.694.052 (76,2%)	31.399.122 (68%)	27.900.197 (68,8%)
Tỉ lệ độ sâu bao phủ >50X (%)	61,8	67,9	61,1%
Độ sâu bao phủ trung bình trong vùng exone (X)	69,2	74,7	66,3

Kết quả sắp hàng dữ liệu giải trình tự của các bệnh nhân với hệ gen tham chiếu cho thấy chất lượng cao, với tỉ lệ sắp hàng thành công đạt 99,8%. Bên cạnh đó, tỉ lệ đoạn dữ liệu được sắp hàng nằm trong vùng exon chiếm tỷ lệ cao trên 68%, đảm bảo độ chính xác trong phân tích biến thể. Sau quá trình sắp hàng, phần lớn dữ liệu có mức độ bao phủ trên 50X, giúp tăng độ tin cậy trong việc phát hiện và phân tích các biến thể di truyền.

3.3.2. Chú giải biến thể và xác định biến thể

Chú giải biến thể: Nhiều công cụ khác nhau đã được phát triển để phát hiện biến thể từ dữ liệu giải trình tự thế hệ mới (NGS), trong đó mỗi công cụ có ưu thế riêng đối với từng loại dữ liệu cụ thể. Trong nghiên cứu này, quy trình xử lý dữ liệu sử dụng bộ công cụ Picard/GATK nhằm đảm bảo độ chính xác trong việc phát hiện biến thể.

Phần mềm Picard được sử dụng để xử lý dữ liệu sau quá trình sắp hàng, bao gồm các bước như hiệu chỉnh chất lượng từng nucleotide, sắp xếp dữ liệu, loại bỏ các đoạn lặp, đồng thời lọc bỏ những đoạn trình tự không được sắp hàng hoặc có độ tin cậy thấp. Sau đó, phần mềm GATK được sử dụng để phát hiện các biến thể có trong hệ gen của từng bệnh nhân. Ngoài ra, để đánh giá ảnh hưởng của những biến đổi trình tự nucleotide lên sự thay đổi của amino acid, phần mềm SnpEff được áp dụng. Kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 3.5, cung cấp thông tin chi tiết về các biến thể được xác định trong nghiên cứu.

Bảng 3.5. Kết quả phân tích và dự đoán biến thể trong vùng gen mã hóa của 3 bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn

Thông số	HN28	HN59	HN89
Tổng số biến thể	92.713	94.133	95.146
Tổng số biến thể đồng nghĩa	11.888	11.683	11.400
Tổng số biến thể sai nghĩa	12.553	11.368	10.475
Tổng số biến thể thêm bộ ba kết thúc	102	75	74

Sàng lọc biến thể: Mỗi bệnh nhân có thể mang một số lượng lớn các biến thể gen, trong đó phần lớn là các biến thể lành tính. Vì vậy, cần có một quy trình sàng lọc chặt chẽ để xác định những biến thể có tiềm năng là nguyên nhân gây bệnh. Danh sách 128 gen (Phụ lục) được sử dụng để sàng lọc bao gồm các gen đã được xác nhận liên quan đến bệnh cơ tim giãn, cũng như một số gen liên quan đến các rối loạn cơ tim khác. Sau quá trình sàng lọc, các biến thể nằm trong vùng exon của các gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn bẩm sinh được chọn để phân tích và phân thành hai nhóm chính dựa trên tần số alen. Nhóm đột biến bao gồm các biến thể có tần số alen $\leq 1\%$, đây là những biến thể hiếm có khả năng liên quan đến bệnh lý, trong khi nhóm đa hình nucleotide đơn (SNP - Single Nucleotide Polymorphism) bao gồm các biến thể có tần số alen $> 1\%$, thường phổ biến hơn trong quần thể. Tần số alen nhỏ nhất (MAF - Minor Allele Frequency) của các biến thể được xác định dựa trên dữ liệu từ cơ sở dữ liệu 1000 Genome Phase 3 nhằm hỗ trợ việc phân loại và đánh giá mức độ ảnh hưởng của các biến thể đến bệnh lý. Kết quả sàng lọc biến thể của ba bệnh nhân được trình bày trong Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Kết quả sàng lọc biến thể trong những gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn

Bệnh nhân	Tổng số biến thể trên các gen liên quan	Số biến thể trong exon của các gen sau khi sàng lọc
HN28	758	10
HN59	1140	8
HN89	1710	10

Tổng số biến thể xảy ra trong 128 gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn là rất lớn. Tuy nhiên, hầu hết các biến thể này xảy ra tại vùng intron, có rất ít biến thể xảy ra tại vùng exon.

Sau khi thực hiện sàng lọc các gen liên quan đến bệnh bằng các công cụ tin sinh, kết quả cụ thể là ở bệnh nhân HN28 có 10 biến thể xảy ra tại vùng exon và vùng giáp ranh exon-intron, bệnh nhân HN59 có 8 biến thể xảy ra tại vùng exon và bệnh nhân HN89 có 10 biến thể xảy ra tại vùng exon (Bảng 3.7).

Bảng 3.7. Danh sách các biến thể trên vùng exon và vùng giáp ranh exon-intron của những gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn ở 3 bệnh nhân

STT	NST	Loại biến thể	Tên gen	HGVS.c	HGVS.p
Bệnh nhân HN28					
1	Chr1	Sai nghĩa	<i>NOTCH2</i>	c.17_18delCC	p.Pro6fs
2	Chr2	Sai nghĩa	<i>TTN</i>	c.62969T>A	p.Asp20990Val
3	Chr3	Sai nghĩa	<i>FANCD2</i>	c.1278+1delG	.
4	Chr3	Sai nghĩa	<i>MYL3</i>	c.413G>A	p.Arg138Gln
5	Chr 4	Sai nghĩa	<i>RBPJ</i>	c.-57-2A>C	.
6	Chr6	Sai nghĩa	<i>FOXC1</i>	c.1359_1361dupCGG	p.Gly454dup
7	Chr7	Dịch khung	<i>LFNG</i>	c.163_166dupGATG	p.Glu56fs
8	Chr11	Sai nghĩa	<i>PTPRJ</i>	c.1252C>T	p.Arg418Cys

9	Chr16	Sai nghĩa	<i>FOXL1</i>	c.976_990delGGG ATCCCCTTCCTC	p.Gly326_Leu330del
10	Chr18	Sai nghĩa	<i>DTNA</i>	c.1184delG	p.Ser395fs
Bệnh nhân HN59					
1	Chr1	Sai nghĩa	<i>OBSCN</i>	c.6143A>G	p.His2048Arg
2	Chr2	Sai nghĩa	<i>PLB1</i>	c.2122A>G	p.Met708Val
3	Chr2	Sai nghĩa	<i>TTN</i>	c.105384A>G	p.Ala35128Ala
4	Chr9	Sai nghĩa	<i>FOXD4</i>	c.1288A>G	p.Ser430Gly
5	Chr10	Sai nghĩa	<i>NRAP</i>	c.4696C>T	p.Arg1566Cys
6	Chr12	Sai nghĩa	<i>PKP2</i>	c.1421C>T	p.Ala474Val
7	Chr14	Sai nghĩa	<i>MYH7</i>	c.4304C>G	p.Ser1435Cys
8	Chr15	Sai nghĩa	<i>ACTC1</i>	c.959C>G	p.Thr320Ser
Bệnh nhân HN89					
1	Chr1	Sai nghĩa	<i>OBSCN</i>	c.10061T>G	p.Leu3354Arg
2	Chr1	Sai nghĩa	<i>ACTN2</i>	c.95delC	p.Pro32fs
3	Chr1	Sai nghĩa	<i>RYR2</i>	c.4094C>T	p.Ala1365Val
4	Chr2	Sai nghĩa	<i>PLB1</i>	c.3953C>T	p.Ala1318Val
5	Chr2	Sai nghĩa	<i>TTN</i>	c.46489G>T	p.Val15497Phe
6	Chr2	Sai nghĩa	<i>TTN</i>	c.58037T>C	p.Val19346Ala

7	Chr3	Sai nghĩa	<i>PARP3</i>	c.320A>G	p.His107Arg
8	Chr6	Sai nghĩa	<i>DSP</i>	c.320A>G	p.His107Arg
9	Chr9	Sai nghĩa	<i>FOXD4</i>	c.614C>T	p.Pro205Leu
10	Chr10	Sai nghĩa	<i>NRAP</i>	c.1079A>G	p.Gln360Arg

Để đánh giá ảnh hưởng của biến thể để tìm ra biến thể có tiềm năng gây bệnh cơ tim giãn, các biến thể đã được báo cáo là lành tính trên cơ sở dữ liệu ClinVar đã bị loại bỏ nhằm tập trung vào các biến thể có khả năng gây bệnh. Từ những biến thể trong các gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn bẩm sinh ở Bảng 3.7 những biến thể còn lại được đánh giá bằng các phần mềm SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster, Provean và được đối chiếu trên cơ sở dữ liệu dbSNP138 và dbSNP142. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của đột biến bằng các công cụ tin sinh được thể hiện ở Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các biến thể ở bệnh nhân HN28, HN59 và HN89 bằng các công cụ tin sinh.

Trạng thái	Tên gen	Vị trí trên cDNA	Vị trí trên protein	dbSNP 138	SIFT	Polyphen/PROVEAN	Mutation Taster
Bệnh nhân HN28 (đánh giá biến thể bằng SIFT, Polyphen và Mutation Taster)							
HET	<i>NOTCH2</i>	c.17_18delC	p.Pro6fs	rs372504208	.	D	P
HET	<i>TTN</i>	c.62969T>A	p.Asp20990 Val	.	D	D	D
HET	<i>FANCD2</i>	c.1278+1del G	.	.	.	P	.
HET	<i>MYL3</i>	c.413G>A	p.Arg138Gln	.	D	D	D
HET	<i>RBPJ</i>	c.-57-2A>C	.	rs200707132	D	D	N
HOM	<i>FOXC1</i>	c.1359_1361dupCGG	p.Gly454dup	rs398123612	D	D	N
HOM	<i>LFNG</i>	c.163_166dupGATG	p.Glu56fs	rs34637446	.	D	P
HET	<i>PTPRJ</i>	c.1252C>T	p.Arg418Cys	rs377560733	D	P	.

HET	<i>FOXL1</i>	c.976_990del lGGGATCC CCTTCCT C	p.Gly326_Le u330del	.	.	D	.
HET	<i>DTNA</i>	c.1184delG	p.Ser395fs	.	.	D	.
Bệnh nhân HN59 (đánh giá biến thể bằng SIFT, PROVEAN và Mutation Taster)							
HOM	<i>OBSCN</i>	c.6143A>G	p.His2048Ar g	rs1188724	.	.	P
HET	<i>PLB1</i>	c.2122A>G	p.Met708Val	rs11681826	T	N	P
HET	<i>TTN</i>	c.100096G> A	p.Val33366Il e	rs55675869	T	D	N
HET	<i>FOXD4</i>	c.1288A>G	p.Ser430Gly	rs4742632	T	N	P
HET	<i>NRAP</i>	c.4696C>T	p.Arg1566Cy s	rs1885434	D	D	P
HET	<i>PKP2</i>	c.1421C>T	p.Ala474Val	rs373399921	T	N	N
HET	<i>MYH7</i>	c.4304C>G	p.Ser1435Cy s	.	D	N	D
HET	<i>ACTC1</i>	c.959C>G	p.Thr320Ser	.	.	N	D
Bệnh nhân HN89 (đánh giá biến thể bằng SIFT, PROVEAN và Mutation Taster)							
HOM	<i>OBSCN</i>	c.10061T>G	p.Leu3354Ar g	.	T	D	N
HOM	<i>ACTN2</i>	c.95delC	p.Pro32fs	rs11355106	.	.	.
HET	<i>RYR2</i>	c.4094C>T	p.Ala1365Va l	rs373261115	T	N	N
HET	<i>PLB1</i>	c.3953C>T	p.Ala1318Va l	rs2199619	D	N	P
HET	<i>TTN</i>	c.46489G>T	p.Val15497P he	rs371299188	D	D	D
HET	<i>TTN</i>	c.58037T>C	p.Val19346A la	.	T	D	N
HOM	<i>PARP3</i>	c.320A>G	p.His107Arg	rs28547534	.	.	.

HET	DSP	c.320A>G	p.His107Arg	rs28547534	.	.	.
HET	FOXD4	c.614C>T	p.Pro205Leu	rs2492215	T	D	N
HET	NRAP	c.1079A>G	p.Gln360Arg	rs3127106	D	N	P

SIFT (D: damage, T: tolerated), *Polyphen* (D: damage, P: probably damage), *PROVEAN* (D: damage, N: neutral), *Mutation Taster* (D: damage, P: polymorphism, N: neutral).

Phần mềm SIFT đánh giá tác động của biến thể dựa trên SIFT Score, với giá trị nằm trong khoảng từ 0 đến 1. Giá trị SIFT Score càng nhỏ, biến thể càng có khả năng gây hại. Cụ thể:

- Nếu SIFT Score > 0,05, biến thể được đánh giá là lành tính (Tolerated - T).
- Nếu SIFT Score < 0,05, biến thể được đánh giá là gây bệnh (Damaging - D).

Phần mềm PolyPhen-2 sử dụng PolyPhen Score (trong khoảng 0 đến 1) để dự đoán mức độ ảnh hưởng của đột biến. Giá trị PolyPhen Score càng lớn, khả năng đột biến gây hại càng cao:

- Benign (B) – Lành tính: PolyPhen Score < 0,452.
- Possibly Damaging (P) – Có khả năng gây bệnh: $0,453 \leq \text{PolyPhen Score} \leq 0,956$.
- Probably Damaging (D) – Gây bệnh: PolyPhen Score > 0,956.

Phần mềm PROVEAN xác định tác động của đột biến dựa trên ngưỡng -2,5:

- Nếu PROVEAN Score > -2,5: đột biến được đánh giá là lành tính (Neutral - N).
- Nếu PROVEAN Score < -2,5: đột biến được đánh giá là gây bệnh (Deleterious - D).

Phần mềm Mutation Taster xác định biến thể trong giá trị từ 0 đến 1. Mức độ ảnh hưởng của biến thể tăng dần theo giá trị output của phần mềm từ 0 đến 1. Giá trị 1 thể hiện mức độ ảnh hưởng cao nhất của biến thể đến protein.

- Disease-causing (Gây bệnh): Biến thể có khả năng gây bệnh cao.
- Disease-causing automatic (Gây bệnh - tự động xác định): Biến thể đã được báo cáo là gây bệnh trong cơ sở dữ liệu.
- Polymorphism (Đa hình - không gây bệnh): Biến thể lành tính.
- Polymorphism automatic (Đa hình - tự động xác định): Biến thể đã được xác nhận là không gây bệnh trong cơ sở dữ liệu.
- Neutral (trung tính): Nhiều khả năng không gây bệnh tuy nhiên cần đối chiếu lại

Như vậy, kết quả phân tích Bảng 3.8 cho thấy bệnh nhân HN28 mang 2 biến thể dạng dị hợp tử là c.62969T>A trên gen *TTN* và c.413G>A trên gen *MYL3*; Bệnh nhân HN59 mang 1 biến thể dạng dị hợp tử là c.4304C>G trên gen *MYH7*; Bệnh nhân HN89 mang 2 biến thể dạng dị hợp tử là c.46489G>T và c.58037T>C trên cùng 1 gen *TTN* có tiềm năng gây bệnh cao ở các bệnh nhân. Thông tin biến thể được tổng hợp trong Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Danh sách biến thể của 3 bệnh nhân HN28, HN59, HN89

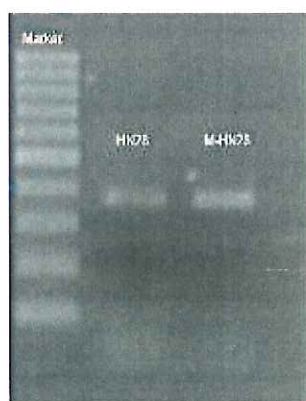
Bệnh nhân	Gen	NST	HGVS.p	HGVS.c	Loại đột biến	Trạng thái
HN28	<i>TTN</i>	Chr2	c.62969T>A	p.Asp20990Val	Sai nghĩa	Dị hợp tử
HN28	<i>MYL3</i>	Chr3	c.413G>A	p.Arg138Gln	Sai nghĩa	Dị hợp tử
HN59	<i>MYH7</i>	Chr14	c.4304C>G	p.Ser1435Cys	Sai nghĩa	Dị hợp tử
HN89	<i>TTN</i>	Chr2	c.46489G>T	p.Val15497Phe	Sai nghĩa	Dị hợp tử
HN89	<i>TTN</i>	Chr2	c.58037T>C	p.Val19346Ala	Sai nghĩa	Dị hợp tử

3.4. Kiểm chứng biến thể bằng Sanger Sequencing

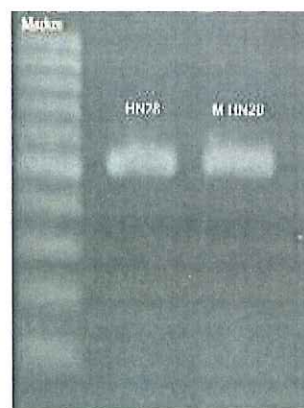
3.4.1. Bệnh nhân HN28

Phân tích WES cho thấy bệnh nhân HN28 mang hai biến thể dị hợp tử: c.62969T>A (p.Asp20990Val) trên gen *TTN*, dẫn đến sự thay thế Aspartic acid bằng Valine tại vị trí 20990 của protein; và c.413G>A (p.Arg138Gln) trên gen *MYL3*, làm thay đổi Arginine thành Glutamine tại vị trí 138 của protein.

Đoạn gen *TTN* có kích thước 515 bp mang biến thể c.62969T> và đoạn gen *MYL3* có kích thước 352 bp mang biến thể c.413G>A được khuếch đại thông qua phản ứng PCR (Hình 3.3). Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy sản phẩm PCR hoàn toàn đặc hiệu và có kích thước phù hợp với thiết kế.



Gen *MYL3*

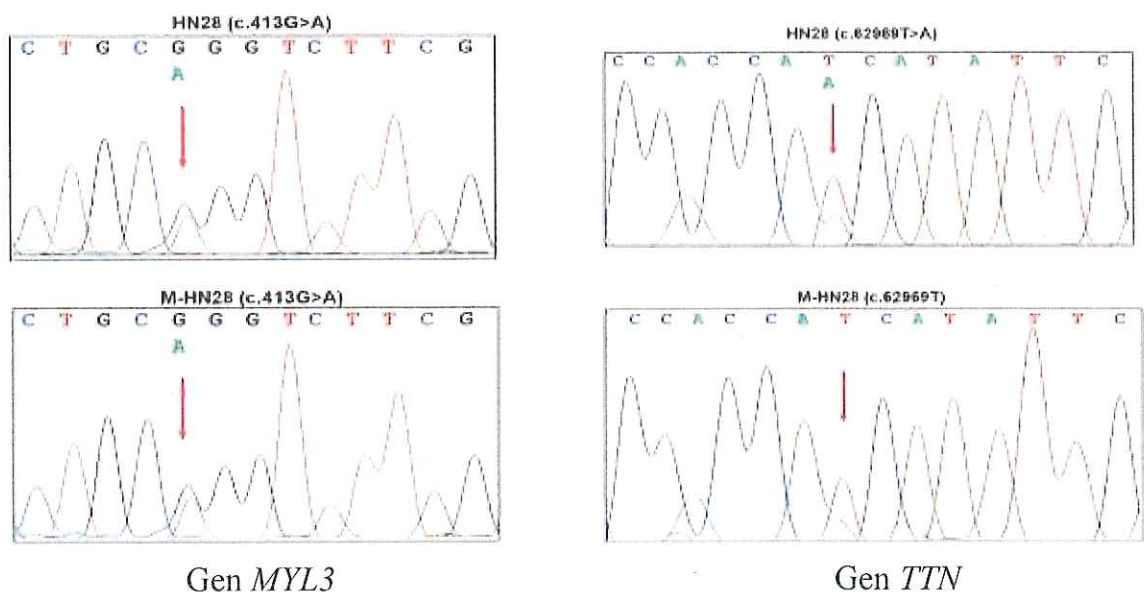


Gen *TTN*

Hình 3.3: Kết quả khuếch đại đoạn gen *TTN* và *MYL3* trên gia đình bệnh nhân HN28

Sau khi giải trình tự Sanger, kết quả cho thấy cho thấy bệnh nhân HN28 và mẹ bệnh nhân đều mang biến thể c.413G>A trên gen *MYL3* với kiểu gen dị hợp tử. Trong nghiên cứu, mẫu của bố bệnh nhân đã không thu thập được vì vậy đây có thể là biến thể di truyền từ mẹ. Tuy nhiên, cần thu mẫu và thực hiện giải trình tự Sanger trên mẫu bố bệnh nhân để có thể kết luận rõ hơn.

Đối với gen *TTN*, phát hiện biến thể c.62969T>A trên bệnh nhân HN28, nhưng không phát hiện biến thể ở vị trí này trên mẹ bệnh nhân. Cho nên biến thể này có thể là biến thể mới (de novo mutation) hoặc di truyền từ bố. Kết quả giải trình tự Sanger của bệnh nhân HN28 và mẹ được thể hiện trong Hình 3.4.



Hình 3.4. Kết quả giải trình tự Sanger 2 gen *MYL3* và *TTN* của bệnh nhân và các thành viên trong gia đình HN28

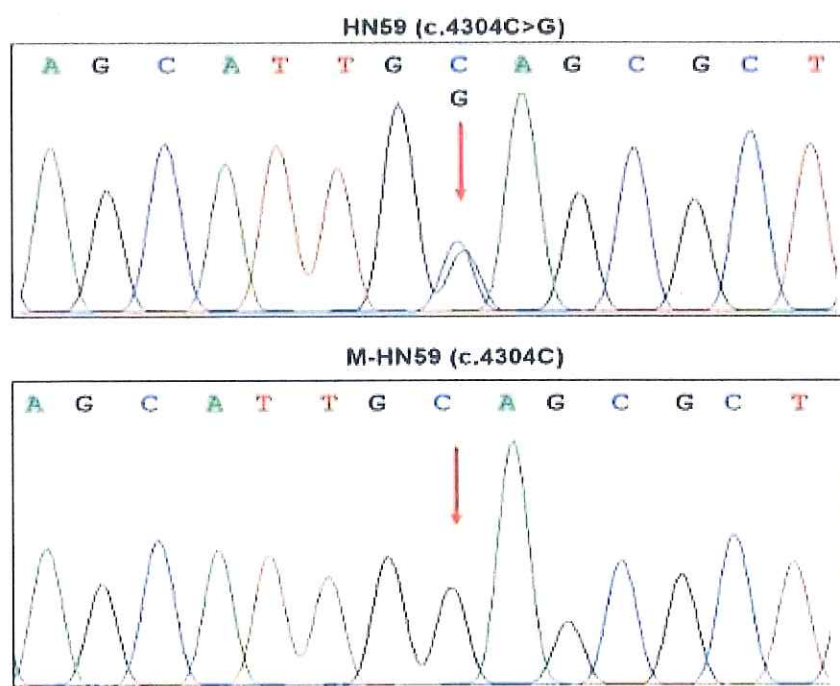
3.4.2. Bệnh nhân HN59

Phân tích WES cho thấy bệnh nhân HN59 mang biến thể dị hợp tử: c.4304C>G (p.Ser1435Cys) trên gen *MYH7*, dẫn đến sự thay thế Serine thành Cysteine tại vị trí 1435 của protein.

Đoạn gen *MYH7*, có kích thước 450 bp, mang biến thể c.4304C>G, được khuếch đại bằng phản ứng PCR (Hình 3.5).



Hình 3.5: Kết quả khuếch đại đoạn gen MYH7 trên gia đình bệnh nhân HN59.



Hình 3.6. Kết quả giải trình tự Sanger trên gen MYH7 của bệnh nhân HN59 và mẹ.

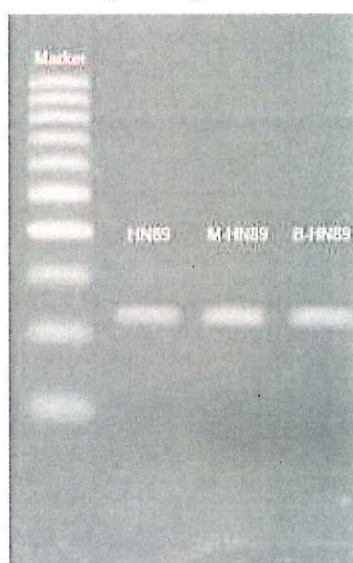
Kết quả giải trình tự Sanger gen MYH7 của bệnh nhân HN59 cho thấy bệnh nhân HN59 mang biến thể dị hợp tử c.4304C>G thể hiện tại Hình 3.6. Mẹ bệnh nhân không mang biến thể tại vị trí này, điều này có thể gợi ý rằng biến thể này có thể đến từ cha hoặc là một biến thể mới (de novo mutation). Tuy nhiên, mẫu máu

của bố bệnh nhân không được thu thập nên nghiên cứu này chưa thể kết luận chính xác yếu tố di truyền của biến thể này.

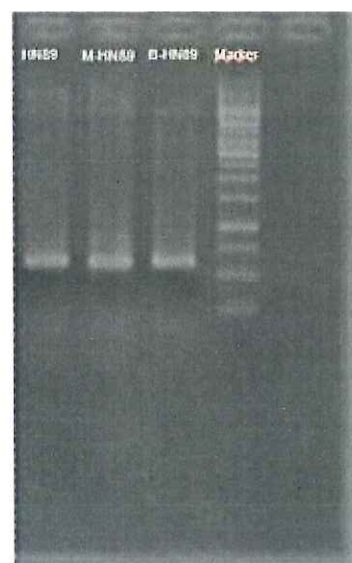
3.4.3. Bệnh nhân HN89

Bệnh nhân mang hai biến thể dị hợp tử c.58037T>C (p.Val19346Ala) và c.46489G>T (p.Val15497Phe) trên gen *TTN*. Biến thể c.58037T>C thay thế axit amin Valine bằng Alanine tại vị trí 19,346 của protein titin, trong khi biến thể c.46489G>T thay thế axit amin Valine bằng Phenylalanine tại vị trí 15,497 của protein titin.

Kết quả khuếch đại 2 đoạn gen *TTN* có kích thước lần lượt là 545 và 615 bp được trình bày trong Hình 3.7.



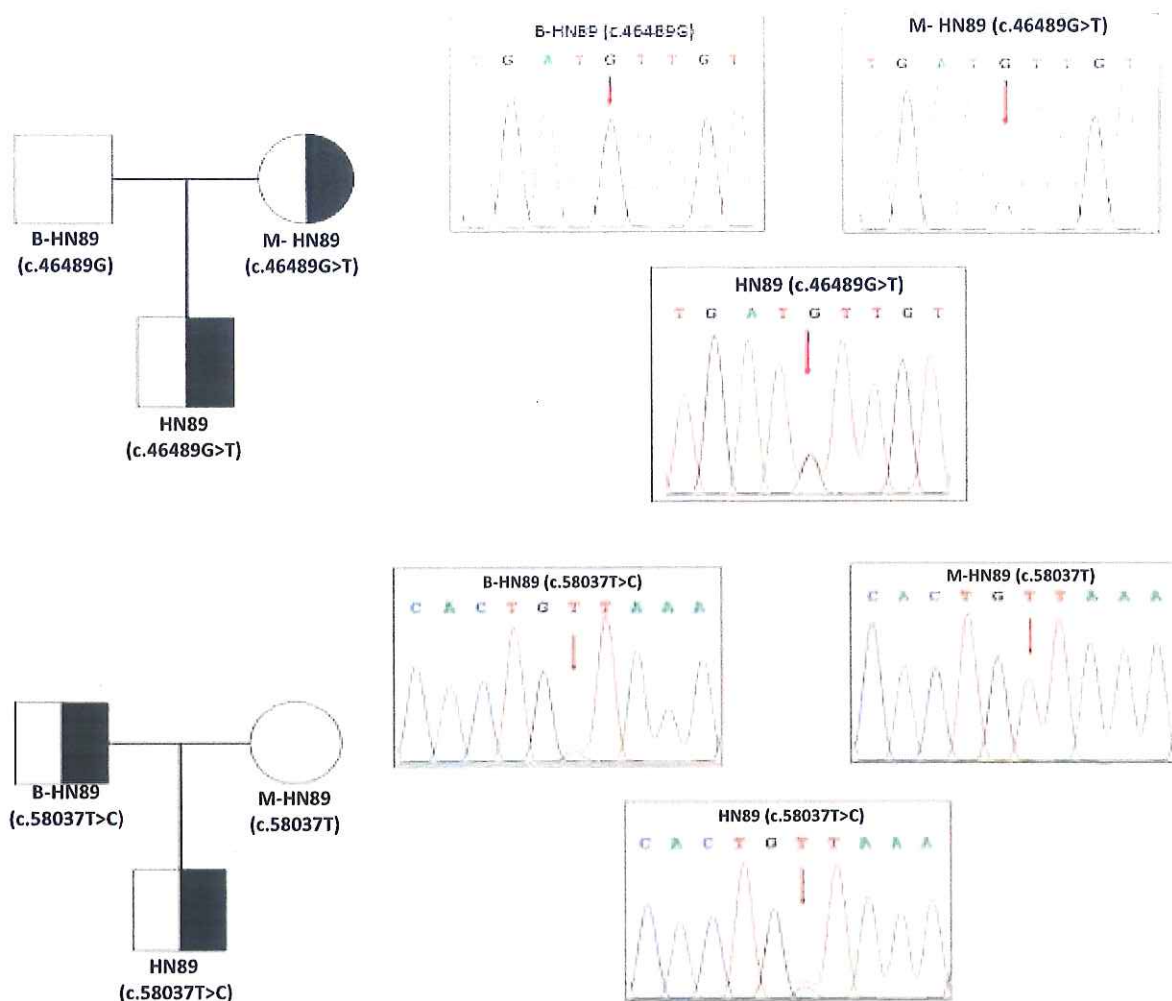
Gen *TTN*-615



Gen *TTN*-515

Hình 3.7: Kết quả khuếch đại 2 đoạn gen *TTN* trên gia đình bệnh nhân HN89

Giải trình tự Sanger đã được thực hiện trên các mẫu DNA thu được từ ba thành viên trong gia đình (bố, mẹ và bệnh nhân) để xác nhận các biến thể được phát hiện thông qua giải trình tự toàn bộ exome. Kết quả giải trình tự Sanger của các thành viên trong gia đình bệnh nhân cho thấy bố mẹ của bệnh nhân mang một biến thể dị hợp tử trên gen *TTN*. Trong khi đó, bệnh nhân mang hai biến thể dị hợp tử c.58037T>C (p.Val19346Ala) và c.46489G>T (p.Val15497Phe) trên gen *TTN*.



Hình 3.8. Phả hệ của gia đình bệnh nhân HN89 bao gồm bố mẹ và bệnh nhân và kết quả giải trình tự Sanger.

4. Thảo luận

4.1. Bệnh nhân HN28

Bệnh nhân HN28 mang hai biến thể trên hai gen liên quan đến bệnh cơ tim, bao gồm biến thể c.413G>A trên gen *MYL3* và biến thể c.62969T>A trên gen *TTN*. Mặc dù cả bệnh nhân HN28 và mẹ đều mang biến thể dị hợp tử c.413G>A trên gen *MYL3*, nhưng chỉ bệnh nhân biểu hiện bệnh, trong khi mẹ không có triệu chứng. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi tính thâm nhập không hoàn toàn tương tự với trường hợp bệnh nhân HN59, khi một người mang biến thể nhưng không nhất thiết phát triển bệnh do các yếu tố bảo vệ trong hệ gen hoặc môi trường. Ngoài ra, tính biểu hiện khác nhau cũng có thể đóng vai trò quan trọng, khi cùng một biến thể có thể gây ra mức độ bệnh khác nhau giữa các cá thể, và có thể mẹ bệnh nhân có dấu hiệu bệnh nhẹ nhưng chưa phát hiện hoặc chưa tiến triển thành bệnh lý rõ ràng.

Với biến thể c.62969T>A trên gen *TTN*, kết quả chỉ ra rằng biến thể này không được tìm thấy ở mẹ bệnh nhân, cho thấy đây có thể là một biến thể mới (de

novo) hoặc được di truyền từ bố. Nếu đây là một biến thể *de novo*, có khả năng biến thể này đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của bệnh nhân. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các biến thể trên gen *TTN*, đặc biệt là những biến thể gây mất chức năng (truncating variants - *TTN*tv), có liên quan đến bệnh cơ tim giãn [17]. Việc phát hiện biến thể này giúp củng cố thêm giả thuyết về vai trò của *TTN* trong bệnh lý của bệnh nhân HN28. Bên cạnh đó, các yếu tố di truyền khác cũng có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện bệnh, khi một số gen có vai trò điều hòa có thể làm tăng hoặc giảm nguy cơ mắc bệnh cơ tim. Ngoài yếu tố di truyền, môi trường và biểu sinh cũng có thể đóng vai trò quan trọng, bao gồm căng thẳng, huyết áp cao, lối sống, chế độ ăn uống và tập luyện, giúp giải thích vì sao mẹ bệnh nhân dù mang biến thể nhưng không phát triển bệnh. Sự khác biệt trong biểu hiện bệnh giữa bệnh nhân HN28 và mẹ có thể do sự kết hợp của tính thâm nhập không hoàn toàn, nhiều biến thể di truyền, các gen điều hòa và yếu tố môi trường.

Nhìn chung, trường hợp của bệnh nhân HN28 cho thấy sự phức tạp trong di truyền bệnh cơ tim, khi có sự kết hợp của biến thể di truyền từ mẹ và một biến thể có khả năng mới xuất hiện. Để làm rõ hơn cơ chế di truyền cũng như ảnh hưởng của từng biến thể lên bệnh trạng, cần thực hiện các phân tích sâu hơn như nghiên cứu chức năng protein, thu thập thông tin lâm sàng của các thành viên trong gia đình, và xét nghiệm di truyền trên bố bệnh nhân.

Biến thể trong *MYL3* có thể làm thay đổi khả năng liên kết giữa myosin và actin, gây rối loạn cơ chế co bóp và làm suy giảm chức năng tim, góp phần vào sự phát triển của DCM. Biến thể *MYL3* được đặc trưng bởi sự thay thế axit amin không bảo thủ, có khả năng ảnh hưởng đến các tính chất như độ phân cực, kích thước và điện tích của cấu trúc protein bậc hai. Hơn nữa, sự thay thế axit amin xảy ra tại miền gắn canxi EF-hand, một vùng được bảo tồn cao giữa các loài. Phân tích *in silico* bằng các phần mềm dự đoán cho thấy biến thể này có tác động gây hại, ảnh hưởng tiêu cực đến chức năng protein [41].

Trước đây, *MYL3* chủ yếu được ghi nhận liên quan đến bệnh cơ tim phì đại, nhưng các nghiên cứu gần đây cho thấy một số đột biến trên gen này có thể gây mất ổn định sarcomere, dẫn đến bệnh cơ tim giãn [28][30]. Nghiên cứu của Daniel Peter Sayer Osborn và cộng sự đã xác định các biến thể *MYL3* đồng hợp tử ở ba gia đình không có quan hệ huyết thống mắc bệnh cơ tim và có tiền sử đột tử. Kết quả cho thấy các biến thể *MYL3* được di truyền theo kiểu lặn, liên quan đến kiểu hình nghiêm trọng, dẫn đến đột tử sớm và tỷ lệ tử vong cao. Cụ thể, nghiên cứu đã phát hiện ba biến thể *MYL3* gây bệnh, bao gồm biến thể sai nghĩa (c.170C>A, p.[Ala57Asp]), biến thể vô nghĩa (c.106G>T, p.[Glu36Ter]) và biến thể tại vị trí

nhận exon thiết yếu (c.4821G>A). Các biến thể này không chỉ liên quan đến HCM và DCM mà còn làm tăng nguy cơ đột tử, do ảnh hưởng tiêu cực đến cấu trúc và chức năng của protein MYL3 [42].

Phát hiện mới về biến thể c.413G>A trên gen *MYL3* trong nghiên cứu của chúng tôi càng củng cố mối liên hệ giữa *MYL3* và bệnh cơ tim giãn. Trong nghiên cứu này, biến thể c.413G>A có thể làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein MYL3, làm gián đoạn sự tương tác của protein này với myosin, dẫn đến giảm khả năng co giãn của cơ tim. Sự gián đoạn này có thể là một yếu tố quan trọng thúc đẩy sự tiến triển của DCM, tương tự như các biến thể *MYL3* c.170C>A (p.[Ala57Asp]), c.106G>T (p.[Glu36Ter]), và c.4821G>A đã được báo cáo trước đó.

Sự phát hiện này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tầm soát đột biến *MYL3* trong chẩn đoán DCM chưa rõ nguyên nhân, đồng thời cung cấp thêm bằng chứng về vai trò của *MYL3* trong sinh bệnh học của DCM, mở ra hướng nghiên cứu mới về cơ chế bệnh sinh cũng như các chiến lược điều trị tiềm năng. Do đó, *MYL3* cần được xem xét như một yếu tố di truyền tiềm năng trong chẩn đoán DCM, đồng thời nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tầm soát đột biến *MYL3* trong các trường hợp DCM chưa rõ nguyên nhân.

4.2. Bệnh nhân HN59

Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy bệnh nhân HN59 mang biến thể dị hợp tử c.4304C>G trên gen *MYH7*, trong khi mẹ bệnh nhân cũng mang biến thể này nhưng không biểu hiện bệnh. Điều này có thể do tính thâm nhập không hoàn toàn của biến thể, tức là không phải ai mang biến thể cũng mắc bệnh. Tính thâm nhập không hoàn toàn (incomplete penetrance) là hiện tượng trong đó không phải tất cả các cá nhân mang một biến thể gen gây bệnh đều biểu hiện triệu chứng của bệnh. Điều này thường gặp trong nhiều bệnh di truyền và có thể do sự tương tác phức tạp giữa gen và môi trường [33][35]. Sự thâm nhập của một biến thể có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác như di truyền đa yếu tố, ảnh hưởng của các gen điều hòa, môi trường sống hoặc các yếu tố biểu sinh. Ngoài ra, bệnh có thể chịu tác động của các yếu tố di truyền và môi trường khác, trong đó mẹ bệnh nhân có thể mang các yếu tố bảo vệ giúp giảm nguy cơ phát triển bệnh [1]. Sự khác biệt về giới tính cũng có thể đóng vai trò, khi các yếu tố nội tiết hoặc sinh học ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện bệnh giữa nam và nữ [6]. Bên cạnh đó, biến thể c.4304C>G có thể chỉ là một yếu tố nguy cơ cho nên để làm rõ hơn cơ chế di truyền và tác động của biến thể này, cần có thêm nghiên cứu sâu hơn, bao gồm phân tích di truyền mở rộng trên các thành viên khác trong gia đình. Phát hiện này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tầm soát và theo dõi sức khỏe cho những người thân trong gia đình có mang biến

thể. Dù mẹ bệnh nhân không có triệu chứng, nhưng vẫn cần kiểm tra tim mạch định kỳ để phát hiện sớm các dấu hiệu bất thường.

MYH7 là một trong những gen được nghiên cứu nhiều nhất trong các bệnh cơ tim di truyền. Trong khi hầu hết các đột biến *MYH7* liên quan đến bệnh cơ tim phì đại, một số đột biến mất chức năng (loss-of-function) hoặc thay đổi cấu trúc myosin có thể làm giảm khả năng co bóp của tim, dẫn đến bệnh cơ tim giãn. Đột biến *MYH7* có thể làm suy yếu khả năng tạo lực của myosin, gây ra giảm phân suất tổng máu và tăng kích thước buồng tim. Trước đây, *MYH7* chủ yếu liên quan đến HCM và RCM, nhưng ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy một số đột biến trên gen *MYH7* có tần xuất xuất hiện ngày càng phổ biến ở những người mắc bệnh cơ tim giãn [34].

Nghiên cứu của tác giả Oc-Hee Kim và nhóm cộng sự đã báo cáo về tần suất và phân bố của các biến thể trên gen *MYH7* trong một nhóm bệnh nhân không có quan hệ huyết thống và mắc bệnh cơ tim (bao gồm HCM, RCM và DCM) tại Hàn Quốc [29]. Nghiên cứu này đã thực hiện phân tích in silico nhằm dự đoán khả năng gây bệnh của các biến thể mới và so sánh với các biến thể đã được xác định là gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh. Ngoài ra, nghiên cứu cũng đánh giá tác động của các biến thể trên gen *MYH7* lên động lực học và độ ổn định của protein bằng các công cụ DynaMut2 và Missense3D. Để xác định tần suất xuất hiện các biến thể *MYH7* ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim (bao gồm cơ tim giãn), nghiên cứu đã lựa chọn 397 bệnh nhân mắc bệnh cơ tim để tham gia nghiên cứu. Kết quả đã xác định được 27 biến thể trong vùng mã hóa của gen *MYH7* ở 41 bệnh nhân không có quan hệ huyết thống. Trong số 41 bệnh nhân này, có 22 nam giới (53,7%) và 19 nữ giới (46,3%), với các dạng bệnh cơ tim khác nhau, bao gồm bệnh cơ tim phì đại (59%), bệnh cơ tim giãn (34%) và chưa xác định (7%). Trong số 27 biến thể *MYH7* được xác định, có 26 biến thể thay thế axit amin (missense variants) và 1 biến thể mất đoạn. Các biến thể được xác định là gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh chủ yếu nằm trong vùng motor của protein *MYH7* (15/27, chiếm 55,6%). Ngoài ra, 2 biến thể gây bệnh nằm trong vùng IQ (2/27, chiếm 7,4%) và 7 biến thể gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh nằm trong vùng cuộn xoắn (coiled-coil domain) (9/27, chiếm 33,4%). Phân tích bằng các công cụ in silico cho thấy các biến thể *MYH7* mới này có ảnh hưởng đến chức năng và độ ổn định cấu trúc của protein.

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy tần suất cao và mức độ phổ biến của các biến thể trên gen *MYH7* ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn. Điều này nhấn mạnh rằng *MYH7* là một gen quan trọng cần được sàng lọc kỹ lưỡng, đặc biệt ở bệnh nhân và gia đình có tiền sử di truyền liên quan đến bệnh cơ tim.

4.3. Bệnh nhân HN89

Phả hệ gia đình bệnh nhân HN89 bao gồm ba thành viên: bệnh nhân, bố và mẹ. Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy bệnh nhân mang hai biến thể dị hợp tử trên gen *TTN*, trong đó biến thể c.46489G>T được di truyền từ mẹ và biến thể c.58037T>C được di truyền từ bố. Bố và mẹ đều mang một biến thể nhưng không có triệu chứng rõ ràng về mặt lâm sàng, trong khi bệnh nhân mang cả hai biến thể và biểu hiện bệnh cơ tim giãn. Sự kết hợp của cả hai biến thể trên gen *TTN* có thể góp phần làm suy giảm chức năng của protein titin, từ đó dẫn đến bệnh cơ tim giãn ở bệnh nhân HN89. Việc mang hai biến thể dị hợp tử (compound heterozygous) trên cùng một gen có thể dẫn đến hiệu ứng cộng gộp (cumulative effect), trong đó từng biến thể riêng lẻ có thể không đủ để gây bệnh, nhưng sự kết hợp của cả hai làm suy giảm nghiêm trọng chức năng của protein titin, góp phần vào sự khởi phát của bệnh. Bệnh nhân mang biến thể kép (compound heterozygous hoặc homozygous) có nguy cơ cao hơn trong việc phát triển bệnh nặng sớm, rối loạn chức năng tim nghiêm trọng hơn và khả năng tiến triển đến suy tim cao hơn. Biến thể kép thường làm giảm mạnh hoặc mất hoàn toàn chức năng của protein liên quan đến cơ tim [43].

Một số nghiên cứu đã xác định 2 biến thể trên cùng 1 gen ở bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn, nhấn mạnh rằng bệnh nhân mang biến thể kép có xu hướng biểu hiện bệnh sớm hơn, nặng hơn và tiến triển nhanh hơn so với những bệnh nhân chỉ mang một đột biến đơn lẻ. Điều này có thể giải thích do hiệu ứng cộng dồn hoặc tương tác bất lợi giữa các biến thể trên cùng một gen, làm suy giảm nghiêm trọng hơn chức năng của protein [44]. Biến thể kép có thể gây mất hoàn toàn hoặc suy giảm nghiêm trọng chức năng protein, dẫn đến giảm phân suất tổng máu, thành tim mỏng hơn, suy tim tiến triển nhanh và nguy cơ rối loạn nhịp cao hơn. Ngoài ra, những bệnh nhân này cũng có tỷ lệ suy tim giai đoạn cuối và nguy cơ đột tử cao hơn [45][46].

Titin là protein lớn nhất trong cơ thể người – là một thành phần cấu trúc có chức năng quan trọng của cơ vân. *TTN* bao gồm bốn vùng chức năng chính: đầu N (N-terminal), dải I (I-band), dải A (A-band) và đầu C (C-terminal). Đầu N đóng vai trò là điểm neo tại vạch Z (Z-disk), không chỉ giúp lắp ráp và duy trì sự ổn định của tơ cơ mà còn tham gia vào các chức năng cảm biến, tương tác protein và các con đường tín hiệu [47] [48]. Do hiện tượng cắt nối thay thế (alternative splicing), dải I đóng vai trò là bộ điều hợp trung tâm, điều chỉnh titin để phù hợp với từng loại mô cụ thể. Dải I chủ yếu chịu trách nhiệm về tính đàn hồi của titin [49]. Ngược lại, dải A không thể kéo giãn và hoạt động như một điểm neo ổn định cho các sợi myosin, đồng thời tương tác với nhiều protein liên

quan đến quá trình chuyển hóa protein tại lõi sarcomere. Trong khi đó, dải M (M-band) hình thành phức hợp myomesin-titin-myosin và đóng vai trò quan trọng trong việc cảm nhận và đáp ứng với căng thẳng chuyển hóa [48]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy bệnh cơ tim giãn do di truyền là một tình trạng hiếm gặp nhưng nghiêm trọng, có tỷ lệ tử vong cao.

Để xác định mức độ bảo tồn tiến hóa của các axit amin trong protein tự nhiên tại các vị trí biến thể được xác định, trình tự axit amin của protein *TTN* từ các loài khác nhau đã được sắp hàng sử dụng phần mềm Clustal X2 (Hình 3.8). Kết quả phân tích cho thấy các biến thể được xác định trong gen *TTN* của bệnh nhân nằm trong các vùng có mức độ bảo tồn cao. Do đó, bất kỳ sự thay đổi nào trong các axit protein. Những phát hiện này tiếp tục khẳng định rằng các biến thể được xác định chính là nguyên nhân gây bệnh ở các bệnh nhân được nghiên cứu.

(A)

<i>H. sapiens</i>	P Q D I L E A P G A D V V F L A E L N K D K V
Patient	P Q D I L E A P G A D F V F L A E L N K D K V
<i>P. troglodytes</i>	P Q D I L E A P G A D V V F L A E L N K D K V
<i>M. mulatta</i>	P Q D I L E A P G A D V V F L A E - - - - -
<i>F. catus</i>	P Q D I L E A P G A D V V F L A E L N K D K V
<i>M. musculus</i>	P Q D I L E A P G A D V I F L A E L N K D K V
	* * * * * : * * * * * - - - - -

(B)

<i>H. sapiens</i>	T N D N L L S R K Y T V K G L K E G D T Y E Y R
Patient	T N D N L L S R K Y T A K G L K E G D T Y E Y
<i>P. troglodytes</i>	T N D N L L S R K Y T V K G L K E G D T Y E
<i>M. mulatta</i>	- - - - - K Y T V K D L K E G D T Y E Y
<i>F. catus</i>	T K D N L L S R K Y T V K G L K E G D T Y E Y
<i>M. musculus</i>	T N D N L L S R K Y T V K G L K E G D T Y E Y
	* * * : * * * * * * * * * *

Hình 3.9. Sắp hàng nhiều trình tự protein *TTN* từ người và các loài khác bằng Clustal-X2. Sắp hàng nhiều trình tự của protein *TTN* tại vị trí xảy ra biến thể. Sắp hàng trình tự axit amin của *TTN* từ các loài khác nhau, bao gồm *Homo sapiens* (người), *Pan troglodytes* (tinh tinh), *Macaca mulatta* (khỉ rhesus), *Felis catus* (mèo nhà) và *Mus musculus* (chuột nhà).

4.4. Những đóng góp của nghiên cứu cho việc chẩn đoán bệnh cơ tim giãn

Việc chẩn đoán tình trạng của bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn đòi hỏi một phương pháp tiếp cận toàn diện, bao gồm đánh giá tiền sử gia đình để xác định yếu tố di truyền và tác động môi trường, khai thác chi tiết tiền sử bệnh, khám lâm sàng,

xét nghiệm máu và một loạt các kỹ thuật hình ảnh [50]. Nền tảng di truyền của bệnh cơ tim giãn nhấn mạnh tầm quan trọng của việc sàng lọc các thành viên trong gia đình có nguy cơ mắc bệnh. Đánh giá gia đình toàn diện trong các trường hợp mắc bệnh cơ tim giãn nên bao gồm tiền sử gia đình ít nhất ba thế hệ, cùng với đánh giá lâm sàng ban đầu đối với những người thân trực hệ [51]. Trong một nghiên cứu do Michels VV thực hiện trên người thân của 59 bệnh nhân mắc DCM, tổng cộng 315 cá nhân đã được kiểm tra, cho thấy cứ năm người thì có ít nhất một người mắc DCM. Những phát hiện này nhấn mạnh vai trò quan trọng của việc sàng lọc gia đình trong việc xác định những cá nhân bị ảnh hưởng [52] [53].

Nghiên cứu của PGS. Ngô Anh Vinh tại bệnh viện Nhi Trung ương trên 34 bệnh nhi mắc bệnh cơ tim giãn, được công bố trên Tạp chí Y học Việt Nam số 506 (9/2021), đã ghi nhận các triệu chứng lâm sàng phổ biến bao gồm suy tim ở 100% trường hợp, khó thở ở 76,5%, gan to chiếm 73,53% và nhịp tim nhanh xuất hiện ở 61,76% bệnh nhân. Về cận lâm sàng, 100% bệnh nhân có bóng tim to trên X-quang, 94,1% có rối loạn chức năng tâm thu với phân suất tổng máu (EF) dưới 50%, trong đó mức độ suy giảm vừa chiếm khoảng một nửa. Điện tâm đồ ghi nhận 35,3% bệnh nhân có dấu hiệu dày thất và 9,1% có rối loạn nhịp tim tại thời điểm chẩn đoán. Nghiên cứu này cho thấy suy tim, giãn thất trái và rối loạn chức năng tâm thu là những đặc điểm nổi bật ở trẻ mắc bệnh cơ tim giãn, qua đó nhấn mạnh tầm quan trọng của việc phát hiện và can thiệp sớm nhằm cải thiện tiên lượng bệnh [54]. Ba bệnh nhân trong nghiên cứu của tôi đều biểu hiện các triệu chứng lâm sàng điển hình của bệnh cơ tim giãn. Cả ba trường hợp đều có dấu hiệu suy tim rõ rệt với biểu hiện khó thở khi gắng sức, mệt mỏi kéo dài và giảm khả năng vận động. Trong đó, bệnh nhân HN59 ghi nhận gan to khi thăm khám và có biểu hiện phù ngoại vi nhẹ. Nhịp tim nhanh được phát hiện ở 3 bệnh nhân qua thăm khám và điện tâm đồ. Siêu âm tim cho thấy cả 3 bệnh nhân đều có giãn thất trái và rối loạn chức năng tâm thu. Những biểu hiện này phù hợp với đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng thường gặp ở bệnh nhân mắc DCM, góp phần củng cố chẩn đoán và cho thấy tính chất tiến triển của bệnh [54].

Giải trình tự WES được áp dụng trong nghiên cứu này góp phần làm sáng tỏ cơ chế tác động của các biến thể lên cấu trúc và chức năng của protein, dẫn tới bệnh cơ tim giãn. Điều này không chỉ hỗ trợ việc chẩn đoán di truyền chính xác hơn mà còn mở ra hướng nghiên cứu mới trong điều trị cá nhân hóa cho bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn bẩm sinh. Những phát hiện này không chỉ mở rộng thêm hiểu biết về cơ chế bệnh sinh của DCM mà còn đặt nền móng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định rõ hơn vai trò của các gen *TTN*, *MYH7*,

MYL3. Việc kết hợp mô phỏng động lực học phân tử, phân tích cấu trúc protein, và thử nghiệm chức năng in vitro sẽ giúp làm rõ tác động của các đột biến này, đồng thời góp phần vào việc phát triển các phương pháp chẩn đoán và điều trị di truyền tiên tiến cho bệnh nhân mắc bệnh cơ tim giãn bẩm sinh.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN:

Nghiên cứu này đã tiến hành thu thập mẫu máu ngoại vi từ 3 bệnh nhân cùng với các thành viên trong gia đình của họ. Thông qua phương pháp giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa, nghiên cứu đã xác định được các biến thể tiềm năng có ảnh hưởng trực tiếp đến tình trạng bệnh cơ tim giãn ở các bệnh nhân, cụ thể như sau:

1. Phát hiện 2 biến thể dạng dị hợp tử là c.62969T>A trên gen *TTN* và c.413G>A trên gen *MYL3* ở bệnh nhân HN28.
2. Bệnh nhân HN59 mang biến thể dạng dị hợp tử là c.4304C>G trên gen *MYH7*.
3. Bệnh nhân HN89 mang 2 biến thể dạng dị hợp tử là c.46489G>T và c.58037T>C trên cùng 1 gen *TTN*.

KIẾN NGHỊ:

Tiếp tục nghiên cứu chuyên sâu về tác động của những biến thể này đến chức năng của protein, qua đó làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh của bệnh cơ tim giãn bẩm sinh.

Có thể mở rộng phạm vi nghiên cứu trên số lượng bệnh nhân lớn hơn.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Schultheiss HP, Fairweather D, Caforio ALP et al, 2019, Dilated cardiomyopathy, *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 32.
2. McNally EM, Mestroni L et al 2017, Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms, *Circulation Research*, 121(7), 731-748.
3. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G et al, 2006, Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113(14):1807-16.
4. Marco Merlo, Davide Stolfo, Thomas Caiffa et al, 2019, Clinical Presentation, Spectrum of Disease, and Natural History, Cham (CH): Springer, Chapter 6.
5. Rakar S, Sinagra G, Di Lenarda A et al, 1997, Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies. The heart muscle disease study group, *European Heart Journal*, 18(1), 117-123.
6. Miura K, Nakagawa H, Morikawa Y et al, 2002, Epidemiology of idiopathic cardiomyopathy in Japan: Results from a nationwide survey, *Heart*, 87(1), 126-130.
7. Ganesh SK, Arnett DK, Assimes TL et al, 2013, Genetics and genomics for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Update: A scientific statement from the American Heart Association, *Circulation*, 128(24), 2813-2851.
8. Kazzam E, Caidahl K, Hällgren R et al, 1991, Non-invasive assessment of systolic left ventricular function in systemic sclerosis, *European Heart Journal*, 12(2), 151-156.
9. Arbustini E, Di Toro A, Giuliani L et al, 2018, Cardiac Phenotypes in Hereditary Muscle Disorders: JACC State-of-the-Art Review, *Journal of the American College of Cardiology*, 72(20), 2485-2506.
10. Stergiopoulos K, Lima FV et al, 2019, Peripartum cardiomyopathy-diagnosis, management, and long term implications, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 29(3), 164-173.
11. Pinto YM, Perry M Elliott, Eloisa Arbustini et al, 2016, Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated

cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases, 1850–1858.

12. Jordan E, Peterson L, Ai T et al, 2021, Evidence-Based Assessment of Genes in Dilated Cardiomyopathy, *Circulation*, 144(1), 7-19.

13. Kellermayer D, Smith JE, Granzier H et al (2019), Titin mutations and muscle disease, *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 471(5), 673-682.

14. McNally E.M, Mestroni L, 2017, Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms, *Circulation Research*, 121(7), 731-748. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309396. PMID: 28912180; PMCID: PMC5626020.

15. Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S et al, 1996, Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle, *Nature Genetics*, 13, 63-69. doi: 10.1038/ng0596-63.

16. Bozkurt B, Colvin M, Cook J et al, 2016, Current diagnostic and treatment strategies for specific dilated cardiomyopathies: A Scientific Statement From the American Heart Association, *Circulation*, 134(23), e579-e646.

17. Gerull B, 2015, The Rapidly Evolving Role of Titin in Cardiac Physiology and Cardiomyopathy, *Canadian Journal of Cardiology*, 31(11), 1351-1359.

18. Janine Meienberg, Rémy Bruggmann, Konrad Oexle, Gabor Matyas, 2016, "Clinical sequencing: is WGS the better WES?" *Human genetics* 135: 359-362.

19. Beukelman T, Patkar NM, Saag KG et al, 2011, 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features, *Arthritis Care & Research*, 63(4), 465-482.

20. Li RG, Li Li, Xing-Biao Qiu et al, 2013, GATA4 loss-of-function mutation underlies familial dilated cardiomyopathy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(4), 591-596.

21. Chauveau C, Rowell J, Ferreira A, 2014, A rising titan: TTN review and mutation update, *Human Mutation*, 35(9), 1046-1059.

22. Shahzadi SK, Naidoo N, Alsheikh-Ali A et al, 2021, Reconnoitering the Role of Long-Noncoding RNAs in Hypertrophic Cardiomyopathy: A Descriptive Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9378.

23. Chintanaphol M, Orgil BO, Alberson NR et al, 2022, Restrictive cardiomyopathy: from genetics and clinical overview to animal modeling, *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 23(3), 108.
24. Gerull B, Gramlich M, Atherton J et al, 2002, Mutations of *TTN*, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy, *Nature Genetics*, 30, 201-204. doi: 10.1038/ng815.
25. Ceyhan-Birsoy O, Agrawal P.B, Hidalgo C et al, 2013, Recessive truncating *TTN* gene mutations presenting as centronuclear myopathy, *Neurology*, 81, 1205-1214. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a6ca62.
26. Hackman P, Vihola A, Haravuori H et al, 2002, Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in *TTN*, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin, *American Journal of Human Genetics*, 71, 492-500. doi: 10.1086/342380.
27. Osborn DPS, Emrahi L, Clayton J et al, 2021, Autosomal recessive cardiomyopathy and sudden cardiac death associated with variants in *MYL3*, *Genetics in Medicine*, 23, 787–792.
28. Park HY, 2017, Hereditary Dilated Cardiomyopathy: Recent Advances in Genetic Diagnostics, *Korean Circulation Journal*, 47(3), 291-298.
29. Mavilakandy A, Ahamed H, 2022, Mutation of the *MYL3* gene in a patient with mid-ventricular obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *BMJ Case Rep*, 15(3), doi: 10.1136/bcr-2021-244573. PMID: 35288424; PMCID: PMC8921845.
30. Van Waning JJ, Moesker J, Heijmans D et al, 2019, Systematic Review of Genotype-Phenotype Correlations in Noncompaction Cardiomyopathy, *Journal of the American Heart Association*, 8(23), e012993.
31. Kim OH, Kim J, Kim Y et al, 2024, Exploring novel *MYH7* gene variants using in silico analyses in Korean patients with cardiomyopathy. *BMC Med Genomics*, 17(1), doi: 10.1186/s12920-024-02000-8. PMID: 39237976; PMCID: PMC11378590.
32. Frank D, Yusuf Rangrez A, Friedrich C et al, 2019, Cardiac α -Actin (*ACTC1*) Gene Mutation Causes Atrial-Septal Defects Associated With Late-Onset Dilated Cardiomyopathy, *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, 12(8), e002491.
33. Knöll R, Buyandelger B, Lab M, 2011, The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies, *Journal of Biomedical Biotechnology*, 569628.

34. Kelly M.A, Caleshu C, Morales A et al., 2018, Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework for *MYH7*-associated inherited cardiomyopathies: recommendations by ClinGen's Inherited Cardiomyopathy Expert Panel, *Genetics in Medicine*, 20(3), 351-359. doi: 10.1038/gim.2017.218.
35. Miller MK, Bang ML, Witt CC et al, 2003, The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules, *Journal of Molecular Biology*, 333(5), 951-964.
36. DeWitt M.M, MacLeod H.M, Soliven B, McNally E.M, 2006, Phospholamban R14 deletion results in late-onset, mild, hereditary dilated cardiomyopathy, *Journal of the American College of Cardiology*, 48(6), 1396-1398. doi: 10.1016/j.jacc.2006.07.016.
37. Kubo Li G, Na Yang , Mingkun Xie et al, 2017, Perinatal and follow-up outcome study of fetal anomalies with multidisciplinary consultation, *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 13(1), 1303-1307.
38. Purevjav E, Takuro Arimura, Sibylle Augustin et al, 2012, Molecular basis for clinical heterogeneity in inherited cardiomyopathies due to myopalladin mutations, *Human Molecular Genetics*, 21(10), 2039-2053.
39. Bagnall RD, Laura Yeates, Christopher Semsarian, 2010, Analysis of the Z-disc genes PDLIM3 and MYPN in patients with hypertrophic cardiomyopathy, *International Journal of Cardiology*, 145(1), 601-602.
40. Purevjav Baumgartner H, Julie De Backer, Sonya V Babu-Narayan et al, 2010, ESC guidelines for the management of grown-up congenital heart disease, *European Heart Journal*, 31(1), 2915-2957.
41. Mavilakandy A, Ahamed H, 2022, Mutation of the *MYL3* gene in a patient with mid-ventricular obstructive hypertrophic cardiomyopathy, *BMJ Case Reports*, 15(3), e244573. doi: 10.1136/bcr-2021-244573.
42. Osborn D.P.S, Emrahi L, Clayton J, et al, 2021, Autosomal recessive cardiomyopathy and sudden cardiac death associated with variants in *MYL3*, *Genetics in Medicine*, 23(4), 787-792. doi: 10.1038/s41436-020-01028-2
43. Yang Q, Zhang Q, Qin Z et al, 2023, Novel compound heterozygous variants in the *RPL3L* gene causing dilated cardiomyopathy type-2D: a case report and literature review, *BMC Med Genomics* 16, 127.
44. Landim-Vieira, Maicon et al, 2020 "Familial dilated cardiomyopathy associated with a novel combination of compound heterozygous *TNNC1* variants." *Frontiers in Physiology* 10: 1612.

45. Mahdavi M, Mohsen-Pour N, Maleki M et al, 2022, Whole-exome sequencing identified compound heterozygous variants in the *TTN* gene causing Salih myopathy with dilated cardiomyopathy in an Iranian family, *Cardiology in the Young*, 32(9):1462-1467. doi:10.1017/S1047951121004455
46. Mahdavi M, Mohsen-Pour N, Maleki M et al, 2022, Whole-exome sequencing identified compound heterozygous variants in the *TTN* gene causing Salih myopathy with dilated cardiomyopathy in an Iranian family, *Cardiology in the Young*, 32(9):1462-1467. doi:10.1017/S1047951121004455
47. Kontogianni-Konstantopoulos A, Ackermann MA, Bowman AL et al, 2009, Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis, *Physiological Reviews*, 89(4), 1217-1267.
48. Jolfayi AG, Kohansal E, Ghasemi S et al, 2024, Exploring *TTN* variants as genetic insights into cardiomyopathy pathogenesis and potential emerging clues to molecular mechanisms in cardiomyopathies, *Scientific Reports*, 14(1), 5313.
49. Mallavarapu A, Taksande A, 2022, Dilated Cardiomyopathy in Children: Early Detection and Treatment, *Cureus*, 14(11), e31111.
50. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P, 2017, Dilated cardiomyopathy, *The Lancet*, 390(10092), 400-414.
51. Michels VV, Moll PP, Miller FA et al, 1992, The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, *New England Journal of Medicine*, 326(2), 77-82.
52. Chong JX, Childers MC, Marvin CT, 2023, Variants in *ACTC1* underlie distal arthrogryposis accompanied by congenital heart defects, *medRxiv [Preprint]*.
53. Daubeney PE, Nugent AW, Chondros P et al, 2006, Clinical features and outcomes of childhood dilated cardiomyopathy: results from a national population-based study, *Circulation*, 114(24), 2671-2678.
54. Ngô Anh Vinh. (2021). Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng bệnh cơ tim giãn ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 506(1), 180–184.

PHỤ LỤC

Danh sách các gen liên quan đến bệnh cơ tim giãn được sử dụng để sàng lọc các biến thể ở ba bệnh nhân trong nghiên cứu

ABCC9 (AD), ACTA1, ACTA2, ACTC (AD), ACTC1 (AD), ACTN, ACTN2 (AD), ANKRD1 (AD), BAG3 (AD), BAT1, CALR2, CAV3, CAVIN4, CHRM2, CRYAB (AD), CSRP3 (AD), CTF1, DES (AD), DMD (XR), DMPK, DNAJC19, DND, DOLK (AR), DPMK, DSC2, DSCG2, DSG2 (AD), DSP (AR), DTNA, EMD (XR), EPG5, EYA1, EYA4, FHL1, FHL2 (AD), FKT, FKTN (XR), FLNC, FOXD4, GATA4 (AD), GATA5, GATA6, GATAD1 (AR), GATAD4, GLA, HFE, HSPB7, IKBL, ILK, ISL1, JPH2 (AD), JUP (AR/AD), KCNQ4, LAMA4 (AD), LAMP2, LAP2, LDB3 (AD), LMNA (AD), LMNA4 (AD), LRRC10, MEXN (AD), MPO, MURC (AD), MYBP3, MYBPC3 (AD), MYH6 (AD), MYH7 (AD), MYL1, MYL2, MYL3, MYLK2, MYLK3, MYOM1, MYOZ2 (AD), MYPN (AD), NBLT, NEBL (AD), NEXN (AD), NKX2-5 (AD), NPPA, NRAP, OBSCN (AD), PDLIM3, PKP2 (AD), PLB (AD), PLB1, PLN, PRDM16, PRKAG2, PSEN1 (AD), PSEN2 (AD), PTPN11, RAB3GAP2, RAF1, RBM2, RBM20 (AD), RIT1, RTN4, RYR2 (AD), SAGD (AD), SCN5A (AD), SCGB, SDHA (AR), SGCB, SGCD (AD), SLC22A5, SLC40A1, SOS1, SYNE1, SYNE2 (AD), TAZ (XR), TBX5, TBX20 (AD), TCAP (AD), TFR2, TGFB3 (AD), TMEM43, TMPO, TNNI3 (AD, AR), TNNC1 (AD), TNNC2 (AD), TNNT2 (AD), TPM1 (AD), TTN (AD), TTR, TXNRD2, VCL (AD), ZBTB17