

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Minh Thư

**PHÁT HIỆN CÁC BIẾN THỂ DI TRUYỀN GÂY BỆNH MỚI
TRÊN BỆNH NHÂN MẮC HỘI CHỨNG SUY GIẢM MIỄN DỊCH
BẨM SINH TĂNG IgE**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Minh Thư

**PHÁT HIỆN CÁC BIẾN THỂ DI TRUYỀN GÂY BỆNH MỚI
TRÊN BỆNH NHÂN MẮC HỘI CHỨNG SUY GIẢM MIỄN DỊCH
BẨM SINH TĂNG IgE**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS.TS. NGUYỄN HUY HOÀNG

2. TS. NGUYỄN THỊ KIM LIÊN

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

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

Hà Nội, ngày 20 tháng 05 năm 2025



Nguyễn Minh Thư

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất tới GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng và TS. Nguyễn Thị Kim Liên, những người đã tận tâm hướng dẫn, chỉ bảo và luôn tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu cũng như triển khai thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám đốc cùng toàn thể cán bộ, giảng viên Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn quan tâm, hỗ trợ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện nghiên cứu tại học viện.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn đồng hành, tạo điều kiện và cung cấp các nguồn lực cần thiết để tôi có thể thực hiện thành công các thí nghiệm và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể các cán bộ phòng Hệ gen học chức năng, Viện Nghiên cứu hệ gen, cùng các bác sĩ và nhân viên y tế tại Khoa Dị ứng miễn dịch, Khoa Di truyền và Sinh học phân tử thuộc Bệnh viện Nhi Trung Ương đã nhiệt tình hỗ trợ, giúp đỡ tôi trong quá trình thu thập mẫu, thực hiện thí nghiệm và phân tích kết quả nghiên cứu.

Xin gửi lời cảm ơn đặc biệt tới phòng Quản lý tổng hợp của Viện Nghiên cứu hệ gen đã luôn sẵn lòng hỗ trợ, tạo điều kiện tốt nhất trong các thủ tục hành chính và công tác liên quan, giúp tôi thuận lợi hoàn thành chương trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc tới gia đình, người thân đã luôn bên cạnh động viên, chia sẻ và hỗ trợ tôi về mọi mặt, là nguồn động lực to lớn giúp tôi vững tâm trong suốt quá trình hoàn thành luận văn này.

Xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC BẢNG BIỂU	v
DANH MỤC HÌNH	vi
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài	2
5. Những đóng góp mới của đề tài	3
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Hội chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh TĂNG IGE	4
1.2. Triệu chứng lâm sàng	6
1.3. Vai trò của yếu tố di truyền trong cơ chế bệnh sinh của HIES	7
1.3.1. Gen <i>PTPRC</i>	8
1.3.2. Gen <i>NHEJ1</i>	9
1.3.3. Gen <i>UNC119</i>	11
1.3.4. Gen <i>IL21R</i>	12
1.4. Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa (WES)	15
1.4.1. Tổng quan về WES	15
1.4.2. Ứng dụng của WES trong chẩn đoán các bệnh di truyền	16
1.5. Tình hình nghiên cứu trên thế giới ở Việt Nam	16
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. Đối tượng nghiên cứu	18
2.2. Hóa chất và trang thiết bị	18
2.3. Phương pháp nghiên cứu	18
2.3.1. Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa	19
2.3.2. Phân tích và sàng lọc biến thể	21
2.3.3. Kiểm tra bằng giải trình tự Sanger	25
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	29
3.1. Kết quả	29
3.1.1. Kết quả thu thập thông tin lâm sàng và cận lâm sàng của 4 bệnh nhân mắc HIES	29

3.1.2. Kết quả giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa	32
3.1.3. Xác định và chú giải biến thể	40
3.1.4. Kết quả sàng lọc biến thể	41
3.2. Thảo luận	47
3.2.1. Gia đình bệnh nhân PID3	49
3.2.2. Gia đình bệnh nhân PID7	51
3.2.3. Gia đình bệnh nhân PID28	52
3.2.4. Gia đình bệnh nhân PID38	54
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	56
KẾT LUẬN.....	56
KIẾN NGHỊ.....	56
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	57
PHỤ LỤC.....	a

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 2.1. Kích thước và trình tự mỗi khuếch đại các gen đột biến.....	26
Bảng 3.1: Thông tin lâm sàng của 4 bệnh nhân mắc hội chứng HIES	31
Bảng 3.2: Thông tin cận lâm sàng của người tham gia nghiên cứu.....	32
Bảng 3.3. Nồng độ DNA thu được từ các mẫu máu của bệnh nhân mắc hội chứng HIES và người thân trong gia đình	33
Bảng 3.4. Nồng độ thư viện DNA của bệnh nhân mắc hội chứng HIES.....	34
Bảng 3.5. Chất lượng giải trình tự 04 bệnh nhân mắc hội chứng HIES	38
Bảng 3.4. Kết quả đóng hàng các mẫu giải trình tự với hệ gen tham chiếu	38
Bảng 3.6. Kết quả sàng lọc biến thể của 4 bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh tăng IgE.....	42
Bảng 3.7. Kết quả về ảnh hưởng của các biến thể đến chức năng protein	43
Bảng 3.8. Tổng hợp các biến thể tìm được trên các bệnh nhân PID3, PID7, PID28, PID38	44

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Một ca bệnh mắc hội chứng HIES điển hình [1].	4
Hình 1.2. Vai trò của PTPRC (CD45) trong hoạt hóa tế bào T [16].	8
Hình 1.3. Vai trò của UNC119 trong định vị Lck [30].	11
Hình 1.4. Mô hình hoạt động của IL21R [35].	13
Hình 2.1. Sơ đồ các bước nghiên cứu.	19
Hình 2.2. Quy trình phân tích và xử lý dữ liệu.	22
Hình 2.3. Quy trình sàng lọc biến thể.	24
Hình 3.1. Ảnh điện di sản phẩm DNA tổng số của người tham gia nghiên cứu.	33
Hình 3.2. Chất lượng giải trình tự 04 bệnh nhân mắc hội chứng HIES.	37
Hình 3.3. Kết quả giải trình tự Sanger của gia đình bệnh nhân PID3.	45
Hình 3.4. Kết quả giải trình tự Sanger của gia đình bệnh nhân PID7.	46
Hình 3.5. Kết quả giải trình tự Sanger của gia đình bệnh nhân PID28.	46
Hình 3.6. Kết quả giải trình tự Sanger của gia đình bệnh nhân PID38 phát hiện biến thể gen NHEJ1, ảnh trình tự Sanger trên sợi bổ sung.	47
Hình 3.7. Cấu trúc 3D của protein PTPRC, hình ảnh xoắn alpha tại vị trí 735 domain D1.	50
Hình 3.8. Cấu trúc 3D của protein UNC119, xoắn alpha tại vị trí 196 domain 1.	52
Hình 3.9. Cấu trúc 3D của protein IL21R, hình ảnh gấp nếp β tại vị trí 161 domain 2.	53
Hình 3.10. Cấu trúc 3D của protein NHEJ1, hình ảnh Arg176.	54

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
HIES	Hyperimmunoglobulin E Syndrome	Hội chứng suy giảm miễn dịch tăng IgE
WES	Whole Exome Sequencing	Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa
WGS	Whole Genome Sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen
AD-HIES	Autosomal dominant	Thể di truyền trội trên NST thường
AR-HIES	Autosomal recessive	Thể di truyền lặn trên NST thường
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	
DOCK8	Dedicator of Cytokinesis 8	
SCID	Severe combined immunodeficiency	Suy giảm miễn dịch kết hợp thể nặng
PTPRC	Gene - Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C	
NHEJ1	Non-homologous end joining factor 1	
UNC119	Uncoordinated-119 homolog	
ID13	Immunodeficiency 13	
ICL	Idiopathic CD4 lymphopenia	

γ c	γ chung	
ID56	Immunodeficiency 56	
ERBB2IP	ERBB2 interacting protein	
BWT	Burrows-Wheeler Transform	
SAM	Sequence Alignment Map	
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant	
PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping v2	
SBS	Sequencing by synthesis	
CADD	Combined Annotation-Dependent Depletion	

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Hội chứng suy giảm miễn dịch tăng IgE (Hyperimmunoglobulin E Syndrome - HIES) thuộc nhóm rối loạn suy giảm miễn dịch tiên phát với đặc điểm lâm sàng chồng chéo, bao gồm áp xe da do tụ cầu tái phát, viêm phổi có thoát vị phổi, nồng độ IgE huyết thanh tăng cao, cùng với các bất thường rõ rệt về mô liên kết xương và răng. Trẻ mắc hội chứng này có nguy cơ nhiễm trùng cao hơn nhiều so với trẻ khỏe mạnh, đặc biệt là các bệnh lý nhiễm trùng nặng. Nếu được phát hiện sớm, bệnh có thể được điều trị ổn định bằng các phương pháp hỗ trợ. Ngược lại, nếu không được điều trị kịp thời, bệnh có thể dẫn đến nguy cơ tử vong cao hoặc gây ra những di chứng nghiêm trọng. Vì vậy, việc xác định nguyên nhân gây ra hội chứng này có ý nghĩa quan trọng giúp bác sĩ chẩn đoán chính xác và đưa ra hướng điều trị phù hợp.

Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán HIES chủ yếu dựa trên các triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm chỉ số IgE huyết thanh, chức năng miễn dịch và chẩn đoán hình ảnh. Tuy nhiên, các phương pháp này chỉ hỗ trợ chẩn đoán mà chưa thể xác định nguyên nhân cụ thể. Trong những năm gần đây, công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới đã cho phép phát hiện nhiều đột biến gen liên quan đến hội chứng HIES, giúp cải thiện khả năng chẩn đoán sớm, giảm biến chứng và chi phí điều trị. Ngoài ra, xét nghiệm di truyền còn có ý nghĩa trong việc xác định nguy cơ mang gen đột biến trong gia đình bệnh nhân, hỗ trợ tư vấn di truyền cho các cặp vợ chồng có kế hoạch sinh con.

Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa (Whole Exome Sequencing - WES) là một phương pháp giải trình tự thế hệ mới tập trung vào các vùng mã hóa protein của bộ gen, nơi chứa hầu hết các biến thể di truyền và các đa hình nucleotide đơn (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) liên quan đến bệnh ở người. Phương pháp này giúp giảm chi phí và thời gian nghiên cứu so với giải trình tự toàn bộ hệ gen, đồng thời tối ưu hóa khả năng phát hiện các biến thể gen quan trọng. WES đã được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh di truyền, đặc biệt là các bệnh hiếm gặp mà các xét nghiệm tiêu chuẩn không thể phát hiện.

Tại Việt Nam, nghiên cứu về hội chứng HIES và ứng dụng giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa trong chẩn đoán bệnh hiếm gặp còn hạn chế. Việc điều trị hiện nay chủ yếu dựa vào sử dụng kháng sinh, điều trị triệu chứng và chăm sóc da tích cực. Do đó, nghiên cứu chuyên sâu về miễn dịch học và di truyền học là cần thiết để

xác định cơ chế bệnh sinh của HIES, góp phần phát triển các phương pháp chẩn đoán và điều trị hiệu quả hơn. Việc nghiên cứu các biến thể gen liên quan đến HIES không chỉ giúp chẩn đoán bệnh sớm mà còn hỗ trợ xây dựng phác đồ điều trị y học cá thể, cải thiện chất lượng cuộc sống và kéo dài tuổi thọ cho bệnh nhân.

Xuất phát từ thực tiễn này, nghiên cứu "Phát hiện các biến thể di truyền mới trên bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh tăng IgE" được thực hiện với mục tiêu xác định các biến đổi di truyền trên các gen liên quan đến HIES. Cụ thể, nghiên cứu sẽ giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của bệnh nhân HIES, phân tích dữ liệu để sàng lọc các biến thể gen liên quan, đồng thời đánh giá tác động của các biến thể này bằng các công cụ dự đoán in silico. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp bằng chứng khoa học quan trọng giúp chẩn đoán sớm, tư vấn di truyền và phát triển phương pháp điều trị hiệu quả cho bệnh nhân HIES tại Việt Nam.

2. Mục tiêu nghiên cứu

– Xác định được các biến đổi di truyền trên các gen liên quan đến hội chứng HIES bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hoá (WES).

– Đánh giá được các biến thể gây bệnh bằng các phần mềm dự đoán in silico từ đó sàng lọc và tìm ra các biến thể gây bệnh.

3. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu thu thập mẫu và giải trình tự vùng gen mã hóa.
- Xác định và chú giải biến thể.
- Sàng lọc biến thể liên quan đến bệnh.
- Nghiên cứu kiểm chứng lại các biến thể.

4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

HIES là một bệnh lý miễn dịch hiếm gặp, đặc trưng bởi tình trạng dễ bị nhiễm trùng nặng và các bất thường về hệ miễn dịch. Phương pháp chẩn đoán hiện tại dựa chủ yếu vào triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm IgE huyết thanh. Tuy nhiên, do sự chồng chéo về triệu chứng lâm sàng việc xác định nguyên nhân chính xác vẫn là một thách thức. Việc nghiên cứu các yếu tố di truyền là cần thiết để hiểu rõ cơ chế sinh bệnh và tìm ra phương pháp chẩn đoán, điều trị hiệu quả HIES. WES là công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới, giúp phát hiện các biến thể di truyền, bao gồm các đột biến gen và SNP ảnh hưởng đến sự phát triển và chức năng của hệ

miễn dịch. Phương pháp này có tiềm năng giúp chẩn đoán sớm và phát triển các phác đồ điều trị y học cá thể.

Tại Việt Nam, nghiên cứu di truyền về HIES và ứng dụng WES còn hạn chế, những đóng góp về việc phát hiện các biến thể mới trên các gen liên quan đến HIES từ nghiên cứu này không chỉ giúp mở rộng hiểu biết về cơ chế di truyền của hội chứng mà còn cung cấp những bằng chứng khoa học quan trọng để phát triển các phương pháp điều trị cá nhân hóa, góp phần nâng cao khả năng chẩn đoán và điều trị hội chứng HIES tại Việt Nam, giảm tỷ lệ tử vong và nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân mắc HIES.

5. Những đóng góp mới của đề tài

– Đã xác định được các biến thể mới thuộc các gen *PTPRC*, *UNC119*, *IL21R*, *NHEJ1* ở bệnh nhân HIES người Việt Nam. Trong đó, biến thể c.526C>T trên gen *NHEJ1* được xác định là dạng đồng hợp tử có khả năng liên quan đến mức độ nghiêm trọng của bệnh.

– Nghiên cứu góp phần mở rộng hiểu biết về cơ chế di truyền của hội chứng HIES và cung cấp bằng chứng khoa học hỗ trợ chẩn đoán sớm, tư vấn di truyền và định hướng điều trị bệnh nhân HIES tại Việt Nam.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. HỘI CHỨNG SUY GIẢM MIỄN DỊCH BẨM SINH TĂNG IGE

HIES bao gồm một nhóm các rối loạn suy giảm miễn dịch nguyên phát hiếm gặp, đặc trưng bởi các triệu chứng như: hàm lượng IgE huyết thanh tăng rất cao, chàm, viêm da dị ứng mạn tính và nhiễm trùng tái diễn ở da và phổi do tụ cầu *Staphylococcus aureus* [1], dẫn đến hình thành các bóng khí trong phổi [2]. Hầu hết bệnh nhân mắc HIES có mức tăng bạch cầu ái toan và IgE rất cao, thường trên 2.000 IU/mL, chỉ số này cao gấp hơn 10 lần giới hạn bình thường [3]. Tỷ lệ mắc HIES được ghi nhận trên toàn cầu khá thấp, ước tính xảy ra khoảng 1 trên 1.000.000 người. Do tính hiếm gặp của nó, với 250 trường hợp được ghi nhận, việc ước tính chính xác mức độ phổ biến của HIES là một thách thức vì nó thường bị chẩn đoán sai [4]. Nhu cầu đặt ra là phải chỉ ra cơ sở khoa học giúp các bác sỹ lâm sàng trong việc chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây ra hội chứng HIES ở các bệnh nhân từ đó có được định hướng điều trị hiệu quả.



Hình 1.1. Một ca bệnh mắc hội chứng HIES điển hình [1].

a. Viêm da ; b. Áp xe lạnh

HIES lần đầu tiên được ghi nhận vào năm 1966 khi Davis và cộng sự báo cáo về trường hợp của hai bé gái mắc chàm nặng từ nhỏ, kèm theo nhiễm trùng da tái phát do tụ cầu và áp-xe phổi. Những tổn thương này không có dấu hiệu viêm điển hình (đỏ, nóng, đau), do đó được gọi là “áp-xe lạnh” [5]. Vài năm sau, Buckley và cộng sự quan sát thấy thêm các đặc điểm bất thường về khuôn mặt và mức IgE tăng rất cao ở hai thiếu niên nam, từ đó xác định hội chứng Buckley [6]. Năm 1974, nghiên cứu của Hill và cộng sự đã chứng minh rằng hội chứng Job và Buckley thực

chất là một bệnh lý chung, sau này được gọi là hội chứng HIES [7]. Đến năm 1999, Grimbacher và cộng sự mô tả HIES là một bệnh đa hệ thống di truyền trội, ảnh hưởng cả miễn dịch và các cơ quan khác như xương, răng và mô liên kết [8].

Hội chứng tăng IgE bẩm sinh được chia thành hai nhóm chính dựa trên cơ chế di truyền: thể di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường (autosomal dominant – AD-HIES) và thể di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường (autosomal recessive – AR-HIES) [9].

Thể HIES di truyền trội trên NST thường, còn gọi là hội chứng Job hoặc STAT3-HIES, là thể điển hình và chiếm đa số trường hợp HIES đã được ghi nhận. Nguyên nhân do đột biến dị hợp tử ở gen *STAT3*. Gen *STAT3* mã hóa cho một yếu tố phiên mã quan trọng trong nhiều con đường truyền tín hiệu cytokine (IL-6, IL-23, IL-10,...), đột biến *STAT3* gây ra các biểu hiện lâm sàng đa dạng của HIES [10], bệnh nhân AD-HIES bị suy giảm biệt hóa tế bào Th17 (dẫn đến dễ nhiễm nấm và tụ cầu “lạnh”), đồng thời làm rối loạn chức năng tạo sợi collagen và mô liên kết (khiến gây ra các bất thường xương, răng, mạch máu) [11].

Thể HIES di truyền lặn (AR-HIES) được hình thành do đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép ở các gen khác nhau. Trong đó, dạng điển hình nhất là thiếu hụt DOCK8, được phát hiện năm 2009 [12]. Đột biến gen gây mất chức năng protein DOCK8 – một protein quan trọng cho sự di chuyển và tương tác của tế bào miễn dịch (điều hòa khung actin của lymphocyte) và tham gia hoạt hóa đường truyền tín hiệu STAT3 [13]. Hậu quả của thiếu hụt DOCK8 dẫn đến suy giảm miễn dịch nặng (giảm chức năng cả lympho T, B và NK) kèm theo cơ địa dị ứng nặng và nguy cơ ung thư cao [14]. Trước đây DOCK8-HIES được xếp vào HIES, nhưng gần đây một số tác giả coi đây là một suy giảm miễn dịch kết hợp riêng biệt vì mức độ suy giảm miễn dịch trầm trọng hơn so với STAT3-HIES [12]. Dù cách phân loại khác nhau, các đặc điểm lâm sàng của thiếu hụt DOCK8 có nhiều điểm tương đồng với AD-HIES như bệnh nhân cũng có đặc điểm eczema nặng, nồng độ IgE trong máu rất cao, nhiễm trùng da và phổi tái diễn. Tuy nhiên, điểm khác biệt là AR-HIES không có các bất thường xương, răng, mặt như AD-HIES, thay vào đó bệnh nhân thường bị nhiễm dai dẳng các virus như HSV, HPV, VZV... và dị ứng nặng toàn thân. Thiếu hụt DOCK8 cũng dẫn đến nhiều biến chứng tự miễn và ung thư do rối loạn điều hòa miễn dịch mạn tính [14].

1.2. TRIỆU CHỨNG LÂM SÀNG

HIES là bệnh lý đa hệ cơ quan, với biểu hiện không chỉ ở hệ miễn dịch mà còn ở da, hô hấp, xương, răng, mạch máu và đôi khi hệ thần kinh [8].

Các tổn thương trên da thường xuất hiện sớm, ngay từ giai đoạn sơ sinh với những đốm hồng phát ban đầy mụn mủ hoặc phát ban dạng chàm [8]. Trẻ có thể bị chàm eczema nặng kéo dài, dễ bội nhiễm tụ cầu. Áp-xe da do tụ cầu vàng tái diễn, thường gọi là “áp-xe lạnh” vì có mủ nhưng ít dấu hiệu viêm (không đỏ, không đau nhiều). Bệnh nhân HIES cũng thường bị nhiễm nấm *Candida* ở da và niêm mạc do rối loạn miễn dịch tế bào T [10]. Đáng chú ý, ở thể AR-HIES do DOCK8, bệnh nhân còn bị các nhiễm trùng virus da nghiêm trọng và dai dẳng như *Herpes simplex*, *Varicella zoster*, *Molluscum contagiosum* và HPV, gây các mụn cóc và tổn thương dạng u mềm dễ lây khó điều trị [9].

Nhiễm trùng đường hô hấp tái diễn là triệu chứng phổ biến. Bệnh nhân thường bị viêm phổi nhiều lần, hay gặp do *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* hoặc *Haemophilus influenzae* [10]. Đặc biệt, viêm phổi do tụ cầu ở bệnh nhân mắc HIES cũng có tính “lạnh” tương tự áp-xe da, bệnh nhân có đờm mủ, ít sốt, ít biểu hiện viêm toàn thân [6]. Quá trình lành phổi thường bất thường, dẫn đến hình thành bọt khí (pneumatoceles) và giãn phế quản. Viêm xoang và viêm tai giữa mạn tính cũng thường gặp do nhiễm trùng tái diễn [4].

Xương khớp và răng: Thể AD-HIES (do STAT3) thường có bất thường về phát triển xương và mô liên kết. Khoảng 60-70% bệnh nhân có tăng độ giãn khớp và cột sống cong vẹo (vẹo cột sống $>10^\circ$). Xương có thể dễ gãy bất thường – khoảng 65% bệnh nhân bị gãy xương chỉ sau chấn thương nhẹ. Khoảng 70% trường hợp được ghi nhận rằng sữa không rụng đúng tuổi, dẫn đến tồn tại hai hàm răng (răng sữa và răng vĩnh viễn cùng tồn tại) [14]. Khuôn mặt bệnh nhân AD-HIES có đặc điểm thô với trán dô, mũi rộng, cằm nhô và khoảng cách hai mắt xa, những nét này thường rõ dần khi đến tuổi dậy thì. Nhiều bệnh nhân có thể gặp tình trạng phình mạch hoặc giãn mạch ở động mạch cỡ trung bình, ví dụ phình động mạch não hoặc vành, mặc dù hiếm gây biến chứng lâm sàng nghiêm trọng [8]. Ngược lại, ở thể AR-HIES do DOCK8 và các gen khác, không thấy các bất thường xương, răng và mô liên kết đặc hiệu như trên [10].

Thần kinh: Hầu hết bệnh nhân HIES không có tổn thương thần kinh trung ương trực tiếp do bệnh, nhưng ở AD-HIES đôi khi ghi nhận các bất thường hình

ảnh học như dị dạng Arnold-Chiari type I (khoảng 40% trường hợp) hoặc các điểm tăng tín hiệu nhỏ trên MRI não (75% trường hợp) [4]. Các tổn thương này thường không gây triệu chứng rõ và được phát hiện tình cờ. Ngược lại, bệnh nhân AR HIES có tỷ lệ biến chứng thần kinh cao hơn, chủ yếu do nhiễm trùng hệ thần kinh. Sự thiếu hụt DOCK8 thường dẫn đến nhiễm virus thần kinh cơ hội như viêm màng não, viêm não do HSV, JC virus (gây leukoencephalopathy đa ổ tiến triển – PML) [9]. Ngoài ra có thể gặp viêm mạch hệ thần kinh trung ương gây đột quỵ ở thể AR HIES (4). Một số thể AR-HIES hiếm (như do PGM3) còn ghi nhận chậm phát triển trí tuệ hoặc triệu chứng thần kinh ngoại vi do ảnh hưởng của rối loạn chuyển hóa và miễn dịch [1].

Tiêu hóa: Biểu hiện ở đường tiêu hóa có thể gặp ở cả hai thể bệnh. Bệnh nhân STAT3-HIES (AD) đôi khi bị trào ngược dạ dày-thực quản và rối loạn nhu động thực quản; hiếm hơn có thể bị thủng ruột tự phát hoặc mắc các túi thừa ở ruột. Các nhiễm trùng nấm đường tiêu hóa cũng được ghi nhận, ví dụ viêm thực quản do *Candida*, hoặc viêm ruột do nấm *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*... mặc dù ít gặp [8]. Ở bệnh nhân thiếu hụt DOCK8, có thể thấy tình trạng viêm thực quản tăng bạch cầu ái toan do cơ địa dị ứng nặng, nhiễm trùng đường ruột do virus (rota, entero...) hoặc vi khuẩn dễ tái diễn [9].

Miễn dịch: Xét nghiệm đặc trưng nhất là IgE huyết thanh tăng cao đột biến. Nồng độ IgE ở bệnh nhân mắc hội chứng HIES thường cao gấp hàng chục lần giới hạn trên của người bình thường (thường >2000 IU/mL) có trường hợp lên đến hàng chục nghìn IU. Kèm theo đó, bạch cầu ái toan ngoại vi tăng cao ở khoảng >90% bệnh nhân [4]. Suy giảm miễn dịch ở bệnh nhân mắc HIES chủ yếu thuộc nhánh miễn dịch dòng T và hàng rào da-niêm mạc. Ở thể STAT3-HIES, do đột biến STAT3 gây thiếu hụt tế bào Th17, bệnh nhân giảm sản xuất cytokine IL-17, IL 22... dẫn đến dễ nhiễm nấm ở da, niêm mạc. Ngược lại, chức năng thực bào và bổ thể đa phần bình thường, nên các dấu hiệu viêm kinh điển (sốt, sưng đỏ) giảm đi – giải thích cho hiện tượng “áp-xe lạnh” và “viêm phổi lạnh” kể trên [10].

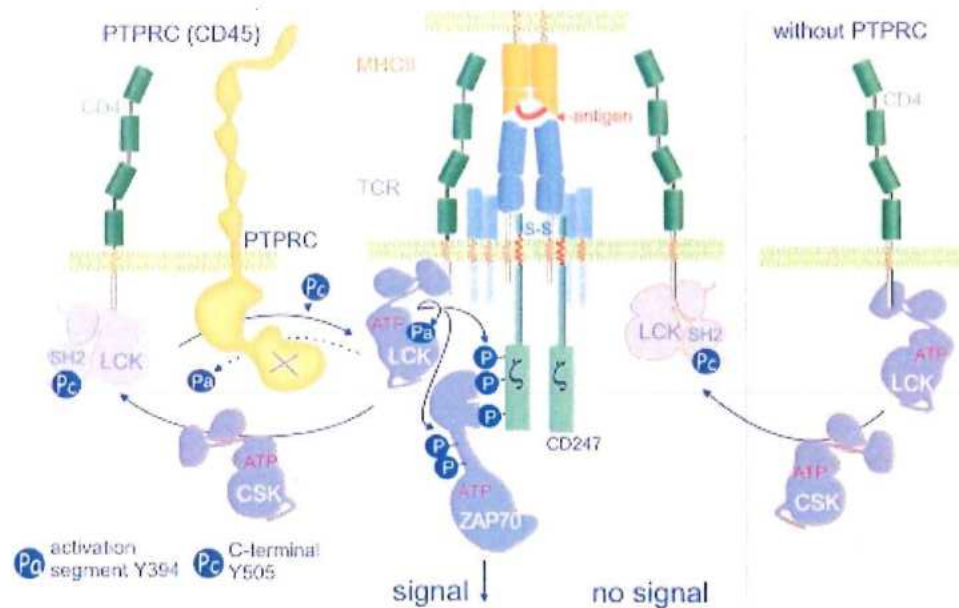
1.3. VAI TRÒ CỦA YẾU TỐ DI TRUYỀN TRONG CƠ CHẾ BỆNH SINH CỦA HIES

Theo phân loại mới nhất của Liên minh các hiệp hội miễn dịch học Quốc tế (International Union of Immunological Societies - IUIS), 11 khiếm khuyết được công nhận là nguyên nhân di truyền của HIES do đột biến trên 10 gen *DOCK8*,

SPINK5, *PGM3*, *ZNF341*, *IL6ST*, *IL6R*, *TGFB1*, *TGFB2* và *CARD11/14* gây ra [15].

Hiện nay các nghiên cứu tiếp tục điều tra cơ sở di truyền của hội chứng HIES, bao gồm cả vai trò tiềm ẩn của các đột biến gen mới như: *PTPRC*, *RLTPR/CARMIL2*, *STAT6*, *NHEJ*, *UNC119*, *TLR3*, *JAK3*, *IL21R* [13].

1.3.1. Gen *PTPRC*



Hình 1.2. Vai trò của *PTPRC* (CD45) trong hoạt hóa tế bào T [16].

Gen *PTPRC* (Gene - Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C) nằm trên nhiễm sắc thể 1 vùng 1q31-q32, mã hóa protein tyrosine phosphatase loại thụ thể C, thường gọi là CD45 [16]. CD45 là một enzyme xuyên màng thuộc họ phosphatase tyrosine [17], hiện diện trên tất cả tế bào máu có nhân (đặc biệt là lympho bào) và giữ vai trò điều hòa hoạt hóa, biệt hóa tế bào T, B cũng như nhiều tế bào miễn dịch khác [18]. CD45 hoạt động như một phosphatase của JAK kinases, qua đó kiểm soát quá trình chuyển lớp kháng thể IgE do IL-4 kích thích ở tế bào B [19]. Cơ chế bệnh sinh có thể liên quan đến việc suy giảm một phần hoạt tính của CD45, dẫn tới rối loạn điều hòa tín hiệu IL-4/IL-13, hậu quả là làm tăng sản xuất IgE. Thực tế, các nghiên cứu in vitro đã cho thấy rằng tình trạng thiếu hụt CD45 làm gia tăng sự chuyển lớp IgE ở tế bào B thông qua việc giảm khả năng khử phosphoryl protein JAK, từ đó khuếch đại tín hiệu IL-4 [20]. Đột biến mất chức năng đồng hợp tử ở *PTPRC* gây thiếu hụt CD45 trầm trọng, dẫn đến suy giảm miễn

dịch kết hợp thể nặng (SCID) kiểu T-, B+ (thiếu tế bào T nhưng có tế bào B) với biểu hiện nhiễm trùng nghiêm trọng khởi phát từ sớm. Mặc dù bệnh nhân mắc SCID thường tử vong sớm nên không biểu hiện đầy đủ các triệu chứng của hội chứng tăng IgE (HIES), nhưng những bằng chứng hiện có cho thấy gen *PTPRC* có vai trò gián tiếp trong việc điều hòa nồng độ IgE và cơ địa dị ứng thông qua kiểm soát con đường tín hiệu của các cytokine [21]. Bệnh nhân SCID do thiếu CD45 thường có chỉ số globulin IgG, IgA giảm mạnh và tăng IgM do khiếm khuyết chuyển lớp kháng thể [20]. Tình trạng này gây nhiễm trùng nặng từ sớm, đặc biệt bệnh nhân dễ nhiễm nấm và virus, tương tự các biểu hiện nhiễm trùng nặng trong hội chứng HIES [20]. Một số nghiên cứu cho thấy các biến thể dị hợp tử gây suy giảm chức năng của protein PTPRC có thể liên quan đến sự gia tăng nồng độ IgE và làm tăng nguy cơ mắc các bệnh lý dị ứng. Một ví dụ cụ thể là trường hợp bệnh nhi 6 tuổi mắc viêm da cơ địa mức độ nặng với nồng độ IgE huyết thanh rất cao (>10.000 IU/mL). Bệnh nhi này được phát hiện mang biến thể dị hợp tử của gen *PTPRC*, cùng với các biến thể ở những gen khác như *FLG*, *ZAP70* và *LYST* [22]. Mặc dù không có biến thể đơn lẻ nào có thể giải thích đầy đủ bệnh cảnh lâm sàng, các tác giả đề xuất rằng sự kết hợp của nhiều biến thể di truyền, trong đó bao gồm cả biến thể ở gen *PTPRC*, đã góp phần hình thành kiểu hình hội chứng HIES ở bệnh nhân này [23]. Đến nay, các trường hợp thiếu hụt CD45 được ghi nhận trên người vẫn rất hiếm gặp. Đột biến đầu tiên được mô tả là một đột biến mất đoạn trên gen *PTPRC*, gây mất hoàn toàn biểu hiện CD45, được phát hiện ở một bệnh nhi mắc SCID [21]. Một trường hợp khác đã ghi nhận đột biến dạng thay thế nucleotide đơn (c.77C>G), gây ra sự thay đổi tại vùng hoạt động của protein CD45, làm mất chức năng enzyme của phân tử này [20].

1.3.2. Gen *NHEJ1*

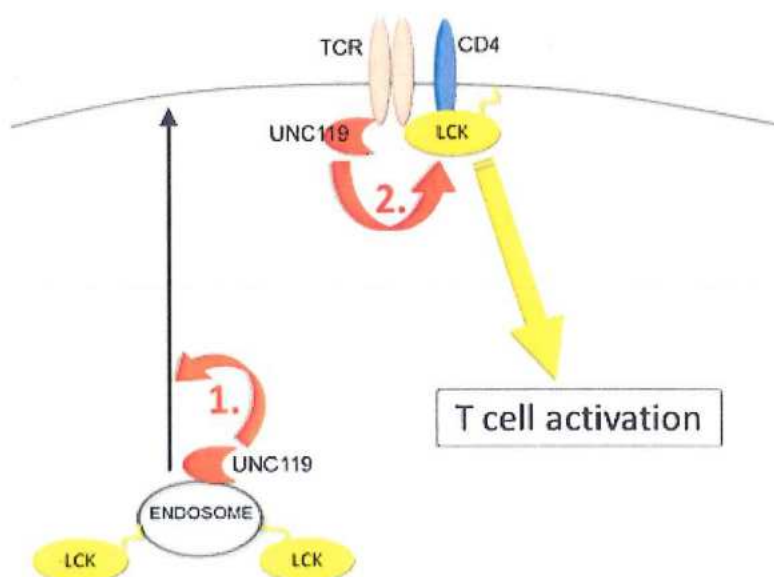
NHEJ1 (Non-homologous end joining factor 1) nằm trên nhiễm sắc thể 2q35, mã hóa protein XLF/Cernunnos – một yếu tố quan trọng trong quá trình sửa chữa DNA theo cơ chế nối đầu không tương đồng [24]. *NHEJ1* có vai trò kết nối các mảnh DNA hai sợi bị đứt gãy, đặc biệt quan trọng trong việc tái tổ hợp V(D)J ở tế bào lympho. Trong giai đoạn phát triển của tế bào T và B, enzyme RAG tạo ra các điểm đứt gãy DNA hai sợi ở gen thụ thể tế bào T và gen kháng thể. Sau đó, hệ thống NHEJ, bao gồm các protein như Ku70/80, DNA-PKcs, Artemis, Ligase IV, XRCC4, và XLF, sẽ thực hiện nối lại các đầu DNA này để tạo thành các thụ thể chức năng [25]. Protein XLF (do *NHEJ1* mã hóa) tương tác với XRCC4 và DNA

Ligase IV, giúp ổn định và tăng cường hiệu quả của quá trình nối DNA. Nếu thiếu XLF, tế bào sẽ gặp khó khăn trong việc nối các đoạn DNA V(D)J, dẫn đến không thể tạo ra các thụ thể TCR/BCR. Bên cạnh đó, XLF còn tham gia sửa chữa các đứt gãy DNA do các tác nhân lý hóa (như bức xạ), giúp bảo vệ tế bào khỏi tổn thương gen [24]. Đột biến ở *NHEJ1* gây ra hội chứng Cernunnos deficiency, một dạng của SCID kết hợp với nhạy cảm phóng xạ (RS-SCID). Bệnh nhân thường biểu hiện suy giảm miễn dịch nặng tương tự như SCID (mất tế bào T và B) kèm theo các bất thường như chậm phát triển, đầu nhỏ và dị dạng mặt nhẹ. Về miễn dịch, các bệnh nhân mắc hội chứng Cernunnos thường có sự giảm sút nghiêm trọng tế bào T và B (kiểu hình $T^- B^- NK^+$ SCID), dẫn đến nhiễm trùng cơ hội từ sớm [24]. Các tế bào của bệnh nhân miễn cảm với tia X (do khó khăn trong việc sửa chữa các đứt gãy DNA) và hầu như không thể tạo ra dòng tế bào T, B chức năng (do không thể tái sắp xếp TCR/BCR). Chính vì kiểu hình suy giảm miễn dịch nặng này, nhiều bệnh nhân có thể tử vong từ khi còn rất nhỏ nếu không được ghép tủy kịp thời [25]. Trên lâm sàng, SCID do đột biến *NHEJ1* có thể có một số điểm tương đồng với HIES ở giai đoạn sớm như bệnh nhân gặp tình trạng viêm da dai dẳng từ sơ sinh, nhiễm nấm *Candida* ở da và niêm mạc, tiêu chảy kéo dài và viêm phổi do *Pneumocystis*, các triệu chứng cũng xuất hiện trong giai đoạn sớm của HIES [26]. Tuy nhiên, mức IgE trong hầu hết các trường hợp SCID do *NHEJ1* thường không cao. Ngược lại, nồng độ các globulin miễn dịch đều rất thấp do thiếu tế bào T trợ giúp, đôi khi hàm lượng IgM có thể tăng tương đối nếu có tế bào B [27].

Một số báo cáo ghi nhận IgE tăng nhẹ ở một số bệnh nhân SCID do đột biến *NHEJ1* (ví dụ, bệnh nhân P2 trong nghiên cứu của Rocio và cộng sự có mức IgE khoảng 150 IU/mL, cao hơn mức bình thường nhẹ), có thể là do hiện tượng viêm da kéo dài kích thích sản xuất IgE. Nhìn chung, *NHEJ1* không phải là một gen gây HIES điển hình, nhưng cần phân biệt SCID do *NHEJ1* với thể HIES khởi phát sớm và nặng. Ở trẻ sơ sinh mắc chậm nặng, nhiễm trùng da và phổi tái diễn kèm theo tăng IgE, xét nghiệm tế bào T-B-NK có thể giúp phân biệt: SCID *NHEJ1* sẽ có giảm nồng độ tế bào T và B, trong khi HIES do STAT3/DOCK8 thường vẫn có nồng độ tế bào lympho ở mức gần bình thường [24]. Năm 2019 đã có báo về hai bệnh nhân mang cùng một đột biến nonsense đồng hợp tử (c.1696C>T, p.Arg565) ở *NHEJ1*, nhưng biểu hiện lâm sàng của họ khác biệt đáng kể: một trường hợp là SCID điển hình khởi phát từ tháng tuổi thứ 1, trong khi trường hợp còn lại chỉ biểu hiện giảm tiểu cầu và thiếu máu trong tám năm đầu đời [28]. Cả hai bệnh nhân đều

có bằng chứng về khiếm khuyết trong sửa chữa DNA và giảm bạch cầu lympho, khẳng định tính đa dạng của kiểu hình đột biến *NHEJ1* [24]. Một nghiên cứu khác chỉ ra rằng thiếu XLF (do *NHEJ1* mã hóa) ảnh hưởng đến quá trình chuyển lớp kháng thể IgCSR: tế bào B thiếu XLF dẫn đến giảm khả năng bổ sung nucleotide ở đoạn nối V(D)J và gặp khó khăn trong việc nối các đoạn DNA trong quá trình chuyển lớp kháng thể. Hệ quả là có thể xuất hiện rối loạn nhẹ nồng độ kháng thể, nhưng trên lâm sàng, tình trạng này thường bị che lấp bởi suy giảm miễn dịch nghiêm trọng hơn [29].

1.3.3. Gen *UNC119*



Hình 1.3. Vai trò của *UNC119* trong định vị *Lck* [30].

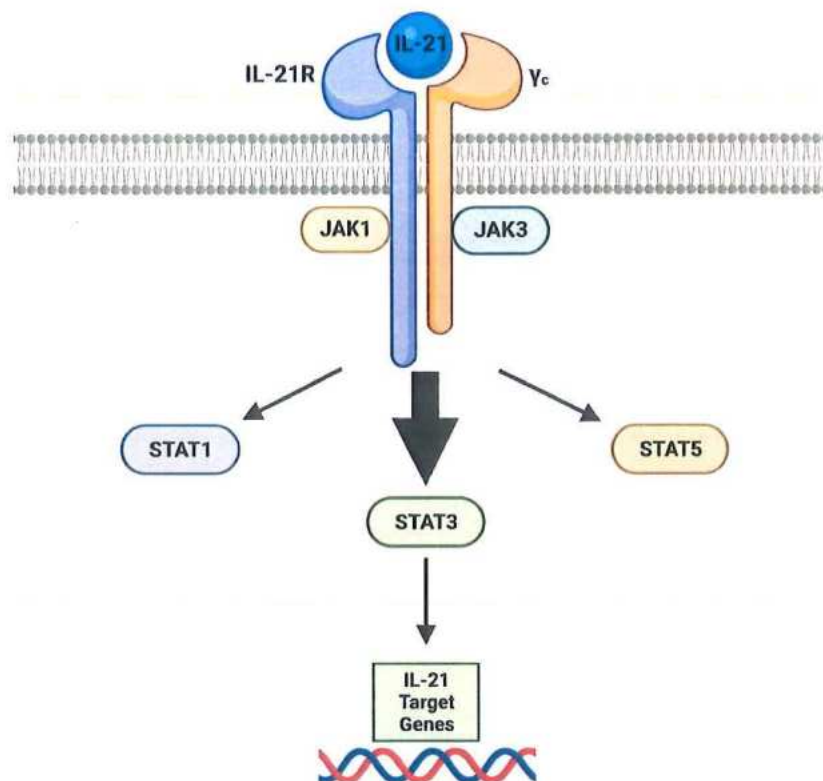
Gen *UNC119* (Uncoordinated-119) nằm trên nhiễm sắc thể 17q11.2 mã hóa protein UNC119, một loại chaperone gắn lipid có mặt trong tế bào T và các mô thần kinh [30]. Trong hệ miễn dịch, UNC119 đóng vai trò là protein thích ứng cho kinase Lck, một loại tyrosine kinase chủ yếu tham gia vào quá trình truyền tín hiệu TCR trong tế bào T. Cụ thể, UNC119 gắn với đuôi acylated của Lck, hỗ trợ vận chuyển Lck tới màng tế bào và gắn vào vị trí gần TCR. Tại đây, Lck được kích hoạt để bật dòng tín hiệu từ TCR. Khi TCR tiếp xúc với kháng nguyên, UNC119 giúp định vị Lck tại vị trí chính xác. Lck sau đó tự hoạt hóa (thông qua việc loại bỏ nhóm phosphoryl Tyr505 ức chế) và phosphoryl hóa chuỗi CD3, tạo ra tín hiệu kích hoạt tế bào T. UNC119 là yếu tố cần thiết cho hoạt động hiệu quả của tế bào T CD4⁺, đặc biệt trong quá trình hoạt hóa và tăng sinh đáp ứng với kích thích kháng nguyên. Ngoài ra, *UNC119* còn biểu hiện trong tế bào thần kinh [30].

Đột biến ở gen *UNC119* có liên quan đến hội chứng suy giảm miễn dịch hiếm gọi là Immunodeficiency 13 (ID13) hay Idiopathic CD4 lymphopenia (ICL) [31]. Hội chứng này được đặc trưng bởi sự suy giảm liên tục số lượng tế bào T CD4+ (<300 tế bào/ μ L) mà không do các bệnh cơ hội hoặc nguyên nhân thứ phát nào. Ca bệnh đầu tiên được Gorska và cộng sự (2012) mô tả là một phụ nữ 32 tuổi có tiền sử nhiễm trùng tái diễn bao gồm viêm xoang, viêm phổi do vi khuẩn, zona tái phát, nấm da và viêm phổi nhiều đợt, kèm theo CD4 giảm còn <300 tế bào/ μ L, các kiểu hình này tương tự HIES [31]. Xét nghiệm di truyền phát hiện bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử sai nghĩa c.65T>G (p.Val22Gly) ở gen *UNC119*. Đột biến này tạo ra protein UNC119 bất thường, khiến Lck bị giữ lại trong nội bào và giảm đáng kể hoạt tính kinase. Hậu quả là quá trình truyền tín hiệu TCR bị suy giảm nghiêm trọng, dẫn đến giảm phosphoryl hóa ZAP70, giảm biểu hiện các phân tử hoạt hóa như CD25, CD69 và giảm sản xuất IL-2, từ đó làm suy yếu khả năng hoạt hóa và tăng sinh của tế bào T CD4+. Sự suy giảm tín hiệu TCR này gây mất cân bằng đáp ứng miễn dịch, với sự giảm rõ rệt các đáp ứng Th1 và Th17 (giảm sản xuất IFN- γ và IL-17), trong khi đáp ứng Th2 lại tăng tương đối (tăng IL-4, IL-5). Trạng thái mất cân bằng này, kết hợp với tình trạng nhiễm trùng da-niêm mạc kéo dài do suy giảm miễn dịch, tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng Th2 chiếm ưu thế và thúc đẩy quá trình chuyển lớp kháng thể sang IgE ở tế bào B. Do đó, mặc dù UNC119 không trực tiếp điều hòa tổng hợp IgE, nhưng sự suy giảm chức năng của gen này có thể dẫn đến tăng IgE thứ phát, chủ yếu thông qua cơ chế mất kiểm soát miễn dịch tế bào T và ưu thế hóa đáp ứng Th2. Điều này giải thích vì sao bệnh nhân mang đột biến *UNC119* thường có biểu hiện tăng nhẹ nồng độ IgE, viêm da mạn tính và nhiễm nấm tái phát, dù không đạt mức tăng IgE điển hình như hội chứng HIES do đột biến *STAT3* hoặc *DOCK8*. Vai trò gián tiếp nhưng quan trọng của UNC119 trong cơ chế bệnh sinh tăng IgE cho thấy đây là một yếu tố di truyền cần được lưu ý khi tiếp cận chẩn đoán các trường hợp suy giảm miễn dịch kết hợp với tăng IgE không rõ nguyên nhân [32].

1.3.4. Gen *IL21R*

Gen *IL21R* nằm trên nhiễm sắc thể 16p12.1 và mã hóa thụ thể Interleukin-21 (IL-21R) [33]. Thụ thể IL-21 gồm hai chuỗi: chuỗi α đặc hiệu (IL-21R α) được mã hóa bởi *IL21R* và chuỗi γ do *IL2RG* mã hóa. γ c này cũng là một thành phần quan trọng trong các thụ thể IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 và IL-15 [34]. Khi thụ thể IL-21 được tiết ra chủ yếu bởi tế bào T trợ giúp và tế bào NK, gắn vào IL-21R, phức hợp này sẽ

kích hoạt cặp kinase JAK1-JAK3. Quá trình này dẫn đến phosphoryl hóa và hoạt hóa các yếu tố tín hiệu nội bào STAT1, STAT3 và STAT5, từ đó điều phối nhiều chức năng miễn dịch quan trọng [33].



Hình 1.4. Mô hình hoạt động của IL21R [35].

Vai trò của IL-21R trong hệ miễn dịch rất đa dạng. Thụ thể này có chức năng thúc đẩy sự phát triển và hoạt hóa tế bào B, kích thích sinh tương bào để sản xuất kháng thể. Ngoài ra, IL-21R còn giúp tăng cường chức năng của tế bào T_{FH}, hỗ trợ quá trình tương tác giữa tế bào T và B, từ đó tối ưu hóa đáp ứng miễn dịch dịch thể. Đối với miễn dịch tế bào, IL-21R đóng vai trò tăng cường độc tính của tế bào NK và CD8⁺, đồng thời hỗ trợ một phần cho sự biệt hóa tế bào Th17. Đặc biệt, IL-21R trên tế bào B có chức năng hỗ trợ chuyển lớp kháng thể từ IgM sang IgG và IgA, giúp tạo ra một hệ miễn dịch thích nghi hiệu quả. Khi thiếu IL-21R, dù số lượng tế bào B vẫn bình thường, nhưng khả năng đáp ứng kháng thể bị suy giảm nghiêm trọng, dẫn đến tình trạng suy giảm miễn dịch dịch thể [36].

Đột biến ở *IL21R* đã được xác định là nguyên nhân gây ra một thể suy giảm miễn dịch kết hợp, được phân loại là ID56 [35]. Bệnh nhân mang đột biến này có các kiểu hình thường thấy trong HIES như nhiễm trùng nặng từ sớm, tiêu chảy mạn tính do ký sinh trùng *Cryptosporidium*, viêm đường mật xơ hóa và suy gan, bệnh

nhân còn có nhiễm trùng da và phổi tái phát do tụ cầu và nhiễm nấm *Candida*. Điểm nổi bật trong xét nghiệm của bệnh nhân thiếu IL-21R là mức IgE huyết thanh tăng rất cao, trong khi IgG và IgA bị suy giảm nghiêm trọng [36]. Một nghiên cứu được thực hi về hai anh em ruột bị thiếu IL-21R có mức IgE lần lượt là ~2000 IU/mL và ~24.425 IU/mL, trong khi nồng độ IgG trong huyết thanh luôn dưới 800 mg/dL. Sự mất cân bằng globulin miễn dịch này tương tự như HIES: hàm lượng IgE tăng vọt, các lớp kháng thể bảo vệ khác lại suy giảm. Cơ chế dẫn đến tình trạng này là do thiếu tín hiệu IL-21, khiến tế bào B không thể biệt hóa thành tương bào sản xuất IgG và IgA. Đồng thời, tế bào T_H2 và T_{FH} có xu hướng tiết nhiều IL-4 hơn, vì trong điều kiện bình thường, IL-21 đóng vai trò ức chế đáp ứng Th2. Khi IL-21 bị thiếu, tín hiệu IL-4 trở nên chiếm ưu thế, dẫn đến chuyển lớp kháng thể ưu tiên sang IgE [35]. Bên cạnh đó, thiếu hụt IL-21R còn làm giảm sự biệt hóa của tế bào Th17, do IL-21 là một yếu tố hỗ trợ cho quá trình này. Hậu quả là bệnh nhân dễ nhiễm nấm, tương tự như bệnh nhân mắc HIES do đột biến STAT3. Nghiên cứu của Kotlarz và cộng sự cũng cho thấy các bệnh nhân bị thiếu IL-21R đều nhiễm *Candida* và *Pneumocystis jirovecii* từ rất sớm [36]. Tổng hợp những yếu tố trên, có thể thấy rằng *IL21R* là một trong những gen liên quan chặt chẽ đến cơ chế bệnh sinh của HIES.

Mối liên hệ giữa *IL21R* và HIES được phát hiện vào năm 2013, khi Kotlarz và cộng sự báo cáo về hai gia đình có nhiều trẻ tử vong do tiêu chảy mạn tính và nhiễm trùng, sau đó được xác định là do đột biến *IL21R* [36]. Tất cả các bệnh nhi này đều có nồng độ IgE cao bất thường, với triệu chứng lâm sàng tương tự HIES, nhưng xét nghiệm di truyền không phát hiện đột biến *STAT3* và *DOCK8*. Giải trình tự toàn bộ gen đã xác định mỗi gia đình mang một đột biến đồng hợp tử khác nhau ở *IL21R*. Gia đình A mang đột biến p.Arg201Leu ở domain ngoài màng, còn gia đình B mang đột biến mất đoạn 6 nucleotide ở exon 1 [33]. Thử nghiệm chức năng trên biến thể Arg201Leu cho thấy thụ thể IL-21 không vận chuyển được lên bề mặt tế bào, dẫn đến mất khả năng gắn với IL-21 và mất hoạt hóa STAT1/3/5. Hậu quả là tế bào B không thể biệt hóa thành tương bào, tế bào T CD8⁺ /NK giảm chức năng tiêu diệt, và tế bào T CD4⁺ giảm tiết cytokine Th17 [35]. Năm 2018, Avery và cộng sự tìm thấy một số đột biến mất chức năng trong gen *IL21* (mã hóa cytokine IL-21) ở bệnh nhân có nồng độ IgE tăng cao và nhiễm trùng tái diễn, càng nhấn mạnh vai trò quan trọng của IL-21 trong việc kiểm soát nồng độ IgE [36].

1.4. GIẢI TRÌNH TỰ TOÀN BỘ VÙNG GEN MÃ HÓA (WES)

1.4.1. Tổng quan về WES

WES là một phương pháp giải trình tự chuyên biệt, tập trung vào phân tích các vùng mã hóa protein trong bộ gen, hay còn gọi là exome. Mặc dù chỉ chiếm khoảng 1-2% tổng bộ gen, exome chứa phần lớn các biến thể di truyền gây bệnh, khiến WES trở thành công cụ quan trọng trong nghiên cứu các bệnh di truyền và ung thư. Phương pháp này cho phép phát hiện các biến thể di truyền như đa hình nucleotide (single nucleotide variant - SNV), chèn, xóa, và biến thể số lượng bản sao (copy number variation - CNV) trong các gen mã hóa protein [37]. So với giải trình tự toàn bộ hệ gen (whole genome sequencing - WGS), WES tiết kiệm chi phí hơn, đặc biệt phù hợp cho các nghiên cứu tập trung vào các bệnh hiếm gặp, nghiên cứu ung thư, hoặc nghiên cứu di truyền quần thể [38].

Quy trình WES bao gồm hai giai đoạn chính: làm giàu các vùng exon và giải trình tự. Quy trình WES thường bắt đầu bằng việc tách chiết DNA và sử dụng các đoạn mồi hoặc probe để bắt các exon của khoảng 20.000 gen người hoặc khuếch đại mục tiêu sử dụng các bộ kit thương mại từ các hãng như NimbleGen, Agilent, Illumina, Twist, và IDT. Sau khi làm giàu, các vùng mục tiêu này được giải trình tự bằng các nền tảng NGS, chủ yếu là Illumina, để tạo ra dữ liệu có độ phân giải cao [39]. Về mặt phân tích, WES sử dụng các phương pháp tin sinh học tương tự như WGS, vì exome là một phần của bộ gen. Quy trình phân tích bao gồm căn chỉnh các lần đọc vào bộ gen tham chiếu, gọi tên các biến thể và giải thích ý nghĩa của chúng trong bối cảnh lâm sàng hoặc nghiên cứu [40]. Nhờ tập trung vào các vùng gen mã hóa, WES tạo ra lượng dữ liệu nhỏ hơn so với WGS, giúp giảm thiểu nhu cầu về lưu trữ và phân tích, trong khi vẫn đạt được độ chính xác cao trong việc phát hiện các biến thể liên quan đến bệnh. So với giải trình tự Sanger truyền thống vốn chỉ đọc một đoạn DNA ngắn mỗi lần, WES có độ phủ rộng và thông lượng cao hơn nhiều lần do có thể khảo sát đồng thời hàng nghìn gen [38].

So với giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS), WES chỉ giải trình tự khoảng từ 1-2% vật liệu di truyền. Do đó, WES tạo ra lượng dữ liệu ít hơn và chi phí thấp hơn WGS, nhưng bỏ sót các biến thể nằm ngoài vùng mã hóa. WGS giải trình tự toàn bộ DNA (bao gồm cả intron và vùng điều hòa), cho phép phát hiện các biến thể mà WES có thể bỏ qua, ví dụ như đột biến vùng không mã hóa hoặc biến thể cấu trúc lớn [41]. Ngược lại, việc diễn giải ý nghĩa của biến thể nằm ngoài exon hiện vẫn

khó khăn và tốn kém hơn, nên trong thực tế các phòng thí nghiệm thường ưu tiên WES trước để tìm biến thể ở vùng mã hóa [39].

1.4.2. Ứng dụng của WES trong chẩn đoán các bệnh di truyền

WES là một công cụ quan trọng phục vụ cho các nghiên cứu tập trung vào các bệnh hiếm gặp, ung thư, hoặc nghiên cứu di truyền học. Nhờ khả năng khảo sát đồng thời hàng nghìn gen mã hóa, WES đặc biệt hữu ích cho những bệnh hiện nay chưa rõ nguyên nhân gây bệnh. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng WES giúp tăng tỷ lệ chẩn đoán so với phương pháp truyền thống. Chẳng hạn, một nghiên cứu trên >2000 bệnh nhân nghi ngờ bệnh di truyền cho thấy WES xác định được nguyên nhân phân tử ở ~25% trường hợp, trong đó ~58% đột biến được tìm ra là đột biến mới chưa từng ghi nhận trước đó [38]. Tỷ lệ chẩn đoán nhờ WES có thể dao động trong khoảng 30-50% tùy nhóm bệnh và tiêu chí lựa chọn bệnh nhân. Đặc biệt ở nhóm bệnh nhi và các rối loạn phát triển hiếm gặp, WES cho tỷ lệ tìm ra biến thể gây bệnh khá cao (thường 1/3 đến 1/2 số trường hợp) [42]. Nhờ WES, nhiều gen là nguyên nhân gây bệnh mới đã được phát hiện trong thập kỷ qua, giúp mở rộng hiểu biết về cơ chế bệnh học di truyền. WES đã góp phần xác định hàng loạt gen mới liên quan đến các bệnh hiếm như các rối loạn phát triển thần kinh, bệnh chuyển hóa bẩm sinh, loạn sản xương, v.v [43]. Điều này chứng tỏ WES mang lại lợi thế vượt trội so với cách tiếp cận chẩn đoán truyền thống (xét nghiệm từng gen đơn lẻ), cho phép chẩn đoán nhanh hơn và toàn diện hơn đối với bệnh nhân nghi ngờ bệnh di truyền. Ngoài ra, WES cũng được ứng dụng trong các lĩnh vực khác như nghiên cứu ung thư di truyền, sàng lọc trước sinh, và nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể, tuy nhiên vai trò nổi bật nhất vẫn là trong chẩn đoán các bệnh lý đơn gen hiếm [42].

Một trường hợp bệnh nhân mắc HIES được xác định thông qua WES đã được báo cáo, công bố này cho thấy sự thay đổi trong các con đường tín hiệu miễn dịch, đặc biệt là sự suy giảm trong tín hiệu IL-6 và hoạt động của STAT3. Phân tích sinh học cho thấy sự thay đổi trong các con đường tín hiệu IL-6 và STAT3, ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào Th17 và khả năng đáp ứng miễn dịch [44].

1.5. TÌNH HÌNH CỨU TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM

Hội chứng HIES thường gây áp xe do tụ cầu tái phát ở da, phổi, khớp và nội tạng. Bệnh nhân cũng có thể bị nhiễm trùng xoang-phổi, thoát vị phổi và viêm da tăng bạch cầu ái toan có ngứa dữ dội. Nhiều dị tật bẩm sinh được quan sát thấy ở những người mắc HIES bao gồm bệnh dính khớp sọ, tình trạng các khớp xương sọ

kết dính sớm và dị tật Arnold Chiari loại 1. Các bất thường về cơ xương được quan sát bao gồm tình trạng khớp bị duỗi quá mức, chứng vẹo cột sống và chứng loãng xương được báo cáo ở ~50% bệnh nhân. Khoảng 70% trẻ mắc hội chứng HIES chậm thay răng sữa. Biến chứng phình động mạch ở vùng mạch vành, não và động mạch chủ, bất thường bẩm sinh ở động mạch vành cũng được ghi nhận [45].

Mặc dù hội chứng HIES hiếm gặp, trên thế giới đã có báo cáo về các kiểu di truyền bao gồm các kiểu gen trội, lặn trên nhiễm sắc thể thường liên quan đến HIES [46]. Trường hợp HIES được báo cáo đầu tiên được trình bày bởi David và cộng sự về hai bệnh nhân có biểu hiện nhiễm trùng phổi tái phát, chàm và áp xe trên da. Những ổ áp xe này rất đặc biệt vì chúng không có các dấu hiệu viêm điển hình như đỏ, đau và nóng nên được gọi là áp xe “lạnh”. Vào thời điểm đó, không có mối liên hệ nào giữa các triệu chứng này và nồng độ IgE tăng cao, vì globulin miễn dịch vẫn chưa được phát hiện [45]. Báo cáo trường hợp tiếp theo của Buckley và cộng sự., Hill và cộng sự [46] và Grimbacher và cộng sự đã xác định thêm các biểu hiện của HIES như các biến dạng trên khuôn mặt, nồng độ IgE huyết thanh cao rõ rệt và các bất thường về răng và mô liên kết [47].

Thông tin nghiên cứu về HIES ở Việt Nam vẫn khá hạn chế và ít được công bố so với các nghiên cứu về các bệnh lý phổ biến khác. Một số nghiên cứu hoặc báo cáo về ca bệnh đặc biệt được thực hiện tại các bệnh viện lớn và viện nghiên cứu y khoa ở Việt Nam. Năm 2025, nhóm tác giả Việt Nam đã mô tả hai ca bệnh nhi mắc hội chứng HIES với đột biến gen *STAT3* và *DOCK8*, đại diện cho hai thể di truyền trội và lặn của bệnh. Việc phân tích đặc điểm lâm sàng và di truyền giúp làm rõ sự khác biệt trong biểu hiện bệnh và cách tiếp cận chẩn đoán giữa hai thể này. Nghiên cứu cũng nhấn mạnh vai trò quan trọng của xét nghiệm di truyền, đặc biệt là giải trình tự gen, trong việc chẩn đoán chính xác HIES ở trẻ em [48].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được tiến hành với sự tham gia của bệnh nhân mắc hội chứng HIES cùng các thành viên trong gia đình bệnh nhân tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Tất cả các đối tượng tham gia nghiên cứu đã được cung cấp đầy đủ thông tin về mục đích, quy trình nghiên cứu và các quyền lợi cũng như nghĩa vụ của họ. Nghiên cứu đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh Viện Nghiên cứu hệ gen thông qua *Quyết định Y đức số 02-2024/NCHG-HĐĐĐ* ngày 18/1/2024 và nhận được sự đồng thuận từ gia đình bệnh nhân. Tất cả các thông tin liên quan đến bệnh nhân và quá trình nghiên cứu đều được bảo mật tuyệt đối, đảm bảo quyền lợi và sự riêng tư của các đối tượng tham gia.

2.2. HÓA CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ

Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Đức) để tách chiết DNA từ mẫu máu, bộ Agilent SureSelect Target Enrichment Kit (Agilent, Mỹ) dùng để tạo thư viện cho việc giải trình tự gen thế hệ mới, Tag DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific™), dNTP 10X mix (Thermo Fisher Scientific™), marker DNA 1 kb và Marker DNA 100 bp (Thermo Fisher Scientific™), agarose (Merk, Mỹ)...

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

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Để thực hiện các mục tiêu nghiên cứu, nghiên cứu này được tiến hành theo sơ đồ như Hình 2.1. DNA tổng số của các đối tượng tham gia nghiên cứu được tách chiết bằng kit QIAGEN. Trong số các gia đình tham gia, 04 bệnh nhân có biểu hiện đặc trưng của hội chứng HIES đã được chọn để giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa. Dữ liệu giải trình tự của các bệnh nhân này được phân tích để tìm kiếm các biến thể, từ đó đánh giá ảnh hưởng của các biến thể tìm được đối với khả năng gây bệnh và mối liên quan với mức độ miễn dịch của bệnh nhân đối với hội chứng HIES.



Hình 2.1. Sơ đồ các bước nghiên cứu.

2.3.1. Giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa

2.3.1.1. Tách chiết DNA tổng số

Bốn gia đình có bệnh nhân mắc hội chứng HIES đã được thu thập mẫu máu tĩnh mạch với thể tích 2 ml từ mỗi đối tượng. Các mẫu máu này được lưu trữ trong ống chứa chất chống đông EDTA (1,5 mg/ml) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C để đảm bảo chất lượng cho các phân tích sau.

Trong nghiên cứu này, DNA tổng số từ các bệnh nhân mắc HIES tham gia được tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Mini Kit của hãng QIAGEN. Quy trình tách chiết được thực hiện qua các bước chính như sau: Đầu tiên, 20 μl proteinase K (20 mg/ml) được thêm vào mỗi ống Eppendorf, sau đó bổ sung 200 μl mẫu máu và 200 μl AL buffer. Hỗn hợp được trộn đều bằng máy vortex trong 15 giây, sau đó ủ ở nhiệt độ 56°C trong 20 phút. Tiếp theo, thêm 200 μl ethanol 100% vào hỗn hợp và trộn đều trước khi chuyển lên cột tách chiết và li tâm với tốc độ 8000 rpm trong 1 phút. Cột được chuyển sang ống mới, bổ sung 500 μl AW1, li tâm tiếp với tốc độ

8000 rpm trong 1 phút. Sau đó, cột được chuyển vào ống thu mới, bổ sung 500 μ l AW2, và li tâm ở tốc độ 12000 rpm trong 3 phút. Sau khi loại bỏ dịch qua cột, tiếp tục li tâm ở tốc độ 12000 rpm trong 1 phút để làm khô cột. Cuối cùng, cột được chuyển sang ống Eppendorf mới và bổ sung 200 μ l AE, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút rồi li tâm với tốc độ 8000 rpm trong 1 phút để thu được DNA. DNA tổng số thu được được kiểm tra chất lượng bằng cách điện di trên gel agarose 0,8% và đo quang phổ để xác định nồng độ cũng như độ tinh sạch, sau đó bảo quản ở nhiệt độ -20°C .

2.3.1.2. Tạo thư viện DNA

Thư viện DNA được tạo ra bằng bộ kit Agilent SureSelect Target Enrichment. Quá trình chuẩn bị thư viện bao gồm các bước chính như sau: (i) phân mảnh DNA thành các đoạn có kích thước phù hợp với yêu cầu của thiết bị giải trình tự; (ii) gắn các oligonucleotide cần thiết cho quá trình giải trình tự, bao gồm index để phân biệt các mẫu DNA khác nhau và adapter để nối các đoạn DNA vào bề mặt của flowcell; (iii) khuếch đại các vùng mã hóa; (iv) kiểm tra chất lượng của thư viện DNA bằng máy 2100 Bioanalyzer trước khi tiến hành giải trình tự.

Chất lượng của thư viện DNA được đánh giá dựa trên hai yếu tố chính: sự phân bố kích thước của các đoạn DNA và nồng độ thư viện. Trong nghiên cứu này, DNA được phân mảnh bằng phương pháp vật lý (siêu âm) với sự hỗ trợ của thiết bị Covaris (Covaris, Woburn, MA), nhằm thu được các đoạn DNA có kích thước trong khoảng 100 – 5000 bp. Đối với các đoạn DNA dài hơn, thiết bị Covaris g-TUBE được sử dụng để thu được các đoạn trong phạm vi 6–20 Kb, cần thiết cho việc tạo thư viện mate-pair. Một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng giải trình tự là nồng độ thư viện DNA. Nồng độ của thư viện phải được xác định bằng phương pháp đo huỳnh quang dành cho DNA sợi kép (dsDNA). Đồng thời, các phương pháp quang phổ như NanoDrop hay UV không được khuyến cáo sử dụng vì chúng có thể đo lẫn các tạp chất như RNA, protein, gây sai lệch kết quả. Các hệ thống giải trình tự NGS khuyến nghị sử dụng Qubit® Fluorometer (Life Technologies) và Quantus™ Fluorometer (Promega Corporation) để đo nồng độ DNA sợi kép.

2.3.1.3. Giải trình tự bằng Illumina NextSeq 500

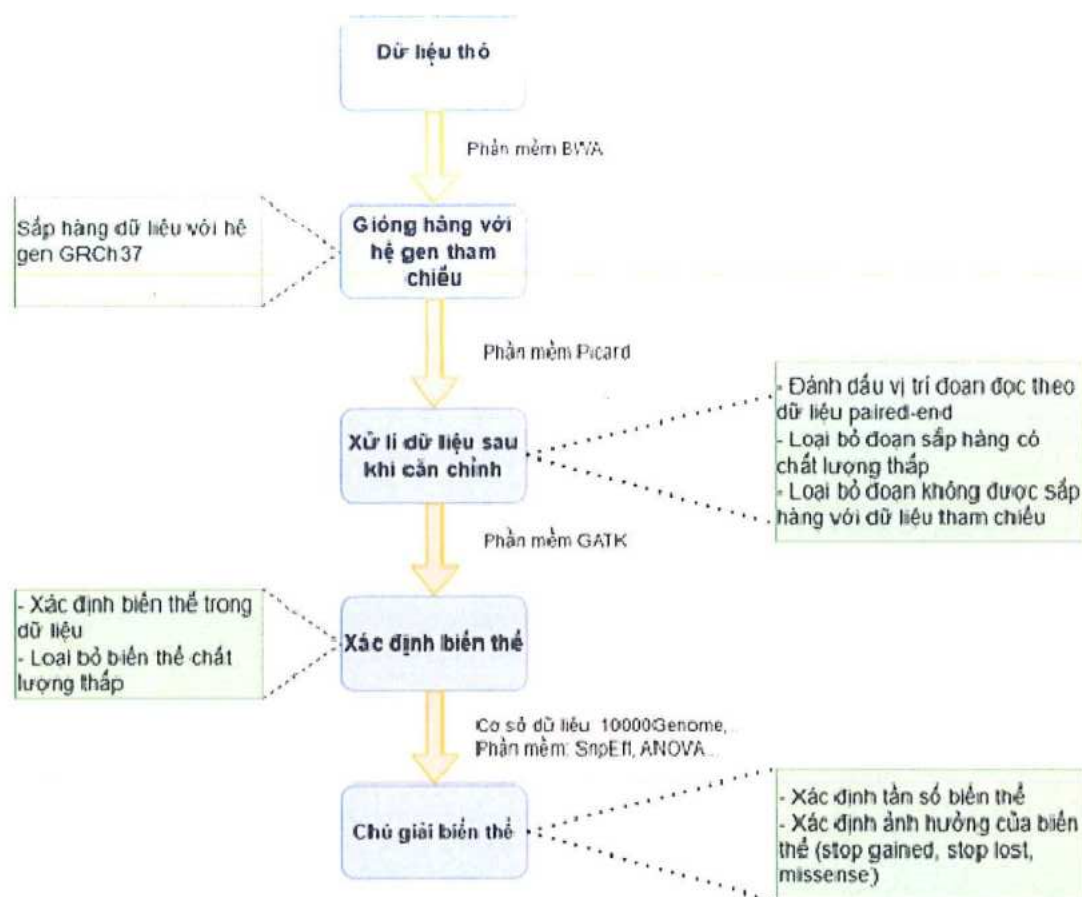
Sản phẩm thư viện DNA đạt chất lượng sẽ được giải trình tự bằng hệ thống Illumina NextSeq 500, một thiết bị giải trình tự DNA thế hệ mới sử dụng công nghệ sequencing by synthesis (SBS). Trong quá trình này, DNA polymerase tổng hợp

DNA mới bằng cách sử dụng các dNTP gắn vào đầu 3' của chuỗi DNA đang tổng hợp theo nguyên tắc bổ sung. Tuy nhiên, khác với phương pháp Sanger, giải trình tự thế hệ mới cho phép giải trình tự hàng nghìn đoạn DNA khác nhau đồng thời, giúp tiết kiệm thời gian và cung cấp lượng dữ liệu đầu ra lớn hơn rất nhiều so với phương pháp cũ. Quá trình giải trình tự này bao gồm hai bước chính: tạo cụm và giải trình tự. Trong bước tạo cụm, mỗi sợi DNA sẽ gắn vào bề mặt của flowcell bằng các adapter, sau đó được khuếch đại để tạo thành nhiều bản sao của sợi DNA đó, tạo thành các cụm DNA giống hệt nhau. Quá trình giải trình tự diễn ra khi các dNTP mang tín hiệu huỳnh quang tương ứng với 4 loại nucleotide được sử dụng để tổng hợp chuỗi DNA. Tín hiệu huỳnh quang từ mỗi nucleotide sẽ được ghi lại trong quá trình tổng hợp, giúp xác định trình tự của đoạn DNA theo nguyên tắc bổ sung trên sợi DNA khuôn.

2.3.2. Phân tích và sàng lọc biến thể

2.3.2.1. Phân tích và chú giải biến thể

Quá trình phân tích và sàng lọc các biến thể được thực hiện bằng các phần mềm và công cụ tin sinh học chuyên dụng trên hệ thống máy tính hiệu năng cao tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, sử dụng hệ điều hành CentOS 7.0. Dữ liệu giải trình tự ban đầu được lưu trữ dưới dạng file FastQ, đây là định dạng tệp chuẩn trong lĩnh vực giải trình tự gen, cho phép lưu trữ thông tin về điểm chất lượng (quality score) của từng nucleotide trong trình tự. Chất lượng của dữ liệu giải trình tự được đánh giá bằng phần mềm FastQC, giúp thống kê và đánh giá chất lượng dữ liệu dựa trên các tiêu chí như thông tin về máy giải trình tự, tổng số đoạn trình tự, tỷ lệ nucleotide GC, và các chỉ số chất lượng khác. Quy trình phân tích và xử lý dữ liệu trong nghiên cứu này được thực hiện thông qua các phần mềm tin sinh học, như mô tả trong Hình 2.2.



Hình 2.2. Quy trình phân tích và xử lý dữ liệu.

Sau khi kiểm tra chất lượng, dữ liệu giải trình tự được căn chỉnh (alignment) với hệ gen tham chiếu Hg19 bằng phần mềm BWA 0.7.10 [49]. Phần mềm BWA sử dụng thuật toán BWT, giúp tăng tốc độ tính toán và giảm bộ nhớ cần thiết [50]. Kết quả dóng hàng được lưu trữ dưới dạng SAM và sau đó được chuyển thành BAM để tiết kiệm dung lượng và tăng hiệu suất xử lý. Tiếp theo, các dữ liệu đã được căn chỉnh được xử lý và hiệu chỉnh bằng công cụ Picard để loại bỏ những đoạn lặp, làm sạch và cải thiện chất lượng dữ liệu. Biến thể được phát hiện và gọi tên bằng phần mềm Genome Analysis Toolkit (GATK) phiên bản v3.4 [51]. GATK là công cụ được sử dụng phổ biến trong việc phát hiện SNPs (đột biến đơn nucleotide) và indels (biến thể chèn, xóa đoạn nhỏ [52]). Sau khi các biến thể được gọi tên, chúng sẽ được chú giải và phân loại chức năng bằng các phần mềm SnpEff [53] và ANNOVAR [54]. SnpEff là công cụ chuyên dụng để chú thích và dự đoán tác động của các biến thể di truyền đối với chức năng protein. Công cụ này có thể đánh giá các tác động như thay đổi axit amin, thay đổi chức năng của protein hoặc thay đổi vị trí mã hóa của gene. SnpEff cung cấp một báo cáo chi tiết về ảnh hưởng của các biến thể, chẳng hạn như ảnh hưởng tới việc tạo ra protein và mối liên quan với các

bệnh lý di truyền. Dữ liệu đầu vào là các biến thể đã được dự đoán (SNPs, chèn, xóa) dưới định dạng VCF (Variant Call Format). Công cụ phân tích các biến thể này để tính toán tác động lên gen, bao gồm kiểu gen, vị trí biến thể, ảnh hưởng đến tổng hợp protein, và so sánh với các dữ liệu khác để xác định các biến thể đã biết.

2.3.2.2. Sàng lọc biến thể

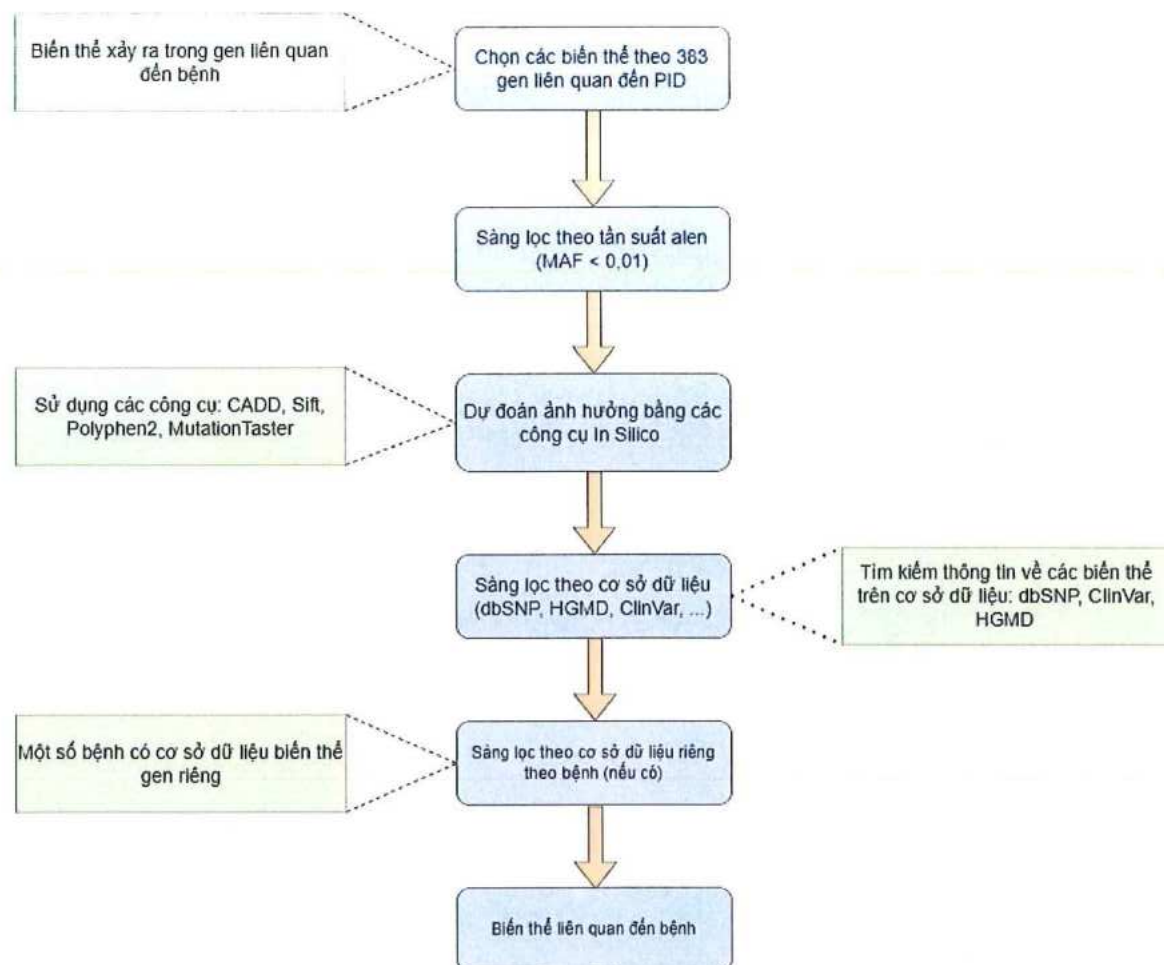
Các tiêu chí chính để sàng lọc và tìm kiếm các biến thể liên quan đến hội chứng HIES bao gồm các nội dung sau:

Biến thể phải xuất hiện trên các gen đã được nghiên cứu và công nhận có liên quan đến hội chứng HIES hoặc các rối loạn miễn dịch có liên quan tới HIES.

Các biến thể có tần suất alen tham khảo từ cơ sở dữ liệu 1000 Genomes Project ($MAF < 1\%$) sẽ được coi là biến thể hiếm. Các biến thể này sẽ được đánh giá khả năng ảnh hưởng đến chức năng của protein. Các biến thể như thêm bộ ba kết thúc dẫn đến việc cắt ngắn protein, mất bộ ba kết thúc gây kéo dài protein, thêm hoặc mất nucleotide dẫn đến dịch khung mã hóa, hoặc thay đổi vị trí dịch khung được lựa chọn vì chúng có ảnh hưởng lớn đến chức năng protein. Các biến thể sai nghĩa sẽ được đánh giá sơ bộ về khả năng gây hại đến chức năng protein thông qua các công cụ như SIFT [53], PolyPhen-2 [55], CADD [56], và MutationTaster [57].

Những biến thể được báo cáo là lành tính trong cơ sở dữ liệu ClinVar sẽ bị loại bỏ.

Các biến thể dạng đồng nghĩa và đa hình không có ảnh hưởng đến chức năng của protein cũng sẽ được loại bỏ khỏi danh sách các biến thể tiềm năng gây ra hội chứng HIES. Quy trình thực hiện trình bày theo Hình 2.3.



Hình 2.3. Quy trình sàng lọc biến thể.

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) là một công cụ dự đoán tác động của các thay đổi amino acid đối với chức năng của protein. Công cụ này dựa trên thông tin trình tự tương đồng và sử dụng thuật toán để đánh giá xem sự thay đổi amino acid tại một vị trí cụ thể có thể ảnh hưởng đến chức năng của protein hay không. SIFT hoạt động bằng cách so sánh trình tự amino acid của protein đích với các protein khác trong cùng họ, từ đó xác định các vị trí bảo tồn. Những vị trí amino acid bảo tồn cao có xu hướng quan trọng đối với chức năng của protein, và sự thay đổi ở các vị trí này sẽ có khả năng gây hại. SIFT đánh giá dựa trên điểm số từ 0 đến 1, trong đó điểm số dưới 0,05 được coi là gây hại đối với chức năng protein, ngược lại các điểm số cao hơn có thể được coi là lành tính.

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) là một công cụ dự đoán tác động của các biến thể sai nghĩa (missense variants) đối với chức năng protein. Phần mềm này sử dụng thông tin về cấu trúc và chức năng của protein để dự đoán tác động của các biến thể. PolyPhen-2 tính toán khả năng gây hại của biến thể dựa trên

ba yếu tố: trình tự amino acid, cấu trúc của protein và các thông tin liên quan đến sự tương đồng của protein trong các loài khác nhau. PolyPhen-2 cung cấp ba mức đánh giá: damaging (D) cho thấy khả năng gây hại cao nhất và có thể làm thay đổi chức năng protein thang điểm trong khoảng 0,957 đến 1; thang điểm trong khoảng 0,453–0,956 được coi là biến thể có thể gây hại (possibly damaging - P); và lành tính (benign - B) là các biến thể có điểm đánh giá trong khoảng 0–0,452.

CADD (Combined Annotation-Dependent Depletion) là một công cụ đánh giá khả năng gây hại của các biến thể di truyền trong DNA, sử dụng một thang điểm để phân loại mức độ nghiêm trọng của các biến thể. CADD tính toán điểm số bằng cách kết hợp nhiều đặc điểm của biến thể, bao gồm các thông tin về cấu trúc và chức năng của protein, cũng như sự bảo tồn của các nucleotide qua các loài khác nhau. Thang điểm của CADD dao động từ 0 đến khoảng 60, với các biến thể có điểm số càng cao càng có khả năng gây hại lớn. Các biến thể có điểm số CADD trên 20 thường được xem là có khả năng gây bệnh cao, vì chúng có xu hướng làm thay đổi chức năng của protein hoặc các quá trình sinh học quan trọng. Những biến thể có điểm dưới 10 thường ít có khả năng gây hại hơn, và có thể là biến thể bình thường hoặc vô hại. CADD cung cấp một cái nhìn tổng quát về tác động của các biến thể di truyền, giúp các nhà nghiên cứu và bác sĩ lâm sàng xác định các biến thể đáng chú ý trong các nghiên cứu di truyền và chẩn đoán bệnh lý.

MutationTaster là công cụ được sử dụng để đánh giá khả năng gây bệnh của các biến thể di truyền, dựa trên phân tích cả ở mức độ DNA và protein. Công cụ này thực hiện nhiều phân tích in silico để ước tính tác động của các biến thể đối với gen và protein. MutationTaster có khả năng xử lý nhiều loại biến thể khác nhau, bao gồm SNPs, indels, và biến thể đồng nghĩa (synonymous variants), đồng thời phân tích khả năng ảnh hưởng đến tính bảo tồn của amino acid trên các loài khác nhau, khả năng làm mất các miền protein chức năng, hoặc thay đổi chiều dài protein. Kết quả từ MutationTaster giúp xác định liệu một biến thể có gây hại đối với protein và có thể gây bệnh di truyền hay không, từ đó hỗ trợ việc phân loại các biến thể là nguy hiểm hay lành tính.

2.3.3. Kiểm tra bằng giải trình tự Sanger

Khi phát hiện các biến thể gây bệnh tiềm năng sau khi giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa, tiến hành kiểm tra lại các biến thể này trên mẫu bệnh nhân và các thành viên trong gia đình bằng phương pháp giải trình tự Sanger nhằm xây dựng

phả hệ và nghiên cứu cơ chế di truyền của bệnh. Trước khi sử dụng phương pháp Sanger cần thiết kế mồi để khuếch đại đoạn gen đích. Dữ liệu giải trình tự sau đó được phân tích trên phần mềm BioEdit bằng cách so sánh với trình tự gen chuẩn của mồi gen. Thông tin về các biến thể được đối chiếu trên các cơ sở dữ liệu có sẵn.

2.3.3.1. Thiết kế mồi

Mồi được thiết kế sử dụng công cụ Primer-BLAST và tổng hợp bởi công ty Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam). Các cặp mồi được lựa chọn cần phải đáp ứng các tiêu chí sau: (1) Bám đặc hiệu vào DNA mẫu, đảm bảo tính đặc hiệu cao trong việc nhận diện vùng gen mục tiêu; (2) Chiều dài của cặp mồi thường dao động từ 18 đến 30 nucleotide để tối ưu hóa sự nhận diện và khuếch đại; (3) Tỷ lệ %GC của mồi được thiết kế trong khoảng từ 50-60% để đảm bảo khả năng kết dính hiệu quả; (4) Tránh sự hình thành cấu trúc xoắn kẹp tóc hoặc hiện tượng mồi bắt cặp với nhau, nhằm giảm thiểu các sản phẩm phụ không mong muốn trong PCR; và (5) Nhiệt độ nóng chảy (T_m) của mồi phải nhỏ hơn nhiệt độ hoạt động của Taq polymerase, thường dao động trong khoảng 50-60°C, để đảm bảo sự ổn định và hiệu quả trong quá trình khuếch đại.

Bảng 2.1. Kích thước và trình tự mồi khuếch đại các gen đột biến

Gen	Exon	Kích thước (bp)	Mồi 5'-3'	T_m (°C)
<i>PTPRC</i>	21	516	F: GGTTTCAAAGAACCCAGGAA R: GTAGGGGGACAGAGAGGCTT	56
<i>UNC119</i>	4	755	F: GCTTTGTCCGCTACCAGTTC R: GGTGTCCCGCTGTAGGAATA	60
<i>IL21R</i>	4	521	F: GGCTGGTGACAGTGGGTAGT R: AATCCCAGACACATGGGGTA	58
<i>NHEJ1</i>	3	573	F: TGCCACCAAGCCCAGTTAAT R: GGGGGAGGCACTTCTCTAAT	58

2.3.3.2. Phản ứng PCR

Quy trình PCR được thực hiện trong khoảng 20–35 chu kỳ liên tiếp, mỗi chu kỳ bao gồm ba giai đoạn chính. Đầu tiên là giai đoạn biến tính, trong đó các liên kết

hydro giữa các mạch DNA bị đứt, khiến các mạch DNA tách rời nhau ở nhiệt độ từ 90–95°C, kéo dài từ 1 đến 2 phút. Tiếp theo là giai đoạn gắn mỗi, trong đó các mỗi bắt cặp với các mạch đơn của DNA khuôn ở đầu 3' theo nguyên lý Chargaff ở nhiệt độ từ 55–65°C, giai đoạn này kéo dài khoảng 30–60 giây. Cuối cùng, là giai đoạn tổng hợp, trong đó enzyme DNA polymerase hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 70–72°C, xúc tác việc tổng hợp thêm nucleotid vào cuối đoạn mỗi. Quá trình này tạo ra các mạch DNA mới dựa trên sự bắt cặp giữa các nucleotide và mạch khuôn theo nguyên tắc bổ sung. Thời gian của giai đoạn tổng hợp thay đổi từ 30 giây đến vài phút, tùy thuộc vào kích thước của đoạn DNA cần khuếch đại.

2.3.3.3. Giải trình tự Sanger

Công nghệ giải trình tự Sanger dựa trên kỹ thuật chain termination (kết thúc chuỗi) bằng cách sử dụng các dideoxynucleotide (ddNTP). Các ddNTP là các nucleotide đã bị sửa đổi, làm mất nhóm OH ở đầu 3' của phân tử đường pentose, ngừng quá trình tổng hợp chuỗi khi chúng được thêm vào. Mỗi loại base (A, T, G, C) được gắn với một màu huỳnh quang đặc hiệu, phát ra ánh sáng ở các bước sóng khác nhau, giúp phân biệt các nucleotide trong chuỗi. Enzyme DNA polymerase xúc tác phản ứng gắn các dNTP vào mạch đơn của DNA. Khi một ddNTP được thêm vào, do thiếu nhóm 3'-OH, quá trình tổng hợp chuỗi bị dừng lại, tạo thành các đoạn DNA có độ dài khác nhau. Sau đó, các phản ứng được điện di trên gel polyacrylamide, các băng huỳnh quang của DNA được phát hiện và trình tự DNA được đọc tự động thông qua máy tính. Quy trình giải trình tự Sanger bao gồm các bước sau: (1) DNA sợi kép (dsDNA) được biến tính thành DNA hai sợi đơn (ssDNA); (2) Một đoạn mỗi tương ứng với một đầu của chuỗi DNA được gắn vào; (3) Phản ứng tổng hợp DNA bắt đầu, chuỗi DNA sẽ kéo dài cho đến khi một ddNTP được gắn vào, khiến quá trình tổng hợp dừng lại; (4) Các đoạn DNA tạo thành sau đó được biến tính thành ssDNA; (5) Các mảnh biến tính được phân tách trên điện di trên gel, từ đó trình tự DNA được xác định dựa trên các tín hiệu huỳnh quang phát ra. Trình tự các đoạn gen chứa đột biến được xác định bằng máy giải trình tự ABI3500 với bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

Khuôn dùng cho phản ứng PCR giải trình tự là sản phẩm PCR đặc hiệu đã tinh sạch, khuếch đại vùng trình tự mang biến thể quan tâm. Thành phần phản ứng bao gồm: 4 µl BigDye Terminator Master Mix (2,5×), 2 µl BigDye Terminator 5× Sequencing Buffer (5×), 1 µl mỗi giải trình tự (1,6 pmole/µl), sản phẩm PCR đã tinh sạch (lượng DNA cho mỗi phản ứng được điều chỉnh tùy vào nồng độ của

DNA của sản phẩm PCR đã tinh sạch trước đó) và bổ sung nước khử ion để đưa tổng thể tích của phản ứng lên 20 μ l. Lưu ý, phản ứng PCR giải trình tự có sử dụng huỳnh quang cho mỗi loại nucleotide nên trong quá trình thao tác cần tránh tiếp xúc với ánh sáng mạnh. Phản ứng được tiến hành trên đĩa PCR 96 giếng bằng máy PCR, cài đặt theo chu trình nhiệt: 96°C trong 1 phút, 25 chu kỳ (96°C trong 10 giây, 50°C trong 5 giây và 60°C trong 4 phút); 4°C- ∞ .

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ

3.1.1. Kết quả thu thập thông tin lâm sàng và cận lâm sàng của 4 bệnh nhân mắc HIES

Đối tượng tham gia nghiên cứu là các bệnh nhân được chẩn đoán mắc hội chứng HIES và các thành viên trong gia đình của họ. Tất cả các đối tượng đều được cung cấp đầy đủ thông tin về mục tiêu nghiên cứu, quy trình thực hiện và tham gia hoàn toàn tự nguyện. Thông tin lâm sàng và cận lâm sàng của các đối tượng tham gia nghiên cứu được trình bày trong Bảng 3.1 và Bảng 3.2 dưới đây.

Tất cả các bệnh nhân mắc hội chứng HIES trong nghiên cứu này đều có biểu hiện nhiễm trùng tái diễn nghiêm trọng, bao gồm một hoặc nhiều các triệu chứng điển hình của HIES như viêm phổi, viêm tai giữa, nhiễm trùng da, nấm *Candida* và loét miệng, kèm theo tăng bất thường nồng độ IgE. Một số bệnh nhân có viêm da cơ địa nặng, áp xe da tái phát và rối loạn miễn dịch nghiêm trọng thể hiện qua bất thường về số lượng tế bào lympho (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56).

Bệnh nhân PID03 nhập viện khi 5 tuổi với chẩn đoán viêm phổi do *Staphylococcus aureus*, kèm theo giãn phế quản thùy dưới trái. Bệnh nhân có tiền sử áp xe lạnh tái diễn tại vùng nách, cánh tay, bẹn và đùi, kèm theo hạch viêm tại vùng bẹn. Mặc dù có biểu hiện nhiễm trùng tái phát, chức năng gan và lách vẫn bình thường. Xét nghiệm huyết thanh cho thấy mức IgE tăng cao bất thường, đạt 12.472 IU/mL. Số lượng tế bào CD3, CD4 trong máu ngoại vi của bệnh nhân đều tăng cao hơn ngưỡng tham chiếu, cho thấy rối loạn trong đáp ứng miễn dịch.

Bệnh nhân PID07 nhập viện khi 1,5 tháng tuổi do viêm phổi nặng. Bệnh nhân có viêm da cơ địa toàn thân nghiêm trọng, tiêu chảy kéo dài 10-20 ngày mỗi đợt, nhiễm trùng tái diễn nhiều lần, viêm tai giữa, và nhiễm nấm *Candida*. Xét nghiệm cho thấy mức IgE huyết thanh cao (898 IU/mL). Phân tích miễn dịch cho thấy bệnh nhân có tăng số lượng tế bào CD19 trong khi tế bào CD56 (tế bào NK) giảm thấp, điều này có thể liên quan đến sự suy giảm khả năng tiêu diệt vi khuẩn và virus của hệ miễn dịch.

Bệnh nhân PID28 được nhập viện khi dưới 1 tháng tuổi, với biểu hiện viêm da cơ địa nghiêm trọng và chàm lan tỏa toàn thân. Xét nghiệm huyết thanh cho thấy

IgE tăng cao (1.481 IU/mL) ngay từ những tháng đầu đời. Phân tích miễn dịch cho thấy số lượng tế bào CD3 và CD4 tăng cao hơn mức tham chiếu, cho thấy rối loạn trong đáp ứng miễn dịch tế bào. Ngoài ra, số lượng tế bào CD19 cũng cao hơn mức bình thường, trong khi CD56 (tế bào NK) giảm, có thể ảnh hưởng đến khả năng chống nhiễm trùng virus và vi khuẩn của bệnh nhân.

Bệnh nhân PID38 nhập viện lúc 6 tháng tuổi với sốt kéo dài, loét miệng và viêm mũi dai dẳng trong năm đầu đời. Bệnh nhân mắc nhiễm trùng do vi khuẩn, virus và nấm tái diễn, bao gồm viêm tai giữa (4-5 lần/năm), viêm phổi (3-4 lần/năm), nấm miệng *Candida*, loét miệng và tiêu chảy kéo dài (2-3 đợt/năm). Ngoài ra, bệnh nhân từng bị nhiễm trùng huyết do *Pseudomonas aeruginosa*, cho thấy hệ miễn dịch suy giảm nghiêm trọng. Mặc dù được điều trị bằng truyền tĩnh mạch globulin miễn dịch (IVIg) hàng tháng, bệnh nhân vẫn tiếp tục mắc viêm tai giữa và viêm phổi tái diễn. Từ 4 tháng tuổi, bệnh nhân có dấu hiệu tăng trưởng kém và chậm phát triển thể chất. Xét nghiệm miễn dịch cho thấy mức IgE rất cao (10.355 IU/mL), cùng với suy giảm đáng kể số lượng tế bào B (CD19: 15,8) và NK (CD56: 383), phản ánh tình trạng suy giảm miễn dịch thể dịch nghiêm trọng.

Bảng 3.1: Thông tin lâm sàng của 4 bệnh nhân mắc hội chứng HIES

Bệnh nhân	PID03	PID07	PID28	PID38
Tuổi	5 tuổi	1.5 tháng	Dưới 1 tháng	6 tháng
Viêm phổi	x	x		x
Viêm da cơ địa		x	x	
Tiêu chảy/ Xuất huyết		x		
Áp xe da/ Eczema	x			
Loét miệng				x
Viêm tai giữa				x
Hạch to	x			
Nhiễm <i>Candida</i>		x		

x: đặc điểm có ở bệnh nhân

Bảng 3.2: Thông tin cận lâm sàng của người tham gia nghiên cứu

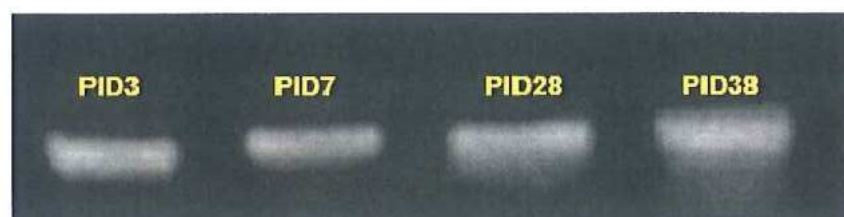
Bệnh nhân		PID3	PID7	PID28	PID38
Nồng độ IgE	(<15 IU/mL)	12472	898	1481	10355
IgA	(0.05–0.4 g/L)	0.98	1.04	0.22*	0.02
IgM	(0.15–0.7 g/L)	1.74	1.18	0.37*	0.1
IgG	(2.1–7.7 g/L)	13.71	7.3*	1.08	0.14
CD3 ($\times 10^6/L$)	(3180–5401)	4877*	1719	5141*	887
CD4 ($\times 10^6/L$)	(2330–3617)	2663*	941	3058*	397
CD8 ($\times 10^6/L$)	(712–1361)	1883	619	1855	433
CD19 ($\times 10^6/L$)	(315–1383)	1917	1315*	1139*	236
CD56 ($\times 10^6/L$)	(201–870)	1153	440*	696*	503*

*: Chỉ số trong ngưỡng bình thường

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

3.1.2.1. Kết quả tách chiết DNA từ mẫu máu toàn phần

Mẫu máu được thu thập từ 4 gia đình có con mắc hội chứng HIES tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Mỗi đối tượng được lấy 2 ml máu toàn phần, bảo quản trong ống chống đông EDTA và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C để phục vụ quá trình phân tích di truyền. Mẫu máu được sử dụng cho tách chiết DNA tổng số và được kiểm tra chất lượng trước khi phân tích.



Hình 3.1. Ảnh điện di sản phẩm DNA tổng số của người tham gia nghiên cứu.

Sản phẩm DNA tổng số thu được sau khi tách chiết từ tất cả các mẫu bệnh nhân được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% và đo tỷ lệ hấp thụ quang phổ OD ở bước sóng 260 nm và 280 nm. Quá trình kiểm tra nhằm xác định nồng độ và độ tinh sạch của DNA. Kết quả cho thấy DNA tổng số từ các mẫu thu thập được có nồng độ cao, không bị đứt gãy, thể hiện qua các dải sáng rõ trên gel agarose theo Hình 3.1. Nồng độ DNA trong các mẫu thu được đều lớn hơn 20 ng/ μ l và giá trị A260/280, đo bằng máy Nanodrop, nằm trong khoảng 1,8 – 2, cho thấy DNA có độ tinh sạch cao, phù hợp để thực hiện các phân tích di truyền tiếp theo Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Nồng độ DNA thu được từ các mẫu máu của bệnh nhân mắc hội chứng HIES và người thân trong gia đình

Mẫu	Nồng độ	A260/280	Mẫu	Nồng độ	A260/280
PID3	28,01	1,81	PID28	29,16	1,91
M-PID3	35,21	1,86	M-PID28	25,31	1,93
B-PID3	30,12	1,98	B-PID28	35,63	1,91
C-PID3	29,00	1,88	PID38	28,64	1,99
PID7	26,87	1,88	M-PID38	27,16	1,80
M-PID7	32,10	1,92	B-PID38	28,50	1,98
B-PID7	31,10	1,84			

3.1.2.2. Kết quả tạo thư viện giải trình tự

Quá trình chuẩn bị thư viện DNA, bao gồm việc gắn adapter vào các mảnh DNA, là một bước quan trọng trong quy trình giải trình tự thế hệ mới (NGS), đóng vai trò quyết định đối với sự thành công của thí nghiệm và độ chính xác của kết quả thu được. Để đảm bảo thư viện DNA đạt chuẩn, cần chú trọng đến hai yếu tố chính: nồng độ DNA phải đủ cao để đáp ứng yêu cầu của hệ thống giải trình tự và kích thước các mảnh DNA phải phân bố trong khoảng phù hợp, tránh tạo ra các đoạn quá dài hoặc quá ngắn có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của quá trình giải trình tự. Trong nghiên cứu này, chất lượng của các mảnh DNA sau khi chuẩn bị thư viện đã được kiểm tra và ghi trong Bảng 3.4, từ đó giúp đánh giá chất lượng thư viện và đảm bảo mẫu đạt tiêu chuẩn cần thiết cho việc giải trình tự, đảm bảo độ chính xác và hiệu quả trong các bước tiếp theo.

Bảng 3.4. Nồng độ thư viện DNA của bệnh nhân mắc hội chứng HIES

Mẫu bệnh nhân	Nồng độ (ng/μl)	Kích thước (bp)
PID3	29,4	351
PID7	28,6	348
PID28	30,1	362
PID38	25,7	360

Các mẫu có nồng độ thư viện DNA dao động từ 25,7 ng/μl (PID38) đến 30,1 ng/μl (PID28), cho thấy nồng độ của các mẫu nằm trong khoảng phù hợp. Kích thước của các mảnh DNA trong các mẫu này cũng nằm trong phạm vi phù hợp, với độ dài từ 348 bp (PID7) đến 362 bp (PID28), đảm bảo sự phân bố kích thước mảnh DNA đồng đều và phù hợp với yêu cầu của quy trình giải trình tự.

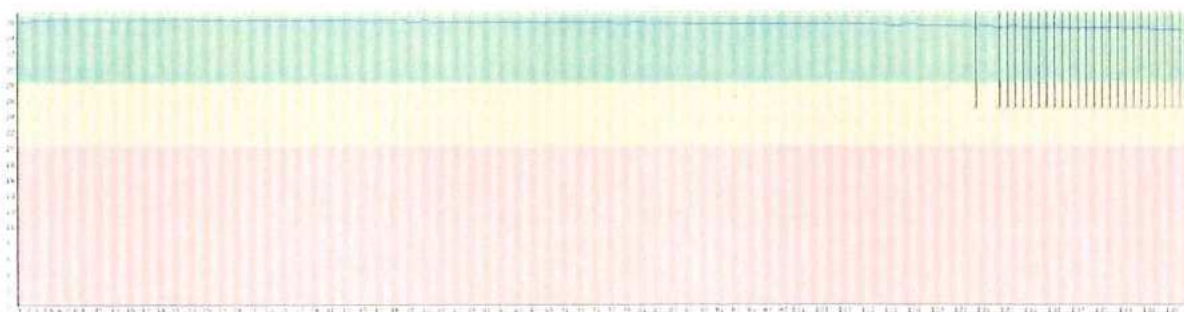
Từ đó, có thể kết luận rằng các mẫu DNA đã được chuẩn bị với chất lượng tốt, sẵn sàng cho các bước tiếp theo trong quy trình giải trình tự.

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

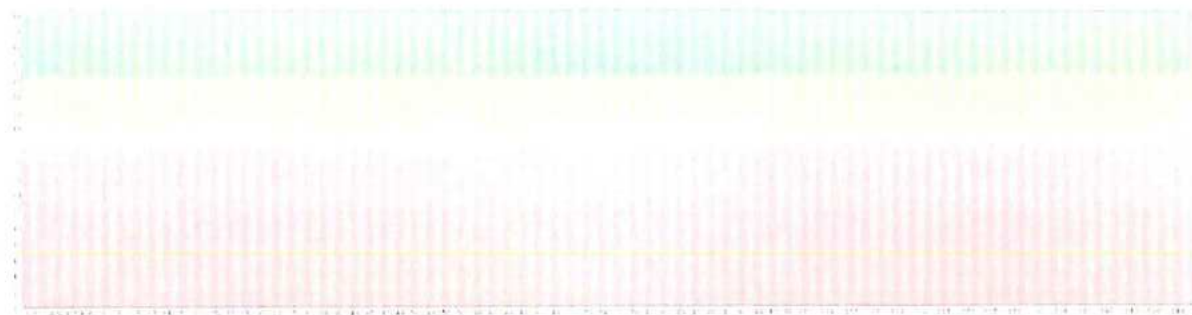
Trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của 4 bệnh nhân mắc HIES được xác định bằng hệ thống Illumina NextSeq 500. Để đánh giá chất lượng dữ liệu giải trình tự, phần mềm FastQC được sử dụng nhằm phân tích và tổng hợp các chỉ số thống kê quan trọng. Chất lượng của từng nucleotide trong dữ liệu thu được được phân loại theo ba mức độ và thể hiện dưới dạng biểu đồ với mã màu trực quan. Cụ thể, các vùng có chất lượng cao ($Q > 28$) được biểu diễn bằng màu xanh, cho thấy độ tin cậy rất tốt và dữ liệu có thể sử dụng trực tiếp mà không cần xử lý bổ sung. Các vùng có chất lượng từ 20 đến 28 ($20 < Q \leq 28$) được thể hiện bằng màu vàng, phản ánh dữ liệu có chất lượng chấp nhận được nhưng có thể cần xem xét tùy vào mục đích phân tích. Trong khi đó, những nucleotide có chất lượng dưới 20 ($Q < 20$) được biểu diễn bằng màu hồng, cho thấy nguy cơ lỗi cao hơn mức cho phép và có thể cần xử lý, chẳng hạn như lọc hoặc cắt bỏ để đảm bảo độ chính xác của kết quả phân tích. Kết quả đánh giá chất lượng dữ liệu được trình bày trong Hình 3.2.



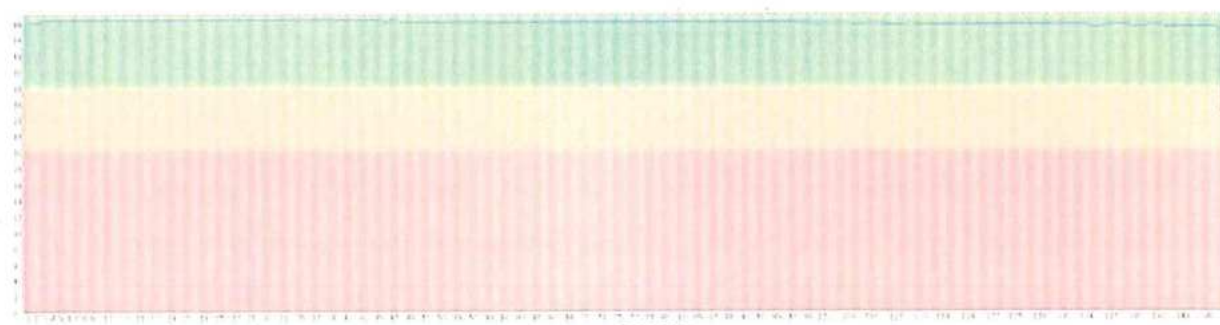
Mẫu PID3 – Read 1.



Mẫu PID3 – Read 2.



Mẫu PID7 – Read 1.



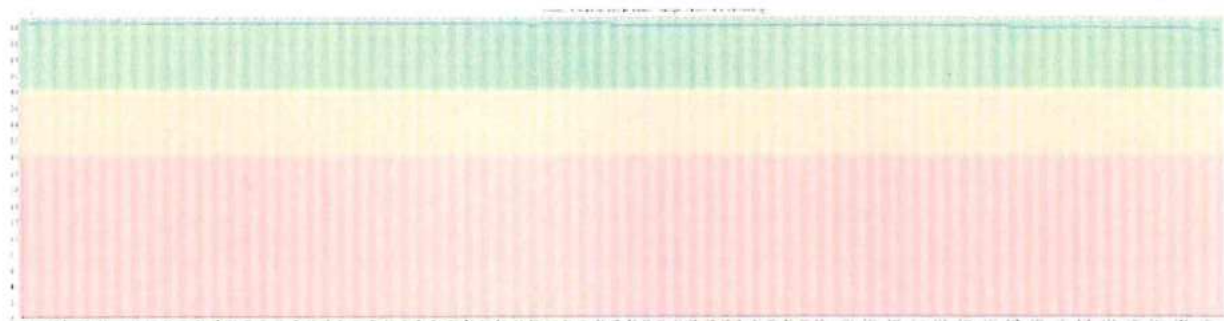
Mẫu PID7 – Read 2.



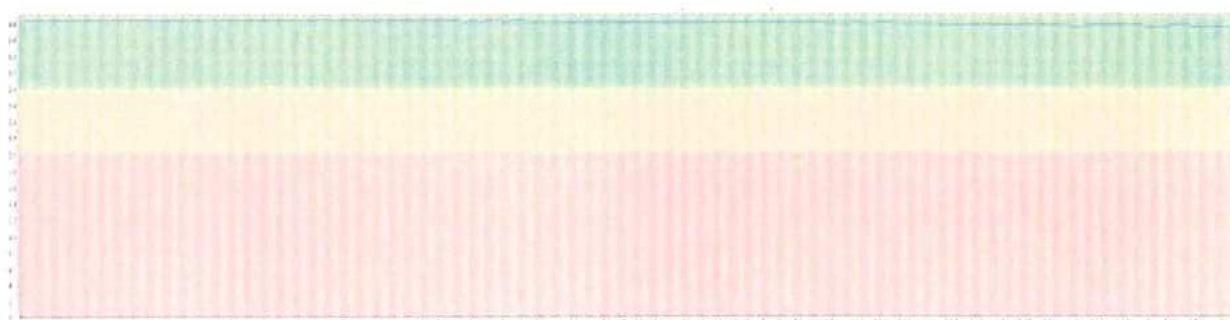
Mẫu PID28 – Read 1.



Mẫu PID28 – Read 2.



Mẫu PID38 – Read 1.



Mẫu PID38 – Read 2.

Hình 3.2. Chất lượng giải trình tự 04 bệnh nhân mắc hội chứng HIES.

Dữ liệu giải trình tự thu được từ hệ thống Illumina NextSeq 500 có dung lượng lớn, với các đoạn đọc có độ dài đồng đều (~150 bp mỗi đoạn) và độ sâu bao phủ cao (>130X mỗi mẫu), đảm bảo tính chính xác và độ tin cậy trong phân tích biến thể. Chất lượng dữ liệu giải trình tự được đánh giá thông qua các chỉ số Q20 và Q30, phản ánh tỷ lệ nucleotide có độ tin cậy cao. Các thông số về kết quả giải trình tự từ các mẫu bệnh nhân mắc HIES được thể hiện ở Bảng 3.5. Kết quả cho thấy dữ liệu thu được có tỉ lệ nucleotide đạt điểm chất lượng lớn hơn 20 (Q20) trên 97% và lớn hơn 30 (Q30) trên 93%, chứng tỏ mức độ sai sót thấp và độ chính xác cao.

Ngoài ra, tỷ lệ GC content dao động từ 48,8% đến 50,3%, phù hợp với đặc điểm của hệ gen người và đảm bảo chất lượng sắp xếp và phân tích dữ liệu. Bảng thống kê chỉ số giải trình tự cung cấp chi tiết về số lượng reads, tổng số base được giải trình tự, và các thông số quan trọng khác cho từng mẫu bệnh nhân, thể hiện rõ chất lượng dữ liệu thu được. Các thông số này khẳng định dữ liệu có chất lượng tốt, đáp ứng các yêu cầu nghiêm ngặt để phân tích biến thể và nghiên cứu di truyền.

Bảng 3.5. Chất lượng giải trình tự 04 bệnh nhân mắc hội chứng HIES

Thông số	PID3	PID7	PID28	PID38
Tổng số nucleotide	8.381.700.270	8.855.243.899	6.504.191.683	7.433.315.656
Tổng đoạn đọc	56.043.974	59.538.082	43.703.154	50.175.448
%GC	49,6	48,8	49,7	50,3
Q20(%)	97,6	98,2	98,1	98,2
Q30(%)	93,4	94,9	94,6	94,8
Độ dài đoạn đọc trung bình (bp)	149,56	148,73	148,83	148,15
Độ sâu bao phủ trung bình (X)	169,4	178,9	131,4	150,2

3.1.2.4. Kết quả phân tích dữ liệu ban đầu toàn bộ vùng gen mã hóa

Bảng 3.1. Kết quả dòng hàng các mẫu giải trình tự với hệ gen tham chiếu

Thông số đánh giá	PID3	PID7	PID28	PID38
Số đoạn trình tự sắp hàng thành công	43.663.550	59.474.351	59.474.351	50.135.593
% Số đoạn trình tự sắp hàng thành công	99,9	99,8	99,8	99,9
Số đoạn trình tự không trùng lặp	41.015.283	54.234.425	54.234.425	46.624.151
% Số đoạn trình tự không trùng lặp	93,9	91,1	91,1	92,9
Số đoạn trình tự được sắp hàng vào vùng mã hóa	28.181.505	36.967.555	36.967.555	32.230.883
% Số đoạn trình tự được sắp hàng vào vùng mã hóa	68,7	68,1	68,1	69,1
Độ sâu bao phủ trung bình trong vùng exon (X)	67,5	88,1	88,1	77,9
Tỉ lệ độ sâu bao phủ >20X (%)	91,4	94,1	94,1	91,7
Tỉ lệ độ sâu bao phủ >30X (%)	83,2	88,7	88,7	84,8

Tỉ lệ độ sâu bao phủ >50X (%)	60,6	73,2	73,2	66,7
----------------------------------	------	------	------	------

Kết quả sắp hàng dữ liệu giải trình tự của các bệnh nhân với hệ gen tham chiếu cho thấy hiệu suất căn chỉnh tốt, với tỷ lệ sắp hàng thành công dao động từ 99,8% đến 99,9%, chứng tỏ phần lớn các đoạn trình tự thu được có thể được căn chỉnh chính xác với hệ gen tham chiếu. Điều này phản ánh chất lượng dữ liệu ban đầu cao, ít nhiễu và sai sót trong quá trình giải trình tự. Ngoài ra, tỷ lệ số đoạn trình tự được sắp hàng nằm trong vùng exon đạt mức 68,1% đến 69,1%, cho thấy quá trình bắt giữ exon và làm giàu trình tự hoạt động hiệu quả. Hầu hết dữ liệu giải trình tự đều tập trung vào các vùng mã hóa, giúp tối ưu hóa việc phát hiện các biến thể di truyền có ý nghĩa trong nghiên cứu. Độ sâu bao phủ trung bình trong vùng exon của các mẫu bệnh nhân giao động từ 67,5X đến 88,1X. Đây là mức độ bao phủ tốt, đảm bảo tính chính xác và độ tin cậy trong việc phát hiện biến thể di truyền, đặc biệt đối với các biến thể có tần suất thấp. Xét về tỷ lệ bao phủ theo độ sâu, dữ liệu cho thấy phần lớn vùng exon được đọc với độ sâu cao. Cụ thể, tỷ lệ các đoạn trình tự có độ bao phủ trên 50X dao động từ 66,7% đến 73,2%, phản ánh rằng phần lớn các vùng exon quan trọng đều được đọc nhiều lần, giúp giảm thiểu lỗi khi gọi biến thể và cải thiện độ chính xác của kết quả phân tích. Nhìn chung, dữ liệu giải trình tự của các bệnh nhân có chất lượng tốt, với độ bao phủ cao và tỷ lệ dữ liệu sắp hàng chính xác với hệ gen tham chiếu đạt mức tối ưu. Điều này đảm bảo độ tin cậy trong quá trình phân tích biến thể di truyền, phục vụ cho việc phát hiện các đột biến liên quan đến bệnh.

3.1.3. Xác định và chú giải biến thể

Trong nghiên cứu này, các biến thể từ dữ liệu giải trình tự gen được phát hiện bằng công cụ Picard/GATK, một bộ công cụ phổ biến trong phân tích hệ gen. Picard xử lý dữ liệu sau gióng hàng, hiệu chỉnh chất lượng nucleotide, sắp xếp trình tự và loại bỏ các đoạn lặp nhằm giảm lỗi kỹ thuật và tỷ lệ dương tính giả. GATK được sử dụng để xác định SNPs và INDELs, và SnpEff được sử dụng để đánh giá tác động của các biến thể lên protein bằng cách dự đoán sự thay đổi amino acid do đột biến gây ra.

Bảng 3.2. Kết quả phân tích và dự đoán biến thể trong toàn bộ vùng mã hóa của 4 bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh tăng IgE

Thông số	PID3	PID7	PID28	PID38
Tổng số biến thể thay thế nucleotide	80.327	82.438	81.529	79.547
Biến thể đồng nghĩa	11.988	12.101	11.944	12.063
Biến thể sai nghĩa	11.329	11.616	11.407	11.544
Thêm bộ ba kết thúc	109	112	115	106
Mất bộ ba kết thúc	44	39	45	40
Tổng số biến thể chèn/xóa	10.328	11.031	10.602	9.701
Biến thể dịch khung	360	330	326	332
Thêm đoạn ngắn	178	191	190	188
Mất đoạn ngắn	215	211	229	197

3.1.4. Kết quả sàng lọc biến thể

Dữ liệu giải trình tự gen thu được từ mỗi bệnh nhân rất lớn, chủ yếu bao gồm các biến thể phổ biến và không mang ý nghĩa bệnh lý. Vì vậy, cần thiết tiến hành một bước sàng lọc kỹ lưỡng nhằm xác định các biến thể thực sự liên quan đến hội chứng HIES. Do tính không đồng nhất cao về di truyền của HIES, nghiên cứu này đã mở rộng phạm vi phân tích lên tới 383 gen đã được các nghiên cứu trước đây chứng minh hoặc đề xuất là có liên quan đến hội chứng HIES cũng như các hội chứng có kiểu hình tương tự. Danh sách các gen này được tổng hợp và trình bày cụ thể tại phụ lục 1 của luận văn.

Sau bước sàng lọc, chỉ những biến thể nằm trong vùng mã hóa (exon) của các gen nói trên mới được tiếp tục xem xét, bao gồm: (1) các biến thể có tần suất alen nhỏ hơn 1%, được xác định dựa trên dữ liệu tham chiếu từ cơ sở dữ liệu 1000 hệ gen người (1000 Genomes Project), có khả năng ảnh hưởng đến chức năng protein; và (2) các biến thể thường gặp (đa hình nucleotide đơn – SNP) có tần suất alen lớn hơn 1%. Kết quả cụ thể quá trình sàng lọc biến thể liên quan đến hội chứng HIES của các bệnh nhân được thể hiện chi tiết tại Bảng 3.8.

Bảng 3.3. Kết quả sàng lọc biến thể của 4 bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh tăng IgE

Bệnh nhân	Tổng số biến thể trên gen liên quan	Số biến thể xảy ra trong exon
PID03	414	14
PID07	520	25
PID28	420	10
PID38	602	15

Kết quả sàng lọc biến thể di truyền trong nghiên cứu này cho thấy sự khác biệt rõ rệt về số lượng và loại biến thể giữa các bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh tăng IgE (HIES). Cụ thể, bệnh nhân PID38 có tổng cộng 602 biến thể, là bệnh nhân có số lượng biến thể cao nhất, phản ánh sự đa dạng di truyền trong bộ gen của bệnh nhân, có thể là nguyên nhân giải thích các triệu chứng nghiêm trọng và phức tạp mà bệnh nhân này gặp phải. Bệnh nhân PID07 có 520 biến thể, trong đó 25 biến thể xảy ra trong vùng exon, con số này cao nhất trong các bệnh nhân, cho thấy sự xuất hiện của nhiều biến thể có khả năng tác động mạnh đến chức năng protein. Bệnh nhân PID28 có tổng cộng 420 biến thể, với 10 biến thể trong vùng exon, mức độ tương đối vừa phải, cho thấy các biến thể di truyền của bệnh nhân này có thể ảnh hưởng đến protein nhưng không quá nghiêm trọng như bệnh nhân PID07. Bệnh nhân PID03 có 414 biến thể, với 14 biến thể trong exon, cho thấy sự xuất hiện của một số biến thể có thể tác động đến chức năng protein, tuy nhiên không nhiều như các bệnh nhân còn lại. Những kết quả này cho thấy sự đa dạng về gen và các biến thể trong vùng exon giữa các bệnh nhân. Các kết quả này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc phân tích chi tiết các biến thể di truyền, đặc

biệt là các biến thể trong vùng exon, để có thể đưa ra những kết luận chính xác hơn về nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của HIES.

3.1.4.1. Đánh giá ảnh hưởng của các biến thể

Sau khi sàng lọc, các biến thể được đánh giá thêm để xác định mức độ ảnh hưởng lên chức năng protein thông qua các công cụ tin sinh học như SIFT, PolyPhen-2, Mutation Taster và CADD. Kết quả phân tích ảnh hưởng đến chức năng protein của các biến thể được tổng hợp và trình bày cụ thể trong Bảng 3.9.

Bảng 3.4. Kết quả về ảnh hưởng của các biến thể đến chức năng protein

Gen	Biến thể	CADD	Sift	PolyPhen2	Mutation Taster	Dự đoán
Mẫu PID3						
<i>PTPRC</i>	p.Asp735Val	28,3	0	1,0	0,9999	D
Mẫu PID7						
<i>UNC119</i>	p.Phe196Ile	29,7	0,004	0,989;0,988	0,9964	D
Mẫu PID28						
<i>IL21R</i>	p.Arg161Cys	16,2	0,034	0,99	0,9733	D
Mẫu PID38						
<i>NHEJ1</i>	p.Arg176*	37	0	.	0,9999	D

Phần mềm SIFT sử dụng thang điểm (SIFT Score) từ 0 đến 1, giá trị càng thấp thì khả năng gây hại của đột biến càng cao. Cụ thể, biến thể được đánh giá là gây bệnh (Damaging - D) khi có SIFT Score $<0,05$ và lành tính (Tolerated - T) nếu SIFT Score $>0,05$. Phần mềm PolyPhen2 cũng sử dụng thang điểm từ 0 đến 1 nhưng giá trị càng cao thì biến thể càng có khả năng gây bệnh. PolyPhen2 phân loại biến thể thành lành tính (Benign - B) khi điểm $<0,452$; có thể gây bệnh (Possibly Damaging - P) khi điểm từ 0,453 đến 0,956 và gây bệnh (Probably Damaging - D) khi điểm $>0,956$. MutationTaster phân loại các biến thể di truyền thành ba nhóm: Disease-causing (gây bệnh), Polymorphism (biến thể bình thường) và Potentially

disease-causing (có thể gây bệnh). Điểm CADD ≥ 20 thường được coi là có tác động mạnh, gợi ý khả năng cao là biến thể gây bệnh. Theo kết quả đánh giá bằng các công cụ tin sinh học, các bệnh nhân PID3, PID7, PID28 và PID38 đều mang các biến thể có khả năng cao gây bệnh. Cụ thể, bệnh nhân PID3 mang biến thể c.2204A>T (p.Asp735Val) trên gen *PTPRC*; bệnh nhân PID7 mang biến thể c.586T>A (p.Phe196Ile) trên gen *UNC119*; bệnh nhân PID28 mang biến thể c.481C>T (p.Arg161Cys) trên gen *IL21R*; và bệnh nhân PID38 mang biến thể vô nghĩa c.526C>T (p.Arg176*) trên gen *NHEJ1*. Tổng hợp thông tin về các biến thể ở các bệnh nhân được ghi trong Bảng 3.10.

Bảng 3.5. Tổng hợp các biến thể tìm được trên các bệnh nhân PID3, PID7, PID28, PID38

Bệnh nhân	Gen	NST	HGVS.p	HGVS.c	Loại biến thể	Mã số rs	Trạng thái
PID3	<i>PTPRC</i>	1	p.Asp735Val	c.2204A>T	Sai nghĩa	.	Dị hợp
PID7	<i>UNC119</i>	17	p.Phe196Ile	c.586T>A	Sai nghĩa	.	Dị hợp
PID28	<i>IL21R</i>	16	p.Arg161Cys	c.481C>T	Sai nghĩa	.	Dị hợp
PID38	<i>NHEJ1</i>	2	p.Arg176*	c.526C>T	Vô nghĩa	.	Đồng hợp

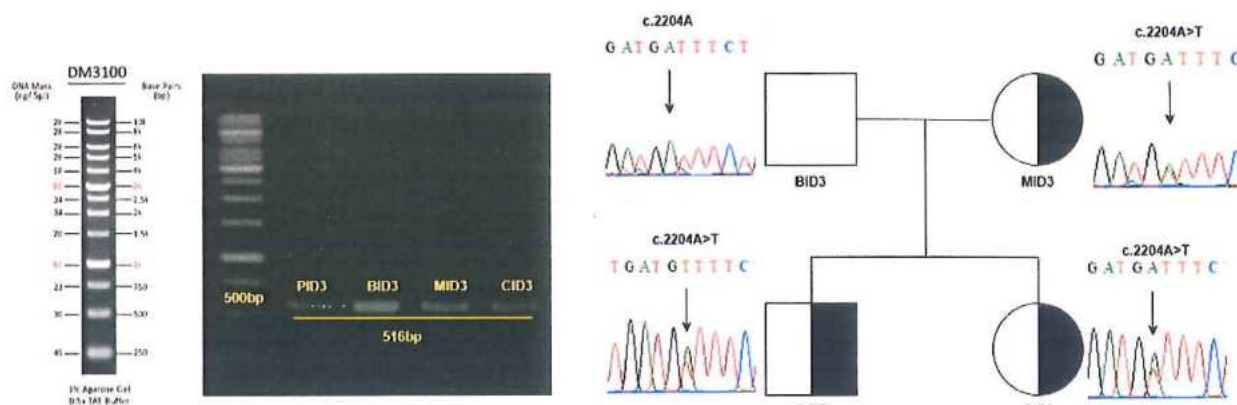
3.1.4.2. Kết quả giải trình tự Sanger

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 25 μ l với các thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được ghi ở phần phương pháp. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại các gen: *PTPRC*, *UNC119*, *IL21R*, *NHEJ1* lần lượt ở các bệnh nhân PID3, PID7, PID28, PID38 và các thành viên trong gia đình các bệnh nhân này cho thấy các băng mẫu lên rõ ràng, có kích thước đúng theo thiết kế như: Hình 3.3, 3.4, 3.5, 3.6.

3.1.4.3. Bệnh nhân PID3 và các thành viên trong gia đình

Gen *PTPRC* được khuếch đại bằng phản ứng PCR, với các băng mẫu rõ ràng trên gel điện di (Hình 3.3). Đoạn gen chứa biến thể có kích thước 516 bp được khuếch đại. Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy biến thể này là dị hợp tử (HET) và cho kết quả giải trình tự của bệnh nhân PID3 có sự thay đổi nucleotide tại vị trí 2204 (từ A thành T), dẫn đến sự thay đổi trong protein tại vị trí Asp735Val.

Sơ đồ phả hệ của gia đình bệnh nhân PID3 Hình (3.3) cho thấy bệnh nhân mang biến thể c.2204A>T (p.Asp735Val) là dị hợp tử (HET), và các thành viên khác trong gia đình (BID3, MID3, CID3) có các trạng thái di truyền khác nhau, cho thấy sự di truyền của biến thể từ mẹ của bệnh nhân.

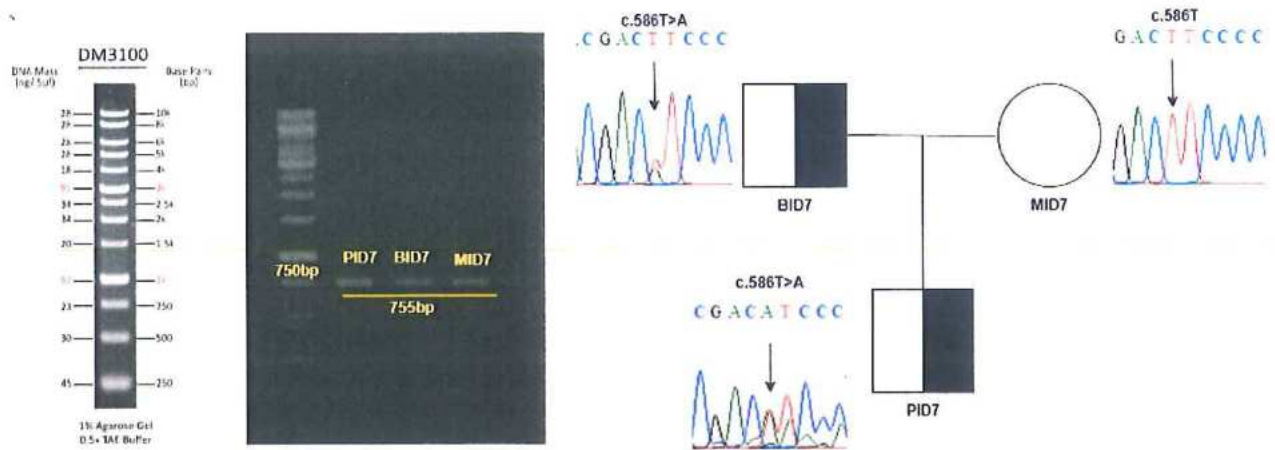


Hình 3.3. Kết quả giải trình tự Sanger của gia đình bệnh nhân PID3

3.1.4.4. . Bệnh nhân PID7 và các thành viên trong gia đình

Gen *UNC119* được khuếch đại bằng phản ứng PCR, với kích thước 755bp, hình ảnh các băng mẫu rõ ràng trên gel điện di (Hình 3.4). Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy biến thể này là dị hợp tử (HET) và có sự thay đổi nucleotide tại vị trí 586 (từ T thành A), dẫn đến sự thay đổi trong protein tại vị trí Phe196Ile.

Sơ đồ phả hệ của gia đình bệnh nhân PID7 (Hình 3.4) cho thấy bệnh nhân mang biến thể c.586T>A (p.Phe196Ile) ở trạng thái dị hợp tử (HET), trong khi các thành viên khác trong gia đình (BID7, MID7) có các trạng thái di truyền khác nhau, theo sơ đồ có thể thấy bệnh nhân PID7 nhận biến thể từ cha của bệnh nhân.

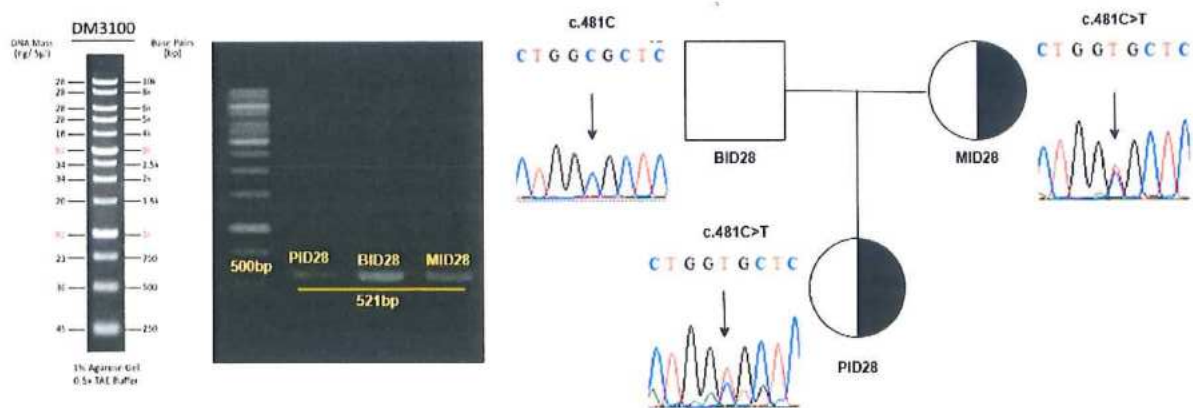


Hình 3.4. Kết quả giải trình tự Sanger của gia đình bệnh nhân PID7

3.1.4.5. Bệnh nhân PID28 và các thành viên trong gia đình

Gen *IL21R* được khuếch đại bằng phương pháp PCR, với đoạn gen có kích thước 521 bp, được phân tích qua điện di gel (Hình 3.5). Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy bệnh nhân PID28 mang biến thể c.481C>T (p.Arg161Cys) ở trạng thái dị hợp tử (HET), với sự thay đổi nucleotide tại vị trí 481 (từ C thành T), dẫn đến sự thay đổi amino acid tại vị trí Arg161Cys trong protein *IL21R*.

Sơ đồ phả hệ của gia đình bệnh nhân PID28 (Hình 3.5) cho thấy bệnh nhân mang biến thể này ở dạng dị hợp tử, trong khi các thành viên khác trong gia đình (BID28, MID28) có các trạng thái di truyền khác nhau. Qua phân tích từ sơ đồ phả hệ, có thể thấy bệnh nhân PID28 đã nhận biến thể từ mẹ của mình mẫu MID28.



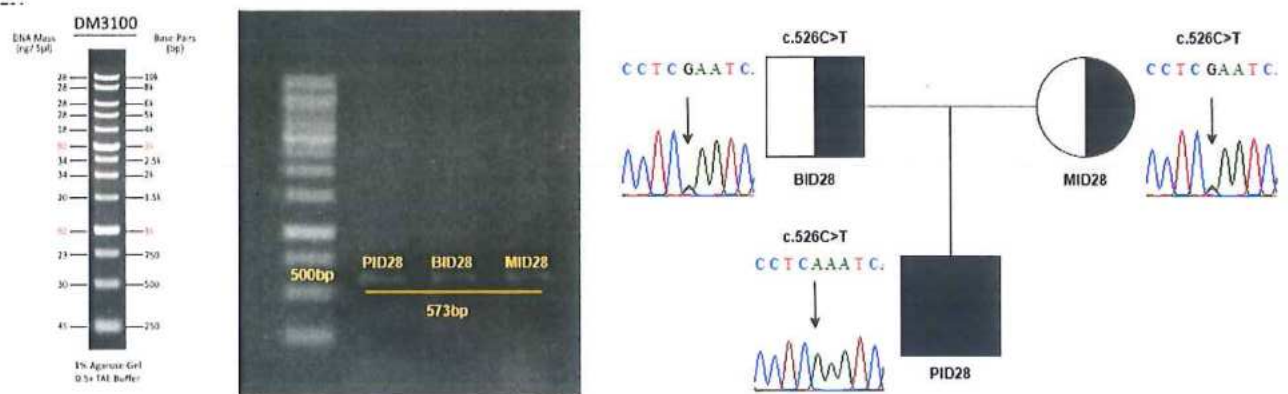
Hình 3.5. Kết quả giải trình tự Sanger của gia đình bệnh nhân PID28

3.1.4.6. Bệnh nhân PID38 và các thành viên trong gia đình

Gen *NHEJ1* được khuếch đại bằng phương pháp PCR có kích thước 573 bp (Hình 3.6). Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy bệnh nhân PID38 mang biến thể

c.526C>T (p.Arg176)* ở trạng thái đồng hợp tử (HOM), với sự thay đổi nucleotide tại vị trí 526 (từ C thành T), tạo ra một codon kết thúc sớm (stop codon) và dẫn đến việc sản xuất một protein ngắn, không còn chức năng bình thường.

Sơ đồ phả hệ của gia đình bệnh nhân PID38 (Hình 3.6) cho thấy bệnh nhân mang biến thể này ở trạng thái đồng hợp tử (HOM), và cả hai bố mẹ của bệnh nhân (BID38, MID38) đều mang biến thể dị hợp tử (HET). Qua đó, có thể thấy bệnh nhân PID38 đã nhận biến thể từ cả hai bố mẹ, dẫn đến việc biểu hiện bệnh lý nghiêm trọng. Biến thể *NHEJ1* trong trường hợp này gây suy giảm chức năng của protein *NHEJ1*, vốn có vai trò quan trọng trong quá trình sửa chữa đứt gãy DNA không tương đồng, từ đó ảnh hưởng đến hệ thống miễn dịch và dẫn đến các triệu chứng như viêm phổi tái diễn, nhiễm trùng huyết và tăng trưởng chậm.



Hình 3.6. Kết quả giải trình tự Sanger của gia đình bệnh nhân PID38 phát hiện biến thể gen *NHEJ1*, ảnh trình tự Sanger trên sợi bổ sung

3.2. THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, các bệnh nhân mắc hội chứng tăng IgE (HIES) đều có biểu hiện lâm sàng điển hình bao gồm nhiễm trùng tái diễn nghiêm trọng như viêm phổi, viêm tai giữa, viêm da cơ địa, nhiễm nấm *Candida*, loét miệng và áp xe da, kèm theo nồng độ IgE huyết thanh tăng cao. Các đặc điểm lâm sàng này phù hợp với biểu hiện điển hình của HIES đã được ghi nhận trong y văn. Bên cạnh đó, phân tích miễn dịch cho thấy đa số bệnh nhân có rối loạn về số lượng tế bào lympho, đặc biệt là sự gia tăng tế bào T (CD3, CD4), B (CD19) và giảm tế bào NK (CD56). Những bất thường này phản ánh sự suy giảm trong chức năng điều hòa miễn dịch, từ đó góp phần vào tình trạng nhiễm trùng tái diễn và đáp ứng kém với vi sinh vật.

Phân tích di truyền đã xác định được bốn biến thể hiếm trên các gen liên quan đến chức năng miễn dịch. Cụ thể, bệnh nhân PID03 mang biến thể c.2204A>T (p.Asp735Val) trên gen *PTPRC*. Bệnh nhân PID07 mang biến thể c.586T>A (p.Phe196Ile) trên gen *UNC119*. Bệnh nhân PID28 mang biến thể c.481C>T (p.Arg161Cys) trên gen *IL21R*. Đáng chú ý, bệnh nhân PID38 mang biến thể vô nghĩa c.526C>T (p.Arg176*) trên gen *NHEJ1*.

Ba bệnh nhân PID3, PID7, PID28 đều mang một biến thể gen ở trạng thái dị hợp tử và biểu hiện bệnh, trong khi các thành viên gia đình mang cùng biến thể lại không có triệu chứng. Phân tích phả hệ cho thấy mỗi bệnh nhân thừa hưởng biến thể gây bệnh từ một bố hoặc mẹ không biểu hiện bệnh (người mang gen bệnh). Cụ thể, bệnh nhân PID3 và PID28 nhận biến thể từ mẹ, trong khi PID7 nhận biến thể từ cha. Những bố, mẹ này đều mang biến thể dị hợp tử nhưng hoàn toàn khỏe mạnh, nghĩa là họ đóng vai trò “thể mang gen bệnh” không có biểu hiện lâm sàng. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi nhiều cơ chế sinh học.

Thứ nhất, trong các bệnh lý di truyền lặn, người dị hợp tử thường không biểu hiện bệnh (carrier state). Thể dị hợp tử vẫn biểu hiện bệnh có thể do thực tế mang thêm một đột biến khác trên alen còn lại hoặc một bất thường di truyền khác làm mất chức năng của gen đó hoàn toàn. Nói cách khác, bệnh nhân có thể không thực sự ở trạng thái dị hợp đơn thuần mà có tình trạng kiểu gen tương đương người đồng hợp tử do một “đột biến thứ hai” ẩn giấu, trong khi bố hoặc mẹ của họ chỉ mang một bản sao đột biến và do đó chỉ là người mang gen bệnh không triệu chứng [58]. Thứ hai, trong các bệnh di truyền trội với độ xâm nhập không hoàn toàn, người mang biến thể có thể không biểu hiện kiểu hình nếu gen không được kích hoạt đầy đủ, khiến biến thể “ẩn mình” qua các thế hệ [59]. Thứ ba, các gen điều biến (modifier genes) có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của gen bệnh. Ở những người mang cùng một đột biến, các biến thể ở gen khác có thể làm giảm nhẹ hoặc tăng nặng hiệu quả của đột biến đó, dẫn đến người thì có triệu chứng, người thì không [60]. Ngoài ra, yếu tố môi trường như nhiễm trùng, chế độ dinh dưỡng hay mức độ phơi nhiễm với các tác nhân có thể đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt hoặc ức chế biểu hiện bệnh [61]. Nếu một thành viên gia đình mang biến thể ở trạng thái khảm (chỉ có một tỷ lệ nhất định tế bào mang đột biến, thay vì tất cả các tế bào), người đó có thể không biểu hiện bệnh hoặc biểu hiện rất nhẹ do phần còn lại của cơ thể vẫn có gen bình thường. Tuy nhiên, nếu biến thể đó được truyền cho con và có mặt trong toàn bộ tế bào cơ thể của người con (đột biến ở trạng thái dòng

mầm hoàn chỉnh), thì người con có nguy cơ biểu hiện bệnh đầy đủ. Thêm vào đó, các cơ chế epigenetic như methyl hóa DNA, biến đổi histone, và cấu trúc nhiễm sắc thể có thể điều chỉnh hoạt động của gen mà không làm thay đổi trình tự DNA. Cuối cùng, nhiều bệnh di truyền chỉ bộc lộ khi người mang gen gặp một tác nhân môi trường nhất định, tức là cần có sự tương tác giữa yếu tố nguy cơ di truyền và yếu tố khởi phát từ môi trường. Ví dụ, một người mang đột biến có thể khỏe mạnh cho đến khi một sự kiện môi trường như nhiễm trùng, căng thẳng, chấn thương DNA xảy ra, vượt qua ngưỡng bù trừ của cơ thể và từ đó kích hoạt quá trình bệnh lý [61].

3.2.1. Gia đình bệnh nhân PID3

Bệnh nhân PID3 mang biến thể p.Asp735Val trên gen *PTPRC*, một phát hiện khá đặc biệt vì trước đây các biến thể trên *PTPRC* chủ yếu được ghi nhận liên quan đến suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID). Tuy nhiên, bệnh nhân PID3 lại có triệu chứng phù hợp hơn với kiểu hình của HIES, bao gồm viêm phổi tái diễn, áp xe da và mức IgE huyết thanh tăng cao (12.472 IU/mL). Phát hiện này cho thấy có thể có một biểu hiện kiểu hình nhẹ hơn hoặc khác biệt của đột biến *PTPRC*, mở ra cơ hội nghiên cứu thêm về phạm vi biểu hiện lâm sàng và chức năng của protein CD45 trong bệnh lý HIES. Trong gia đình bệnh nhân PID3, các thành viên khác mang biến thể p.Asp735Val nhưng không có triệu chứng. Điều này có thể do sự ảnh hưởng của các yếu tố di truyền bổ sung hoặc do sự bảo vệ của các gen khác trong cơ thể, giúp giảm thiểu tác động của đột biến *PTPRC*. Các yếu tố môi trường, chẳng hạn như mức độ tiếp xúc với các tác nhân gây bệnh hoặc yếu tố dinh dưỡng, có thể giúp ngăn ngừa sự phát triển của bệnh ở các thành viên này. Phả hệ gia đình của bệnh nhân PID3 cung cấp thông tin quan trọng để hiểu rõ hơn về sự di truyền của bệnh và các yếu tố tác động đến sự biểu hiện triệu chứng.



Hình 3.7. Cấu trúc 3D của protein PTPRC, hình ảnh xoắn alpha tại vị trí 735 domain D1

Trong nghiên cứu này, bệnh nhân PID03 mang biến thể c.2204A>T, dẫn đến thay thế axit amin tại vị trí 735 từ Aspartic acid sang Valine (p.Asp735Val) trên gen *PTPRC*. Gen này mã hóa protein CD45 – một phosphatase tyrosine chuyên biệt (protein tyrosine phosphatase, PTP), đóng vai trò then chốt trong điều hòa hoạt động của tế bào lympho thông qua việc khử phosphoryl trên các phân tử tín hiệu nội bào. Cấu trúc của CD45 bao gồm ba vùng chính: vùng ngoài màng, đoạn xuyên màng và vùng nội bào chứa hai domain PTP: một domain xúc tác hoạt động (D1) nằm gần màng và một domain điều hòa không có hoạt tính enzym (D2) nằm xa màng hơn. Domain D1 chịu trách nhiệm chính trong hoạt động dephosphoryl hóa các tyrosine trên các phân tử tín hiệu, chẳng hạn như các kinase thuộc họ Src và ZAP-70 – các thành phần thiết yếu trong quá trình hoạt hóa tế bào T [62].

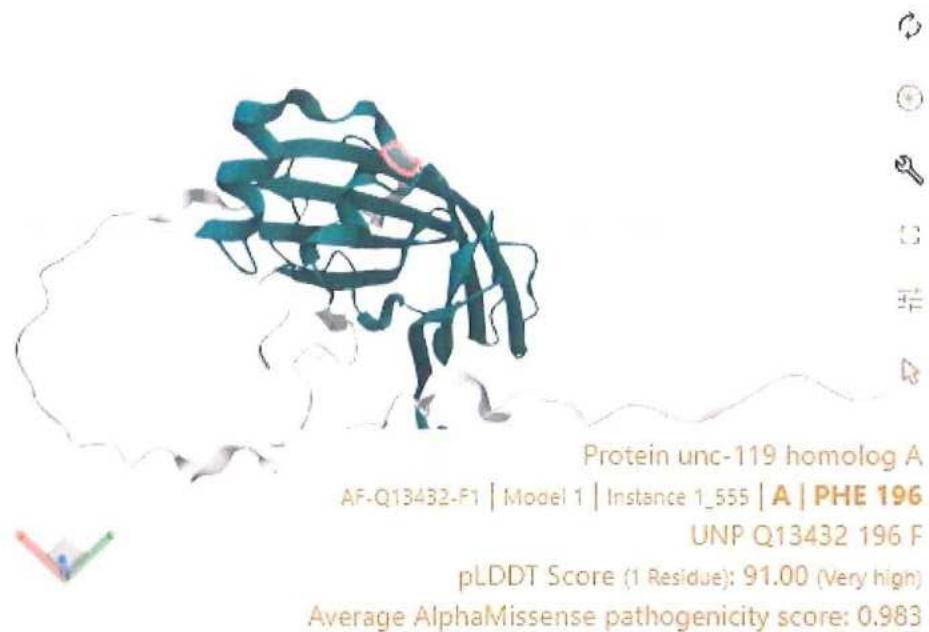
Đột biến p.Asp735Val xảy ra tại vùng domain D1, chính xác trong một đoạn xoắn alpha – một cấu trúc thứ cấp quan trọng góp phần duy trì tính ổn định và cấu trúc ba chiều của vùng xúc tác. Aspartic acid là một axit amin phân cực, mang điện tích âm, thường đóng vai trò quan trọng trong duy trì tương tác ion hoặc liên kết hydro ổn định giữa các phần tử trong cấu trúc protein. Việc thay thế aspartic acid bằng valine – một axit amin không phân cực, kỵ nước – tại vị trí này có thể làm mất đi các tương tác quan trọng, dẫn đến biến dạng cấu trúc xoắn alpha và thay đổi đáng kể cấu trúc cục bộ hoặc toàn bộ domain D1. Sự biến đổi này có thể ảnh hưởng đến

khả năng định hướng chính xác của các gốc amin trong vùng hoạt động enzym, làm giảm hoặc mất chức năng xúc tác của CD45 [62].

Sự suy giảm chức năng CD45 có thể dẫn đến rối loạn trong quá trình truyền tín hiệu khởi động đáp ứng miễn dịch, đặc biệt là trong hoạt hóa và biệt hóa tế bào T và B. Hậu quả lâm sàng có thể bao gồm tình trạng suy giảm miễn dịch, biểu hiện bằng nhiễm trùng tái diễn, tăng IgE huyết thanh và rối loạn tế bào lympho – những đặc điểm đã được ghi nhận rõ ràng trên bệnh nhân PID03. Ngoài ra, những thay đổi cấu trúc tại vùng xoắn alpha cũng có thể khiến protein trở nên không ổn định, dễ bị phân hủy hoặc không thể tương tác hiệu quả với các phân tử tín hiệu khác như Src family kinases và ZAP-70 làm giảm hiệu suất truyền tín hiệu miễn dịch và tăng nguy cơ rối loạn tự miễn hoặc suy giảm miễn dịch bẩm sinh.

3.2.2. Gia đình bệnh nhân PID7

Bệnh nhân PID7 mang biến thể p.Phe196Ile trên gen *UNC119*, một phát hiện mới chưa từng được báo cáo trong bất kỳ nghiên cứu HIES nào trước đây. Gen *UNC119* chủ yếu được biết đến liên quan tới các bệnh lý miễn dịch khác, cụ thể là hội chứng giảm lympho T CD4 tự phát (Idiopathic CD4 lymphopenia - ICL), theo báo cáo duy nhất bởi Stepensky và cộng sự (2014) [63]. Các triệu chứng như viêm da cơ địa nặng, tiêu chảy mãn tính và nhiễm trùng tái diễn quan sát trên bệnh nhân PID7 cho thấy *UNC119* có thể ảnh hưởng rộng hơn đến hệ thống miễn dịch, vượt qua phạm vi hiện tại được công nhận. Mặc dù kết quả dự đoán tin sinh học đều cho thấy biến thể này có khả năng gây bệnh cao, nhưng việc thiếu hụt các dữ liệu chức năng cụ thể đòi hỏi phải tiếp tục nghiên cứu chuyên sâu về cơ chế tác động của *UNC119* lên các tế bào miễn dịch, đặc biệt là tế bào T và khả năng ảnh hưởng đến quá trình điều hòa cytokine [64].



Hình 3.8. Cấu trúc 3D của protein UNC119, xoắn alpha tại vị trí 196 domain 1

UNC119 là một protein hoạt động như một chất kích hoạt các kinase kiểu Src (như LCK và FYN) trong tế bào T, giúp điều chỉnh các tín hiệu từ thụ thể tế bào T (TCR). Ngoài ra, UNC119 cũng có vai trò quan trọng trong việc điều hòa các con đường tín hiệu khác, bao gồm các con đường tín hiệu quan trọng trong các tế bào miễn dịch khác như tế bào B và tế bào đơn nhân. Một trong những chức năng quan trọng của UNC119 là việc nó có khả năng tương tác với các protein myristoyl, giúp ổn định và điều hòa quá trình tín hiệu trong các tế bào [64]. UNC119 đóng vai trò trong việc kích hoạt các kinase Src như LCK và FYN trong tế bào T. Đột biến làm thay đổi cấu trúc của UNC119 có thể làm giảm khả năng kích hoạt các kinase này, từ đó ảnh hưởng đến tín hiệu tế bào T [64]. Đột biến thay đổi cấu trúc xoắn alpha tại vị trí 196 của domain 1 làm thay đổi cấu trúc của UNC119. Sự thay đổi cấu trúc này dẫn tới suy giảm hoạt động của UNC119 có thể dẫn đến rối loạn trong việc kích hoạt tế bào T và làm suy yếu các phản ứng miễn dịch.

3.2.3. Gia đình bệnh nhân PID28

Bệnh nhân PID28 mang biến thể c.481C>T (p.Arg161Cys) trên gen *IL21R*, một phát hiện quan trọng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu quốc tế trước đây. Các nghiên cứu đã công bố chứng minh rằng đột biến trên *IL21R* gây ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng biệt hóa tế bào lympho B, T và NK thông qua sự suy giảm con đường tín hiệu IL-21 [65]. Điều này dẫn đến hiện tượng tăng sản xuất IgE và

các triệu chứng lâm sàng nghiêm trọng của HIES như viêm da cơ địa, viêm phổi tái diễn, và áp xe lạnh tái phát. Các triệu chứng lâm sàng trên bệnh nhân PID28 trong nghiên cứu này như viêm da cơ địa nghiêm trọng ngay từ giai đoạn sơ sinh và IgE tăng cao (>1400 IU/mL) là hoàn toàn phù hợp với các báo cáo trước đây, qua đó khẳng định mối quan hệ nhân quả rõ ràng giữa biến thể này và kiểu hình lâm sàng quan sát được [66]. Phân tích phả hệ trong trường hợp này cho thấy mặc dù mẹ của bệnh nhân mang cùng một biến thể di truyền, nhưng việc người mẹ không biểu hiện bệnh có thể liên quan đến sự tương tác phức tạp giữa các yếu tố di truyền khác chưa được xác định trong nghiên cứu này.

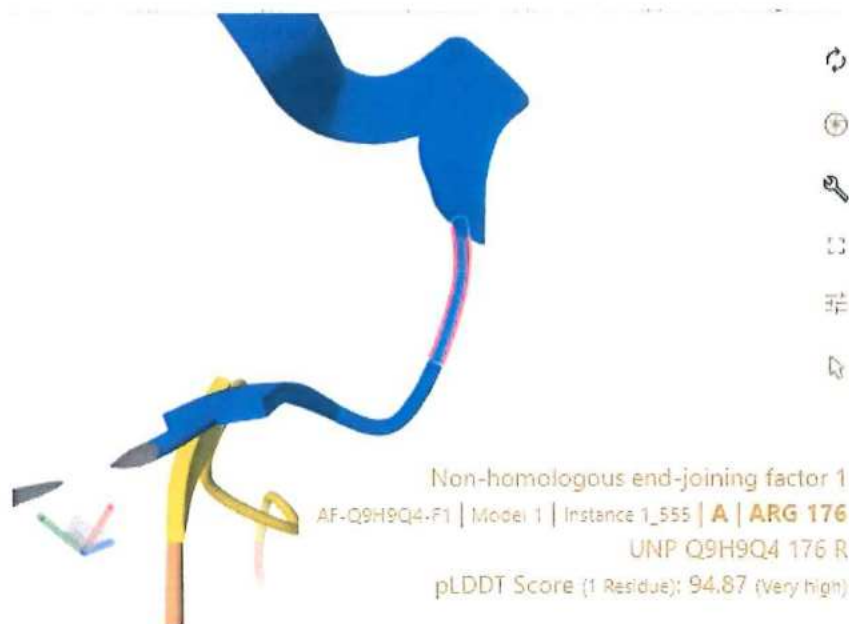


Hình 3.9. Cấu trúc 3D của protein IL21R, hình ảnh gấp nếp β tại vị trí 161 domain 2

Protein IL-21R ở người gồm một chuỗi polypeptide xuyên màng type I với vùng ngoại bào gắn IL-21, một vùng xuyên màng, và đuôi trong bào tương chứa motif gắn JAK1. Vùng ngoại bào của IL-21R có hai domain kiểu fibronectin type III (FnIII) giàu cấu trúc gấp nếp β . Một đột biến đáng chú ý trong vùng ngoại bào của IL-21R là p.Arg161Cys (c.481C>T), trong đó arginin tích điện dương bị thay thế bằng cystein mang nhóm -SH phân cực. Arg161 nằm trong domain fibronectin type III (FnIII) thứ hai – vùng cấu trúc thiết yếu cho sự ổn định và hoạt động chức năng của thụ thể. Vị trí này nằm gần các acid amin bảo tồn quan trọng như Trp138 và Leu158, vốn tạo thành lõi kỵ nước duy trì cấu trúc beta-sheet ổn định, cũng như lân cận Glu157, một vị trí tích điện âm tham gia tương tác nội phân tử [67]. Việc thay thế Arg161 bằng Cystein có thể dẫn đến mất các tương tác điện tích có lợi, gây

mất ổn định cấu trúc domain FnIII. Ngoài ra, sự xuất hiện của một cystein “tự do” tại vị trí không thông thường có thể dẫn đến hình thành cầu disulfide sai lệch, khiến IL-21R bị giữ lại tại lưới nội chất và không được đưa ra màng tế bào [67]. Hậu quả là thụ thể không có mặt trên bề mặt tế bào để gắn với IL-21, dẫn đến mất khả năng hoạt hóa chuỗi tín hiệu JAK/STAT. Mặc dù đột biến p.Arg161Cys chưa được mô tả trong các ca bệnh đã công bố, dữ liệu từ cơ sở ClinVar đã ghi nhận biến thể này có liên quan đến hội chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh liên quan IL-21R (Immunodeficiency 56). Vị trí Arg161 cũng nằm gần các đột biến gây bệnh đã biết như Trp138Ser, Leu158Pro, và Arg201Leu/Gln – tất cả đều dẫn đến mất chức năng IL-21R và biểu hiện kiểu hình suy giảm miễn dịch trầm trọng [68]. Do đó, có cơ sở vững chắc để suy luận rằng p.Arg161Cys là một đột biến gây mất chức năng (loss-of-function), ảnh hưởng đến sự biểu hiện thụ thể trên màng và làm suy yếu hoạt động tín hiệu IL-21, từ đó góp phần vào rối loạn miễn dịch ở bệnh nhân mang biến thể này [69].

3.2.4. Gia đình bệnh nhân PID38



Hình 3.10. Cấu trúc 3D của protein NHEJ1, hình ảnh Arg176

Biến thể *NHEJ1* (p.Arg176*) cũng được ghi nhận trên bệnh nhân PID38 vốn là nguyên nhân gây ra hội chứng Cernunnos, một dạng suy giảm miễn dịch nghiêm trọng. Tuy nhiên, triệu chứng điển hình của hội chứng này (đầu nhỏ, chậm phát triển nghiêm trọng) không được quan sát rõ ràng ở bệnh nhân này, mà thay vào đó là sự tăng cao nồng độ IgE và nhiễm trùng tái diễn.

Protein NHEJ1 (còn gọi là Cernunnos hoặc XLF) tồn tại dưới dạng homodimer, mỗi monomer gồm miền đầu N-terminal dạng cầu (globular head), một đoạn thân α -helix kéo dài, và vùng đuôi C-terminal không có cấu trúc cố định. Amino acid Arg176 nằm ở khoảng giữa chuỗi polypeptide, gần cuối miền protein bảo tồn cao (miền Pfam XLF từ amino acid 12 đến 174) [70]. Vị trí Arg176 thuộc phần α -helix thân (stalk) nối liền đầu N-terminal với đuôi C-terminal của protein. Trên mô hình cấu trúc 3D (dựa theo dự đoán AlphaFold và cấu trúc tinh thể XLF 1-233), Arg176 nằm trên bề mặt của một bó xoắn α ở vùng trung tâm của dimer [71]. Vùng helices này góp phần quan trọng vào việc tạo cấu trúc dimer ổn định của NHEJ1, giúp hai monomer XLF gắn kết với nhau. Nhìn chung, Arg176 không thuộc vùng hoạt động xúc tác đặc hiệu nào mà chủ yếu đóng vai trò duy trì cấu trúc không gian của protein XLF. Đột biến p.Arg176* (thay đổi codon Arg thành codon kết thúc tại vị trí 176) sẽ làm chuỗi polypeptide dừng lại sớm ở amino acid 176. Điều này khiến protein bị cắt ngắn và mất đi 123 amino acid cuối C-terminal (từ 177 đến 299). Phần bị mất bao gồm một đoạn lớn của thân α -helix (phần cuối của stalk) cùng toàn bộ vùng đuôi không cấu trúc C-terminal. Sự thiếu hụt này được dự đoán ảnh hưởng nghiêm trọng đến khả năng gấp cuộn và ổn định của protein. Cụ thể, protein cắt ngắn sẽ thiếu các miền chức năng quan trọng: cấu trúc xoắn α không còn đầy đủ để tạo dimer vững chắc, và vùng đuôi C-terminal (thường linh động) bị mất hoàn toàn. Hậu quả là cấu trúc 3D có thể bị biến đổi hoặc không bền vững, dẫn đến mất chức năng sinh học của NHEJ1 [72]. Thông thường, đột biến vô nghĩa sớm như p.Arg176* sẽ tạo ra mRNA chứa codon kết thúc bất thường, kích hoạt cơ chế phân hủy mRNA qua trung gian nonsense (NMD). Do đó, rất có thể không có protein hoặc chỉ một lượng rất ít protein dị dạng được tạo thành trong tế bào mang đột biến này. Ngay cả khi một protein ngắn (1–176) được sinh tổng hợp, protein đó không còn miền tương tác cần thiết để tham gia sửa chữa DNA. Thực tế, nhiều báo cáo đã ghi nhận, đột biến Arg176 tương đương với alen mất chức năng hoàn toàn. Ví dụ, biến thể c.526C>T (p.Arg176X) được Dutrannoy và cộng sự tìm thấy ở bệnh nhân hội chứng giống Nijmegen breakage, gây ngừng tổng hợp protein tại exon 4. Bệnh nhân mang đột biến này biểu hiện đầu nhỏ (microcephaly) và quá mẫn cảm với bức xạ do mất chức năng NHEJ1 [72]. Điều này khẳng định rằng p.Arg176* gây hậu quả nghiêm trọng đến protein, làm mất hoạt động sinh học bình thường của NHEJ1.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã thu thập mẫu máu từ các bệnh nhân được chẩn đoán mắc hội chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh tăng IgE (HIES) và người thân trong gia đình của họ tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa (Whole-exome sequencing – WES) trên 4 bệnh nhân mắc hội chứng HIES điển hình, nghiên cứu đã xác định được một số biến thể di truyền có khả năng liên quan đến hội chứng HIES, cụ thể như sau:

1. Phát hiện biến thể dị hợp tử c.2204A>T (p.Asp735Val) mới trên gen *PTPRC* ở bệnh nhân PID3, có khả năng liên quan đến hội chứng HIES.

2. Phát hiện biến thể dị hợp tử c.586T>A (p.Phe196Ile) mới trên gen *UNC119* ở bệnh nhân PID7, biến thể này được đánh giá là có khả năng ảnh hưởng đến chức năng protein và liên quan đến biểu hiện lâm sàng của bệnh.

3. Phát hiện biến thể dị hợp tử c.481C>T (p.Arg161Cys) trên gen *IL21R* ở bệnh nhân PID28 có khả năng liên quan mật thiết đến biểu hiện lâm sàng của hội chứng HIES.

4. Phát hiện biến thể mới trên bệnh nhân PID38 ở dạng đồng hợp tử c.526C>T (p.Arg176*) trên gen *NHEJ1*, biến thể này đều có tiềm năng cao gây ra các rối loạn miễn dịch nghiêm trọng ở bệnh nhân.

KIẾN NGHỊ

Cần triển khai thêm các nghiên cứu chức năng trên tế bào và động vật mô hình để hiểu rõ hơn cơ chế gây bệnh của các biến thể đã được phát hiện, góp phần hoàn thiện hiểu biết về cơ chế sinh bệnh của HIES.

Xây dựng cơ sở dữ liệu quốc gia về các biến thể liên quan đến hội chứng HIES, làm cơ sở tham khảo trong chẩn đoán, tư vấn di truyền và xây dựng liệu pháp điều trị phù hợp cho bệnh nhân tại Việt Nam.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AlYafie R., Velayutham D., van Panhuys N., et al., 2025, The genetics of hyper IgE syndromes. *Front Immunol*, 16.
2. Freeman A.F. and Olivier K.N., 2016, Hyper IgE Syndromes and the Lung, *Clin Chest Med*, 37(3), pp.557–567.
3. Grimbacher B., Belohradsky B.H., and Holland S.M., 2002, Immunoglobulin E in primary immunodeficiency diseases. *Allergy*, 57(11), pp. 995–1007.
4. Dave T., Tashrifwala F.A.A., Rangwala U.S., et al., 2024, Hyper-IgE syndrome: a case report. *Ann Med Surg*, 86(2), pp. 1205–1209.
5. Davis StarkeyD., Schaller J., Wedgwood RalphJ., et al., 1966, JOB'S SYNDROME: Recurrent, " Cold ", Staphylococcal Abscesses, *The Lancet*, 287(7445), pp. 1013–1015.
6. Ramdani M., El Hammoumi M.M., and Kabiri E.H, 2024, Job-Buckley syndrome: a case report and literature review, *Kardiochirurgia Torakochirurgia Pol Pol J Cardio-Thorac Surg*, 21(3), pp. 191–193.
7. Hill H. and Quie P, 1974, Raised serum-ige levels and defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent bacterial infections, *The Lancet*, 303(7850), pp. 183–187.
8. Grimbacher B., Schäffer A.A., Holland S.M., et al, 1999, Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4, *Am J Hum Genet*, 65(3), pp. 735–744.
9. Freeman A.F. and Holland S.M, 2009, Clinical Manifestations, Etiology, and Pathogenesis of the Hyper IgE Syndromes, *Pediatr Res*, 65(5 Pt 2), 32R-37R.
10. Al-Shaikhly T. and Ochs H.D, 2019, Hyper IgE syndromes: clinical and molecular characteristics, *Immunol Cell Biol*, 97(4), pp. 368–379.
11. Carrabba M., Moschetti G., Vasco C., et al, 2024, 200 Characterization of CD4+ T lymphocytes in STAT3-DN hyper-IgE syndrome patients, *Clin Immunol*, 262, 110142.

12. Yaakoubi R., Mekki N., Ben-Mustapha I., et al, 2023, Diagnostic challenge in a series of eleven patients with hyper IgE syndromes, *Front Immunol*, 13.
13. Hsu A.P., Davis J., Puck J.M., et al., 1993, STAT3 Hyper IgE Syndrome, *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
14. Biggs C.M., Keles S., and Chatila T.A, 2017, DOCK8 Deficiency: Insights into Pathophysiology, Clinical Features and Management, *Clin Immunol Orlando Fla*, 181, pp. 75–82.
15. Bergerson J.R.E. and Freeman A.F, 2019, An Update on Syndromes with a Hyper-IgE Phenotype, *Immunol Allergy Clin North Am*, 39(1), pp. 49–61.
16. IJsbrand M. Kramer, 2015, PTPRC and the regulation of immune cell function, *Signal Transduction*, pp. 935-995.
17. Kaplan R., Morse B., Huebner K., et al, 1990, Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(18), pp. 7000–7004.
18. Nicholas D Huntington, David M Tarlinton, 2004, CD45: direct and indirect government of immune regulation, *Immunology Letters*, pp.167-174.
19. Hermiston M.L., Xu Z., and Weiss A, 2003, CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells, *Annu Rev Immunol*, 21, pp. 107–137.
20. Thomas M.L, 1989, The Leukocyte Common Antigen Family, *Annu Rev Immunol*, 7, pp. 339–369.
21. Fleming H.E., Milne C.D., and Paige C.J, 2004, CD45-Deficient Mice Accumulate Pro-B Cells Both In Vivo and In Vitro1, *J Immunol*, 173(4), pp. 2542–2551.
22. NIH Genetic Testing Registry (GTR), Severe combined immunodeficiency, autosomal recessive, T cell-negative, B cell-negative, NK cell-positive.

23. Chin A., Balasubramanyam S., and Davis C.M, 2021, Very Elevated IgE, Atopy, and Severe Infection: A Genomics-Based Diagnostic Approach to a Spectrum of Diseases, *Case Rep Immunol*, 2767012.
24. Howard H. Y. Chang, Nicholas R. Pannunzio, Noritaka Adachi & Michael R. Lieber, 2017, Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 495–506.
25. Recio M.J., Dominguez-Pinilla N., Perrig M.S., et al., 2019, Extreme Phenotypes With Identical Mutations: Two Patients With Same Non-sense NHEJ1 Homozygous Mutation, *Front Immunol*, pp. 356-8.
26. Kotlarz D., Ziętara N., Uzel G., et al, 2013, Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome, *J Exp Med*, 210(3), pp. 433–443.
27. Frizinsky S., Rechavi E., Barel O., et al, 2022, Novel NHEJ1 pathogenic variant linked to severe combined immunodeficiency, microcephaly, and abnormal T and B cell receptor repertoires, *Front Pediatr*, 10, 883173.
28. Lawrence M.G., Barber J.S., Sokolic R.A., et al, 2013, Elevated IgE and atopy in patients treated for early onset ADA-SCID, *J Allergy Clin Immunol*, 132(6)
29. Murray J.E., van der Burg M., IJspeert H., et al, 2015, Mutations in the NHEJ Component XRCC4 Cause Primordial Dwarfism, *Am J Hum Genet*, 96(3), pp. 412–424.
30. Gorska M.M. and Alam R, 2012, Consequences of a Mutation in the UNC119 Gene for T Cell Function in Idiopathic CD4 Lymphopenia, *Curr Allergy Asthma Rep*, 12(5), pp. 396–401.
31. Gorska M.M. and Alam R, 2012, A mutation in the human Uncoordinated 119 gene impairs TCR signaling and is associated with CD4 lymphopenia. *Blood*, 119(6), pp. 1399–1406.

32. M Maduro 1, D Pilgrim 1, 2005, Identification and Cloning of Unc-119, a Gene Expressed in the *Caenorhabditis Elegans* Nervous System, *Genetics*, pp. 1211-23.
33. Mengwei Han, Luni Hu, Di Wu, Yime Zhang, Peng Li, Xingyu Zhao, Yanyu Zeng, Guanqun Ren, Zhiyuan Hou, Yanli Pang, Tongbiao Zhao & Chao Zhong, 2023, IL-21R-STAT3 signalling initiates a differentiation program in uterine tissue-resident NK cells to support pregnancy, *Nature Communications*, pp. 23-25.
34. Brahim Belaid 1 2, Lydia Lamara Mahammed 1 2, Aida Mohand Oussaid 2 3, Melanie Migaud 4 5, Yasmine Khadri 3, Jean Laurent Casanova 4 5 6 7, Anne Puel 4 5 6, Nafissa Ben Halla 2 3, Reda Djidjik 1 2, 2021, *Frontiers in Immunology*, pp. 191-200.
35. John S. Yi, Maureen A. Cox, Allan J. Zaja, 2010, Interleukin-21: a multifunctional regulator of immunity to infections, *Science direct*, pp. 1111-1119.
36. Akamatsu N., Yamada Y., Hasegawa H., et al, 2007, High IL-21 receptor expression and apoptosis induction by IL-21 in follicular lymphoma, *Cancer Lett*, 256(2), pp. 196–206.
37. Warr A., Robert C., Hume D., et al, 2015, Exome Sequencing: Current and Future Perspectives, *G3 GenesGenomesGenetics*, 5(8), pp. 1543–1550.
38. Sathyanarayanan A., Manda S., Poojary M., et al, 2019, Exome Sequencing Data Analysis, *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, pp. 164–175.
39. Cheng C., Fei Z., and Xiao P, 2023, Methods to improve the accuracy of next-generation sequencing, *Front Bioeng Biotechnol*, 11, 982111.
40. Frésard L. and Montgomery S.B, 2018, Diagnosing rare diseases after the exome, *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 4(6).
41. Belkadi A., Bolze A., Itan Y., et al, 2015, Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants, *Proc Natl Acad Sci*, 112(17), pp. 5473–5478.

42. Juan Li, Wei-Hua Han, Meng-Yu Zhang, Jia-Qi Fan, Guo-Dong Li, Jun-Yi Li, Xiao Chen, 2025, Hyper-IgE Syndrome: A Case Report with Insights from Bioinformatics Analysis of Key Pathways and Genes, Dovepress, 312(18), pp. 1567-1580.
43. Taha Al-Shaikhly, Hans D Ochs, 2018, Hyper IgE syndromes: clinical and molecular characteristics pp, Wiley Online Library, pp. 32–37.
44. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., et al, 2022, Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee, J Clin Immunol, 42(7), pp. 1473–1507.
45. Dave T., Tashrifwala F.A.A., Rangwala U.S., et al, 2024, Hyper-IgE syndrome: a case report, Ann Med Surg, 86(2), pp. 1205–1209.
46. Buckley R.H., Wray B.B., and Belmaker E.Z, 1972, Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. Pediatrics, 49(1), pp. 59–70.
47. Grimbacher B., Holland S.M., Gallin J.I., et al, 1999, Hyper-IgE syndrome with recurrent infections-an autosomal dominant multisystem disorder, N Engl J Med, 340(9), pp. 692–702.
48. Nguyen Ngoc Quynh Le, Nguyen Thi Van Anh, Ha Phuong Anh, Nguyen Dinh Giang, Tran Thi Van Anh, Bui Thi Thuy Quynh, Nguyen Thi Thanh Huong, Thuc Thanh Huyen, Le Quynh Chi, 2025, HYPER IGE SYNDROME IN CHILDREN: CASE REPORTS AND LITERATURE REVIEW, Medical research journal, pp. 343-351.
49. Li H. and Durbin R, 2009, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform, Bioinforma Oxf Engl, 25(14), pp. 1754–1760.
50. Jing Zhang, Heshan Lin, Balaji Pavan, Wu-Chun Feng, 2013, Optimizing Burrows-Wheeler Transform-Based Sequence Alignment on Multicore Architectures, IEEE, pp. 10-13.

51. McKenna A., Hanna M., Banks E., et al, 2010, The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data, *Genome Res*, 20(9), pp. 1297–1303.
52. Yi M., Zhao Y., Jia L., et al, 2014, Performance comparison of SNP detection tools with illumina exome sequencing data-an assessment using both family pedigree information and sample-matched SNP array data, *Nucleic Acids Res*, 42(12), e101.
53. Ng P.C. and Henikoff S, 2003, SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3812–3814.
54. Wang K., Li M., and Hakonarson H, 2010, ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data, *Nucleic Acids Res*, 38(16), e164.
55. Adzhubei I., Jordan D.M., and Sunyaev S.R, 2013, Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2, *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 7, Unit7.20.
56. Rentzsch P., Witten D., Cooper G.M., et al, 2019, CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome, *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D886–D894.
57. Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M., et al, 2014, MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age, *Nat Methods*, 11(4), pp. 361–362.
58. Aaishwariya Gulani, Tracey Weiler, 2023, *Genetics, Autosomal Recessive*, StatPearls, pp.205-210.
59. Shawky R.M, 2014, Reduced penetrance in human inherited disease, *Egypt J Med Hum Genet*, 15(2), pp.103–111.
60. David N. Cooper, Michael Krawczak, Constantin Polychronakos, Chris Tyler-Smith, Hildegard Kehrer-Sawatzki, 2013, Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease, *Springer Nature Link*, pp. 1077–1130

61. Gruber C. and Bogunovic D, 2020, Incomplete penetrance in primary immunodeficiency: a skeleton in the closet, *Hum Genet*, 139(6–7), pp. 745–757.
62. Aron Marchler-Bauer, John B. Anderson, Myra K. Derbyshire, Carol DeWeese-Scott, Noreen R. Gonzales, Marc Gwadz, Luning Hao, Siqian He, David I. Hurwitz, John D. Jackson, Zhaoxi Ke, Dmitri Krylov, Christopher J. Lanczycki, Cynthia A. Liebert, Chunlei Liu, Fu Lu, Shennan Lu, Gabriele H. Marchler, Mikhail Mullokandov, James S. Song, Narmada Thanki, Roxanne A. Yamashita, Jodie J. Yin, Dachuan Zhang, Stephen H. Bryant, 2007, CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis, *Nucleic Acids Research*, D 237–240.
63. Cen O., Gorska M.M., Stafford S.J., et al, 2003, Identification of UNC119 as a Novel Activator of SRC-type Tyrosine Kinases *, *J Biol Chem*, 278(10), pp. 8837–8845.
64. Gorska M.M., Stafford S.J., Cen O., et al, 2004, Unc119, a Novel Activator of Lck/Fyn, Is Essential for T Cell Activation, *J Exp Med*, 199(3), pp.369–379.
65. Kotlarz D., Ziętara N., Milner J.D., et al, 2014, Human IL-21 and IL-21R deficiencies: two novel entities of primary immunodeficiency, *Curr Opin Pediatr*, 26(6), pp. 704–712.
66. John S. Tzartos, Matthew J. Craner, Manuel A. Friese, Karen B. Jakobsen, Jia Newcombe, Margaret M. Esiri, Lars Fugger, 2011, IL-21 and IL-21 Receptor Expression in Lymphocytes and Neurons in Multiple Sclerosis Brain, *Neurobiology*, pp. 402-406.
67. Erman B., Bilic I., Hirschmugl T., et al, 2015, Combined immunodeficiency with CD4 lymphopenia and sclerosing cholangitis caused by a novel loss-of-function mutation affecting IL21R, *Haematologica*, 100(6), e216–e219.
68. Leonard W.J. and Wan C.-K, 2016, IL-21 Signaling in Immunity, *F1000Research*, 5, pp. 220-224.
69. Margolskee E., Krichevsky S., Orazi A., et al, 2017, Evaluation of bone marrow morphology is essential for assessing disease status in recombinant interferon α -treated polycythemia vera patients, *Haematologica*, 102(3), e97–e99.

70. Jang H., Stevens P., Gao T., et al, 2021, The leucine-rich repeat signaling scaffolds Shoc2 and Erbin: cellular mechanism and role in disease, *FEBS J*, 288(3), pp. 721–739.
71. Lyons J.J., Liu Y., Ma C.A., et al, 2017, ERBIN deficiency links STAT3 and TGF- β pathway defects with atopy in humans, *J Exp Med*, 214(3), pp. 669–680.
72. Li Y., Chirgadze D.Y., Bolanos-Garcia V.M., et al, 2008, Crystal structure of human XLF/Cernunnos reveals unexpected differences from XRCC4 with implications for NHEJ, *EMBO J*, 27(1), pp. 290–300.

PHỤ LỤC

DANH SÁCH CÁC GEN LIÊN QUAN ĐẾN SUY GIẢM MIỄN DỊCH

ACD (AD/AR); ACP5 (AR); ACTB (AD); ADA (AR); ADAM17 (AR); ADAR (AD/AR); AICDA (AD/AR); AIRE (AD/AR); AK2 (AR); ALPI (AR); AMN (AR); AP3B1 (AR); AP3D1 (AR); ARHGEF1 (AR); ARMC4#* (AR); ARPC1B (AR); ATM (AD/AR); ATP6AP1 (XL); B2M (AR); BACH2 (AD); BCL10 (AR); BCL11B (AD); BLM (AR); BLNK (AR); BTK (XL); C11ORF70 (AR); C17ORF62 (AR); C1QA (AR); C1QB (AR); C1QC (AR); C1S (AD/AR); C2* (AR); C21ORF59 (AR); C3 (AD/AR); C5# (AD/AR); C6 (AR); C7 (AR); C8A (AR); C8B (AR); C9 (AR); CARD11 (AD/AR); CARD14 (AD); CARD9 (AR); CASP10 (AD); CASP8 (AR); CCBE1 (AR); CCDC103 (AR); CCDC114 (AR); CCDC151 (AR); CCDC39 (AR); CCDC40 (AR); CCDC65 (AR); CCNO (AR); CD19 (AR); CD247 (AR); CD27 (AR); CD3D (AR); CD3E (AR); CD3G (AR); CD4 (AR); CD40 (AR); CD40LG (XL); CD46* (AD/AR); CD55# (BG); CD59 (AR); CD70 (AR); CD79A (AR); CD79B (AR); CD81 (AR); CD8A (AR); CDC42* (AD); CDCA7 (AR); CDK9 (AR); CEBPE (AR); CECR1 (AR); CENPF (AR); CFAP57 (AD); CFB (AD/AR); CFD (AR); CFH* (AD/AR); CFI (AD/AR); CFP (XL); CFTR (AD/AR); CHD7 (AD); CHITA (AR); CLCN7 (AD/AR); CLPB (AD/AR); COG6 (AR); COLEC11 (AR); COPA (AD); CORO1A#* (AR); CR2 (AR); CSF2RA#* (XL); CSF2RB (AR); CSF3R (AD/AR); CTC1 (AR); CTLA4 (AD); CTPS1 (AR); CTSC (AR); CXCR4 (AD); CYBA (AR); CYBB (XL); CYP27A1 (AR); DBR1 (AR); DCLRE1C* (AR); DDX58 (AD); DGAT1 (AR); DGKE (AR); DIAPH1 (AD/AR); DKC1 (XL); DNAAF1 (AR); DNAAF2 (AR); DNAAF3 (AR); DNAAF5 (AR); DNAH1 (AR); DNAH11* (AR); DNAH5 (AR); DNAH8 (AR); DNAH9 (AR); DNAIL1 (AR); DNAIL2 (AR); DNAJB13 (-); DNAJC21 (AR); DNAL1 (AR); DNASE1L3 (AR); DNASE2 (AR); DNMT3B (AR); DOCK2 (AR); DOCK8 (AR); DRC1 (AR); DSG1 (AD/AR); DYX1C1 (AR); EFL1* (-); ELANE (AD); EPG5 (AR); ERCC6L2 (AR); EXTL3 (AR); FADD (AR); FANCA (AR); FAS (AD/AR); FASLG (AD/AR); FAT4 (AR); FCGR3A* (AR); FCHO1 (AR); FERMT3 (AR); FOXN1 (AD/AR); FOXP3 (XL); G6PC (AR); G6PC3 (AR); G6PD (XL); GAS2L2 (AR); GAS8 (AR); GATA2 (AD); GFII1 (AD); GINS1 (AR); GUCY2C (AD/AR); HAVCR2 (AR); HAX1 (AR); HELLS (AR); HMOX1 (AR); HYDIN#* (AR); HYOU1 (AR); ICOS (AR); IFIH1 (AD/AR); IFNAR2 (AR); IFNGR1 (AD/AR); IFNGR2 (AR); IGLL1* (AR); IKBKB (AR); IKZF1 (AD); IL10 (AD/AR); IL10RA (AR); IL10RB (AR); IL12B (AR); IL12RB1# (AR); IL17RA (AR);*

IL17RC (AR); IL1RN (AR); IL21 (AR); IL21R (AD/AR); IL23R (AR); IL2RA (AR);
IL2RB (AR); IL2RG (XL); IL36RN (AR); IL6R (AR); IL6ST (AD/AR); IL7*
(AD/AR); IL7R (AR); INVS (AR); IRAK4 (AR); IRF2BP2 (AD); IRF4 (AD); IRF7
(AR); IRF8 (AD/AR); ISG15 (AR); ITGB2 (AR); ITK (AR); JAGN1 (AR); JAK1
(AD/AR); JAK3 (AR); KRAS (AD); LAMTOR2 (AR); LAT (AR); LCK (AR); LIG1*
(AR); LIG4 (AR); LPIN2 (AR); LRBA (AR); LRRC56 (-); LRRC6 (AR); LYST (AR);
MAGT1 (XL); MALT1 (AR); MAP3K14 (AR); MASP1 (AR); MCIDAS (AR); MCM4
(-); MEFV (AD/AR); MKL1 (AR); MOGS (AR); MRE11A (AR); MSN (XL);*
MTHFD1 (AR); MVK (AD/AR); MYD88 (AR); MYO5A (AR); NBN (AD/AR);
NCF1# (AR); NCF2 (AR); NCF4 (AR); NCSTN (AD); NFE2L2 (-); NFKB1 (AD);*
NFKB2 (AD); NFKBIA (AD); NHEJ1 (AR); NHP2 (AR); NLRC4 (AD); NLRP1
(AD/AR); NLRP12 (AD); NLRP3 (AD); NME8 (AR); NOD2 (AD); NOP10 (AR);
NRAS (AD); NSMCE3 (AR); OBFC1 (-); OFD1 (XL); ORAI1 (AD/AR); OTULIN
(AR); PARN (AD/AR); PEPD (AR); PGM3 (AR); PIGA* (XL); PIH1D3 (XL);*
PIK3CD (AD); PIK3R1 (AD/AR); PLCG2 (AD); PMS2* (AD/AR); PNP (AR);*
POLA1 (-); POLD1 (AD/AR); POLE (AD/AR); POLE2 (AR); POMP (AR); PRF1
(AR); PRG4 (AR); PRKCD (AR); PRKDC (AR); PSENEN (AD); PSMB4 (-);
PSMB8 (AR); PSTPIP1 (AD); PTPRC (AR); RAB27A (AR); RAC2 (AD); RAG1
(AR); RAG2 (AR); RANBP2 (AD); RASGRP1 (AR); RBCK1 (AR); RECQL4 (AR);*
RELA (AD); RELB (-); RFX5 (AR); RFXANK (AR); RFXAP (AR); RHOH*
(AD/AR); RIPK1 (AD/AR); RLTPR (AR); RMRP (AR); RNASEH2A (AR);
RNASEH2B (AR); RNASEH2C (AR); RNF168 (AR); RNF31 (AR); RNU4ATAC
(AR); RORC (AR); RPGR (XL); RPSA (AD); RSPH1 (AR); RSPH3 (AR); RSPH4A
(AR); RSPH9 (AR); RTEL1 (AD/AR); SAMD9 (AD/AR); SAMD9L (AD); SAMHD1
(AD/AR); SBDS (AR); SEC61A1 (AD); SERPING1 (AD/AR); SH2D1A (XL);*
SLC29A3 (AR); SLC35C1 (AR); SLC37A4 (AD/AR); SLC39A7 (AR); SLC46A1
(AR); SLC7A7 (AR); SMARCA1 (AR); SMARCD2 (AR); SP110 (AR); SPAG1
(AR); SPINK5 (AR); SPPL2A (AR); SRP54 (AD); SRP72 (AD); STAT1 (AD/AR);*
STAT2 (AR); STAT3 (AD); STAT5B (AD/AR); STIM1 (AD/AR); STK36 (AR);*
STK4 (AR); STX11 (AR); STXBP2 (AR); TAP1 (AR); TAP2 (AR); TAPBP (AR);
TAZ (XL); TBX1 (AD); TCF3 (AD); TCN2 (AR); TERC (AD); TERT (AD/AR);
TFRC (AR); TGFB1 (AD); THBD (AD); TINF2 (AD); TLR3 (AD/AR); TMC6 (AR);
TMC8 (AR); TMEM173 (AD/AR); TNFAIP3 (AD); TNFRSF13B (AD/AR);
TNFRSF1A# (AD); TNFRSF4 (AR); TNFRSF9 (-); TRAF3IP2 (AR); TREX1
(AD/AR); TRNT1 (AR); TTC25 (AR); TTC37 (AR); TTC7A (AR); TYK2 (AR); UBA1

(XL); UNC119 (AD); UNC13D (AR); UNC93B1 (AR); UNG (AR); USB1 (AR); USP18#* (AR); VPS13B (AR); VPS45# (AR); WAS (XL); WDR1 (AR); WIPF1 (AR); WRAP53 (AR); XIAP* (XL); ZAP70 (AR); ZBTB24 (AR); ZMYN10 (AR); ZNF341* (AR).*