

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



HOÀNG THỊ YẾN

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN *LDLR*  
Ở NGƯỜI TĂNG CHOLESTEROL MÁU  
CÓ TÍNH CHẤT GIA ĐÌNH**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2020**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

HOÀNG THỊ YẾN

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN *LDLR*  
Ở NGƯỜI TĂNG CHOLESTEROL MÁU  
CÓ TÍNH CHẤT GIA ĐÌNH**

Chuyên ngành : Hóa sinh y học

Mã số : 62720112

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

**PGS.TS. Đặng Thị Ngọc Dung**

**HÀ NỘI - 2020**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi là Hoàng Thị Yến nghiên cứu sinh khóa 34 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh Y học xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Đặng Thị Ngọc Dung.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2020*

**Tác giả**

**Hoàng Thị Yến**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

### *Tiếng Việt:*

NMCT	Nhồi máu cơ tim
NST	Nhiễm sắc thể
SHPT	Sinh học phân tử
THA	Tăng huyết áp
XVĐM	Xơ vữa động mạch

### *Tiếng Anh:*

a.a	Acid amin (Amino acid)	
ACC	American College of Cardiology	Tim mạch học Hoa Kỳ
AHA	American Heart Association	Hiệp hội Tim mạch Hoa Kỳ
Apo	Apolipoprotein	
bp	Base pair	Cặp base ni tơ
CHD	Coronary heart disease	Bệnh tim mạch vành
DLCN	Dutch lipid clinic network	Mạng lưới lâm sàng lipid Hà Lan
DNA	Deoxyribonucleic acid	
EAS	European Atherosclerosis Society	Hiệp hội xơ vữa động mạch châu Âu
EGF	Epidermal growth factor	Yếu tố phát triển biểu mô
FH	Familial hypercholesterolemia	Tăng cholesterol tính chất gia đình
HDL-C	High density lipoprotein- cholesterol	Cholesterol trong lipoprotein trọng lượng phân tử cao
HeFH	Heterozygous Familial Hypercholesterolemia	Tăng cholesterol có tính chất gia đình thể dị hợp tử
HoFH	Homozygous Familial Hypercholesterolemia	Tăng cholesterol có tính chất gia đình thể đồng hợp tử

LDL-C	Low density lipoprotein-cholesterol	Cholesterol trong lipoprotein trọng lượng phân tử thấp
LPL	Lipoprotein lipase	
LDLr	Low density lipoprotein receptor	Thụ thể lipoprotein trọng lượng phân tử thấp
MEDPED	Make early diagnose to prevent early death	Chẩn đoán sớm để ngăn ngừa tử vong sớm
NGS	Next generation sequencing	Giải trình tự gen thế hệ mới
NICE	The National Institute for Clinical Excellence	Viện xuất sắc lâm sàng quốc gia
NLA	National Lipid Association	Hiệp hội lipid quốc gia
OD	Optical Density	Mật độ quang
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Đa hình đơn nucleotid
TC	Total cholesterol	Cholesterol toàn phần
TG	Triglycerid	

## MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN

LỜI CAM ĐOAN

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU

DANH MỤC CÁC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN .....	3
1.1. Bệnh tăng cholesterol máu có tính chất gia đình .....	3
1.1.1. Lịch sử phát hiện bệnh .....	3
1.1.2. Dịch tễ bệnh FH .....	4
1.1.3. Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH.....	5
1.1.4. Hậu quả rối loạn chuyển hóa lipid máu .....	8
1.1.5. Điều trị.....	10
1.1.6. Cơ chế gây bệnh.....	13
1.2. Gen LDLR và protein LDLr .....	16
1.2.1. Vai trò của protein LDLr trong duy trì nồng độ cholesterol máu. 16	
1.2.2. Cấu trúc gen LDLR.....	17
1.2.3. Các loại đột biến gen LDLR .....	19
1.2.4. Ảnh hưởng đến kiểu hình của đột biến gen LDLR.....	21
1.2.5. Đa hình kiểu gen LDLR và mối liên quan đến bệnh FH .....	22
1.2.6. Chương trình quản lý và chiến lược sàng lọc bệnh FH .....	26
1.2.7. Các nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan .....	27
1.3. Một số kỹ thuật SHPT ứng dụng trong phát hiện đột biến gen .....	31
1.3.1. Kỹ thuật khuếch đại gen - polymerase chain reaction (PCR).....	32
1.3.2. Giải trình tự gen bằng máy tự động theo nguyên tắc Sanger .....	33
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	36
2.1. Đối tượng nghiên cứu .....	36
2.1.1. Nhóm bệnh nhi.....	36
2.1.2. Nhóm các thành viên trong gia đình bệnh nhi .....	36

2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	37
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	37
2.2.2. Biến số và chỉ số trong nghiên cứu.....	37
2.2.3. Phương tiện nghiên cứu.....	38
2.2.4. Các kỹ thuật nghiên cứu.....	39
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	49
2.4. Đạo đức trong nghiên cứu:.....	50
2.5. Phương pháp xử lý số liệu.....	50
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>52</b>
3.1. Một số đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.....	52
3.1.1. Đặc điểm về tuổi.....	52
3.1.2. Đặc điểm về giới.....	53
3.1.3. Đặc điểm về triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng.....	53
3.2. Xác định đột biến trên exon 3, 4, 9, 13, 14 gen LDLR.....	57
3.2.1. Tách DNA từ máu toàn phần.....	57
3.2.2. Phản ứng khuếch đại exon 3, 4, 9, 13, 14 gen LDLR.....	58
3.2.3. Kết quả giải trình tự exon 3, 4, 9, 13, 14 gen LDLR.....	60
3.3. Kết quả phân tích phả hệ.....	72
3.3.1. Phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 và MS08.....	72
3.3.2. Phả hệ gia đình bệnh nhi MS03.....	78
3.3.3. Phả hệ gia đình bệnh nhi MS15.....	81
<b>CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>86</b>
4.1. Bàn luận về các đột biến và SNP tìm được trên bệnh nhi FH.....	88
4.2. Phả hệ gia đình bệnh nhi có đột biến gen LDLR.....	112
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>126</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>128</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Tiêu chuẩn chẩn đoán DLCN cho bệnh FH .....	6
Bảng 1.2.	Tiêu chuẩn chẩn đoán MEDPED cho bệnh FH.....	8
Bảng 2.1.	Trình tự môi khuếch đại exon 3, 4, 9, 13, 14 của gen LDLR.....	47
Bảng 2.2.	Thành phần phản ứng PCR khuếch đại exon 3, 4, 9, 13, 14 .....	47
Bảng 2.3.	Chu trình nhiệt của phản ứng PCR khuếch đại exon 3.....	48
Bảng 2.4.	Thành phần phản ứng giải trình tự gen.....	48
Bảng 2.5.	Chu trình nhiệt của phản ứng giải trình tự gen.....	49
Bảng 3.1.	Đặc điểm về tuổi của nhóm bệnh nhi trong nghiên cứu.....	52
Bảng 3.2.	Đặc điểm về giới của nhóm bệnh nhi trong nghiên cứu.....	53
Bảng 3.3.	Đặc điểm u vàng và chỉ số lipid máu của nhóm bệnh nhi.....	54
Bảng 3.4.	Đặc điểm chỉ số lipid máu của nhóm bệnh nhi phát hiện FH trong quá trình nghiên cứu .....	56
Bảng 3.5.	So sánh chỉ số lipid máu của 2 nhóm bệnh nhi .....	56
Bảng 3.6.	Kết quả đo độ tinh sạch và nồng độ DNA của 26 bệnh nhi FH ban đầu .....	57
Bảng 3.7.	Các loại đột biến và SNP được tìm thấy trong nghiên cứu .....	67
Bảng 3.8.	Đặc điểm các chỉ số lipid máu.....	70
Bảng 3.9.	Đặc điểm về các chỉ số lipid máu giữa nhóm đột biến dạng nặng với nhóm đột biến dị hợp tử.....	71
Bảng 3.10.	Một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 .....	76
Bảng 3.11.	So sánh chỉ số lipid máu giữa các thành viên mang 2 đột biến khác nhau .....	77
Bảng 3.12.	Đặc điểm các chỉ số lipid máu giữa nhóm đột biến dị hợp tử và không đột biến.....	78



Bảng 3.13. Một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS03 .....	80
Bảng 3.14. Một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS15 .....	84
Bảng 3.15. Đặc điểm về chỉ số lipid máu ở nhóm đột biến dị hợp tử và không đột biến của phả hệ MS15 .....	85
Bảng 4.1. Chỉ số lipid máu ở một số nghiên cứu .....	90

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Các hình thái lâm sàng nổi bật của bệnh FH .....	5
Hình 1.2. Chuyển hóa lipoprotein nội và ngoại sinh .....	13
Hình 1.3. Quá trình chuyển hóa LDL .....	15
Hình 1.4. Chức năng sinh lý của protein LDLr .....	16
Hình 1.5. Cấu trúc của gen và protein LDLr .....	19
Hình 1.6. Mô phỏng hiện tượng đa hình đơn nucleotide .....	23
Hình 1.7. Mô hình sàng lọc phân tầng bệnh FH .....	26
Hình 1.8. Tỷ lệ các loại đột biến ở các exon của gen LDLR .....	29
Hình 2.1. Hình ảnh trình tự exon 13 và các vùng intron liền kề thông qua phần mềm CLC Main Workbench 8.1.2 phiên bản giới hạn. ....	44
Hình 2.2. Hình ảnh chọn môi đặc hiệu dựa trên phần mềm Primer-BLAST... ..	45
Hình 2.3. Các cặp môi gợi ý với một số đặc tính cụ thể sau khi sử dụng phần mềm Primer-BLAST của NCBI.....	46
Hình 2.4. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu .....	51
Hình 3.1: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 3 với môi LDLR.....	58
Hình 3.2: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 4 với môi LDLR.....	59
Hình 3.3: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 9 với môi LDLR.....	59
Hình 3.4: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 13, 14 với môi LDLR... ..	60
Hình 3.5. Hình ảnh đột biến c.664T>C trên exon 4 gen LDLR.....	61
Hình 3.6. Hình ảnh đột biến đồng hợp tử c.664T>C trên exon 4 gen LDLR	61
Hình 3.7. Hình ảnh đột biến c.1285G>A trên exon 9 gen LDLR .....	62
Hình 3.8. Hình ảnh đột biến c.1335C>T trên exon 9 gen LDLR.....	63
Hình 3.9. Hình ảnh đột biến c.1978C>T .....	63
Hình 3.10. Hình ảnh SNP rs1003723 dị hợp tử và đồng hợp tử.....	64
Hình 3.11. Hình ảnh SNP rs5925 dị hợp tử và đồng hợp tử.....	65
Hình 3.12. Hình ảnh u vàng ở da bệnh nhi MS02 .....	72

Hình 3.13. Đột biến exon 4, 9 ở phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 .....	74
Hình 3.14. Hình ảnh u vàng ở da bệnh nhi MS03 .....	79
Hình 3.15. Đột biến trên exon 4 phả hệ gia đình bệnh nhi MS03 .....	79
Hình 3.16. Hình ảnh u vàng ở da bệnh nhi MS15 .....	81
Hình 3.17. KQ đột biến Exon 4 của phả hệ gia đình bệnh nhi MS15 .....	82
Hình 4.1. Dự đoán khả năng gây bệnh đột biến c.664T>C bằng phần mềm Polyphen 2 .....	96
Hình 4.2. Dự đoán khả năng gây bệnh đột biến c.664T>C bằng phần mềm MutationTaster.....	97
Hình 4.3. Dự đoán khả năng gây bệnh đột biến c.664T>C bằng phần mềm SIFT .....	98
Hình 4.4. Dự đoán khả năng gây bệnh đột biến c.1335C>T bằng phần mềm MutationTaster.....	100
Hình 4.5. Vị trí đột biến c.1978C>T tạo mã stop codon và vùng mã hóa cho protein LDLr tương ứng. ....	101
Hình 4.6. Hiệu quả của chất ức chế NMD trên hiệu quả dịch mã của LDLR mRNA được xác định với Realtime-PCR và Northern blots được thực nghiệm trên tế bào bình thường và tế bào có đột biến vô nghĩa dị hợp tử p.S78* .....	104

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tăng cholesterol máu có tính chất gia đình (familial hypercholesterolemia: FH) là một rối loạn chi phối tự phát, đặc trưng bởi sự gia tăng suốt đời của cholesterol trong huyết thanh liên quan đến lipoprotein tỉ trọng thấp (LDL) [1]. Tỉ lệ mắc bệnh FH ước tính trong quần thể trên toàn thế giới từ 1:500 đến 1:300 [2],[3]. Nguyên nhân chính trong khoảng 85% trường hợp FH là đột biến gen mã hóa receptor của LDL (LDLr), chịu trách nhiệm làm sạch LDL-cholesterol (LDL-C) khỏi máu tuần hoàn nhờ quá trình thoái hóa trong tế bào tổ chức ngoại biên. Hơn 1000 đột biến khác nhau trên gen *LDLR* ở nhánh ngắn của nhiễm sắc thể 19 (p13.1 - p13.3) đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới mô tả cho đến nay [4]. Một số gen khác chịu trách nhiệm cho 20-26% trường hợp FH còn lại là gen Apolipoprotein B (*ApoB*), Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*) là những gen khi bị đột biến làm giảm gắn kết LDL-C với LDLr hoặc giảm số lượng LDLr dẫn đến tăng cholesterol trong máu và gây bệnh FH [5].

FH là bệnh di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường. Những đột biến gây bệnh FH phần lớn là do di truyền từ bố, mẹ hoặc cả hai cho bệnh nhân. Bệnh nhân FH có đột biến gen *LDLR* biểu hiện mức cholesterol toàn phần (TC) và LDL-C trong máu tăng cao rõ rệt dẫn đến lắng đọng cholesterol trong lòng động mạch ở lứa tuổi rất sớm, gây xơ vữa động mạch và đặc biệt làm tăng nguy cơ mắc nhồi máu cơ tim (NMCT). Đặc điểm nhồi máu cơ tim ở bệnh nhân FH thường tiến triển tốc độ nhanh, có thể gây đột tử hoặc các biến cố tim mạch khác trong thập kỷ thứ tư hoặc thứ năm của cuộc đời [6],[7]. Đặc biệt là thể đột biến phức tạp (đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kết hợp...), hầu hết các bệnh nhân trong nhóm này đều mắc CHD nghiêm trọng ở tuổi 20 và tỉ lệ tử vong hoặc phẫu thuật bắc cầu mạch vành trong những năm thiếu niên là rất cao, hẹp động mạch chủ nặng cũng phổ biến [8],[9].

Mặc dù có nguy cơ mắc bệnh tim mạch rất cao, nhưng hầu hết những người mắc bệnh FH vẫn không được chẩn đoán và điều trị kịp thời hoặc điều trị không đầy đủ. Bệnh nhân FH được phát hiện sớm và điều trị kịp thời có thể ngăn ngừa hoặc giảm mức độ nặng của bệnh lý mạch vành.

Chỉ riêng nồng độ cholesterol là không đủ để xác nhận chẩn đoán bệnh FH vì nồng độ cholesterol trong máu thay đổi theo tuổi tác, giới tính và đặc trưng dân số [4]. Ngoài ra, phạm vi nồng độ cholesterol máu trong bệnh FH trùng lặp với những người bị tăng cholesterol máu đa yếu tố không di truyền, làm giảm độ chính xác chẩn đoán. Do đó, tiêu chuẩn chẩn đoán của FH bao gồm các triệu chứng lâm sàng và kết quả xét nghiệm cũng như tiền sử gia đình về kiểu di truyền trội đối với bệnh tim mạch sớm hoặc tăng cholesterol máu.

Hiện nay ở Việt Nam, nhóm bệnh nhân FH chưa được thực sự quan tâm đầy đủ, các xét nghiệm về gen hầu hết chưa được thực hiện, nhiều trường hợp trẻ đến viện vì các biến cố tim mạch nặng nề. Những công trình nghiên cứu về sinh học phân tử nhằm xác định các dạng đột biến của gen, đặc biệt là gen *LDLR* ở bệnh nhân FH còn nghèo nàn, do đó việc tư vấn điều trị dự phòng cho bệnh nhân và các thành viên trong gia đình nhằm giảm các nguy cơ biến chứng sớm các bệnh lý mạch vành còn chưa được thực hiện.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu đề tài: ***“Nghiên cứu đột biến gen LDLR ở người tăng cholesterol máu có tính chất gia đình”*** với 2 mục tiêu chính:

- 1. Xác định đột biến trên một số vùng gen LDLR ở bệnh nhi tăng cholesterol máu có tính chất gia đình.***
- 2. Phát hiện đột biến gen LDLR và một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở các thành viên trong phả hệ của bệnh nhi FH mang đột biến gen.***

## Chương 1

### TỔNG QUAN

#### 1.1. Bệnh tăng cholesterol máu có tính chất gia đình

##### 1.1.1. Lịch sử phát hiện bệnh

Năm 1938, nhà khoa học Norwegian Dr Carl Müller nhận ra sự liên hệ giữa tăng nồng độ TC huyết thanh, u vàng ở gân và vữa xơ động mạch ở các thành viên của một nhóm gia đình và đưa ra giả thuyết đây là một bệnh di truyền đơn gen [10].

Năm 1960, Khachadurian khi nghiên cứu trên một dòng họ ở Li Băng đã mô tả sự khác biệt về kiểu hình giữa dạng đồng hợp tử và dị hợp tử và khẳng định rằng cấu trúc phả hệ phù hợp với di truyền trội đơn gen. Năm 1964, FH được xác định như một bệnh di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường và mô tả sự khác biệt về lâm sàng giữa dạng đồng hợp tử và dị hợp tử [11].

Trong giai đoạn này Fredrickson và cộng sự đã đưa ra giả thuyết kiểu hình của bệnh FH có liên quan với rối loạn chuyển hóa LDL-C [12]. Năm 1970, với sự phối hợp của Ott và cộng sự [13], Elston và cộng sự [14], Berg và Heiberg đã chỉ ra gen liên quan với kiểu hình bệnh FH nằm trên nhiễm sắc thể 19 [15]. Năm 1986, Brown và Goldstein nhận thấy receptor trên bề mặt tế bào có liên quan với việc thu nhận những mảnh còn lại của LDL lưu hành trong máu, các nhà khoa học đã khám phá ra sai sót về phân tử gây bệnh FH là do đột biến chức năng ở gen mã hóa LDLr [16]. Phát hiện của công trình nghiên cứu này đã cung cấp nền tảng cơ sở cho công tác dự phòng và điều trị hiện tại để làm giảm LDL-C. Tiếp bước những thành công này, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành tại nhiều quốc gia trên thế giới.

Ngoài ra bệnh FH do đột biến lặn dạng đồng hợp tử cũng được phát hiện (ARH - Autosomal Recessive Hypercholesterolemia: Là dạng đồng hợp tử về

đột biến gen mã hóa cho LDLr adaptor protein 1 – LDLrAP1) [17]. Một số dạng hiếm khác của di truyền lặn gây tăng TC máu gồm sitosterolemia do ATP gắn cassette subfamily G member 5 (ABCG5) hoặc thiếu hụt ABCG8 và thiếu cholesterol 7 alpha hydroxylase (CYP7A1) là enzym của bước đầu tiên tổng hợp acid mật dẫn tới nồng độ TC cao trong tế bào gan và giảm sự hiện diện bề mặt của LDLr [18].

### **1.1.2. Dịch tễ bệnh FH**

Qua nhiều nghiên cứu thấy rằng FH là một trong những bệnh di truyền phổ biến nhất. Tỷ lệ mắc ước tính trên toàn thế giới là 1:500 đến 1:300 (0,2 – 0,3%) [19]. Tỷ lệ ước tính này tương ứng với khoảng 13 triệu người khắp thế giới và khoảng 600.000 người Mỹ mắc bệnh FH. Tỷ lệ này còn cao hơn ở một số quần thể: Quần thể người Li Băng là 1: 85 [20], người Nam Phi gốc Âu là 1:100 đến 1:72 [21], người Tuynidi là 1:165 [22], người Pháp gốc Canada là 1:270 [23]. Tuy nhiên, số bệnh nhân được chẩn đoán bệnh FH rất thấp, ước tính dưới 25%, phần lớn bệnh nhân không được chẩn đoán cho tới khi vào viện vì xơ vữa động mạch (XVĐM) hay những bệnh tim mạch khác. Bệnh nhân có thể được điều trị tăng cholesterol mà không biết mình mắc bệnh FH, dẫn đến điều trị không phù hợp và hiệu quả điều trị rất thấp, tỷ lệ tử vong tương đối cao [24],[25].

Phần lớn những trường hợp mắc là dị hợp tử (được di truyền một đột biến gây bệnh). Một số nhỏ bệnh nhân là dị hợp tử kết hợp (được di truyền hai đột biến gây bệnh khác nhau), trong khi đó những bệnh nhân đồng hợp tử bệnh FH được di truyền hai đột biến gây bệnh giống nhau.

Do tỷ lệ mắc bệnh FH cao giữa các thành viên trong cùng gia đình (50% thành viên có quan hệ huyết thống bậc 1 với người FH dị hợp tử bị mắc bệnh), việc sàng lọc phân tầng được cho thấy là phương pháp hiệu quả về chi phí để xác định người mắc bệnh FH [26],[27],[28]. Việc phát hiện và

điều trị sớm với statin cho thấy làm giảm tỉ lệ bệnh tật và tỉ lệ tử vong ở những người FH dị hợp tử [29].

Mặc dù đã có một nỗ lực toàn cầu nhằm tăng cường việc phát hiện và quản lý bệnh nhân FH, nhưng đến thời điểm hiện tại chỉ có một vài quốc gia thiết lập những chương trình quy mô lớn để xác định một cách hệ thống tình trạng FH ở những thành viên trong gia đình của bệnh nhân FH [30],[31].

### **1.1.3. Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH**

Bệnh nhân FH đặc trưng bởi nồng độ cao của TC và LDL-C trong máu, có thể dẫn đến lắng đọng ở mô gây ra những biểu hiện trên lâm sàng như: U vàng ở da, gân và dây chằng hay gặp nhất ở khuỷu tay, gân achille, bàn tay. Cholesterol có thể lắng đọng quanh mắt và có thể xuất hiện ở cả giác mạc dẫn tới lão hóa giác mạc hình vòng cung [32]. Tuy nhiên, người châu Á ít gặp đặc điểm này so với các nước khác trên thế giới [33]. Một điều vô cùng quan trọng là sự lắng đọng LDL-C ở động mạch khi sinh ra là nguyên nhân dẫn đến bệnh tim mạch từ khi còn rất trẻ và nhất là bệnh mạch vành ở bệnh nhân FH.



U vàng da

U vàng gân

Vòng giác mạc

### **Hình 1.1. Các hình thái lâm sàng nổi bật của bệnh FH [32]**

Việc chẩn đoán bệnh FH dựa vào sự kết hợp: Tiền sử gia đình, dấu hiệu lâm sàng (đặc biệt là u vàng) và nồng độ cholesterol máu. Hiện nay, tiêu chuẩn được sử dụng phổ biến trên thế giới để chẩn đoán FH là tiêu chuẩn Dutch lipid clinic network (DLCN) của Hà Lan; tiêu chuẩn Simon Broome của Anh và tiêu chuẩn MEDPED (Make Early Diagnosis to Prevent Early Death) của Mỹ [19].



**Tiêu chuẩn DLCN:****Bảng 1.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán DLCN cho bệnh FH**

<b>Tiêu chuẩn</b>		<b>Score</b>
<b>Lịch sử gia đình</b>	Họ hàng bậc 1 có: - Sớm mắc bệnh mạch vành hoặc bệnh mạch máu khác (nam <55 tuổi; nữ <60 tuổi). - Đã từng có kết quả LDL-C cao, trong nhóm >95% phân bố theo tuổi và giới.	1
	- Họ hàng bậc 1 có hình ảnh u mỡ bám gân và/hoặc vòng giác mạc - Hoặc trẻ <18 tuổi có kết quả LDL-C cao, trong nhóm > 95% phân bố theo tuổi và giới	2
<b>Bệnh cảnh lâm sàng</b>	- Người sớm mắc bệnh mạch vành (nam < 55 tuổi, nữ < 60 tuổi)	2
	- Người bị tai biến mạch não hoặc bệnh động mạch ngoại biên sớm (nam<55 tuổi, nữ<60 tuổi)	1
<b>Khám lâm sàng</b>	- Có u mỡ bám gân	6
	- Có vòng giác mạc từ trước 45 tuổi	4
<b>LDL-C (mmol/L) chưa điều trị</b>	LDL-C $\geq 8.5$	8
	LDL-C 6.5–8.4	5
	LDL-C 5.0–6.4	3
	LDL-C 4.0–4.9	1
<b>Xét nghiệm gen: Có đột biến gen <i>LDLR</i>, <i>ApoB</i>, hoặc <i>PCSK9</i></b>		8
<b>Chẩn đoán</b>	<b>Tổng điểm</b>	
Chắc chắn	>8	
Có thể	6-8	
Nghi ngờ	3-5	
Ít khả năng	<3	

Tiêu chuẩn Simon Broome và DLCN có nhiều điểm tương đồng khi có kết hợp thêm triệu chứng lâm sàng, tiền sử bệnh mạch vành và tìm thấy đột biến gen *LDLR*, *ApoB*, hoặc *PCSK-9*.

**Tiêu chuẩn chẩn đoán Simon Broome:**

- (1) Chỉ số TC máu > 7.5 mmol/L hoặc LDL-C >4.9 mmol/L ở người lớn  
TC máu > 6.7 mmol/L hoặc LDL-C >4.0 mmol/L ở trẻ em <16 tuổi
- (2) Triệu chứng kèm theo:
  - + Xanthoma gân xuất hiện ở bệnh nhân hoặc có ở thể hệ có mối quan hệ huyết thống bậc 1 với bệnh nhân (cha mẹ, anh chị em ruột) hoặc có ở thể hệ có mối quan hệ huyết thống bậc 2 với bệnh nhân (ông bà, chú, dì).
- (3) Hoặc: Xét nghiệm có đột biến gen (*LDLR*, *ApoB*, hoặc *PCSK9*).
- (4) Tiền sử gia đình có người nhồi máu cơ tim trước 50 tuổi ở họ hàng bậc 2 hoặc trước 60 tuổi ở họ hàng bậc 1.
- (5) Tiền sử gia đình có chỉ số TC máu > 7.5 mmol/L ở người lớn có quan hệ huyết thống bậc 1 hoặc bậc 2 với bệnh nhân hoặc chỉ số TC máu > 6.7 mmol/L ở con hoặc ở anh chị em ruột <16 tuổi.

✚ Theo Simon Broome:

- Được chẩn đoán xác định bệnh FH khi có tiêu chuẩn (1) + (2) hoặc (3)
- Có thể bị bệnh FH khi có tiêu chuẩn (1) + (4) hoặc (5)

✚ Nghiên cứu thực hiện trên đối tượng bệnh nhi nên tiêu chuẩn (1) + (2) của Simon Broome được chúng tôi áp dụng để chẩn đoán xác định bệnh FH trong nghiên cứu này.

Chẩn đoán FH chính xác nhất là phối hợp giữa tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm DNA, tuy nhiên nguyên nhân gây bệnh FH có thể do một đột biến vẫn chưa được đánh giá. Do đó không phát hiện thấy đột biến vẫn không loại trừ được chẩn đoán bệnh FH [2].

**Tiêu chuẩn MEDPED:****Bảng 1.2. Tiêu chuẩn chẩn đoán MEDPED cho bệnh FH**

<b>Tuổi</b>	<b>Nồng độ TC (LDL-C) (mmol/L)</b>			
	<b>Quan hệ huyết thống bậc 1 với bệnh nhân FH</b>	<b>Quan hệ huyết thống bậc 2 với bệnh nhân FH</b>	<b>Quan hệ huyết thống bậc 3 với bệnh nhân FH</b>	<b>Cộng đồng</b>
<b>&lt;20</b>	5,7 (4,0)	5,9 (4,2)	6,2 (4,4)	7,0 (5,2)
<b>20-29</b>	6,2 (4,4)	6,5 (4,7)	6,7 (4,8)	7,5 (5,7)
<b>30-39</b>	7,0 (4,9)	7,2 (5,2)	7,5 (5,5)	8,8 (6,2)
<b>&gt;40</b>	7,5 (5,3)	7,8 (5,6)	8,0 (5,8)	9,3 (6,8)

Với các giá trị cut-off này MEDPED có độ nhạy 54-88% và độ đặc hiệu 98%.

Tiêu chuẩn MEDPED mở rộng phạm vi chẩn đoán do chỉ dựa vào nồng độ cholesterol máu của bản thân trong cộng đồng hoặc có quan hệ huyết thống bậc 1, bậc 2 hoặc bậc 3 với người đã được chẩn đoán mắc bệnh FH với mức độ thấp hơn. Ở Việt Nam việc chẩn đoán FH chưa được rộng rãi trong lâm sàng vì thế nếu sử dụng tiêu chuẩn này sẽ bỏ sót rất nhiều bệnh nhân có mức tăng cholesterol thấp nhưng có người trong gia đình mắc FH.

**1.1.4. Hậu quả rối loạn chuyển hóa lipid máu**

Hậu quả của rối loạn chuyển hóa lipid thứ phát xảy ra hầu hết các trường hợp khi tuổi cao và có bệnh lý đi kèm như đái tháo đường, bệnh thận...trong khi đó hậu quả của rối loạn chuyển hóa lipid nguyên phát thường xảy ra ở độ tuổi còn trẻ nếu không được phát hiện sớm và điều trị kịp thời: Nam giới không được điều trị có nguy cơ 50% mắc biến cố mạch vành tuổi 55; phụ nữ không được điều trị có nguy cơ 30% ở tuổi 60, đặc biệt các trường hợp nguyên nhân do di truyền đột biến dạng nặng (đồng

hợp tử, dị hợp kết hợp...) có nguy cơ mắc bệnh mạch vành nghiêm trọng ở tuổi 20 và tỉ lệ tử vong hoặc phẫu thuật bắc cầu mạch vành trong những năm thiếu niên là rất cao [34],[35].

#### 1.1.4.1. Bệnh tim mạch

##### - Tăng huyết áp

Huyết áp là áp lực máu ở trong lòng động mạch. Huyết áp được tạo ra bởi lực co bóp của tim và sức cản của động mạch. Khi tim co bóp, máu sẽ được bơm ra ngoài và ép vào thành động mạch làm mạch máu căng lên. Số đo huyết áp ở thời điểm này gọi là huyết áp tâm thu hay huyết áp tối đa. Sau khi co bóp, tim sẽ giãn ra và thành động mạch sẽ co lại về trạng thái ban đầu. Số đo huyết áp tại thời điểm này gọi là huyết áp tâm trương hay huyết áp tối thiểu.

Theo Tổ chức Y tế Thế giới, tăng huyết áp khi huyết áp tâm thu  $\geq 140$  mmHg và hoặc huyết áp tâm trương  $\geq 90$  mmHg.

Tăng lipid máu có thể tạo ra các mảng xơ vữa, khiến lòng mạch hẹp lại, thành mạch kém đàn hồi làm tăng sức cản lên lòng mạch máu. Để cung cấp đầy đủ nhu cầu máu, cơ thể có những đáp ứng như tăng nhịp tim, tăng sức co bóp cơ tim, tăng hấp thu giữ nước trong cơ thể... dẫn đến tăng huyết áp.

Bên cạnh đó, tăng lipid máu còn làm tăng độ nhớt của máu. Đây cũng là một yếu tố góp phần làm tăng huyết áp. Bản thân tăng huyết áp lại làm tổn thương nội mô mạch máu, các LDL dư thừa trong máu bị oxy hóa dễ dàng xâm nhập và làm nặng hơn tình trạng xơ vữa.

##### - Xơ vữa động mạch

Nguyên nhân chủ yếu gây nhồi máu cơ tim cấp là do XVDM vành, những mảng xơ vữa được tạo ra do tăng cholesterol máu kéo dài sẽ làm hẹp và dần gây tắc mạch vành, làm cho máu không đến để nuôi cơ tim, có thể dẫn đến hoại tử vùng cơ tim đó nếu không được can thiệp kịp thời. Tuy nhiên mảng xơ vữa thường không phát triển từ từ mà nó có thể bị nứt vỡ ra đột ngột. Khi

mảng xơ vữa bị vỡ ra, quá trình hình thành cục huyết khối được khởi động. Các ảnh hưởng tương tự cũng có thể xảy ra khi huyết khối hình thành trong động mạch gan, động mạch thận, động mạch về các chi, động mạch dạ dày, ruột ...[36],[37].

- Nhồi máu cơ tim (NMCT): Tăng TC trong máu là nguyên nhân chủ yếu của quá trình xơ vữa và dần làm hẹp các động mạch cung cấp máu cho tim. Đặc biệt, khi cholesterol và triglyceride cùng tăng thì nguy cơ này cao hơn gấp nhiều lần và thúc đẩy nhanh hơn quá trình XVĐM, dẫn đến hậu quả nghiêm trọng gây thiếu máu cơ tim, nguy hiểm hơn là NMCT. Có đến 90% trường hợp NMCT là do biến chứng của mảng xơ vữa. Mảng xơ vữa tiến triển dần gây hẹp lòng động mạch vành và cuối cùng gây tắc hẳn. Bệnh cảnh là cơn đau thắt ngực không ổn định với tần suất, cường độ và thời gian tăng dần dẫn tới NMCT. Mặt khác, mảng xơ vữa không vững có thể bị bong ra và huyết khối thành lập nhanh chóng gây nên hội chứng vành cấp [38],[39].

Kết quả một số nghiên cứu cho thấy, người có lượng TC trong máu cao có tỉ lệ mắc bệnh mạch vành cao gấp 2-3 lần so với người bình thường, cụ thể nếu nồng độ TC tăng cao quá 10% giá trị bình thường, nguy cơ mắc các biến chứng tim mạch sẽ tăng thêm 30%. Nồng độ LDL-C trong máu cao làm tăng nguy cơ XVĐM và dễ gây biến chứng. Ngược lại, HDL-C trong máu cao thì tỉ lệ XVĐM thấp. Nếu giảm 1mg/dL LDL-C thì giảm được 2% tỉ lệ tử vong. Nếu mức HDL-C tăng 1%, thì sự nguy hiểm của bệnh tim mạch giảm 2-3% [40].

### **1.1.5. Điều trị**

🚩 Nguyên tắc điều trị bệnh FH:

Kiểm soát chặt chẽ nồng độ cholesterol máu trong suốt quá trình điều trị, kết hợp các kỹ thuật (siêu âm mạch, chụp mạch) nhằm chẩn đoán sớm nguy cơ mắc các bệnh lý tim mạch như XVĐM, NMCT, đặc biệt với các bệnh nhi FH do đột biến gen dạng nặng (đồng hợp tử, dị hợp tử kết hợp...) [41]. Các

biện pháp điều trị bệnh FH cần hướng tới hiệu quả điều trị với LDL-C mục tiêu tùy từng lứa tuổi như sau:

LDL-C mục tiêu:


<2,5 mmol/L cho người trưởng thành

<1,8 mmol/L cho người trưởng thành có bệnh mạch vành hoặc đái tháo đường

8 – 10 tuổi: <4 mmol/L

>10 tuổi: < 3,5 mmol/L

Mức LDL-C đích điều trị cần được hạ thấp hơn ở những trẻ có tiền sử gia đình có bệnh mạch vành hoặc có các yếu tố nguy cơ tim mạch khác [42].

 Biện pháp điều trị:

- *Chế độ dinh dưỡng khoa học, luyện tập phù hợp:*

- Giảm chất béo: Hạn chế hoặc giảm thịt, mỡ động vật, trứng, sữa toàn phần, phủ tạng động vật, các loại pho mat...

- Khuyến khích ăn đều đặn hoa quả, rau, gạo lứt, hạnh nhân, các sản phẩm không hoặc chứa ít chất béo, các loại đậu, cá và thịt nạc [43].

Chế độ ăn rất quan trọng, chế độ ăn ít chất béo đã chỉ ra làm giảm LDL-C từ 8-10 % và tích lũy <200mg/ngày của cholesterol từ thức ăn có thể làm giảm 3-5% LDL-C. Guideline của NLA khuyến cáo bệnh nhân FH nên giảm lượng acid béo no chỉ chiếm <7% năng lượng ăn vào và giảm cholesterol trong chế độ ăn <200mg/ngày [44].

- Học viện Nhi khoa Mỹ khuyến cáo rằng việc phòng ngừa biến chứng do tăng lipid máu ở trẻ em FH dị hợp tử nên tập trung vào thay đổi chế độ ăn uống, tuy nhiên nếu không làm giảm LDL-C xuống mức chấp nhận được thì những trẻ này sẽ là ứng viên cho can thiệp bằng thuốc [45].

- Hoạt động thể chất thường xuyên, phù hợp với lứa tuổi và tình trạng sức khỏe, kiểm soát cân nặng. Chế độ sinh hoạt, làm việc điều độ, tránh căng thẳng thần kinh, nghỉ ngơi, giải trí.

- *Giảm các yếu tố nguy cơ:*

- Tránh và ngừng ngay hút thuốc lá chủ động hoặc thụ động
- Tuân thủ điều trị các bệnh kèm theo như tăng huyết áp, béo phì...

- *Sử dụng thuốc:*

Thuốc điều trị hàng đầu cho bệnh nhân FH là statin - thuốc ức chế tổng hợp cholesterol. Một nghiên cứu thuần tập dài trên các bệnh nhân FH cho thấy nguy cơ khởi phát lần đầu của bệnh tim mạch ở nhóm điều trị statin giảm khoảng 80% so với nhóm không điều trị [46].

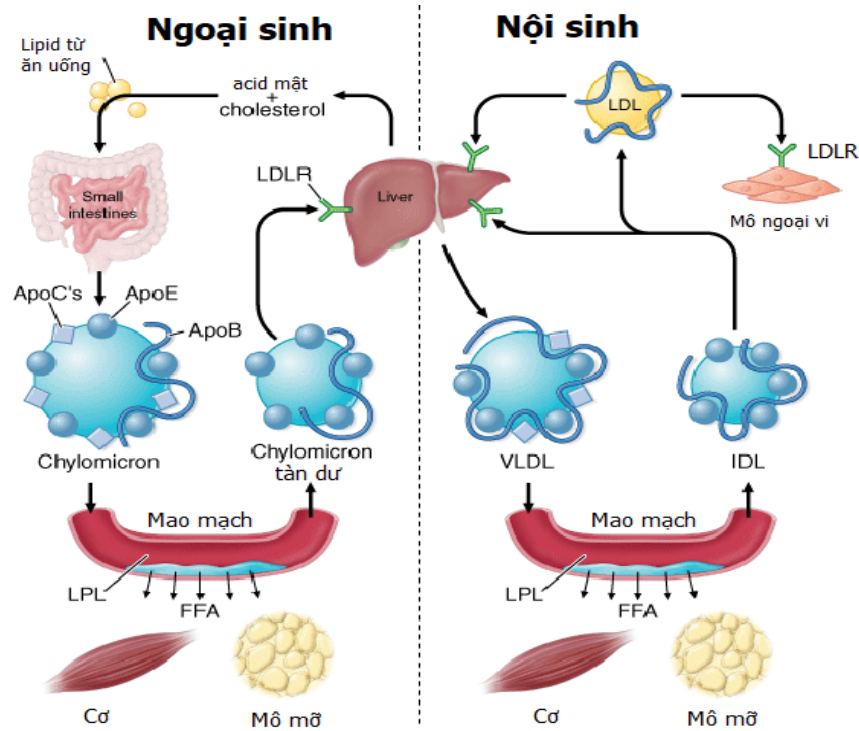
Nếu việc dùng statin với liều tối đa không đạt được mục đích điều trị thì cần sử dụng statin kết hợp thuốc khác như Ezetimibe làm tăng sự đáp ứng điều trị. Ezetimibe là thuốc ức chế hấp thu cholesterol với cơ chế ức chế chọn lọc hấp thu cholesterol và phytosterol. Tác dụng của Ezetimibe rất hiệu quả ngay cả khi không ăn cholesterol vì chúng ức chế tái hấp thu cholesterol bài tiết trong mật [47].

Những nghiên cứu khác đã ước tính tỉ lệ nguy cơ tử vong do bệnh tim mạch trong vòng 5 năm, tỉ lệ này ở các thành viên từ 20-79 tuổi có quan hệ huyết thống bậc 1 với bệnh nhân FH là 44% đối với nam và 57% đối với nữ. Đáng chú ý là nghiên cứu này ước tính 96-98% các trường hợp tử vong do bệnh tim mạch trong số những người <40 tuổi có thể dự phòng bằng cách điều trị giảm cholesterol máu [48]. Hội Tim mạch Mỹ và NICE khuyến cáo xem xét điều trị giảm lipid máu đối với trẻ em từ 10 tuổi trở lên (và với trẻ nữ dậy thì) có nồng độ LDL-C tăng cao nghiêm trọng; độ tuổi hoặc nồng độ LDL-C bắt đầu điều trị có thể thấp hơn ở những trẻ có thêm các yếu tố nguy cơ tim mạch [26]. Trường hợp bệnh FH do đột biến dạng nặng cần sử dụng statin mạnh (Atorvastatin, Rosuvastatin) kết hợp với các thuốc khác và xem xét lọc máu apheresis hoặc gửi đến trung tâm chuyên khoa [32],[49],[50]. Thay đổi lối sống là vấn đề quan trọng trong quản lý bệnh FH ở cả trẻ em và

người lớn do các yếu tố môi trường và chuyển hóa có thể ảnh hưởng đến kiểu hình bệnh FH [51],[52]. Bệnh nhân FH (bao gồm cả trẻ em) được khuyến khích tập luyện thể lực phù hợp, chế độ ăn lành mạnh và không hút thuốc lá.

### 1.1.6. Cơ chế gây bệnh

#### ✚Chuyển hóa lipoprotein:



**Hình 1.2. Chuyển hóa lipoprotein nội và ngoại sinh [53]**

*LPL: Lipoprotein lipase; FFA: Free fatty acids; VLDL: Very low density lipoproteins; IDL: Intermediate-density lipoproteins; LDL: Low-density lipoproteins; LDLR: Low-density lipoprotein receptor.*

*Con đường ngoại sinh:* Lipid từ thức ăn được hấp thu qua niêm mạc ruột non tạo thành chylomicron (CM). CM vào hệ tuần hoàn rồi tới mô mỡ và cơ. Tại các mô, TG được tách ra nhờ enzym LPL thành glycerol và acid béo, các acid béo được dự trữ hoặc được các mô sử dụng làm nguồn cung cấp năng lượng. Quá trình này xảy ra liên tục và tạo thành CM tàn dư giàu cholesterol. CM tàn dư được gắn bắt ở tế bào gan nhờ các thụ thể đặc hiệu với ApoB và ApoE có

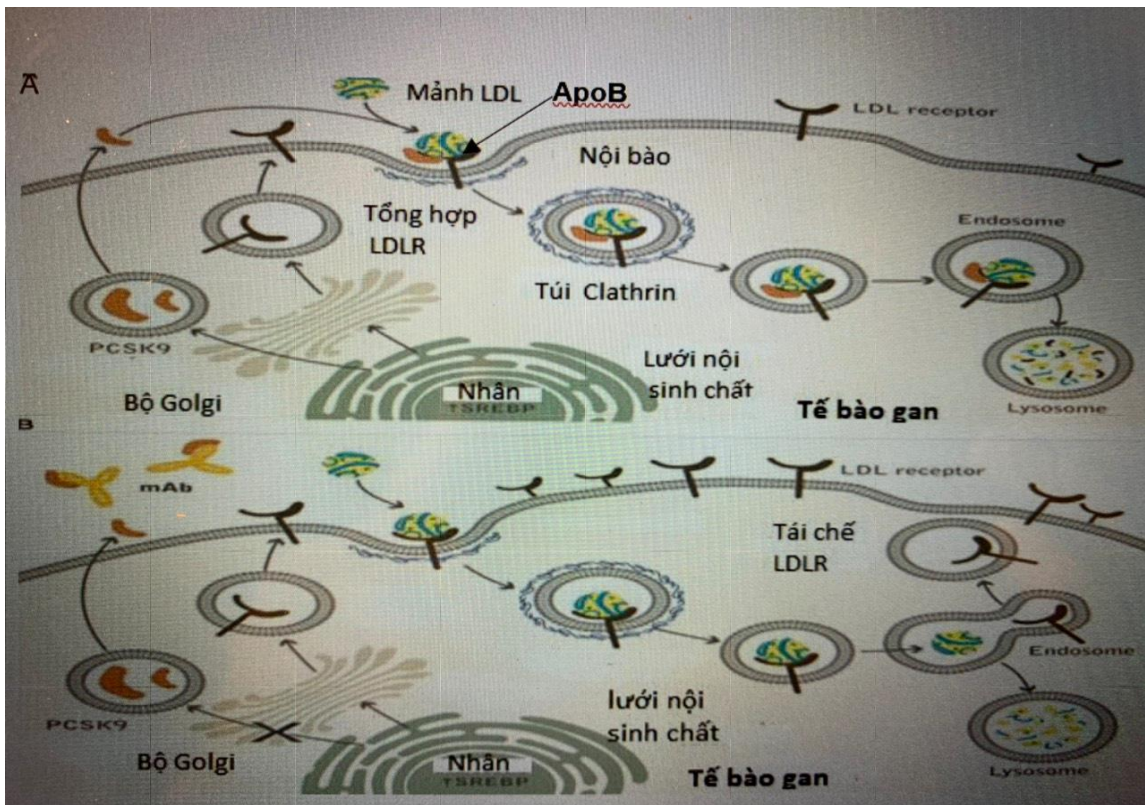


trong thành phần CM tàn dư. Ở gan, cholesterol được chuyển thành acid mật và đào thải theo đường mật xuống ruột non, một phần cholesterol và TG tham gia tạo VLDL. VLDL này rời gan vào hệ tuần hoàn để bắt đầu con đường chuyển hoá lipid nội sinh.

*Con đường nội sinh:* VLDL được tạo thành ở tế bào gan, là dạng vận chuyển triglyceride nội sinh vào hệ tuần hoàn. Apo của VLDL bao gồm ApoB-100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III và ApoE. VLDL sau khi giải phóng TG, nhận thêm cholesterol este và mất đi ApoC sẽ chuyển thành IDL và chất này nhanh chóng thoái hóa thành LDL bởi tác dụng của lipase gan hoặc được gan bắt giữ qua LDLr. LDL dư thừa có thể được gửi vào thành mạch, nơi nó có thể gây XVĐM.

#### **✚ Quá trình chuyển hóa LDL**

Chức năng chủ yếu của lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL - low density lipoprotein) là vận chuyển cholesterol cho các mô. LDL trong máu có ApoB-100 trên bề mặt, LDLr là một glycoprotein có trên bề mặt tế bào gan và gắn ApoB-100 của LDL-C. Khi phức hợp LDL-C và LDLr được hình thành, thụ thể và chất gắn LDL-C đều được đưa vào trong thể nội bào (endosome) cùng với những protein khác thông qua tương tác liên quan đến protein chuyển đổi LDLr (LDLRAP1). Sau khi phức hợp chất gắn thụ thể phân ly, LDLr được tái sử dụng trên màng tế bào, còn cholesterol tự do được sử dụng bên trong tế bào.



**Hình 1.3. Quá trình chuyển hóa LDL [54]**

*A: LDLr được tổng hợp ở lưới nội chất, sau đó đưa tới bộ Golgi và vận chuyển tới bề mặt tế bào. LDLr gắn đặc hiệu với ApoB của mảnh LDL. Phức hợp LDLr-LDL được đưa vào trong tế bào.*

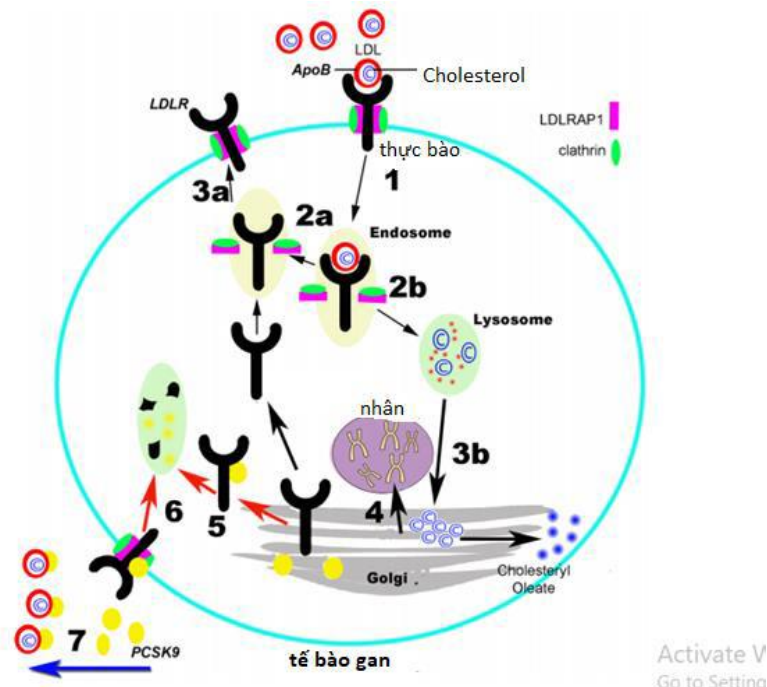
*B: Kháng thể ngăn gắn PCSK9 vào phức hợp LDLr-LDL. PCSK9 gắn với phức hợp LDLr-LDL ở bên ngoài tế bào và bảo vệ nó khỏi bị phân tách trong túi clathrin, mà sẽ bị giáng hóa ở lysosome.*

PCSK9 có vai trò gắn với phức hợp LDLr-LDL ở bên ngoài tế bào và bảo vệ nó khỏi bị phân tách trong túi clathrin, mà sẽ bị giáng hóa ở lysosome. Điều hòa của nhân đối với sản xuất LDLr bao gồm 2 con đường, con đường thứ nhất là việc gắn của protein gắn yếu tố đáp ứng steroid (steroid response element binding protein: SREBP) với một yếu tố đáp ứng steroid (steroid response element) trên DNA sẽ kích thích sự phiên mã của *LDLR* nhằm đáp ứng với sự giảm nồng độ cholesterol nội bào [55]. Con đường này được hoạt

hóa trong quá trình điều trị bằng các chất ức chế HMG-CoA Reductase. Con đường thứ hai trong điều hòa LDLr là một thụ thể của nhân qua trung gian sterol khác (LXR), cho thấy làm giảm phiên mã của chất thoái giáng cảm ứng của *LDLR*. Con đường này giúp hấp thu LDL-C trong máu. Bất kỳ thiếu hụt nào trong con đường này cũng tạo ra sai sót trong quá trình hấp thu và LDL-C tăng cao trong máu, gây nên các triệu chứng trên lâm sàng của bệnh FH.

## 1.2. Gen *LDLR* và protein LDLr

### 1.2.1. Vai trò của protein LDLr trong duy trì nồng độ cholesterol máu



Hình 1.4. Chức năng sinh lý của protein LDLr [55].

Các thụ thể LDL (LDLr) liên kết với ApoB trong các hạt LDL, tiêu hóa nội bào chúng (1). Phức hợp receptor-phôi tử tách ra và LDLr được tái chế (2a và 3a) hoặc bị suy thoái (2b và 3b). Mức cholesterol dư điều chỉnh phiên mã của LDLr (4). PCSK9 được tiết ra nội sinh từ bộ máy Golgi, nơi nó liên kết với LDLr (5). Ngoài ra, PCSK9 có thể liên kết ngoại sinh với LDLr (6). Sau khi được tiếp xúc với tế bào gan, PCSK9 dẫn trực tiếp LDLr tới lysosome

để làm suy thoái. Bằng chứng gần đây cho thấy PCSK9 có thể liên kết với LDL qua ApoB trong lưu thông tự do (7) [55].

Sai sót trong cấu trúc của LDLr dẫn tới giảm vận chuyển LDL-C vào trong tế bào, làm tăng nồng độ LDL-C trong máu và gây nên các triệu chứng trên lâm sàng của bệnh FH. Gần đây người ta thấy rằng LDLr hấp thu không chỉ LDL-C mà còn sản phẩm khác của VLDL và các sản phẩm giáng hóa chylomicron. Vì vậy, giảm chức năng của LDLr cũng có thể làm suy yếu sự chuyển hóa phần còn lại của CM và có thể đóng góp vào vữa xơ động mạch sớm [56]. Carneiro và cộng sự đã chỉ ra rằng sự thanh lọc phần còn lại của CM trong huyết thanh bị giảm một cách rõ rệt ở người FH dị hợp tử mà có đột biến gen *LDLR* khi sử dụng nhũ tương nhân tạo giống CM để chứng minh sự chuyển hóa này [57].

### **1.2.2. Cấu trúc gen *LDLR***

Gen mã hóa LDLr nằm trên nhánh ngắn của NST 19 vùng 13.2 (19p13.2) dài 45kb gồm 18 exon và 17 intron. Chứa 11.089.361 đến 11.133.829 đôi base. Mã hóa cho mARN dài 5,3kb [18].

Gen *LDLR* gồm 6 đoạn chức năng:

- Exon 1: Chức năng kiểm soát dịch mã (promoter translation signal) và trình tự tín hiệu (21 acid amin), cần thiết cho vận chuyển qua màng tế bào và chia tách trong khi chuyển vào lưới nội bào.

- Exon 2-6: Chức năng là đoạn gắn phối tử, là trung gian cho sự tương tác với lipoprotein. Mỗi modul LR gồm 1 đoạn dài 40 acid amin (a.a) chứa 6 Cysteine và 1 vùng acid đảo ngược gần đầu C tận mà được xem là vị trí gắn calci. Nghiên cứu đột biến của 7 modul LR của *LDLR* chỉ ra rằng modul 3-7 đóng góp đáng kể tới việc gắn mảnh LDL. Motif LR5 đã được chỉ ra là duy nhất trong 7 motif LR có khả năng gắn 2 phối tử của receptor gồm cả ApoB và ApoE, trong khi 6 motif khác chỉ gắn ApoB. Vì vậy, những đột biến ảnh

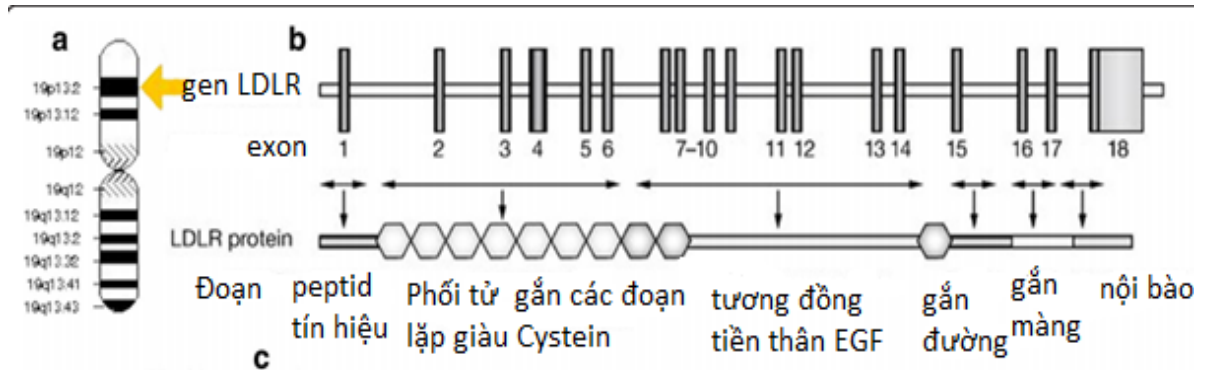
hưởng đến motif này có liên quan tới việc ảnh hưởng trầm trọng hơn việc dị hóa lipoprotein và vì vậy có khuynh hướng cao hơn được lựa chọn bởi tiêu chuẩn xác định bệnh FH [58].

- Exon 7-14: Đoạn tương đồng với tiền thân của yếu tố phát triển biểu mô EGF (400 a.a được mã hóa bởi exon 7-exon 14) được tạo bởi 40 a.a nhắc lại tương đồng với tiền thân EGF và có liên quan với sự tách ra của receptor và lipoprotein ở nội bào. Hai đoạn lặp lại đầu tiên nằm liên tiếp nhau và ngăn cách với đoạn thứ 3 bởi một trình tự 280 a.a mà chứa 5 copy của 1 motif lặp lại mà mỗi đoạn lặp lại chứa 40 - 60 a.a. Đoạn lặp lại đầu tiên giống yếu tố phát triển biểu mô ở chuỗi tiền thân EGF tương tác với một trình tự đặc hiệu với PCSK9. PCSK9 tinh tiến theo sau điều hòa LDLr của gan bằng cách gắn với chúng trên bề mặt tế bào và dẫn tới sự thoái hóa chúng. Các đột biến làm tăng cường chức năng hay làm tăng ái lực của PCSK9 với receptor kết quả là làm tăng nồng độ LDL-C huyết thanh ở người. Các đột biến giảm chức năng tức là làm giảm ái lực của PCSK9 với receptor dẫn tới nồng độ thấp LDL-C.

- Exon 15: Mã hóa cho 1 trình tự gồm 58 a.a rất giàu serine và threonine, nó là vị trí gắn cho liên kết O của chuỗi đường.

- Exon 16 và đầu 5' của exon 17: Mã hóa cho 22 a.a có vai trò đặc hiệu cho việc gắn của receptor vào màng tế bào.

- Exon 17-18: Là đoạn bào tương, trong đó phần còn lại của exon 17 và đầu 5' của exon 18 mã hóa cho đoạn đuôi gồm 50 a.a là đoạn nội bào của protein. Đây là vị trí tương tác với bộ phận tiếp hợp clathrin AP-2. Vì vậy quan trọng trong việc tạo lỗm áo trên bề mặt tế bào và đóng vai trò tương tác với chuỗi gắn phosphotyrosine của 1 protein tiếp nối clathrin đặc hiệu được mã hóa bởi gen *LDLRAP1*. Đoạn còn lại của exon 18 dài 2,6kb ở đầu 3' là vùng không được dịch mã của mARN [58],[59].



**Hình 1.5. Cấu trúc của gen và protein LDLr [60]**

### 1.2.3. Các loại đột biến gen LDLR

Đột biến ở gen mã hóa LDLr là nguyên nhân phổ biến nhất gây bệnh FH (chiếm khoảng 80%). Hiện nay, gen *LDLR* có trên 1700 đột biến, trong đó 1295 đột biến được biết là các biến thể độc lập (1064 gây bệnh, 143 không gây bệnh, 88 chưa rõ) [60].

Căn cứ theo cơ chế tác động, đột biến ở *LDLR* chia làm 5 loại chính:

- Loại 1: Đột biến gen *LDLR* dẫn tới không tổng hợp được LDLr. Người dị hợp tử chỉ sản xuất được một nửa số LDLr.
- Loại 2: Vẫn tổng hợp được LDLr nhưng những thụ thể này không thể rời khỏi lưới nội sinh chất để tới bộ Golgi để thể hiện trên bề mặt tế bào và sẽ bị giáng cấp. Lớp 2A thiếu hụt hoàn toàn khi di chuyển tới màng tế bào và lớp 2B khi di chuyển có thể thiếu hụt nhưng tốc độ bị hạn chế đáng kể.
- Loại 3: Đột biến dẫn tới sản xuất LDLr bất thường, LDLr này có thể di chuyển tới bề mặt tế bào nhưng không thể gắn với LDL-C.
- Loại 4: Loại hiếm, LDLr tổng hợp được nhưng không tới được lỗm áo ở màng tế bào do đó không vận chuyển được LDL-C vào trong tế bào. Đột biến ảnh hưởng đến đơn chuỗi trong bào tương là 4A, còn loại đột biến ảnh hưởng đến vùng bắc qua màng là 4B.
- Loại 5: LDLr khi đi vào trong tế bào không tách ra được, do đó LDLr không thể quay trở lại màng tế bào và bị giáng cấp [18],[61].

Sự liên quan giữa loại chức năng của đột biến và mức độ nặng của bệnh đã được thiết lập và bệnh nhân mang đột biến lớp 1 thì bị ảnh hưởng nặng hơn những người mang 1 đột biến của các nhóm còn lại. Trong dữ liệu cơ sở của UMD-LDLR trong số 288 đột biến đơn nucleotide thì có 42% (121/288) là lớp 2B; 31,9% (92/288) là lớp 1; 13,5% (39/288) là lớp 5; 7,6% (22/288) là lớp 2A; 3,8% (11/288) là lớp 4A và 1% (3/288) là lớp 3. Đột biến lớp 1 chủ yếu là đột biến vô nghĩa và đột biến dịch khung (66,3% là vô nghĩa và 30,4% là đột biến dịch khung và 3,3% là sai nghĩa); 62% của chúng nằm ở exon 2 đến exon 6 mã hóa cho một nửa chuỗi gắn phối tử cho một nửa và ở exon 7 đến exon 14 mã hóa cho chuỗi giống EGF cho nửa còn lại. Đột biến lớp 2B chủ yếu là đột biến sai nghĩa (92,6% sai nghĩa và 7,4% là đột biến dịch khung) và 71% của chúng nằm ở exon 2 đến exon 6 mã hóa cho chuỗi gắn phối tử. Đột biến lớp 5 chủ yếu là sai nghĩa (95% sai nghĩa và 5% là đột biến vùng nối) và 95% của chúng nằm ở exon 7 đến exon 14 mã hóa cho chuỗi giống EGF. Đột biến lớp 2A, 3 và 4A chủ yếu là sai nghĩa (59% là sai nghĩa và 22% vô nghĩa và 19% dịch khung) và 67% của chúng nằm ở exon 7 đến exon 14 mã hóa cho chuỗi giống EGF [58].

Ban đầu một số thiếu hụt đầu tiên ở gen *LDLR* có đặc trưng là các mất đoạn lớn được xác định bằng Southern blotting. Sau đó với sự ra đời của các phương pháp mới và đơn giản hơn trong việc chỉ ra những thay đổi nhỏ (thay đổi ở 1 base của gen) như: Giải trình tự tự động trực tiếp sản phẩm PCR, SSCP (single strand conformational polymorphism), RFLP (hiện tượng đa hình về chiều dài các đoạn DNA)... Ngày càng nhiều đột biến ở gen *LDLR* được chỉ ra, bao gồm: Sắp xếp lại đoạn lớn, codon kết thúc sớm, thay thế 1 a.a, đột biến ở vùng promoter tác động đến sự sao chép gen, đột biến ảnh hưởng đến sự kéo dài của pre-mARN. Điều rất thú vị là các đột biến của gen *LDLR* ảnh hưởng đến chức năng của nó trải dài suốt chiều dài của gen và hầu

hết mỗi thay thế amino acid đơn mà đã được tìm thấy đều có tác động có hại lên chức năng của receptor [61]. Theo báo cáo của Hội Tim mạch Anh dựa trên số liệu đột biến gen *LDLR* trên toàn thế giới tính đến năm 2005 tần suất đột biến gen *LDLR* gặp chủ yếu là thay thế nucleotide chiếm 73,5% (76,6% trong số này là thay thế đơn nucleotide) và mất nucleotide chiếm 19,4%; thêm nucleotide và lặp đoạn gặp với tỉ lệ thấp. Đột biến sai nghĩa gen *LDLR* do thay thế nucleotide cùng loại chiếm 55,9% tần suất gặp cao hơn sự thay thế nucleotide khác loại (42,5%) [58].

Vị trí 3 CpG5' được biết là hot spot cho đột biến ở người vì nó có thể trải qua phản ứng khử amin oxy hóa của 5methyl Cytosine. Gen *LDLR* gồm 123 CpG dinucleotide chiếm 4,8% trình tự mã hóa. Tỉ lệ này cũng tương tự tỉ lệ các CpG (3,7%) ở trình tự mã hóa của phần lớn các gen liên quan với bệnh tật của con người nằm trên nhiễm sắc thể thường. Cysteine, Tryptophan và Aspartat có vai trò đặc hiệu với hoạt động của protein vì vậy các đột biến sai nghĩa liên quan tới các a.a này thường gây ảnh hưởng hơn so với các a.a còn lại [58].

#### ***1.2.4. Ảnh hưởng đến kiểu hình của đột biến gen LDLR***

Kiểu hình biểu hiện trên lâm sàng của bệnh FH do đột biến gen *LDLR* rất thay đổi, nó phụ thuộc vào loại đột biến và mức độ hoạt động còn lại của gen *LDLR* có liên quan với mỗi phần của alen đột biến. Có thể chia mức độ biểu hiện kiểu hình trên lâm sàng bệnh FH do đột biến gen *LDLR* thành 2 loại:

 Đột biến dạng nặng:

Đột biến dạng nặng bao gồm: Đột biến đồng hợp tử, đột biến dị hợp tử kết hợp, đột biến stop codon, hầu hết các dạng đột biến này có biểu hiện kiểu hình rất rầm rộ, u vàng ở nhiều vị trí với diện rộng trên cơ thể. Nồng độ TC và LDL-C tăng cao rõ rệt trong máu.



#### ✚ Đột biến dị hợp tử:

Bệnh nhân FH dị hợp tử biểu hiện kiểu hình ít rầm rộ, triệu chứng u vàng trên lâm sàng và tăng TC, LDL-C trong máu có thể không gặp ở bệnh nhân FH dị hợp tử [62]. Tuy nhiên, tác động của môi trường hoặc yếu tố di truyền khác sẽ làm tăng nguy cơ mắc các bệnh tim mạch ở bệnh nhân FH dị hợp tử có biểu hiện kiểu hình tiềm tàng [52].

Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện chỉ ra rằng sự thay đổi ở các locus gen khác nhau có thể ảnh hưởng đến kiểu hình lâm sàng bệnh FH ở bệnh nhân đột biến gen *LDLR*, nhưng hầu hết trong số này chưa kết luận được vì nghiên cứu chỉ thực hiện trên số lượng nhỏ bệnh nhân [62]. Mặc dù các đột biến ở các đoạn đặc hiệu của gen *LDLR* làm suy giảm chức năng đặc hiệu của đoạn tương ứng trên LDLr, vấn đề này chỉ có thể giải thích một phần sự biểu hiện kiểu hình nổi bật có giá trị của bệnh. Biểu hiện kiểu hình của bệnh FH chịu sự tác động của rất nhiều yếu tố, chính vì vậy các đột biến khác nhau trên cùng một đoạn và thậm chí cùng 1 loại đột biến ở các bệnh nhân khác nhau thể hiện sự khác nhau về đặc điểm lâm sàng [63].

Nghiên cứu trên 86 bệnh nhân FH châu Á: Bệnh nhân với đột biến gen *LDLR* có nồng độ LDL-C cao hơn có ý nghĩa ( $p \leq 0,05$ ), tỉ lệ mắc u vàng cao hơn có ý nghĩa ( $p \leq 0,05$ ) và bệnh tim mạch cao hơn 2 lần so với bệnh nhân không có đột biến gen *LDLR* [33].

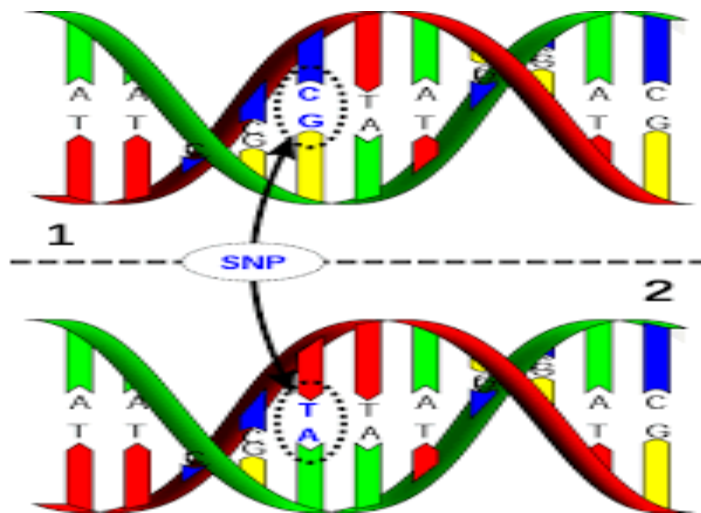
### **1.2.5. Đa hình kiểu gen *LDLR* và mối liên quan đến bệnh FH**

#### **1.2.5.1. Đa hình đơn nucleotide (SNP- single nucleotide polymorphism)**

Sự khác biệt cho mỗi cá thể được tạo bởi đa hình thái của các gen. Hiện tượng đa hình thái đơn nucleotide là sự khác nhau về trình tự DNA xảy ra khi một nucleotide đơn A, T, G, C ở trong bộ gen (hay trong các trình tự được phân lập khác) khác nhau giữa các cá thể của một loài hay giữa các cặp nhiễm sắc thể của một người. Bộ gen người với 23 cặp NST (22 NST thường và cặp

NST giới tính) chứa khoảng 3,2 tỉ bp. Giống nhau giữa các cá thể đến trên 90% và khoảng 1% sự khác biệt còn lại chủ yếu biểu hiện bởi các SNP [64].

Đa hình đơn nucleotide là một hiện tượng phổ biến, được coi là hậu quả của những đột biến điểm thay thế một cặp nucleotide. Để phân biệt đột biến và SNP thì người ta dựa vào tần số xuất hiện trong cộng đồng. Nếu những đột biến xuất hiện > 1% trong quần thể dân cư thì được coi là SNP. Theo dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI) tính đến tháng 6.2012 có khoảng gần 19 triệu SNP trong bộ gen người. Các đa hình đơn nucleotide có tính chủng tộc. Cùng một SNP nhưng tỉ lệ các biến thể (variant) trong quần thể, khác nhau giữa các tộc người. Thậm chí có những SNP có và không có trong bộ gen của những tộc người khác nhau.



**Hình 1.6. Mô phỏng hiện tượng đa hình đơn nucleotide**

Nguồn từ <http://www.dnabaser.com/>

Hiện tượng đa hình đơn nucleotide có thể xảy ra trên vùng mã hoá (exon) và không mã hoá (intron) của gen. Có những SNP làm thay đổi a.a, dẫn đến có thể ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng phân tử protein. Những SNP này thường là do thay đổi nucleotide tại vị trí đầu tiên hoặc thứ hai của bộ ba mã hoá. Ví dụ CGC chuyển thành CCC, hay GCT chuyển thành CCT. Còn những thay thế nucleotide ở vị trí thứ 3 trong bộ ba mã hoá thường không làm thay

đôi a.a. Ví dụ CCT chuyển thành CCG. Những thay thế này được gọi là các silent SNP. Các silent SNP không làm thay đổi trình tự a.a, nhưng nếu nằm trên các vùng chức năng quan trọng, cũng có thể gây ra các tác động đến chức năng sinh học của gen đó.

Sự khác biệt trong trình tự DNA ở người có thể ảnh hưởng đến sự phát triển bệnh tật, sự đáp ứng với các tác nhân gây bệnh, hóa chất, thuốc, vaccin, stress. Tuy nhiên, ứng dụng lớn nhất của SNP trong nghiên cứu y sinh học là so sánh các vùng gen giữa các nhóm người với nhau (chẳng hạn giữa nhóm người bị bệnh và không bị bệnh), từ đó xác định mối liên quan giữa SNP với sự hình thành và phát triển của bệnh và tiến hành sàng lọc, tư vấn di truyền cho các cá nhân mang những biến thể có nguy cơ mắc bệnh cao [65].

#### ***1.2.5.2. Tính đa hình của gen LDLR***

Các đa hình thái đơn (SNP) có thể tác động riêng lẻ hoặc nhiều SNP có thể hoạt động hiệp đồng để gây ra sự khác biệt về chức năng giữa các kiểu hình (haplotypes). Tương tác giữa nhiều SNP có thể cùng ảnh hưởng đến nguy cơ mắc bệnh. Nếu chỉ đánh giá SNP cá nhân độc lập mà không xem xét các hình thức tương tác SNP-SNP (ngay cả trên các SNP cho thấy mối liên hệ rất yếu với tỉ lệ chênh lệch ước tính) sẽ khó phát hiện ra các mức độ tương tác giữa các SNP lên kiểu hình [66],[67]. Các biến thể không có chức năng thường được phát hiện trong trường hợp tăng cholesterol máu tiên phát, so với các bệnh nhân FH kiểu hình tăng cholesterol thường nhẹ hơn, mức độ biểu hiện kiểu hình trong gia đình thường thấp hơn. Trên thực tế, hầu hết các nhóm đối tượng trên được chẩn đoán là tăng cholesterol máu đa gen, và được cho rằng các SNP di truyền phổ biến trong dân số liên quan tới kiểu hình này [68],[69],[70].

Gần đây một số lượng đáng kể các bệnh nhân FH không có các đột biến gây bệnh đã biết trước, làm tăng số lượng SNP liên quan đến tăng cao LDL-

C, do đó có thể nguyên nhân liên quan đến đa gen [71],[72],[73]. Một số nghiên cứu trên toàn bộ hệ gen - Genome Wide Association Studies (GWAS) được thực hiện trong thập kỷ qua đã tiết lộ rằng sự biến đổi ở một số vị trí *LDLR* có liên quan đến mức độ LDL-C [74],[75]. Các GWAS chỉ ra *LDLR* là một gen ứng cử viên cho tăng cholesterol máu đa gen. Ví dụ, kiểu gen thứ phát SNP rs6511720 gen *LDLR* có liên quan đến việc giảm 6,99 mg/dL trong tổng mức cholesterol [76] và biến thể này đã được đưa vào điểm số gen LDL-C do Talmud đề xuất, tuy nhiên chức năng của nó vẫn chưa rõ [71].

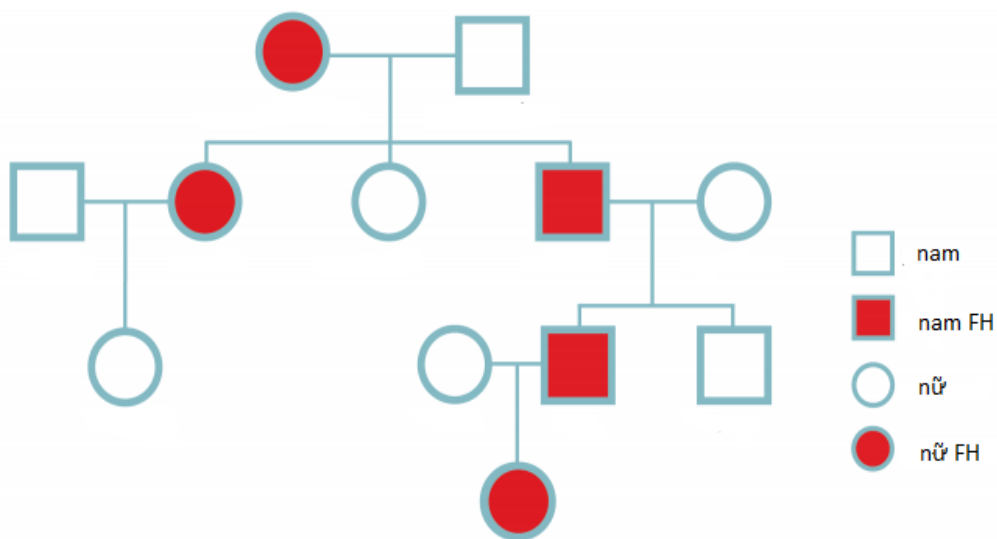
Trong nghiên cứu về các SNP phổ biến và hiếm trên gen *LDLR* ở quần thể người da đen Nam Phi năm 2013 [77], cho thấy một SNP hầu như rất hiếm rs17249141 (c.-217C>T) tại vùng promoter liên quan tới giảm nồng độ LDL-C có ý nghĩa thống kê ( $p=0,05$ ). Trong khi đó 4 SNP khác (rs2738447, rs14158, rs2738465 và rs3180023) liên quan có ý nghĩa thống kê với tăng nồng độ LDL-C trong máu. Nghiên cứu chỉ ra rằng sự kết hợp tương tác giữa các SNP: block 1 (rs11669576; rs72658862; rs5930; rs1569372; rs5929) cho 2 kiểu gen tương tác GCGGC liên quan với sự giảm LDL-C ( $p=0,03$ ) và kiểu gen GCAAC liên quan tới tăng LDL-C ( $p<0.01$ ), block 3 (rs5927; rs14158; rs3826810) 2 trong 3 kiểu tương tác gen này liên quan tới tăng LDL-C là AGG ( $p=0,03$ ), GAG ( $p=0,01$ ), kiểu tương tác gen thứ ba (GGG) trong block 3 xuất hiện trong nhóm chứng chủ yếu và có mối liên quan với nồng độ thấp LDL-C. Chỉ duy nhất kiểu tương tác gen GC trong block 4 (rs2738465; rs1433099) cho thấy mối tương quan với nồng độ thấp LDL-C. Hay trong nghiên cứu của Rafiq và cộng sự cho thấy 2 biến thể rs688 (c.1773 C>T) và rs5925 (c.1959 T>C) trên gen *LDLR* được xác định là những biến thể có chức năng tăng khả năng ghép nối exon, có liên quan mật thiết với tình trạng tăng LDL-C trong máu [78].

Do đó, ngoài xác định các đột biến xuất hiện trên bệnh nhân FH, các biến thể SNP cũng cần được xem xét khi đánh giá mối tương quan giữa kiểu gen và tình trạng tăng TC và LDL-C trong máu.

### 1.2.6. Chương trình quản lý và chiến lược sàng lọc bệnh FH

Các quốc gia trên Thế giới đã có nhiều chương trình sàng lọc bệnh nhân FH trong cộng đồng nhằm hạn chế thiệt hại về sức khỏe và kinh tế do bệnh FH gây ra [79]. Một số chiến lược sàng lọc bệnh nhân FH tại cộng đồng được đưa ra đó là [7]:

- (1) Sàng lọc cơ hội (cho bệnh nhân khám ban đầu)
- (2) Sàng lọc hệ thống (cho trẻ em và thanh thiếu niên- NICE khuyến cáo)
- (3) Sàng lọc phân tầng (sàng lọc chủ đích cho gia đình bệnh nhân FH)



**Hình 1.7. Mô hình sàng lọc phân tầng bệnh FH [80]**

Sàng lọc phân tầng được đánh giá là có hiệu quả trong phát hiện và điều trị sớm bệnh FH và làm tăng tuổi thọ, giảm nguy cơ mắc bệnh mạch vành và mang lại lợi ích về mặt kinh tế trong việc giảm chi phí điều trị [81].

Tại Úc, mô hình nghiên cứu Markov với tầm nhìn 10 năm đã được xây dựng để mô phỏng sự khởi đầu của CHD lần đầu tiên và cái chết trong những

người thân của bệnh nhân FH được xác nhận di truyền. Mô hình bao gồm 3 trạng thái sức khỏe: "sống không có CHD", "sống với CHD" và "tử vong". Phân tích so sánh các hậu quả lâm sàng và chi phí sàng lọc phân tầng so với không sàng lọc. Mô hình ước tính rằng sàng lọc bệnh FH sẽ làm giảm tỉ lệ mắc CHD trong 10 năm từ 50% xuống 25% ở những người mắc bệnh FH, chi phí điều trị tiết kiệm được 4155 đô la mỗi năm cho bệnh nhân FH so với không sàng lọc. Cứ 100 người được sàng lọc, có tổng thời gian sống thêm lên 24,95 năm. Do đó, sàng lọc bệnh nhân FH theo tầng, sử dụng xét nghiệm di truyền bổ sung đo nồng độ LDL-C trong huyết tương và điều trị bằng statin, là biện pháp hiệu quả về chi phí để ngăn ngừa CHD ở các thành viên trong gia đình có nguy cơ mắc bệnh FH [82].

Một nghiên cứu tổng quan hệ thống phân tích chi phí hiệu quả của sàng lọc phân tầng bệnh FH tại châu Âu từ 119 nghiên cứu (2002 – 2015) đưa ra kết luận: Sàng lọc phân tầng và xét nghiệm di truyền các người thân của bệnh nhân FH kết hợp với chỉ số lâm sàng và xét nghiệm lipid máu để chẩn đoán bệnh FH đã được chứng minh là rất có hiệu quả về chi phí trong các nghiên cứu được thu thập [83].

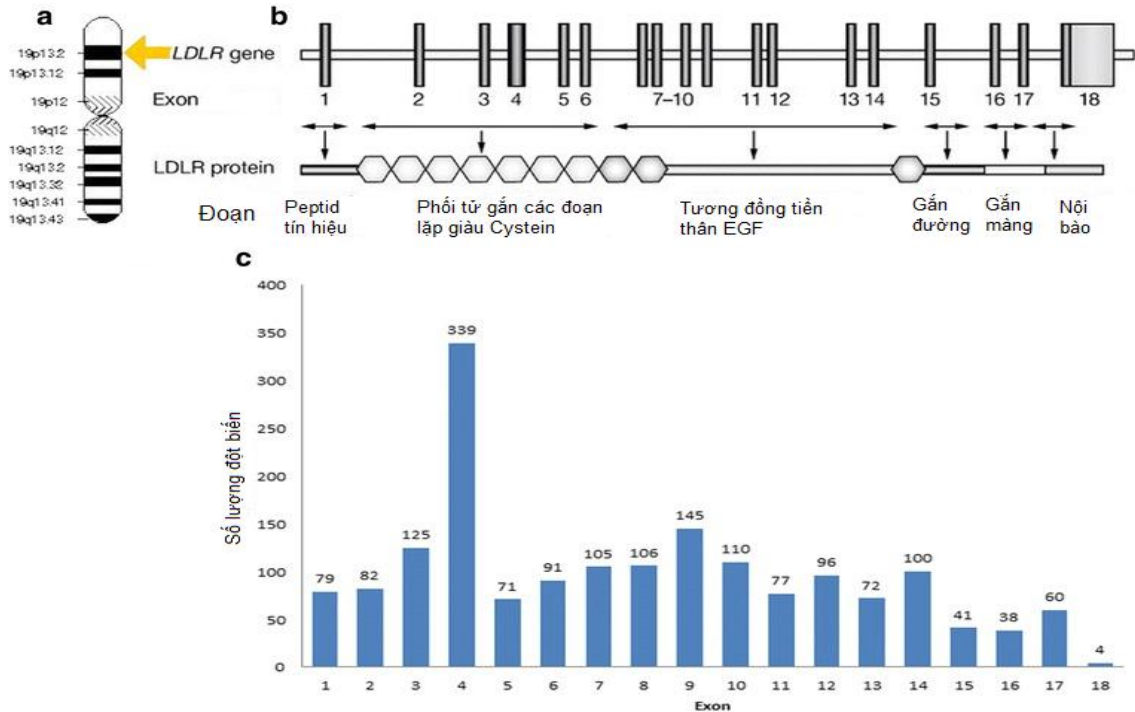
### ***1.2.7. Các nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan***

#### ***a, Nước ngoài:***

Nhiều nghiên cứu được thực hiện trên thế giới và trong khu vực trên bệnh nhân FH cho thấy tỉ lệ đột biến chiếm tỉ lệ cao ở các exon 3, 4, 9, 13 và 14. Nghiên cứu của Humphries S E và cộng sự ở Anh (2006) trên 409 bệnh nhân FH, trong đó 158 bệnh nhân (38,6%) có CHD, sàng lọc đột biến trên exon 3,4,6-10 và 14 của gen *LDLR*, exon 26 của gen *ApoB*, kết quả phát hiện ra đột biến ở 253 bệnh nhân (61,9%), trong đó có 236 bệnh nhân (57,7%) mang đột biến gen *LDLR*, 10 bệnh nhân (2,4%) mang đột biến gen *ApoB* và 7 bệnh nhân (1,7%) mang đột biến *PCSK9*. Bệnh nhân FH phát hiện đột biến

trên gen *LDLR*, *PCSK9* có nguy cơ mắc CHD cao hơn do sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ cholesterol máu so với những người không phát hiện đột biến với  $p = 0,001$  [84]. Một nghiên cứu khác trên quần thể người Anh cho thấy tỉ lệ đột biến ở exon 4 là cao nhất (28%), tiếp theo là exon 14 (21%), exon 3 là 10% [85]. Một nghiên cứu thuần tập của Cristina Maglio và cộng sự ở Thụy Điển (2014) trên 77 bệnh nhân FH theo tiêu chuẩn DLCN, có 29% bệnh nhân có u vàng gân, 23% có tiền sử CHD, 87% có tiền sử gia đình tăng cholesterol máu, thực hiện sàng lọc đột biến gen *LDLR*, *ApoB*, *PCSK9* phát hiện 50 bệnh nhân (64,9%) mang 26 loại đột biến khác nhau trong đó có 23 đột biến ở gen *LDLR* tập trung chủ yếu ở exon 3 và exon 4; có 2 đột biến trên *ApoB*, 1 đột biến trên *PCSK9*. Trong 26 đột biến khác nhau, có 12 đột biến sai nghĩa (46%) dẫn đến sự thay đổi a.a trong chuỗi protein, 7 đột biến (27%) vô nghĩa (cả đột biến dừng codon hoặc dịch khung). Một trong các đột biến phổ biến nhất, được tìm thấy trong 12 bệnh nhân (24%) là một stop-codon ở vị trí 99 trên gen *LDLR* [86]. Nghiên cứu thuần tập của Jannes C E và cộng sự ở Brazil (2015) trên 248 bệnh nhân FH, xác định đột biến trên gen *LDLR*, exon 26 của *ApoB*, exon 7 của *PCSK9*, kết quả cho thấy 70 đột biến khác nhau trên gen *LDLR* nằm chủ yếu trên exon 4 và 14; 2 đột biến trên gen *ApoB*, không tìm được đột biến nào trên gen *PCSK9* [87]. Kết quả nghiên cứu của Henderson và cộng sự (2016) cho thấy nồng độ TC và LDL-C cao hơn đối với người mang đột biến đồng hợp tử so với người dị hợp tử. U vàng được quan sát có tần suất cao hơn với người mang đột biến dẫn tới 1 protein kích thước bất thường (đột biến vô nghĩa, lệch khung và đột biến vị trí nối) hơn là người dị hợp tử mang đột biến sai nghĩa. Không có sự khác nhau nào được quan sát về sự xuất hiện của bệnh mạch vành giữa đột biến sai nghĩa và các đột biến dẫn tới protein có kích thước bất thường. Các đột biến dẫn tới một protein có kích thước bất thường là nguồn gốc của kiểu hình trầm trọng hơn

đột biến sai nghĩa. Nghiên cứu này phân tích đột biến ở 18 exon gen *LDLR* và kết quả được thể hiện như sau:



**Hình 1.8. Tỷ lệ các loại đột biến ở các exon của gen *LDLR* [60]**

Nghiên cứu của Fouchier và cộng sự (2001) thực hiện trên 1641 bệnh nhân FH người Hà Lan được làm xét nghiệm gen trên 18 exon của gen *LDLR* bao gồm: DGGE, giải trình tự gen, Southern blotting cho kết quả phát hiện 159 đột biến, tần suất đột biến cao nhất là ở exon 4 và 9 [88].

Nghiên cứu của Mahdis Ekrami và cộng sự (2018) ở Iran trên 80 bệnh nhân FH được chẩn đoán theo tiêu chuẩn Simon Broom, tất cả bệnh nhân trong nghiên cứu đều có tiền sử gia đình mắc bệnh CHD. Sàng lọc đột biến trong 4 exon (3,4,9,10) của gen *LDLR* cho thấy một đột biến mới trong exon 3 (C95W, c.285C>G) và 1 đột biến được mô tả trước đây trong exon 4 (D139H, c.415G>C). Bệnh nhân mang đột biến c.285C>G là một đứa trẻ chín tuổi, nữ, có tiền sử mắc bệnh CHD và có u vàng, đột biến c.415G>C ở một bệnh nhân



nữ, 65 tuổi có cả CHD và u vàng gân. Tiến hành lập phả hệ cho 2 bệnh nhân này thấy phù hợp với kiểu di truyền trội trên NST thường [89]. Nghiên cứu của Ying-Tat Mak và cộng sự năm 1998 trên 30 bệnh nhân FH người Trung Quốc bằng phương pháp SSCP và giải trình tự gen cả vùng promoter và 18 exon của gen *LDLR* đưa ra kết luận: Có 18 loại đột biến gen trong các promoter và 10 exon ở 21 bệnh nhân có đột biến, tần suất cao nhất là exon 4 và exon 9; 9 bệnh nhân không có đột biến [90]. Nghiên cứu của Khoo KL và cộng sự năm 2000 gồm 86 bệnh nhân Nam Á (Malaysia, Trung Quốc, Ấn Độ) được chẩn đoán bệnh FH dựa vào triệu chứng lâm sàng, sau khi làm DGGE và giải trình tự gen toàn bộ 18 exon của gen *LDLR* và exon 26 của gen *ApoB* thì 73% (64 bệnh nhân) không tìm thấy đột biến, 22 bệnh nhân có đột biến gen *LDLR*, trong đó đột biến ở exon 4 chiếm tỉ lệ cao nhất [33]. Nghiên cứu của Ashavaid và cộng sự (2000) trên 14 bệnh nhân FH ở Ấn Độ, kết quả cho thấy tần suất đột biến gen *LDLR* cao nhất ở exon 4, sau đó là exon 3, 9, 14 [91]. Nghiên cứu của Wenxin Yu và cộng sự (2002) trên 200 bệnh nhân FH ở Nhật Bản, có 37 bệnh nhân có đột biến gen *LDLR*, tần suất đột biến cao nhất ở exon 3, 4, 9, 14 với tỉ lệ tương ứng như sau:  $9/200 = 4,5\%$ ;  $3/200 = 1,5\%$ ;  $3/200 = 1,5\%$ ;  $3/200 = 1,5\%$  [92]. Nghiên cứu của Jui-Hung Chang và cộng sự (2003) trên 58 bệnh nhân FH ở Trung Quốc, xác định đột biến trên 18 exon gen *LDLR*, phát hiện được 10 đột biến ở các exon 3, 4, 9, 13 và tỉ lệ đột biến phát hiện được trên exon 4 và exon 13 là cao nhất đều chiếm 5,1% [93]. Nghiên cứu của Samia Perwaiz Khan và cộng sự (2011): Trong tổng số 120 bệnh nhân FH có 42 trường hợp bệnh nhân dị hợp tử với xanthoma và LDL-C > 160 mg/dL. Hai đột biến đã được ghi nhận trong exon 3 và exon 4 gen *LDLR* [94]. Nghiên cứu của So Min Han và cộng sự (2015) trên 69 bệnh nhân FH Hàn Quốc, xác định đột biến trên 18 exon gen *LDLR* đã phát hiện 23 đột biến, trong đó đột biến trên exon 4 chiếm tần suất cao nhất 11,6% [95].

*b, Trong nước:*

Nghiên cứu của Phạm Thị Minh Huyền (2016) thực hiện giải trình tự exon 3, 4 gen *LDLR* trên 50 bệnh nhân FH người lớn, theo tiêu chuẩn MEDPED đã phát hiện được 4 loại đột biến: 1 đột biến c.78G>A trên exon 3; 8 bệnh nhân có đột biến trên exon 4 với 3 loại đột biến: c.368C>G; c.191G>T; c.351T>C và chưa thấy mối liên quan về tỉ lệ mắc bệnh mạch vành, u vàng, các chỉ số lipid máu (TC, triglyceride, HDL-C, LDL-C) ở nhóm có đột biến và không đột biến [96].

Kết quả nghiên cứu của Lê Thị Yên (2019) thực hiện trên 50 bệnh nhân FH người lớn (theo tiêu chuẩn chẩn đoán của MEDPED), nghiên cứu phân tích đột biến trên exon 4, 14, 17 gen *LDLR*, kết quả đã xác định được 3 đột biến trên exon 4 gồm: c.664T>C dị hợp tử, c.502G>T dị hợp tử và c.694+1G>C dị hợp tử (ghép nối); trên exon 14 có 2 đột biến: c.2030G>A dị hợp tử và c.1991\_1997delinsAGGCAGACCTCTCCT dị hợp tử; trên exon 17 có 2 đột biến: c.2544dupC dị hợp tử và c.2480T>A [97].

Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn 5 exon của gen *LDLR* có tần suất xuất hiện đột biến cao nhất để tiến hành phân tích đột biến gen là exon 3, exon 4, exon 9, exon 13 và exon 14.

### **1.3. Một số kỹ thuật SHPT ứng dụng trong phát hiện đột biến gen**

Với sự phát triển của SHPT, hiện nay có rất nhiều kỹ thuật để xác định kiểu gen. Một số kỹ thuật được sử dụng trong nghiên cứu đột biến gen *LDLR* như: Kỹ thuật khuếch đại gen PCR, kỹ thuật giải trình tự gen sản phẩm PCR (DNA sequencing of PCR products), phân tích tính đa hình chuỗi đơn SSCP (Single-strand conformation polymorphism analysis), phân tích DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis), phương pháp MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), Real-time PCR, Southern blotting, giải trình tự gen thế hệ mới NGS (Next generation sequencing). Phương pháp

SSCP ưu điểm là rẻ hơn nhưng có một số hạn chế: Các đột biến cần phát hiện là các đột biến của vùng hotspot, thiết kế enzyme cắt đúng vị trí xảy ra đột biến. Phương pháp DGGE thì không đặc hiệu nên vẫn phải kiểm tra lại bằng giải trình tự gen. MLPA và southern blotting thì hữu hiệu cho việc phát hiện thêm, mất đoạn lớn. Giải trình tự gen thế hệ mới là một công cụ hiện đại với các ưu điểm: (1) Không đòi hỏi thao tác khuếch đại các đoạn gen đích. (2) Có thể dễ dàng bao phủ vùng có mật độ GC cao hoặc có độ lặp lại cao (độ chính xác của SMRT sequencing lên tới 99.999%). (3) Có độ chính xác cao hơn trong việc định lượng các đột biến có tần số thấp. (4) Có thể đọc được trình tự từ DNA khuôn dài (ví dụ trung bình chiều dài trình tự được đọc của SMRT là 8-15kb và lên đến tới 40-70kb). (5) Tốc độ đọc nhanh, tốc độ giải trình tự hiệu quả theo thời gian. (6) Xác định trực tiếp các biến đổi vật chất di truyền cơ sở trên bộ gen. Tuy nhiên nhược điểm lớn nhất của kỹ thuật NGS là kỹ thuật vô cùng phức tạp, đòi hỏi người thực hiện phải có trình độ về kỹ thuật và chi phí cho hóa chất trang thiết bị cao [98]. Còn giải trình tự trực tiếp các sản phẩm PCR có nhiều ưu điểm: Cho phép phát hiện tất cả các đột biến, đặc biệt là các đột biến điểm vì vậy đây cũng là phương pháp được lựa chọn trong nhiều nghiên cứu về đột biến gen *LDLR* [46] và cũng là phương pháp được lựa chọn trong nghiên cứu của chúng tôi. Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ trình bày về kỹ thuật PCR và giải trình tự gen bằng máy giải trình tự tự động theo nguyên tắc của Sanger.

### ***1.3.1. Kỹ thuật khuếch đại gen - polymerase chain reaction (PCR)***

*Nguyên tắc chung:* Dựa vào hoạt tính của các DNA polymerase có khả năng tổng hợp mạch DNA mới từ mạch DNA khuôn, với nguyên liệu là bốn loại nucleotide. Phản ứng này đòi hỏi sự có mặt của những môi xuôi và môi ngược có trình tự bổ sung với hai đầu của trình tự DNA khuôn. Phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba bước:

- Bước 1: Là giai đoạn biến tính (denaturation), phân tử DNA được biến tính ở nhiệt độ cao hơn  $T_m$  (nhiệt độ nóng chảy) của phân tử, thường là  $94^{\circ}\text{C}$  -  $95^{\circ}\text{C}$  trong vòng 30 giây - 1 phút.

- Bước 2: Là giai đoạn bắt cặp (annealing). Nhiệt độ được hạ thấp cho phép các môi bắt cặp với khuôn, dao động trong khoảng  $40^{\circ}\text{C}$  -  $70^{\circ}\text{C}$ , tùy thuộc  $T_m$  của các môi sử dụng và kéo dài khoảng 30 giây - 1 phút.

- Bước 3: Là giai đoạn tổng hợp hay kéo dài (extension). Nhiệt độ được tăng lên  $72^{\circ}\text{C}$  để DNA polymerase là các polymerase chịu nhiệt (*Taq* polymerase, *Tth* polymerase, *Pfu* polymerase,...) hoạt động tổng hợp tốt nhất. Thời gian phụ thuộc vào độ dài của trình tự chuỗi DNA cần khuếch đại, thường kéo dài từ 30 giây đến nhiều phút.

Sau mỗi chu kỳ các chuỗi đôi DNA mới tạo thành sẽ tiếp tục được dùng làm các DNA nền để tổng hợp các DNA mới trong chu kỳ tiếp theo. Sản phẩm cuối của phản ứng PCR là những đoạn DNA mạch kép có chiều dài là khoảng cách giữa hai đoạn gen môi và hai đầu tận cùng của sản phẩm được xác định bởi đầu tận cùng 5' của hai đoạn gen môi [99].

Số lượng sản phẩm DNA tạo thành khi hoàn thành phản ứng PCR được biểu thị bằng công thức:  $N = A.2^n$

Trong đó N: Số lượng sản phẩm DNA tạo thành

A: Số DNA khuôn ban đầu trong mẫu

n: Số chu kỳ của phản ứng.

### ***1.3.2. Giải trình tự gen bằng máy tự động theo nguyên tắc Sanger***

Giải trình tự gen là kỹ thuật phát hiện được thứ tự sắp xếp của 4 loại nucleotide trên phân tử DNA. Năm 1977 Sanger và cộng sự đã phát minh ra kỹ thuật giải trình tự gen bằng phương pháp enzyme.

Hiện nay, các phòng xét nghiệm thường sử dụng máy giải trình tự gen tự động hoàn toàn thiết kế trên nguyên tắc của Sanger. Để thực hiện được giải

trình tự gen bằng máy tự động thì các mạch DNA đơn sản sinh trong ống phản ứng giải trình tự phải được đánh dấu huỳnh quang để các vạch điện di của các mạch đơn này phát sáng khi đi qua một chùm tia sáng laser. Cấu tạo của một máy giải trình tự tự động gồm 2 phần chính: Phần điện di với gel polycrylamid và phần phát hiện các vạch điện di. Phần điện di polycrylamid có thể là một bản gel hay là một ống mao quản chứa gel. Phần phát hiện vạch điện di là những con mắt cảm quang và một chùm tia laser đi qua trước nó. Nguyên tắc hoạt động của máy là trong suốt quá trình điện di, mỗi khi có vạch điện di đi qua chùm tia laser thì vạch điện di sẽ phát sáng lên và sự phát sáng này sẽ được con mắt cảm quang ghi nhận và lưu lại thành một đỉnh cường độ sáng trong biểu đồ. Từ biểu đồ của các đỉnh cường độ sáng này, máy sẽ so dòng của các đỉnh tương ứng với các màu, cuối cùng phân tích thành trình tự của đoạn DNA.

Với các máy thế hệ mới sau này, người ta dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP. Nhờ vậy phản ứng giải trình tự có thể thực hiện trong 1 ống nghiệm và chỉ cần điện di trên 1 hàng mà không phải trên 4 hàng như trước đây, hệ thống điện di thường là điện di mao quản. Phương pháp giải trình tự gen cho phép phát hiện tất cả các đột biến, đặc biệt là các đột biến điểm.

Những kết quả phân tích gen trên máy giải trình tự tự động của từng bệnh nhân và người thân trong gia đình bệnh nhân sẽ giúp chẩn đoán xác định bệnh FH; toàn bộ các đối tượng nghiên cứu trên sẽ được tư vấn di truyền và tư vấn phòng bệnh phù hợp.

Việc áp dụng sàng lọc phân tử và xét nghiệm gen gây bệnh FH đã được thực hiện ở nhiều nước trên thế giới. Ở Việt Nam, thông tin về gen gây bệnh cũng như sử dụng sàng lọc phân tử để phát hiện bệnh vẫn chưa có nhiều nghiên cứu được thực hiện, đồng thời cũng chưa thiết lập được bản đồ

đột biến gen *LDLR* ở những gia đình có bệnh nhân FH; nhiều nhà khoa học nước ngoài quan tâm và muốn cộng tác nghiên cứu vấn đề này trên quần thể người Việt Nam, do đó khả năng công bố kết quả nghiên cứu trên các tạp chí quốc tế là chắc chắn.

Đề tài thực hiện kết hợp giữa ba cơ sở có bề dày về lâm sàng và nghiên cứu y học là Trường Đại học Y Hà Nội, Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Tim Hà Nội. Ba cơ sở này có đầy đủ điều kiện thuận lợi để sàng lọc, lựa chọn bệnh nhân cũng như các trang thiết bị, khoa Xét nghiệm hiện đại để thực hiện nghiên cứu. Các điều kiện này sẽ giúp nghiên cứu có được thành công và những kết quả có giá trị và đồng thời trong tương lai kết quả của nghiên cứu sẽ được ứng dụng và phát triển hơn nữa.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

##### 2.1.1. Nhóm bệnh nhi:

Bệnh nhi < 16 tuổi được khám và chẩn đoán bệnh FH tại bệnh viện Nhi Trung ương theo tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ sau:

✚ Tiêu chuẩn lựa chọn:

- Bệnh nhi đáp ứng tiêu chuẩn Simon Broome:

(1) TC máu > 6.7 mmol/L hoặc LDL-C >4.0 mmol/L ở trẻ em <16 tuổi.

(2) Triệu chứng kèm theo:

+ Xanthoma gân xuất hiện ở bệnh nhân hoặc có ở thể hệ có mối quan hệ huyết thống bậc 1 với bệnh nhân (cha mẹ, anh chị em ruột) hoặc có ở thể hệ có mối quan hệ huyết thống bậc 2 với bệnh nhân (ông bà, chú, dì).

- Bố, mẹ hoặc người bảo trợ và bệnh nhi FH đồng ý cho bệnh nhi tham gia nghiên cứu.

✚ Tiêu chuẩn loại trừ:

- Bệnh nhi mắc một trong các bệnh sau: Cường giáp, suy giáp, hội chứng thận hư, đái tháo đường, bệnh gan mạn.

##### 2.1.2. Nhóm các thành viên trong gia đình bệnh nhi:

- Các thành viên trong phả hệ 3 gia đình bệnh nhi FH (MS02, MS03, MS15)

+ Gồm 45 thành viên trong phả hệ 3 gia đình

+ Trong đó 30/45 thành viên trong phả hệ 3 gia đình có quan hệ huyết thống di truyền bệnh FH.

+ Các thành viên trong phả hệ 3 gia đình đồng ý tham gia nghiên cứu.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện theo phương pháp nghiên cứu hồi cứu kết hợp mô tả cắt ngang.

### 2.2.2. Biến số và chỉ số trong nghiên cứu

- Tuổi, giới tính của nhóm bệnh nhi trong nghiên cứu

- Triệu chứng và chẩn đoán trên lâm sàng của các đối tượng trong 2 nhóm nghiên cứu: U vàng, đau ngực kiểu mạch vành, tăng huyết áp, xơ vữa động tĩnh mạch, NMCT.

+ Chẩn đoán u vàng: Tổn thương là củ, màu vàng nhạt, nổi cao lên mặt da, giới hạn rõ rệt, hình tròn hoặc hình bầu dục. Các tổn thương lúc đầu nhỏ, có thể lớn dần, đường kính có thể lên đến 2-3 cm. Không kèm theo triệu chứng cơ năng nào. Vị trí thường gặp ở gân Achille và gân khớp duỗi ở khớp ngón tay, đôi khi có thể gặp ở khớp gối, khuỷu tay, mông, giác mạc [100].

+ Đau ngực kiểu mạch vành: Theo AHA/ACC xác định cơn đau thắt ngực điển hình do bệnh ĐMV dựa trên các tính chất:

- (1) Đau thắt chẹn sau xương ức với tính chất và thời gian điển hình
- (2) Xuất hiện khi gắng sức hoặc xúc cảm
- (3) Dỡ đau khi nghỉ hoặc dùng nitrates

Đau thắt ngực không điển hình: Chỉ gồm 2 trong 3 yếu tố trên.

Không phải đau thắt ngực: Có nhiều nhất 1 trong 3 yếu tố nói trên.

- Xơ vữa động tĩnh mạch: Trên lâm sàng có kết luận chẩn đoán xơ vữa động tĩnh mạch (các bác sĩ chẩn đoán hình ảnh kết luận dựa vào các kết quả siêu âm mạch máu).
- Nhồi máu cơ tim: Trên lâm sàng có kết luận chẩn đoán NMCT (các bác sĩ điều trị chẩn đoán dựa vào các kết quả xét nghiệm máu, điện tâm đồ).



- Chỉ số lipid máu: TC, LDL-C, HDL-C, triglyceride.
- Một số chỉ số hóa sinh - miễn dịch: AST, ALT, creatinin, glucose, FT4, TSH.
- Kết quả đột biến trên exon 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR*.

### 2.2.3. Phương tiện nghiên cứu

#### a. Hóa chất:

- Hóa chất tách DNA từ máu toàn phần: Phương pháp Exgene Blood SV mini (GeneAll, Hàn Quốc), hóa chất theo kit của nhà sản xuất.
- Hóa chất PCR:
  - Mastermix Goldtaq green, mastermix hotstart (trong thành phần chứa dNTP, Taq polymerase, buffer tối ưu phản ứng).
  - Các cặp mồi xuôi, ngược.
  - Nước cất không có nuclease.
- Hóa chất điện di:
  - Agarose
  - Dung dịch TBE (boric acid EDTA), Ethidium bromide.
  - Thang DNA chuẩn.
- Hóa chất tinh sạch sản phẩm PCR: Theo phương pháp của Promega Wizard SV gel clean up system (Promega Inc) gồm dung dịch gắn kết màng, dung dịch rửa màng, nước cất không có nuclease.
- Hóa chất giải trình tự gen: Sử dụng BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) gồm:
  - BigDye Terminator v3.1 (dATP, dCTP, dGTP, dUTP).
  - BigDye Seq.buffer và cặp mồi đặc hiệu.

#### b. Trang thiết bị nghiên cứu

- Pipet và đầu côn các loại 1000 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 10 $\mu$ l
- Ống PCR

- Ống eppendorf 1,5 ml, ống Falcon
- Găng tay, giấy thấm đã được vô trùng tuyệt đối.
- Ống nghiệm pha hóa chất
- Cốc thủy tinh, ống đong, bình nón
- khay đổ gel
- Cân điện tử
- Máy vortex
- Máy hấp vô trùng dụng cụ, tủ lạnh âm sâu  $-30^{\circ}\text{C}$ , tủ ẩm.
- Máy ly tâm để bàn Eppendorf (Đức).
- Máy xét nghiệm sinh hóa – miễn dịch: Máy C501, C702, E601, E602 của hãng Roche.
- Hệ thống điện di ngang Mupid, máy PCR Eppendorf (Đức).
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động.
- Máy đo nồng độ DNA Nano Drop 1000 (Mỹ).
- Buồng ủ nhiệt, buồng hút, lò vi sóng.
- Máy giải trình tự gen tự động.

#### **2.2.4. Các kỹ thuật nghiên cứu**

Bệnh nhân thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn được thu thập số liệu theo mẫu bệnh án nghiên cứu thống nhất. Các bệnh nhân được lấy máu làm một số xét nghiệm sinh hóa, miễn dịch và tiến hành phân tích gen.

##### **🚩 Lấy máu tĩnh mạch xét nghiệm:**

Các đối tượng nghiên cứu được lấy máu lúc đói (sau khi bệnh nhân đã nhịn ăn từ sau 8 tiếng), một số bệnh nhi quá nhỏ có thể lấy máu sau khi bệnh nhi đã nhịn ăn khoảng 3-4 tiếng, gồm 4 ml máu tĩnh mạch ngoại vi (2ml máu chống đông bằng EDTA, 2 ml máu chống đông bằng heparin). Thực hiện một số xét nghiệm sinh hóa, miễn dịch, tách chiết DNA. Phần còn lại bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ  $-30^{\circ}\text{C}$ .

### **✚ Phương pháp, nguyên lý định lượng một số chỉ số xét nghiệm**

- Phương pháp enzyme so màu: Triglyceride (mmol/L), TC (mmol/L), HDL-C (mmol/L), LDL-C (mmol/L), ALT (U/L), AST (U/L), creatinin ( $\mu\text{mol/L}$ ).

- Nguyên lý điện cực hóa phát quang: FT4 (pmol/L), TSH ( $\mu\text{IU/L}$ )

Các xét nghiệm thực hiện trên máy phân tích hóa sinh - miễn dịch tự động C702, C501, E601 và E602 tại khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Tim Hà Nội với thuốc thử, chất chuẩn của hãng Roche, kiểm tra chất lượng xét nghiệm được thực hiện bởi hãng Randox.

### **✚ Kỹ thuật tách DNA từ máu toàn phần:**

➤ Tách chiết DNA là khâu đầu tiên để thực hiện quy trình chẩn đoán xác định đột biến gen. Đây là bước rất quan trọng quyết định sự thành công của các kỹ thuật tiếp sau. DNA tách chiết phải đảm bảo tinh sạch, không lẫn hóa chất và các thành phần khác của tế bào. Quy trình tách chiết theo phương pháp Exgene Blood SV mini (GeneAll, Hàn Quốc) như sau:

- 1- Cho 20  $\mu\text{l}$  dịch Proteinase K vào ống eppendorf 1,5 ml.
- 2- Thêm 200  $\mu\text{l}$  máu toàn phần chống đông EDTA.
- 3- Thêm 200  $\mu\text{l}$  buffer BL, vortex để trộn hoàn toàn, ủ ở  $56^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút.
- 4- Thêm 200  $\mu\text{l}$  ethanol tuyệt đối và trộn.
- 5- Chuyển hỗn hợp vào cột SV và li tâm 8000 vòng/1 phút rồi loại bỏ dịch lọc.
- 6- Thêm 600  $\mu\text{l}$  buffer BW, li tâm 8000 vòng/1 phút rồi loại bỏ dịch lọc.
- 7- Thêm 700  $\mu\text{l}$  buffer TW, li tâm 8000 vòng/1 phút rồi loại bỏ dịch lọc.
- 8- Li tâm tốc độ tối đa 13000 vòng trong 1 phút và chuyển cột SV vào tube 1,5 ml.
- 9- Thêm 50  $\mu\text{l}$  buffer AE hoặc nước tiệt trùng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút, li tâm 13000 vòng trong 1 phút.

➤ Rửa tủa bằng cồn 70°. Tủa DNA được hoà tan bằng 50 ml nước tinh khiết. DNA thu được sẽ được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose.

### **Kiểm tra chất lượng DNA**

#### ➤ *Phương pháp quang phổ:*

✓ Nguyên lý đo mật độ quang: Giá trị mật độ quang học ở bước sóng 260 nm (OD260) của các mẫu cho phép xác định nồng độ acid nucleic có trong mẫu nghiên cứu. Protein hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 280nm do có sự hấp thụ của a.a thơm và dị vòng (tyrosin, tryptophan, phần nhỏ nhờ phenylalanine).

✓ Tiến hành đo mật độ quang DNA tổng số: Lấy 1,0 µl DNA tổng số tách được đo trên máy Nanodrop. Kết quả OD của mẫu DNA được coi là đạt khi nồng độ khoảng 20 ng/µl trở lên. Với những mẫu có nồng độ quá cao (> 300 ng/µl) sẽ được pha loãng để đưa nồng độ < 100 ng/µl. Độ tinh sạch của DNA được đo bằng tỉ số OD260/ OD280 và mẫu DNA tinh sạch khi tỉ số này từ 1,8 – 2,0.

#### ➤ *Điện di DNA*

✓ Mục đích: Kiểm tra chất lượng và ước lượng nồng độ DNA tách chiết được. Bên cạnh đó điện di DNA còn là phương pháp đánh giá kết quả phản ứng PCR, xem đoạn gen được khuếch đại có đúng kích thước, có đặc hiệu không.

✓ Nguyên lý: Ở pH = 8, acid nucleic mang điện tích âm, dưới tác dụng của dòng điện một chiều acid nucleic sẽ di chuyển về cực dương. Các đoạn DNA có kích thước khác nhau sẽ di chuyển khác nhau. Tùy mục đích, có thể sử dụng các chất khác nhau để điện di DNA, phổ biến nhất là sử dụng gel agarose 1,5%.

✓ Đánh giá kết quả: Khi vạch điện di rõ nét, băng gọn, đúng kích thước đoạn cần khuếch đại chứng tỏ phản ứng PCR tối ưu. Sản phẩm PCR có thể được sử dụng ở các công đoạn tiếp theo (giải trình tự...). Ngược lại, phân tử DNA bị đứt gãy, lẫn nhiều protein hoặc các tạp chất khác thì hình ảnh điện di là một vệt trải dài không tạo thành băng gọn.

#### **✚ Kỹ thuật PCR khuếch đại exon 3, 4, 9, 13, 14**

##### ➤ Thiết kế môi:

Thiết kế môi đóng vai trò quyết định thành công của nghiên cứu. Mục đích của thiết kế môi nhằm khuếch đại được các exon 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR*.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng môi tự thiết kế, trình tự môi cho các đoạn exon trong nghiên cứu được thiết kế đặc hiệu với các vùng trình tự đích mong muốn. Việc thiết kế môi được tuân thủ chặt chẽ theo nguyên tắc thiết kế môi cụ thể như sau [101],[102]:

1. Chiều dài của môi: Môi tối ưu cho phản ứng khuếch đại PCR và cho phản ứng giải trình tự từ 18-24bp, đủ để gắn đặc hiệu và gắn vào với khuôn ở nhiệt độ gắn môi.

2. Nhiệt độ nóng chảy của môi ( $T_m$ ): Tối ưu trong khoảng 52-58°C,  $T_m > 65^\circ\text{C}$  thường dễ xảy ra các sản phẩm phụ thứ cấp.

→  $T_m$  nên được tính toán cẩn trọng, nếu  $T_m$  giữa hai môi chênh nhau quá 5°C phản ứng khuếch đại rất khó xảy ra.

3. Nhiệt độ gắn môi ( $T_a$ ) quyết định tính đặc hiệu quan trọng của phản ứng khuếch đại PCR.  $T_a$  quá cao dẫn đến việc gắn không hiệu quả giữa môi và DNA gốc dẫn tới hiệu suất sản phẩm PCR thấp.  $T_a$  quá thấp có thể dẫn tới việc gắn không đặc hiệu gây ra bởi việc bắt cặp nhầm với sản phẩm phụ khác.  $T_a$  được tính

$$T_a = 0.3 \times T_m (\text{môi}) + 0.7 T_m (\text{sản phẩm PCR}) - 14.9$$

Trong đó:  $T_m$  (môi): Nhiệt độ nóng chảy của môi

$T_m$  (sản phẩm): Nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm PCR

4. Tỷ lệ G, C trong môi: Hàm lượng base G, C trong tổng số base trong mỗi môi nên trong khoảng 40-60%.

5. Kẹp GC: Sự hiện diện của base G, C ở 5 base cuối cùng tại đầu 3' của mỗi môi vô cùng quan trọng quyết định khả năng liên kết do liên kết G và C thường mạnh hơn. Tuy nhiên để tránh việc gấn không đặc hiệu, lượng base G,C không nên lớn hơn 3 trong 5 base cuối đầu 3'.

6. Cấu trúc bậc 2: Sự hiện diện của các cấu trúc thứ cấp của môi được tạo ra bởi các tương tác giữa các phân tử môi hoặc nội phân tử môi có thể dẫn đến kém hoặc không có năng suất của sản phẩm. Chúng ảnh hưởng xấu đến quá trình ủ mẫu môi và cả quá trình khuếch đại, do đó làm giảm đáng kể “số lượng thực” sẵn có của môi cho phản ứng.

- Cấu trúc kẹp tóc (Hairpins): Là cấu trúc thứ phát được tạo ra do sự tương tác liên kết giữa chính các base trong môi đó. Nên hạn chế cấu trúc kẹp tóc này. Điều kiện tối ưu  $\Delta G$  kẹp tóc tại vị trí 3' nên lớn hơn -2 kcal/mol,  $\Delta G$  kẹp tóc bên trong (ngoại trừ 5 base đầu 3') nên lớn hơn -3 kcal/mol.

$\Delta G$ : Năng lượng tự do Gibbs (G) là năng lượng đo được từ quá trình hoạt động liên kết ở áp suất không đổi. Nó là thước đo tính tự phát của phản ứng. Độ ổn định của kẹp tóc thường được biểu thị bằng giá trị  $\Delta G$  của nó, năng lượng cần thiết để phá vỡ cấu trúc thứ cấp. Giá trị âm lớn hơn cho  $\Delta G$  biểu thị cặp tóc ổn định, không mong muốn. Sự hiện diện của kẹp tóc ở đầu 3' ảnh hưởng xấu nhất đến phản ứng.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

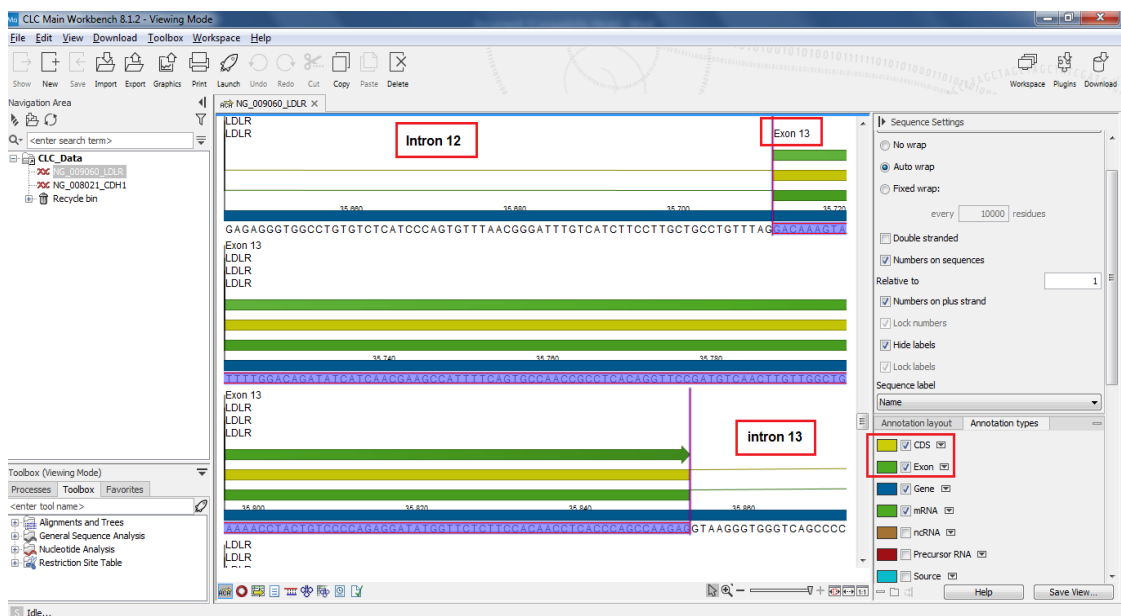
- Liên kết tự thân của môi (Self-dimer): Cấu trúc này hình thành do sự liên kết giữa 2 môi đơn cùng loại (ví dụ môi 2 môi xuôi tự liên kết với nhau trong chính ống stock ban đầu). Khi các môi hình thành các liên kết self-dimer sẽ giảm hiệu quả bắt cặp với DNA đích, chúng làm giảm năng suất sản phẩm. Điều kiện tối ưu  $\Delta G$  của liên kết tự thân tại vị trí 3' nên lớn hơn -5 kcal/mol,  $\Delta G$  liên kết tự thân bên trong môi (trừ 5 base đầu 3') nên lớn hơn -6 kcal/mol.

- Liên kết chéo giữa 2 môi (Cross-dimer): Liên kết hình thành giữa môi xuôi và môi ngược. Điều kiện tối ưu  $\Delta G$  của liên kết giữa 2 môi tại vị trí 3' nên lớn hơn -5 kcal/mol,  $\Delta G$  liên kết giữa 2 môi bên trong môi (trừ 5 base đầu 3') nên lớn hơn -6 kcal/mol.

7. Lặp cặp: Nên tránh các đoạn di-nucleotide lặp đi lặp lại nhiều lần trong các môi có thể gây bắt cặp nhầm. VD: ATATATATAT. Số lượng cặp di-nucleotide có thể chấp nhận trong môi nên dưới 4 cặp.

8. Lặp nucleotide: Hạn chế các nucleotide lặp lại liên kế quá nhiều lần cũng dễ dẫn tới sự bắt cặp nhầm. VD: AGCGGGGGATGGGG số nucleotide lặp lần lượt là 5 và 4 trong 1 môi. Số lượng nucleotide đơn lặp liên tục tối đa cho phép nên không quá 4.

Trình tự gen *LDLR* được lấy trực tiếp từ trình tự FASTA trên kho dữ liệu NCBI thông qua phiên bản giới hạn phần mềm CLC Main Workbench 8.1.2 của hãng QIAGEN [103]. Trên phần mềm hiển thị rõ các vùng exon, các vùng mã hóa protein (coding DNA sequence), intron...



**Hình 2.1. Hình ảnh trình tự exon 13 và các vùng intron liên kế thông qua phần mềm CLC Main Workbench 8.1.2 phiên bản giới hạn.**

Nhóm nghiên cứu tiến hành thiết kế các cặp mồi bao trùm cả exon và một phần intron liền kề để đảm bảo các yêu cầu về chiều dài đoạn DNA đích:

- (1) Có thể kiểm tra các đột biến ghép nối splicing cận kề nếu có
- (2) Đảm bảo khi giải trình tự bằng phương pháp Sanger có thể hạn chế những vùng tín hiệu nhiễu ban đầu có thể ảnh hưởng tới đoạn exon và rìa intron mong muốn.

(3) Thực hiện trên hệ thống Prism 3730xl – ABI có thể giải trình tự được đoạn 1000bp, do đó đoạn đích mong muốn chiều dài dưới 1000bp.

Các exon trong nghiên cứu có kích thước lần lượt là:

exon 3: 123 bp; exon 4: 381 bp; exon 9: 173 bp;

exon 13: 142 bp; exon 14: 153 bp.

Đoạn liền kề trước exon 14 là intron 13 dài 136 bp, nên nhóm nghiên cứu tiến hành thiết kế cặp mồi bao trùm cả đoạn exon 13-intron13-exon14 dài 431 bp.

Các đoạn bao trùm trình tự đích từ NCBI được đưa vào phần mềm Primer-BLAST [101] lựa chọn đoạn trình tự dài khoảng 900 bp bao trùm đoạn exon13-intron13-exon14 dài 431 bp cùng đoạn đích mong muốn dài tối thiểu 500 bp.

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

PCR Template [Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

Enter accession, nt, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)  Clear

Range

From  To  Clear

Forward primer  Clear

Reverse primer  Clear

Or, upload FASTA file  Chọn tệp | Không có tệp nào được chọn

**Đoạn trình tự dài ~ 900 bp bao gồm đoạn exon 13 - exon 14 dài 431 bp**

Primer Parameters

Use my own forward primer (5' → 3' on plus strand)  Clear

Use my own reverse primer (5' → 3' on minus strand)  Clear

PCR product size Min  Max

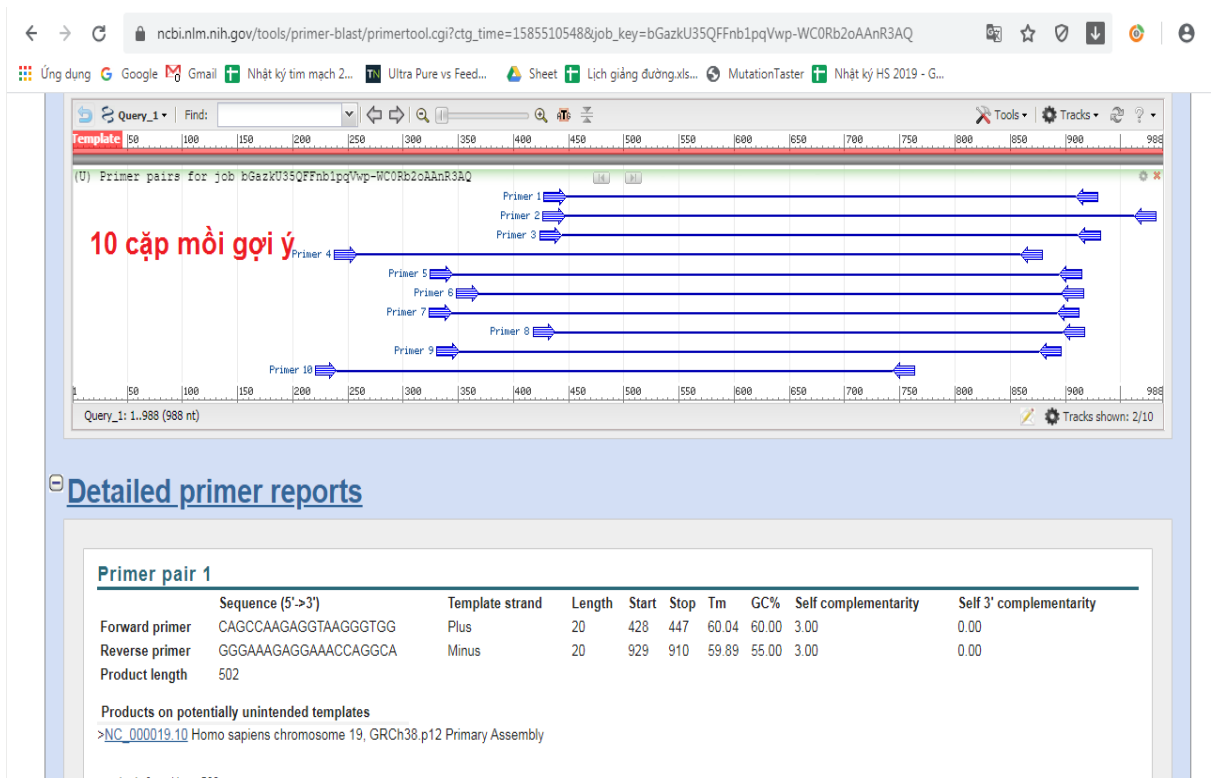
# of primers to return

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>) Min  Opt  Max  Max T<sub>m</sub> difference

**Lựa chọn chiều dài đích mong muốn tối thiểu là 500bp**

**Hình 2.2. Hình ảnh chọn mồi đặc hiệu dựa trên phần mềm Primer-BLAST (NCBI).**





**Hình 2.3. Các cặp môi gợi ý với một số đặc tính cụ thể sau khi sử dụng phần mềm Primer-BLAST của NCBI**

Các đoạn môi gợi ý được kiểm tra ngược lại từng cặp trên BLAST của NCBI so sánh với toàn bộ hệ gen người để kiểm tra độ đặc hiệu [101]. Ngoài ra các đặc tính vật lý  $\Delta G$  cho phép về hairspin, self-dimer, cross-dimer được kiểm tra bằng phần mềm hỗ trợ OligoAnalyzer Tool [104] tính toán nhiệt độ gắn môi dựa trên nồng độ muối trong thể tích và thành phần phản ứng để lựa chọn những cặp môi đặc hiệu và tối ưu nhất, cùng với các  $T_a$  và  $T_m$  dự đoán trước.

**Bảng 2.1. Trình tự mỗi khuếch đại exon 3, 4, 9, 13, 14 của gen LDLR**

	Mũi	Trình tự	Kích thước (bp)
Exon 3	Mũi xuôi <i>LDLR</i> (5'-3')	CTCAGTGGGTCTTTCCTTTG	400
	Mũi ngược <i>LDLR</i> (3'-5')	CCTGACTGTGCGTGACAA	
Exon 4	Mũi xuôi <i>LDLR</i> (5'-3')	TGTTGGGAGACTTCACACGG	529
	Mũi ngược <i>LDLR</i> (3'-5')	TCCACTTCGGCACCTAAATCA	
Exon 9	Mũi xuôi <i>LDLR</i> (5'-3')	CTCTTTTTCTGGGTGCCTC	448
	Mũi ngược <i>LDLR</i> (3'-5')	CTGGATGTCTCTGCTGATGA	
Exon 13, 14	Mũi xuôi <i>LDLR</i> (5'-3')	TAGTTGTGGAGAGAGGGTGGC	638
	Mũi ngược <i>LDLR</i> (3'-5')	AAAGTATGGTTATCCCGACTCA	

**Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại exon 3, 4, 9, 13, 14**

Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
Master mix hotstart	17,5
Mũi xuôi (tùy theo exon)	0,5
Mũi ngược (tùy theo exon)	0,5
DNA	1,0
Nước không có nuclease	5,5
<b>Tổng số</b>	<b>25,0</b>

**Bảng 2.3. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR khuếch đại exon 3**

Nhiệt độ	Thời gian	
95 <sup>0</sup> C	5 phút	
95 <sup>0</sup> C	30 giây	35 chu kỳ
<b>T<sub>m</sub> 55<sup>0</sup>C</b>	30 giây	
72 <sup>0</sup> C	30 giây	
72 <sup>0</sup> C	5 phút	
4 <sup>0</sup> C	Vô cùng	

- Tương tự tiến hành cùng chu kỳ nhiệt độ và số chu kỳ tương tự với exon 9, 13, 14 tại T<sub>m</sub> = 55<sup>0</sup>C, exon 4 tại T<sub>m</sub> = 57<sup>0</sup>C.
- Tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% để kiểm tra chất lượng sản phẩm.

#### **Giải trình tự gen**

- Phản ứng giải trình tự gen

**Bảng 2.4. Thành phần phản ứng giải trình tự gen**

Thành phần	Thể tích (μl)
DNA đích đã được tinh sạch	2
BigDye Terminator v3.1	4
Môi xuôi (hoặc môi ngược) 10 pmol	3,2
BigDye seq.buffer 5X	2
Nước khử ion	8,8
<b>Tổng số</b>	<b>20,0</b>

**Bảng 2.5. Chu trình nhiệt của phản ứng giải trình tự gen**

Nhiệt độ	Thời gian	
96 <sup>0</sup> C	1 phút	
96 <sup>0</sup> C	10 giây	25 chu kỳ
50 <sup>0</sup> C	5 giây	
60 <sup>0</sup> C	4 phút	
4 <sup>0</sup> C	Lưu trữ	

- Sản phẩm PCR giải trình tự sau khi tinh sạch, tiến hành giải trình tự gen trên máy giải trình tự tự động Prism 3730xl – ABI (Mỹ).

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

✚ Thời gian nghiên cứu: Nghiên cứu thực hiện từ tháng 10/2015 – 9/2019.

✚ Địa điểm nghiên cứu:

- Bệnh viện Nhi Trung ương: Thực hiện khám và lấy mẫu máu các đối tượng trong nhóm bệnh nhi tại khoa Nội tiết - Chuyển hóa, Bệnh viện Nhi Trung ương.

- Bệnh viện Tim Hà Nội:

+ Thực hiện lấy mẫu máu một số thành viên trong nhóm phả hệ 3 gia đình bệnh nhi MS02, MS03 và MS15 (các đối tượng nghiên cứu khác trong phả hệ gia đình 3 bệnh nhi MS02, MS03, MS15 được lấy máu tại gia đình của các đối tượng nghiên cứu).

+ Thực hiện một số xét nghiệm hóa sinh - miễn dịch của các đối tượng trong 2 nhóm nghiên cứu.

- Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng xét nghiệm - Trường ĐH Y Hà Nội: thực hiện kỹ thuật sinh học phân tử.

- Bộ môn Hóa sinh-Đại học Y Hà Nội: Thực hiện phân tích kết quả nghiên cứu, họp nhóm nghiên cứu và báo cáo tiến độ nghiên cứu.

#### **2.4. Đạo đức trong nghiên cứu:**

- Việc thực hiện nghiên cứu này đã được thông qua bởi Hội đồng Đạo đức theo Quyết định số 187/HĐĐĐĐHYHN, ngày 20/02/2016 của Hội đồng Đạo đức Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

- Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia nghiên cứu và cung cấp đầy đủ, trung thực các thông tin liên quan đến tình hình bệnh của bệnh nhân.

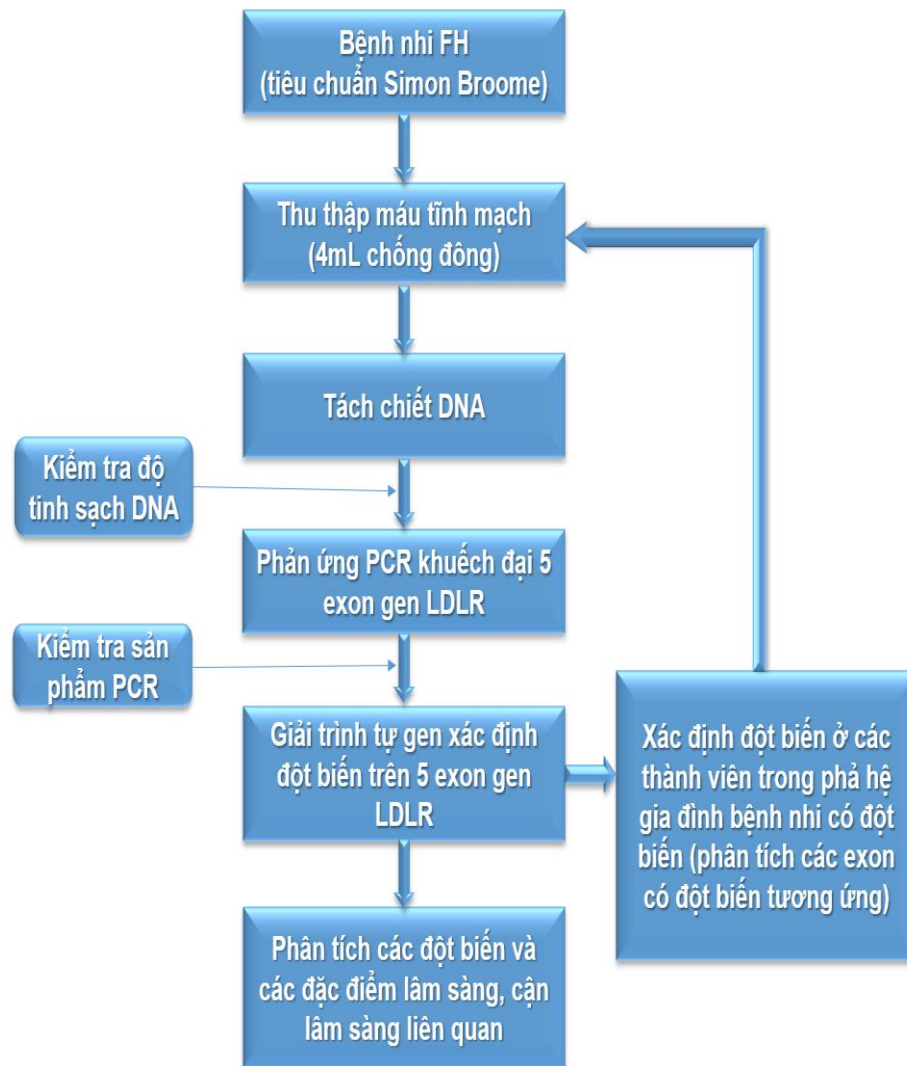
- Bệnh nhân được thông báo kết quả xét nghiệm đột biến gen thông qua bác sĩ điều trị.

- Các thông tin về bệnh nhân, kết quả chẩn đoán được hoàn toàn giữ bí mật. Nghiên cứu được tiến hành hoàn toàn vì mục đích khoa học, không vì bất kỳ mục đích nào khác.

#### **2.5. Phương pháp xử lý số liệu**

Kết quả giải trình tự gen thu được phân tích trên phần mềm Sequencing Scanner 2.0 và so sánh với trình tự các a.a trên gene bank bằng phần mềm ApE. Phân tích xác định vị trí đột biến, loại đột biến hay SNP, kết hợp với các phần mềm dự báo khả năng gây bệnh của đột biến hay SNP.

Sử dụng phần mềm SPSS 16.0 để phân tích thống kê. Kiểm định và so sánh giá trị trung bình của các biến theo phân phối chuẩn bằng T-test, không chuẩn bằng kiểm định Mann-Whitney test.



**Hình 2.4. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu**

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả nghiên cứu thu được trên 26 bệnh nhi được chẩn đoán tăng cholesterol máu có tính chất gia đình và 45 thành viên trong các gia đình của 3 bệnh nhi mang đột biến được chúng tôi trình bày trong các bảng và biểu đồ dưới đây:

#### 3.1. Một số đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

##### 3.1.1. Đặc điểm về tuổi

*Bảng 3.1. Đặc điểm về tuổi của nhóm bệnh nhi trong nghiên cứu*

Nhóm bệnh nhi	$\bar{X} \pm SD$ (tuổi)	Min	Max
(1) Nhóm bệnh nhi FH (n1 = 26)	6,66 ± 3,92	0,1	15
(2) Nhóm bệnh nhi có đột biến trong phả hệ (n2 = 9)	5,33 ± 3,3	2	11
Tổng (n=35)		0,1	15
p(1)&(2)	0,41		

Kết quả bảng 3.1 cho thấy độ tuổi trung bình của nhóm đối tượng bệnh nhi FH ban đầu (n=26) khi được phát hiện bệnh là  $6,66 \pm 3,92$  tuổi, từ một số bệnh nhi có đột biến trong nhóm này chúng tôi đã thực hiện sàng lọc phân tầng 3 phả hệ gia đình và phát hiện thêm 9 bệnh nhi có đột biến, độ tuổi trung bình của 9 bệnh nhi thấp hơn độ tuổi trung bình của nhóm đối tượng bệnh nhi FH ban đầu, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.2. Đặc điểm về giới

**Bảng 3.2. Đặc điểm về giới của nhóm bệnh nhi trong nghiên cứu**

Giới	Nhóm 26 bệnh nhi FH ban đầu		Nhóm bệnh nhi đột biến trong phả hệ		Tổng	
	n	%	n	%	n	%
Nam	16	61,5	4	44	20	57,1
Nữ	10	38,5	5	56	15	42,9
Tổng	26		9		35	

Bảng 3.2 bao gồm 2 nhóm với tổng số 35 bệnh nhi, trong đó nhóm 26 bệnh nhi FH có tỉ lệ bệnh nhân nam (61,5%) nhiều hơn hẳn tỉ lệ bệnh nhân nữ (38,5%), còn nhóm 9 bệnh nhi được phát hiện đột biến hoàn toàn chủ động thì số bệnh nhân nam và nữ tương đối đồng đều nhau. Từ đó tỉ lệ về giới của toàn bộ số bệnh nhi (n=35) cho thấy tỉ lệ nam > nữ nhưng khác biệt không lớn.

### 3.1.3. Đặc điểm về triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng

Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã thực hiện khám và xét nghiệm 26 bệnh nhi FH, tất cả 26 bệnh nhi đều không có các triệu chứng lâm sàng như: đau ngực, NMCT, tăng huyết áp. Các triệu chứng khác như u vàng và xét nghiệm được thể hiện theo bảng sau:



**Bảng 3.3. Đặc điểm u vàng và chỉ số lipid máu của nhóm bệnh nhi**

<b>Mã BN</b>	<b>U vàng</b>	<b>TC</b>	<b>LDL-C</b>	<b>HDL-C</b>	<b>Triglycerid</b>
MS01	+	6,1	4,5	0,95	1,4
MS02	+	24,7	20,6	1,3	1,2
MS03	+	8,5	6,7	1,0	0,8
<b>MS04</b>	+	<b>19,37</b>	<b>12,6</b>	<b>1,25</b>	<b>23,8</b>
MS05	+	9,67	7,53	0,94	1,5
MS06	+	18,95	15,4	1,05	1,4
MS07	+	6,47	4,9	0,79	1,51
MS08	-	10,4	8,7	1,4	0,6
MS09	+	6,1	4,6	0,9	1,4
MS10	+	14,0	12,0	1,2	1,1
MS11	+	11,3	10,4	0,5	1,7
MS12	+	12,68	9,65	1,13	1,86
MS13	+	12,5	10,4	0,7	4,1
MS14	+	17,92	15,23	1,39	2,15
MS15	+	19,1	15,4	1,72	1,3
MS16	+	6,83	4,5	1,1	1,6
MS17	+	12,7	10,6	0,9	1,73
MS18	+	12,2	10,1	0,7	2,79
MS19	+	12,53	11,02	1,14	0,82
MS20	+	8,85	7,03	1,29	1,09
MS21	+	12,36	10,1	0,9	3,84
MS22	+	10,2	8,3	1,5	0,92
MS23	+	18,75	13,86	1,1	1,25
MS24	+	7,36	5,03	1,99	0,84
MS25	+	15,04	10,82	1,29	0,82
MS26	+	9,06	6,11	1,47	1,15
$\bar{X} \pm SD$ (n=25)*	24/25	12,17 $\pm$ 4,77	9,74 $\pm$ 4,1	1,13 $\pm$ 0,34	1,55 $\pm$ 0,87
$\bar{X} \pm SD$ (n=26)	25/26	12,45 $\pm$ 4,88	9,85 $\pm$ 4,06	1,14 $\pm$ 0,33	2,38 $\pm$ 4,45

\* Không bao gồm bệnh nhi MS04 (Triglyceride tăng cao)

Tại bệnh viện Nhi Trung ương trong thời gian nghiên cứu chỉ có 26 bệnh nhi đáp ứng tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH của Simon Brome và đồng ý tham gia nghiên cứu. Triệu chứng u vàng trên lâm sàng chỉ có một trường hợp MS08 không có biểu hiện, còn lại 25 bệnh nhi có u vàng ở nhiều vị trí trên cơ thể: vùng gối, khuỷu tay, vùng mông 2 bên và biểu hiện với các mức độ khác nhau. Nồng độ TC và LDL-C tăng cao ở tất cả 26 bệnh nhi với các mức độ khác nhau, nồng độ HDL-C nằm trong giới hạn bình thường. Cụ thể, với  $n=25$  (không bao gồm bệnh nhi MS04): Nồng độ TC trung bình trong máu tăng cao ở mức  $12,17 \pm 4,77$  mmol/L (min: 6,1 mmol/L và max: 24,7 mmol/L). Tương tự nồng độ LDL-C trung bình trong máu của những bệnh nhi FH này cũng tăng cao rõ rệt và cao nhất là kết quả xét nghiệm LDL-C của bệnh nhi MS02 (20,6 mmol/L) và thấp nhất là 4,5 mmol/L, nồng độ TG và HDL-C trong giới hạn bình thường. Khi thêm số liệu xét nghiệm lipid máu của bệnh nhi MS04 để tính giá trị trung bình thì các chỉ số TC và LDL-C không thay đổi nhiều, chỉ có giá trị TG trung bình tăng cao, lý do nồng độ TG trong máu của bệnh nhi MS04 tăng cao bất thường với giá trị là 23,8 mmol/L.

Sàng lọc phân tầng phá hệ gia đình của 3 bệnh nhi có đột biến trong nhóm 26 bệnh nhi FH ban đầu, kết quả đã phát hiện được thêm 9 bệnh nhi có đột biến dạng dị hợp tử trên gen *LDLR*, tất cả 9 bệnh nhi đều không có biểu hiện trên lâm sàng như: U vàng, tăng huyết áp hay NMCT. Kết quả xét nghiệm lipid máu ở 9 bệnh nhi này được trình bày ở bảng 3.4.

**Bảng 3.4. Đặc điểm chỉ số lipid máu của nhóm bệnh nhi phát hiện FH trong quá trình nghiên cứu**

Phả hệ	stt	Mã BN	TC	LDL-C	HDL-C	TG
Phả hệ MS02	1	III.1	7,6	6,0	1,5	1,49
	2	III.5	4,1	2,9	1,2	0,61
	3	III.6	5,2	3,9	1,2	0,95
Phả hệ MS03	4	III.3	7,57	6,06	0,85	1,43
Phả hệ MS15	5	III.6	6,1	4,7	1,3	0,83
	6	III.6	7,0	5,6	1,3	1,65
	7	III.6	5,3	4,5	0,8	1,02
	8	III.6	6,9	5,3	1,1	1,85
	9	III.6	7,3	6,1	1,2	1,14
	n=9	$\bar{X} \pm SD$	6,34 $\pm$ 1,16	5,0 $\pm$ 1,04	1,16 $\pm$ 0,21	1,19 $\pm$ 0,4

Kết quả xét nghiệm lipid máu của nhóm 9 bệnh nhi có đột biến trong phả hệ cho thấy nồng độ TC và LDL-C trung bình đều tăng cao so với giá trị bình thường, với giá trị lần lượt là 6,34  $\pm$  1,16 mmol/L và 5,0  $\pm$  1,04 mmol/L, tuy nhiên trong 9 bệnh nhi này có 2 bệnh nhi có nồng độ TC và LDL-C bình thường hoặc chỉ tăng nhẹ.

**Bảng 3.5. So sánh chỉ số lipid máu của 2 nhóm bệnh nhi**

Nhóm bệnh nhi	TC (1) (mmol/L)	LDL-C (2) (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)
Nhóm 26 bệnh nhi	12,45 $\pm$ 4,88	9,85 $\pm$ 4,06	1,14 $\pm$ 0,33	2,38 $\pm$ 4,45
Nhóm 9 bệnh nhi	6,34 $\pm$ 1,16	5,0 $\pm$ 1,04	1,16 $\pm$ 0,21	1,19 $\pm$ 0,4
p	0,00	0,00	0,64	0,27

Bảng 3.5 cho thấy nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH ban đầu có chỉ số trung bình cholesterol máu toàn phần (12,45  $\pm$  4,88 mmol/L) và LDL-C (9,85

$\pm 4,06$  mmol/L) tăng cao, sự khác biệt về 2 chỉ số này so với nhóm 9 bệnh nhi phát hiện có đột biến trong phả hệ có ý nghĩa với  $p < 0,05$ , chỉ số HDL-C và TG không có sự khác biệt giữa 2 nhóm bệnh nhi này ( $p > 0,05$ ).

### 3.2. Xác định đột biến trên exon 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR*

#### 3.2.1. Tách DNA từ máu toàn phần

DNA của các đối tượng nghiên cứu được tách chiết theo quy trình bằng phương pháp Exgene Blood SV mini (GeneAll, Hàn Quốc). Sau khi tách chiết, các mẫu DNA được kiểm tra độ tinh sạch và nồng độ DNA bằng phương pháp đo mật độ quang học.

**Bảng 3.6. Kết quả đo độ tinh sạch và nồng độ DNA của 26 bệnh nhi FH ban đầu**

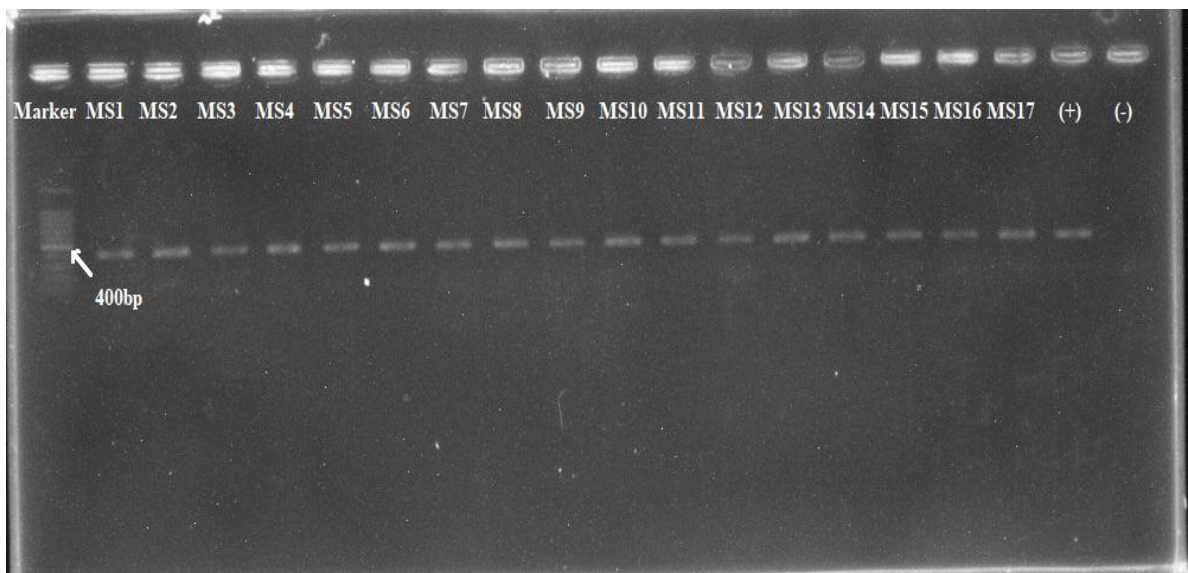
Bệnh nhi (mã số)	Nồng độ DNA ng/ $\mu$ l	Độ tinh sạch (A260/A280)	Bệnh nhi (mã số)	Nồng độ DNA ng/ $\mu$ l	Độ tinh sạch (A260/A280)
MS01	110,9	1,89	MS14	34,8	1,95
MS02	41,6	1,89	MS15	49,5	1,89
MS03	48,4	1,91	MS16	92,6	1,87
MS04	66,1	1,81	MS17	45,2	1,85
MS05	44,2	1,9	MS18	51,9	1,85
MS06	76,1	1,82	MS19	41,1	1,86
MS07	81,1	1,87	MS20	58,4	1,91
MS08	47,5	1,83	MS21	40,3	1,83
MS09	40,1	1,87	MS22	44,1	1,9
MS10	69,6	1,84	MS23	60,7	1,87
MS11	114,1	1,8	MS24	50,3	1,9
MS12	35,4	1,91	MS25	42,5	1,91
MS13	34,7	1,91	MS26	39,2	1,87

Kết quả bảng 3.6 cho thấy nồng độ DNA thấp nhất là 34,7 ng/ $\mu$ l, cao nhất là 114,1 ng/ $\mu$ l. Kết quả đo quang của tất cả các mẫu DNA đều đạt độ tinh sạch cao (OD260/OD280 nằm trong khoảng 1,8 – 2,0). Tất cả các kết quả DNA tách chiết đều đủ tiêu chuẩn để sử dụng cho các xét nghiệm khuếch đại và giải trình tự tiếp theo.

Kết quả độ tinh sạch và nồng độ DNA của 45 đối tượng nghiên cứu thuộc nhóm phả hệ 3 gia đình bệnh nhi mang đột biến trên exon 4, exon 9 gen *LDLR* (bệnh nhi MS02, MS03 và MS15) thu được trong quá trình nghiên cứu trình bày tại phụ lục 2.

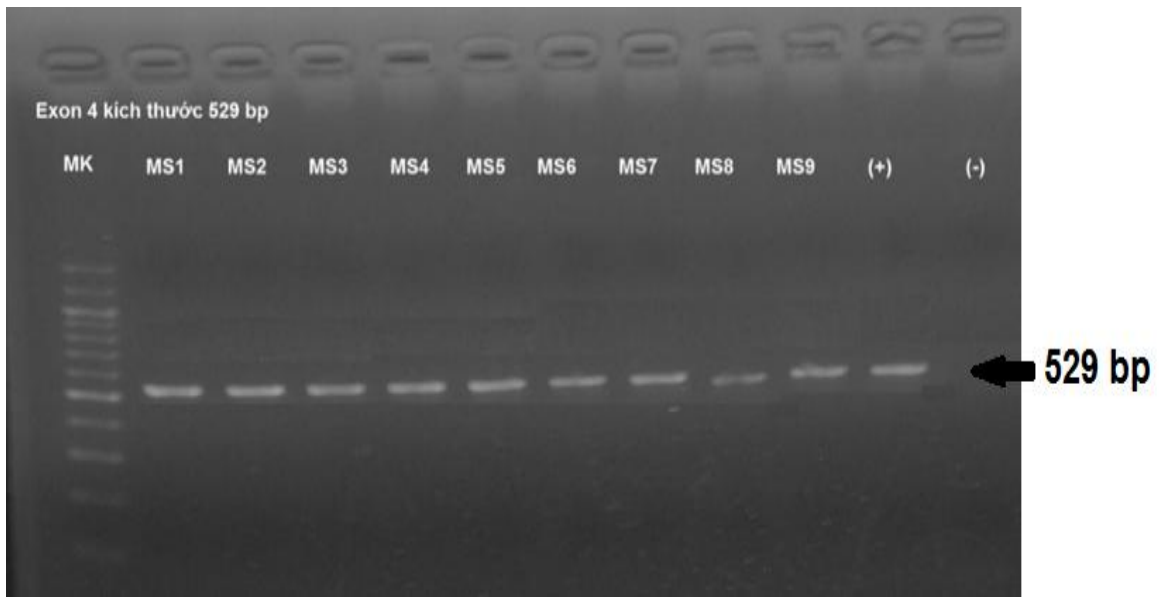
### 3.2.2. Phản ứng khuếch đại exon 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR*

Các exon 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi tự thiết kế đạt yêu cầu chất lượng, quá trình tự thiết kế mồi luôn đảm bảo tuân thủ chặt chẽ theo nguyên tắc thiết kế mồi (được mô tả cụ thể ở mục 2.2.4). Điện di trên gel agarose 1,5% để kiểm tra sản phẩm PCR, kết quả thu được như sau:



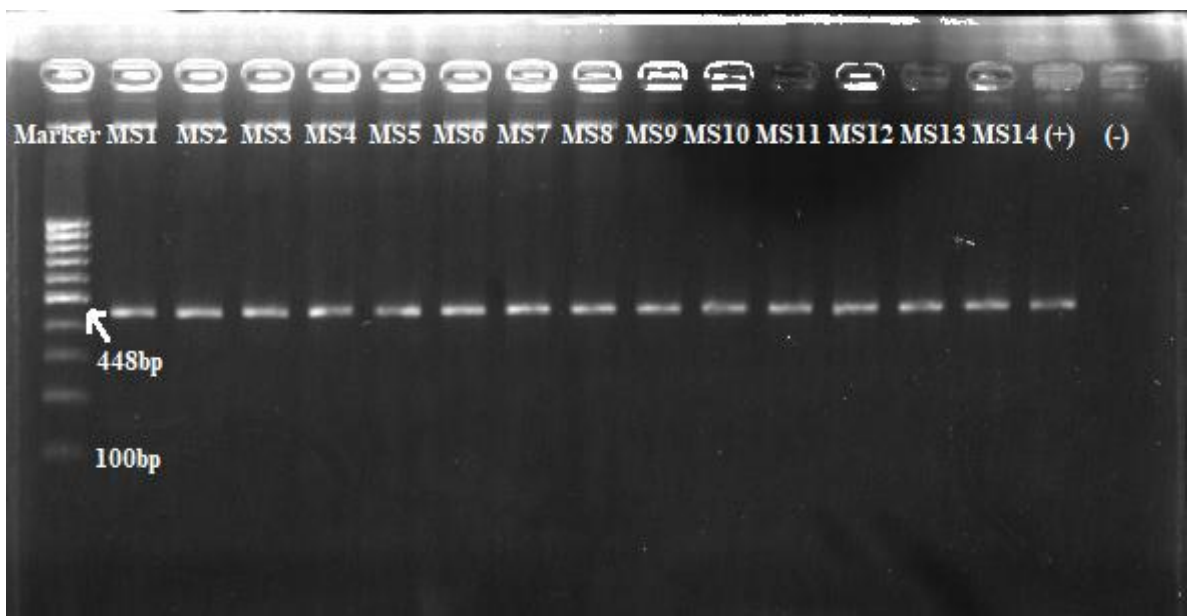
**Hình 3.1: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 3 với mồi *LDLR* (400 bp)**

Marker: 100 bp; (-): Chứng âm; (+): Chứng dương; MS1-MS17: Mẫu bệnh nhi từ MS1 → MS17



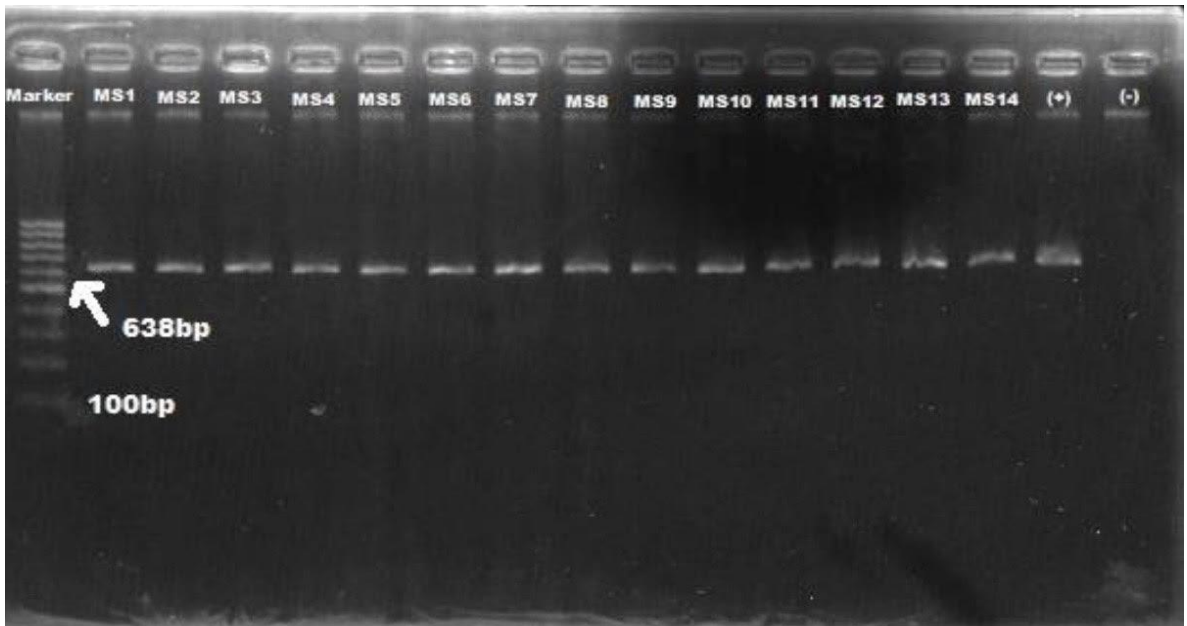
**Hình 3.2: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 4 với mỗi LDLR (529 bp)**

MK: Marker 100 bp; (-): Chứng âm; (+): Chứng dương; MS1-MS9: Mẫu bệnh nhi từ MS1 → MS9



**Hình 3.3: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 9 với mỗi LDLR (448 bp)**

Marker: 100 bp; (-): Chứng âm; (+): Chứng dương; MS1-MS14: Mẫu bệnh nhi từ MS1 → MS14



**Hình 3.4: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 13, 14 với mỗi LDLR (638 bp)**

Marker: 100 bp; (-): Chứng âm; (+): Chứng dương; 1-14: Mẫu bệnh nhi từ MS1 → MS14

Băng điện di của các exon 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR* ở các hình từ 3.1 – 3.4 thể hiện rõ nét, đúng kích thước, không có sản phẩm phụ. Mẫu đối chứng âm (-) không có sản phẩm khuếch đại PCR, chứng tỏ sản phẩm PCR không bị nhiễm sản phẩm ngoại lai. Các giếng của mẫu nghiên cứu đều xuất hiện sản phẩm khuếch đại của các exon có kích thước tương ứng với mẫu chứng dương, điều này cho thấy khuếch đại đúng sản phẩm và không có hiện tượng biến đổi bất thường trên các exon của các mẫu nghiên cứu. Các sản phẩm PCR này đủ chất lượng để tiến hành giải trình tự gen để xác định đột biến.

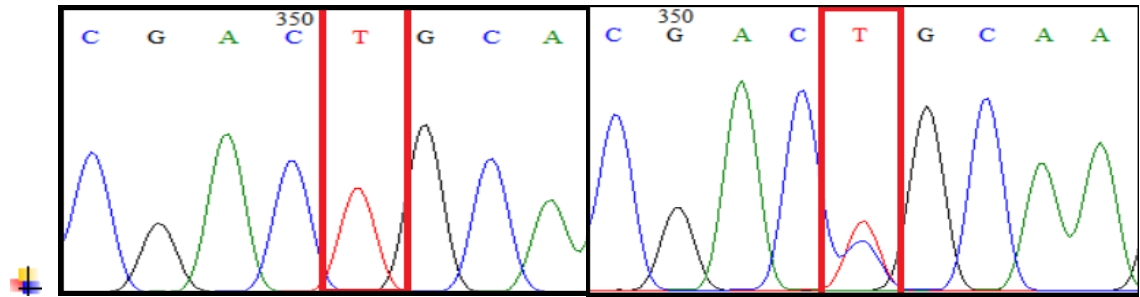
### **3.2.3. Kết quả giải trình tự exon 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR***

#### **3.2.3.1. Kết quả xác định đột biến gen *LDLR***

Các sản phẩm PCR của các exon 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR* được giải trình tự tự động trên máy Prism 3730xl - ABI (Mỹ) theo nguyên tắc Sanger. Các mẫu PCR của bệnh nhi được dùng mỗi xuôi hoặc ngược để phát hiện đột biến.

Kết quả giải trình tự nếu xuất hiện nghi ngờ đột biến thì sẽ được giải trình tự lại bằng môi còn lại để khẳng định đột biến. Sau đây là những hình ảnh kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm Sequencing Scanner 2.0 sau đó được so sánh với trình tự gen *LDLR* trên gene bank.

✚ Đột biến dị hợp tử trên exon 4 (c.664T>C)



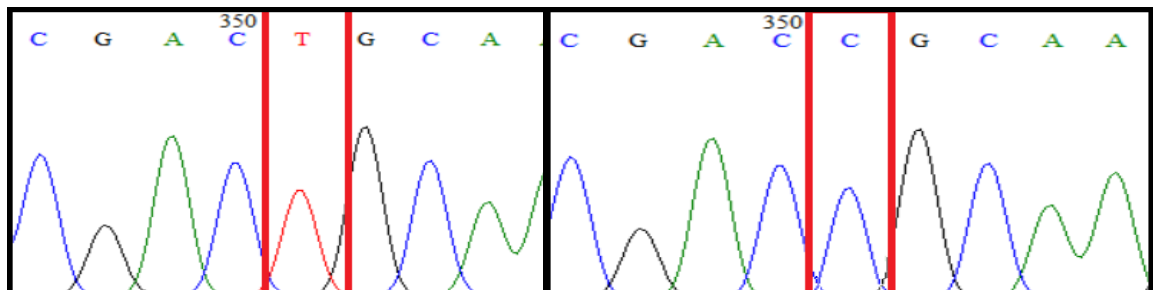
Bình thường c.664T

c.664T>C

**Hình 3.5. Hình ảnh đột biến c.664T>C trên exon 4 gen *LDLR***

Hình 3.5 cho thấy kết quả giải trình tự exon 4 gen *LDLR* mẫu MS02 thu được 2 đỉnh: màu đỏ và xanh da trời tương ứng với nucleotide Thymin và Cytosin của kiểu gen dị hợp tử TC tại vị trí c.664 trên exon 4 gen *LDLR*. Đột biến này gây ra sự thay đổi a.a ở vị trí 222 từ Cysteine thành Arginine. Đột biến này được tìm thấy trên 4 bệnh nhân trong nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH (MS02, MS03, MS08 và MS18).

✚ Đột biến đồng hợp tử trên exon 4 (c.664T>C)



Bình thường c.664T

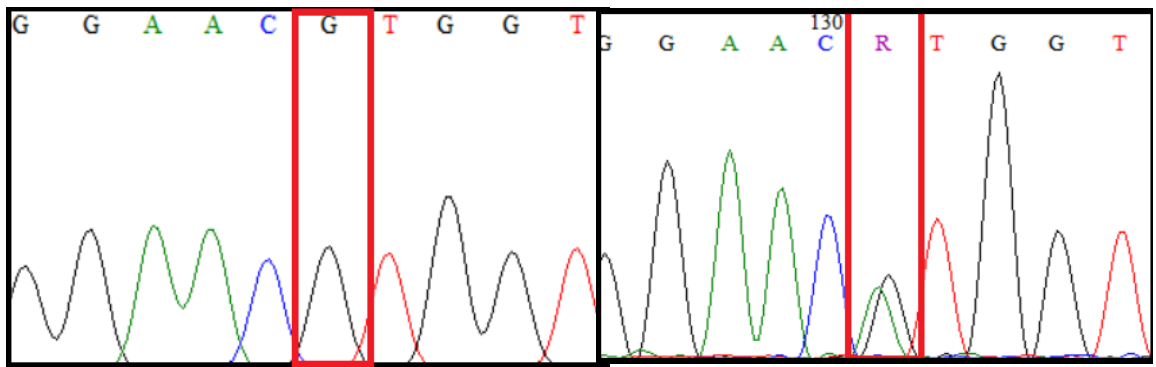
c.664T>C

**Hình 3.6. Hình ảnh đột biến đồng hợp tử c.664T>C trên exon 4 gen *LDLR***



Hình 3.6 thể hiện kết quả giải trình tự mẫu MS15 thu được 1 đỉnh duy nhất màu xanh da trời tương ứng với nucleotide Cytosin của kiểu gen đồng hợp tử CC tại vị trí c.664 trên exon 4 gen *LDLR*. Đột biến này gây ra sự thay đổi a.a từ Cysteine thành Arginine. Đột biến này được tìm thấy trên bệnh nhân MS15 trong nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH.

✚ Đột biến dị hợp tử trên exon 9 (c.1285G>A)



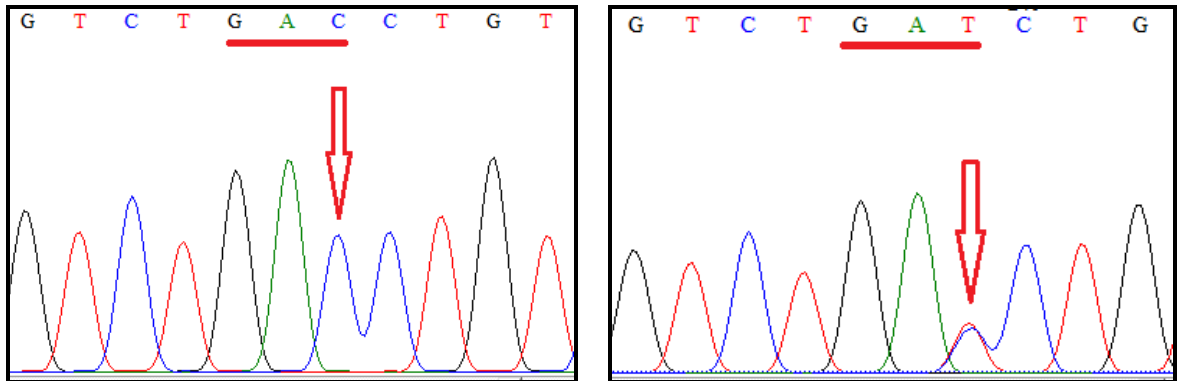
**Bình thường c.1285G**

**c.1285G>A**

**Hình 3.7. Hình ảnh đột biến c.1285G>A trên exon 9 gen *LDLR***

Hình 3.7 thể hiện kết quả giải trình tự trên exon 9, mẫu MS02 có 2 đỉnh: màu xanh lá và màu đen tương ứng với nucleotide Adenin và Guanin của kiểu gen dị hợp tử AG tại vị trí c.1285. Đột biến này gây ra sự thay đổi a.a ở vị trí 429 từ Valine thành Methionine. Đây là đột biến đã được công bố có tên là c.1285G>A và được tìm thấy trên bệnh nhân MS02 trong nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH.

✚ Đột biến dị hợp tử trên exon 9 (c.1335C>T)



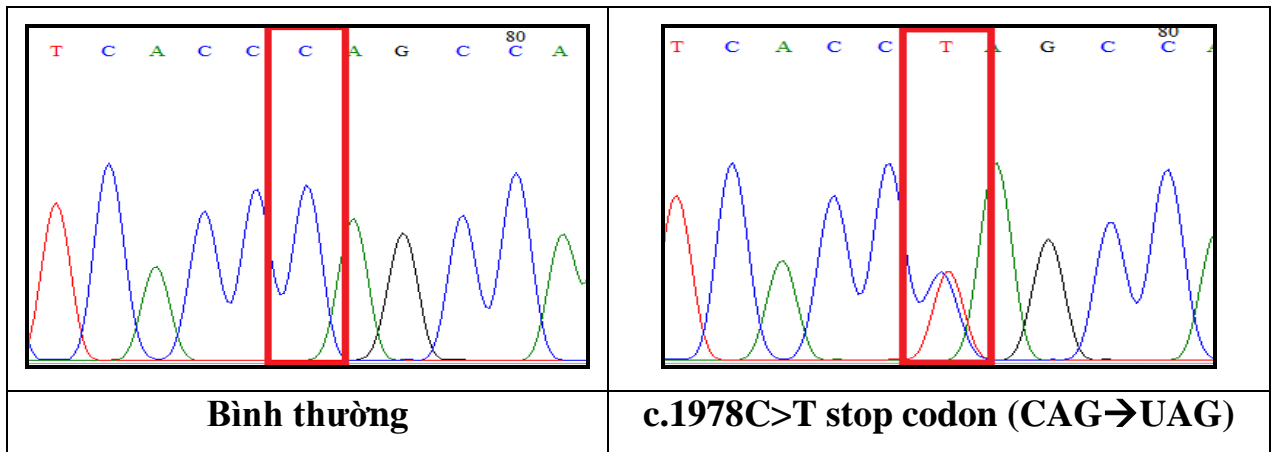
**Bình thường**

**c.1335C>T**

**Hình 3.8. Hình ảnh đột biến c.1335C>T trên exon 9 gen LDLR**

Hình 3.8 cho thấy kết quả giải trình tự mẫu MS19 thu được 2 đỉnh: màu đỏ và màu xanh da trời tương ứng với nucleotide Thymin và Cytosin của kiểu gen dị hợp tử TC tại vị trí nucleotide 1335 trên exon 9 gen *LDLR*. Đột biến c.1335C>T không gây ra sự thay đổi a.a và là đột biến mới chưa từng được công bố trước đây. Đột biến này được tìm thấy trên bệnh nhân MS19 trong nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH.

✚ Đột biến exon 13 (c.1978C>T)



**Bình thường**

**c.1978C>T stop codon (CAG→UAG)**

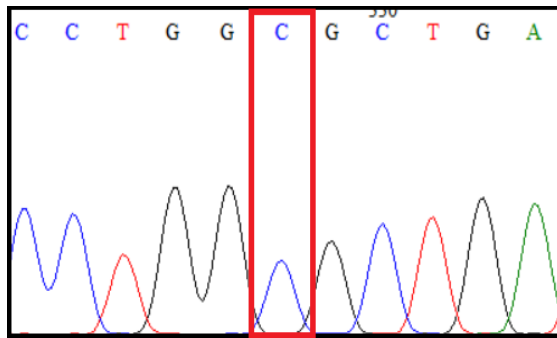
**Hình 3.9. Hình ảnh đột biến c.1978C>T**

Hình 3.9 cho thấy kết quả giải trình tự mẫu MS23 thu được 2 đỉnh: màu đỏ và màu xanh da trời tương ứng với nucleotide Thymin và Cytosin của kiểu

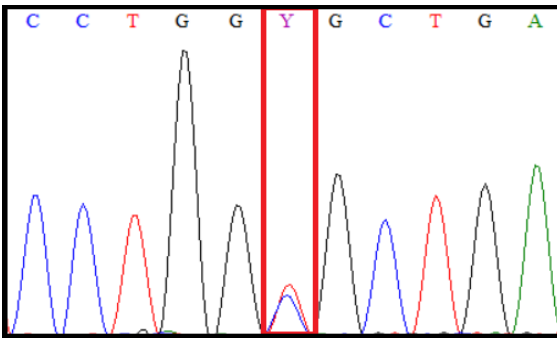
gen dị hợp tử TC tại vị trí nucleotide 1978 trên exon 13 gen *LDLR*. Trong đột biến này có sự thay thế từ nucleotide Cytosin thành Thymin, từ đó gây ra sự thay đổi bộ 3 mã hóa ở vị trí a.a 660, từ bộ ba CAG thay bằng UAG (UAG là 1 trong 3 bộ ba kết thúc). Đây là đột biến mới được phát hiện trong nghiên cứu có tên là c.1978C>T stop codon, là dạng đột biến vô nghĩa. Đột biến này được tìm thấy trên bệnh nhân MS23 trong nhóm 26 bệnh nhi FH.

### 3.2.3.2. Kết quả xác định các đa hình gen *LDLR*

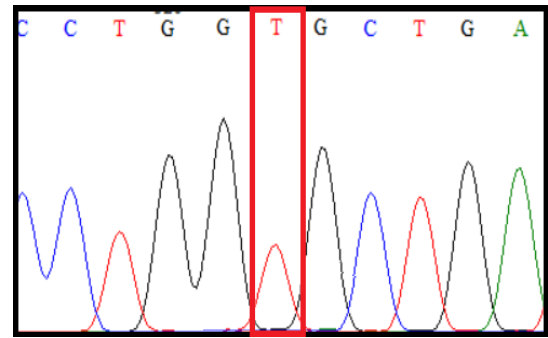
✚ Đa hình thái đơn SNP rs1003723 (intron 9)



(a) Bình thường



(b) c.1359-30C>T dị hợp tử



(c) c.1359-30C>T đồng hợp tử

**Hình 3.10. Hình ảnh SNP rs1003723 dị hợp tử và đồng hợp tử.**

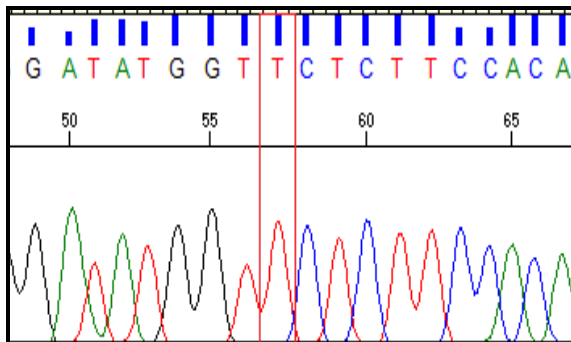
Hình (a) cho thấy kết quả giải trình tự tại vị trí nucleotide 1359 trên intron 9 gen *LDLR* (trước exon 9 một khoảng cách 30 nucleotide) bình thường sẽ thu được 1 đỉnh duy nhất màu xanh da trời tương ứng với nucleotide Cytosin.

Hình (b): Giải trình tự mẫu MS02 thu được 2 đỉnh: màu xanh màu đỏ và màu xanh da trời tương ứng với nucleotide Thymin và Cytosin của kiểu gen

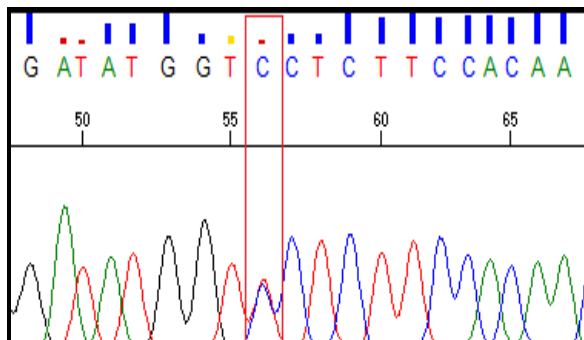
dị hợp tử TC tại vị trí c.1359-30 trên intron 9 gen *LDLR* (trước exon 9 một khoảng cách 30 nucleotide). Đây là SNP đã được công bố có tên là SNP rs1003723. SNP này được tìm thấy trên 11 bệnh nhi trong nhóm 26 bệnh nhi FH.

Hình (c): Kết quả giải trình tự mẫu MS15 có duy nhất 1 đỉnh màu đỏ tương ứng với nucleotide Thymin của kiểu gen đồng hợp tử TT tại vị trí c.1359-30. Đây là SNP đã được công bố có tên là SNP rs1003723. SNP này được tìm thấy trên bệnh nhân MS15 trong nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH.

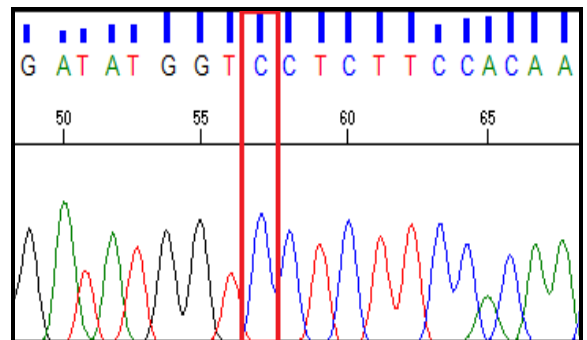
✚ Đa hình thái đơn SNP rs5925 (exon 13)



(a) Bình thường



(b) c.1959T>C dị hợp tử



(c) c.1959T>C đồng hợp tử

**Hình 3.11. Hình ảnh SNP rs5925 dị hợp tử và đồng hợp tử**

Hình (a) cho thấy kết quả giải trình tự tại vị trí nucleotide 1959 trên exon 13 gen *LDLR* ở mỗi xuôi bình thường sẽ thu được 1 đỉnh duy nhất màu đỏ tương ứng với nucleotide Thymin.

Hình (b): Giải trình tự mẫu MS02 thu được 2 đỉnh: Màu đỏ và màu xanh da trời tương ứng với nucleotide Thymin và Cytosin của kiểu gen dị hợp tử TC tại vị trí c.1959 trên exon 13 gen *LDLR*. Đây là SNP đã được công bố có tên là SNP rs5925, SNP này không làm thay đổi a.a (p.Val653Val) và được tìm thấy trên 7 bệnh nhân trong nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH.

Hình (c): Kết quả giải trình tự mẫu MS15 có duy nhất 1 đỉnh màu xanh da trời tương ứng với nucleotide Cytosin của kiểu gen đồng hợp tử CC. SNP này được tìm thấy trên bệnh nhân MS15 trong nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH.

### 3.2.3.3. Kết quả phân tích đặc điểm các đột biến và SNP

Kết quả giải trình tự trực tiếp các exon được so với trình tự gene bank mã NG\_009060 bằng công cụ ApE và Bioedit để xác định vị trí đột biến và SNP. Kết quả giải trình tự 5 exon phát hiện nhiều kiểu đột biến, SNP khác nhau xuất hiện trên nhóm bệnh nhi trong nghiên cứu bao gồm: Đột biến sai nghĩa, đột biến tạo mã kết thúc và SNP trên exon hay intron. Nhóm bệnh nhi có thể có kiểu gen đột biến dị hợp tử, đồng hợp tử, kết hợp các đột biến dị hợp tử hoặc có kết hợp với các SNP (bảng 3.7).

**Bảng 3.7. Các loại đột biến và SNP tìm thấy trong nghiên cứu**

STT	Mã BN	n*	Exon	Đột biến/SNP	n	Thể đột biến	Chú thích
1	MS02	9	E4	c.664T>C (p.C222R)	1	Dị hợp	Đột biến gây bệnh
			E9	c.1285G>A (p.V429M)		Dị hợp	Đột biến gây bệnh
			I9	c.1358+1-30C>T (rs1003723)		Dị hợp	SNP
			E13	c.1959T>C (rs5925)		Dị hợp	SNP
2	MS03	3	E4	c.664T>C (p.C222R)	3	Dị hợp	Đột biến gây bệnh
	MS08 MS18		I9	c.1358+1-30C>T (rs1003723)		Dị hợp	SNP
3	MS15	13	E4	c.664T>C (p.C222R)	1	Đồng hợp	Đột biến gây bệnh
			I9	c.1358+1-30C>T (rs1003723)		Đồng hợp	SNP
			E13	c.1959T>C (rs5925)		Đồng hợp	SNP
4	MS19		E9	c.1335C>T (p.D445D)	1	Dị hợp	Đột biến mới
5	MS23		E13	c.1978C>T (p.Q660*)	1	Dị hợp	Đột biến mới
6	MS06 MS14		I9	c.1358+1-30C>T (rs1003723)	4	Dị hợp	SNP
	MS17 MS22					E13	c.1959T>C (rs5925)
7	MS04		E13	c.1959T>C (rs5925)	1	Dị hợp	SNP
8	MS05 MS10		I9	c.1358+1-30C>T (rs1003723)	2	Dị hợp	SNP
Tổng		25	3 exon và 1 intron		14		

n\*: Bệnh nhân có đột biến trong phả hệ 3 gia đình

Bảng 3.7 cho thấy trong nhóm 26 bệnh nhi FH có 14 bệnh nhi mang các đột biến và SNP trên một số exon được phân tích của gen *LDLR*:

- Đột biến c.664T>C trên exon 4 có ở 5 bệnh nhi (MS02, MS03, MS08, MS15 và MS18), đây là đột biến đã được công bố, trong đó 4/5 bệnh nhi là đột biến dị hợp tử và 1 bệnh nhi mang đột biến đồng hợp tử.

- Đột biến c.1285G>A và c.1335C>T dạng dị hợp tử cùng trên exon 9, trong đó đột biến c.1285G>A là đột biến đã được công bố và tìm thấy trên 1 bệnh nhi; c.1335C>T là đột biến mới chưa được công bố và phát hiện trên 1 bệnh nhi khác trong nhóm 26 bệnh nhi FH.

- Đột biến c.1978C>T dạng dị hợp tử trên exon 13 được phát hiện ở 1 bệnh nhi, là đột biến mới chưa được công bố, đây là đột biến stop codon - loại đột biến vô nghĩa.

- SNP rs1003723 trên intron 9 có ở 11 bệnh nhi, SNP này có thể xuất hiện ở dạng đồng hợp tử (01 bệnh nhi) hoặc dị hợp tử (10 bệnh nhi); SNP rs1003723 có thể xuất hiện đơn lẻ hoặc phối hợp cùng đột biến hoặc SNP khác.

- SNP rs5925 trên exon 13 được phát hiện ở 7 bệnh nhi, SNP này có thể xuất hiện ở dạng đồng hợp tử (ở 1 bệnh nhi) hoặc dị hợp tử (ở 6 bệnh nhi); SNP rs5925 có thể xuất hiện đơn lẻ (ở 1 bệnh nhi) hoặc phối hợp cùng đột biến hoặc SNP khác.

Phân tích đột biến chi tiết trên nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH ban đầu cho thấy có những bệnh nhi mang nhiều đột biến và SNP, có bệnh nhi chỉ mang 1 đột biến hoặc chỉ mang 1 SNP, cụ thể kết quả phân tích đột biến trên từng bệnh nhi như sau:

- Bệnh nhi MS02 phát hiện đồng thời 2 đột biến dị hợp tử c.664T>C (exon 4) và đột biến dị hợp tử c.1285G>A (exon 9). Hai đột biến này từng được công bố trước đây và được cho là liên quan tới bệnh FH. Cùng với đó bệnh nhân MS02 xuất hiện 2 SNP rs5925 (exon 13) và rs1003723 (intron 9) đều ở dạng dị hợp tử.

- Bệnh nhi MS15 phát hiện đột biến dạng đồng hợp tử c.664T>C (exon 4), kèm theo 2 SNP rs5925 và rs1003723 cũng được phát hiện dưới dạng đồng hợp tử.

- Có 3 bệnh nhi MS03, MS08, MS18 cùng phát hiện đột biến c.664T>C kết hợp SNP rs1003723 ở dạng dị hợp tử.

- Bệnh nhân MS19 phát hiện đột biến dị hợp tử c.1335C>T trên exon 9;

- Bệnh nhi MS23 phát hiện đột biến c.1978C>T dị hợp tử trên exon 13 là một đột biến tạo ra stop codon.

- 7 bệnh nhi chỉ có SNP dạng dị hợp tử:

SNP rs1003723 (MS05, MS10) hoặc rs5925 (MS04) hoặc kết hợp cả 2 SNP (MS06, MS14, MS17, MS27).

Khi phân tích phả hệ, trên exon 4, chúng tôi phát hiện thêm 20 bệnh nhân có đột biến c.664T>C dạng dị hợp tử, những bệnh nhân này mang đột biến trùng với đột biến của các bệnh nhi đã phát hiện đột biến trong cây phả hệ tương ứng. Tương tự trên exon 9, cũng phát hiện thêm 5 bệnh nhân mang đột biến c.1285G>A ở dạng dị hợp tử giống với đột biến trên exon 9 gen *LDLR* của bệnh nhi MS02.

#### 3.2.3.4. Kết quả các chỉ số lipid máu trên bệnh nhi phát hiện đột biến và SNP

Các xét nghiệm TC, LDL-C, HDL-C, TG được thực hiện tại thời điểm bệnh nhân vào viện và được chẩn đoán bệnh FH theo tiêu chuẩn của Simon Broome. Tiêu chuẩn xét nghiệm lipid máu để chẩn đoán bệnh FH và lựa chọn vào nhóm bệnh nhi trong nghiên cứu của chúng tôi bao gồm chỉ số TC > 6,7 mmol/L, LDL-C > 4,0 mmol/L. Kết hợp giữa kết quả đột biến gen *LDLR* và kết quả xét nghiệm lipid máu, nhóm nghiên cứu phân tích đặc điểm các chỉ số này ở 26 bệnh nhi FH qua các bảng sau:



**Bảng 3.8. Đặc điểm các chỉ số lipid máu**

Nhóm Bệnh nhi		n	TC	LDL-C
			$\bar{X} \pm SD$ (mmol/L)	$\bar{X} \pm SD$ (mmol/L)
Có đột biến	Có SNP	5	14,98 ± 6,75	12,3 ± 5,65
	Không SNP	2	15,64 ± 3,99	12,44 ± 2,0
	<b>Tổng (1)</b>	<b>7</b>	<b>15,17 ± 5,8</b>	<b>12,34 ± 4,68</b>
Không đột biến	Có SNP	7	14,69 ± 4,09	11,66 ± 3,09
	Không SNP (2)	12	9,55 ± 3,1	7,34 ± 2,7
	<b>Tổng (3)</b>	<b>19</b>	<b>11,44 ± 4,23</b>	<b>8,93 ± 3,5</b>
p(1) & (2)			0,04	0,01
p(1) & (3)			0,188	0,06

Bảng 3.8 cho thấy 7 bệnh nhi FH mang đột biến gen *LDLR* có nồng độ chỉ số TC và LDL-C trong máu cao hơn rõ rệt so với giá trị trung bình của 2 chỉ số này ở nhóm bệnh nhi không phát hiện đột biến và không có SNP, sự khác biệt có ý nghĩa với  $p < 0,05$ . Tuy nhiên khi so sánh 2 chỉ số này ở nhóm có đột biến và không đột biến (tổng) thì không có sự khác biệt với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.9. Đặc điểm về các chỉ số lipid máu giữa nhóm đột biến dạng nặng với nhóm đột biến dị hợp tử**

Mã	Đột biến	Tuổi	Giới	Lipid máu (mmol/L)			
				TC	LDL-C	HDL-C	TG
MS03	Đột biến dị hợp tử	5	Nam	8,5	6,7	1,1	1,62
MS08		5	Nữ	10,4	8,7	1,4	0,6
MS18		13	Nam	12,2	10,1	0,7	2,79
MS19		7	Nữ	12,53	11,02	1,14	0,82
<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>				<b>10,91±1,86</b>	<b>9,13±1,88</b>	<b>1,09±0,29</b>	<b>1,46±0,99</b>
MS02	Đột biến đồng hợp tử	10	Nam	24,7	20,6	1,3	1,2
MS15	Đột biến dị hợp tử kết hợp	5	Nữ	19,1	15,4	1,72	1,3
MS23	Đột biến stop codon	5	Nữ	18,75	13,86	1,1	1,25
<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>				<b>20,85±3,34</b>	<b>16,62±3,53</b>	<b>1,37±0,32</b>	<b>1,25±0,05</b>
<b>p</b>				<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,26</b>	<b>0,74</b>

Bảng 3.9 thể hiện nhóm đột biến dạng nặng (bao gồm đột biến đồng hợp tử, dị hợp tử kết hợp hay stop codon) có nồng độ cholesterol toàn phần ( $20,85 \pm 3,34$  mmol/L) và LDL-C ( $16,62 \pm 3,53$  mmol/L) cao hơn hẳn so với nhóm đột biến dị hợp tử gen *LDLR* với tương ứng 2 chỉ số lipid này là  $10,91 \pm 1,86$  mmol/L và  $9,13 \pm 1,88$  mmol/L. Sự khác biệt có ý nghĩa với  $p < 0,05$ . Các chỉ số HDL-C và TG không thấy có sự khác biệt ở 2 nhóm bệnh nhi này.

### 3.3. Kết quả phân tích phả hệ

Từ các đột biến được xác định ở 7 bệnh nhi trong nhóm nghiên cứu được trình bày ở phần 3.2.3, chúng tôi đã được sự chấp thuận của 3 gia đình bệnh nhi MS02, MS03, MS15 cho thực hiện nghiên cứu ở các thành viên, các thành viên trong phả hệ 3 gia đình được khám, xét nghiệm máu và phát hiện đột biến gen *LDLR* với các kết quả được trình bày chi tiết ở từng phả hệ như sau:

#### 3.3.1. Phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 và MS08

Bệnh nhi MS02 và MS08 là hai anh em ruột cùng đến khám và điều trị tại bệnh viện Nhi Trung ương. Mức độ biểu hiện trên lâm sàng và các chỉ số xét nghiệm rất khác nhau ở hai bệnh nhi này.

##### ✚ Chẩn đoán bệnh nhi MS02

Bệnh nhân nam sinh năm 2006 vào viện vì xuất hiện nhiều u, mảng sần màu vàng dưới da vùng khớp gối 2 bên. Phát hiện các u vàng từ 4 tháng tuổi.



(a)

(b)

(c)

**Hình 3.12. Hình ảnh u vàng ở da bệnh nhi MS02**

(a) vùng mông

(b) đầu gối

(c) da khuỷu tay.

Tình trạng bệnh nhi MS02 lúc vào viện: Có nhiều u vàng ở 2 bên mắt, khuỷu tay, khớp gối 2 bên. Kết quả xét nghiệm máu thời điểm vào viện: TC máu tăng cao (24,7 mmol/L); LDL-C tăng cao (20,6 mmol/L).

#### *Chẩn đoán bệnh nhi MS08*

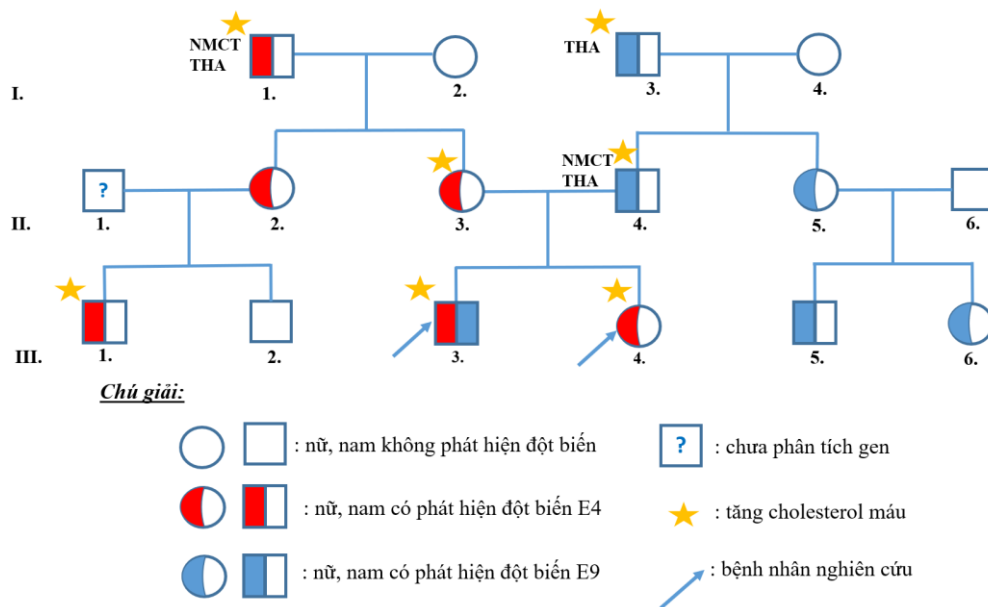
Bệnh nhi MS08 không có các biểu hiện trên lâm sàng như: Tăng huyết áp, u vàng, đau ngực, tuy nhiên kết quả xét nghiệm chỉ số TC và LDL-C trong máu tăng cao kết hợp với tiền sử gia đình nên đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH theo tiêu chuẩn của Simon Broome.

#### *Tiền sử gia đình*

Bố của bệnh nhi từng phát hiện NMCT đã được điều trị bằng thuốc tiêu sợi huyết từ tháng 8.2016 khi 36 tuổi. Ông ngoại của bệnh nhi được chẩn đoán NMCT và đặt 3 stent từ tháng 6.2019 (64 tuổi). Phân tích các biểu hiện lâm sàng rõ ràng của bệnh nhi MS02 kết hợp với tiền sử gia đình, nhóm nghiên cứu đã tư vấn di truyền bệnh FH cho gia đình MS02.

Giải trình tự 5 exon (exon 3, 4, 9, 13, 14) gen *LDLR* của 2 bệnh nhi MS02 và MS08 đã phát hiện 2 loại đột biến dị hợp tử: c.664T>C nằm trên exon 4 (hình 3.5) và c.1285G>A nằm trên exon 9 (hình 3.7). Tiếp theo chúng tôi phân tích xác định 2 loại đột biến này trên exon 4 và exon 9 gen *LDLR* ở các thành viên trong phả hệ gia đình 2 bệnh nhi này. Kết quả phân tích lâm sàng, cận lâm sàng được trình bày ở bảng 3.10 và kết quả xác định đột biến gen theo phả hệ ở hình 3.13.

✚ Phả hệ gia đình



**Hình 3.13. Đột biến exon 4, 9 ở phả hệ gia đình bệnh nhi MS02**

Hình 3.13 cho thấy phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 gồm 3 thế hệ với 16 thành viên, trong đó có 15 thành viên tham gia nghiên cứu, tỉ lệ di truyền bệnh trong phả hệ tính ở 12/15 thành viên tham gia nghiên cứu. Kết quả phân tích đột biến trên exon 4, exon 9 gen *LDLR* ở các thành viên đã xác định được 2 loại đột biến dị hợp tử trên gen *LDLR* đó là c.664T>C và c.1285 G>A, 2 đột biến này đã được xác định trước đó ở bệnh nhi MS02. Kết quả có 11 thành viên tham gia nghiên cứu mang đột biến bao gồm: 5 thành viên mang đột biến dị hợp tử trên exon 4; 5 thành viên mang đột biến dị hợp tử trên exon 9 và bệnh nhi MS02 mang cả 2 đột biến dạng dị hợp tử trên exon 4 và exon 9 gen *LDLR*, mô tả chi tiết kiểu di truyền của từng loại đột biến như sau:

- Đột biến trên exon 4 - c.664T>C xuất hiện ở ông ngoại (I.1) và di truyền cho mẹ (II.3) và bác ruột (II.2) của bệnh nhi, sau đó tiếp tục di truyền cho bệnh nhi (III.3) và em gái (III.4) của bệnh nhi. Một người anh họ (III.1) của

bệnh nhi nhận đột biến c.664T>C từ bác ruột (II.2) của bệnh nhi; 1 người con út (III.2) của bác ruột bệnh nhi không phát hiện có đột biến.

- Đột biến exon 9 - c.1285G>A tìm thấy ở ông nội (I.3) di truyền cho bố (II.4) và cô ruột (II.5) của bệnh nhi. Bệnh nhi MS02 và hai người em họ (III.5 và III.6) đều nhận đột biến c.1285G>A từ bố và cô của bệnh nhi. Bà ngoại (I.2) và bà nội (I.4) của bệnh nhi đều không phát hiện thấy đột biến trên exon 4 và exon 9 gen *LDLR*.

Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 cho thấy 10 thành viên có quan hệ huyết thống bậc 1, 2, 3 với bệnh nhi MS02 mang đột biến, cụ thể:

***Đột biến trên exon 9:***

*Họ hàng bậc 1:* Bao gồm bệnh nhân II.4 và III.4; có 1/2 thành viên (50%) mang đột biến; 1/2 thành viên có NMCT.

*Họ hàng bậc 2:* Bao gồm bệnh nhân I.3 và II.5; cả 2 thành viên (100%) mang đột biến; 1/2 thành viên không tăng lipid máu.

*Họ hàng bậc 3:* Bao gồm bệnh nhân III.5 và III.6; cả 2 thành viên (100%) mang đột biến và 2 thành viên này đều không tăng lipid máu.

***Đột biến trên exon 4:***

*Họ hàng bậc 1:* Bao gồm bệnh nhân II.3 và III.4; cả 2 thành viên (100%) mang đột biến.

*Họ hàng bậc 2:* Bao gồm bệnh nhân I.1 và II.2; cả 2 thành viên (100%) mang đột biến, trong đó 1 thành viên không tăng lipid máu, 1 thành viên có NMCT.

*Họ hàng bậc 3:* Bao gồm bệnh nhân III.1 và III.2; có 1/2 thành viên (50%) mang đột biến.

**Bảng 3.10. Một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS02**

STT	Mã	Tuổi	Giới	Lipid máu (mmol/L)				U vàng	Đau ngực/ NMCT	THA
				TC	LDL-C	HDL-C	TG			
1	I.1	61	Nam	8,3	5,9	1,1	1,6	-	+	+
2	I.2	60	Nữ	3,8	2,0	1,5	1,6	-	-	-
3	I.3	64	Nam	7,4	6,3	1,2	1,38	-	-	+
4	I.4	58	Nữ	3,2	1,8	1,2	0,96	-	-	-
5	II.2	35	Nữ	5,7	3,9	1,9	1,06	-	-	-
6	II.3	33	Nữ	8,1	5,6	2,3	0,6	-	-	-
7	II.4	36	Nam	10,4	8,7	1,6	1,4	+	+	+
8	II.5	34	Nữ	6,4	4,8	1,2	1,94	-	-	-
9	II.6	36	Nam	4,8	1,2	1,1	1,7	-	-	-
10	III.1	9	Nam	7,6	6,0	1,5	1,49	-	-	-
11	III.2	2	Nam	3,3	2,0	1,2	0,84	-	-	-
12	III.4 (MS08)	5	Nữ	10,4	8,7	1,4	0,6	-	-	-
13	III.5	9	Nam	4,1	2,9	1,2	0,61	-	-	-
14	III.6	6	Nữ	5,2	3,9	1,2	0,95	-	-	-
15	III.3 (MS02)	10	Nam	24,7	20,6	1,3	1,2	+	-	-

Có 11 thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 tham gia nghiên cứu được xác định mang đột biến trên exon 4, exon 9 gen *LDLR*. Trong đó bệnh nhân I.3 (ông nội của bệnh nhi) mang đột biến trên exon 9, có tăng huyết áp trên lâm sàng. Bố của bệnh nhi MS02 (II.4) nhận đột biến trên exon 9 từ ông nội của bệnh nhi, trên lâm sàng vừa có u vàng trên da, THA và NMCT ở thời điểm trước nghiên cứu (năm 2016; 36 tuổi).

Bệnh nhân I.1 (ông ngoại của bệnh nhi) mang đột biến trên exon 4, có tăng huyết áp và NMCT và đã đặt 3 stent năm 64 tuổi. Mẹ bệnh nhi (II.3) nhận đột biến trên exon 4 từ ông ngoại bệnh nhi, tuy nhiên trên lâm sàng không có u vàng, 2 chỉ số TC và LDL-C tăng trong máu. Bệnh nhi MS02 (III.3) nhận 2 đột biến từ bố và mẹ (đột biến dị hợp tử kết hợp), chính vì vậy biểu hiện u vàng trên lâm sàng ở bệnh này rất điển hình và kết quả TC và LDL-C trong máu tăng rất cao tương ứng là 24,7 mmol/L và 20,6 mmol/L. Hầu hết các thành viên mang đột biến trên exon 4 hay exon 9 đều có tăng TC và LDL-C, tuy nhiên có 4 thành viên mang đột biến nhưng chỉ số lipid máu hoàn toàn bình thường hoặc chỉ tăng nhẹ (II.2; II.5; III.5 và III.6).

**Bảng 3.11. So sánh chỉ số lipid máu giữa các thành viên mang 2 đột biến khác nhau**

Thành viên	Tuổi	Họ ngoại (exon 4) n=5		Thành viên	Tuổi	Họ nội (exon 9) n=5		p
		TC(1)	LDL-C (2)			TC (3)	LDL-C (4)	
I.1	61	8,3	5,9	I.3	64	7,4	6,3	
II.2	35	5,7	3,9	II.4	36	10,4	8,7	
II.3	33	8,1	5,6	II.5	34	6,4	4,8	
III.1	9	7,6	6,0	III.5	9	4,1	2,9	
III.4	5	10,4	8,7	III.6	6	5,2	3,9	
$\bar{X} \pm SD$ mmol/L)		8,02±1,68	6,02±1,72			7,44±3,92	5,94±3,51	p(1)&(3)=0,34 p(2)&(4)=0,6

Bảng 3.11 thể hiện số thành viên trong gia đình họ nội và họ ngoại mang gen đột biến gây bệnh trên exon 4 và exon 9 gen *LDLR* chiếm tỉ lệ cao, cụ thể: Có 5 thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 mang đột biến trên exon 4 (họ ngoại) và cũng có 5 thành viên mang đột biến trên exon 9 (họ nội)



gen *LDLR*. Chỉ số TC và LDL-C trung bình ở cả 2 nhóm đều tăng gấp khoảng 2 lần so với giá trị bình thường, sự khác biệt của 2 chỉ số này ở 2 nhóm đột biến exon 4 và exon 9 không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.12. Đặc điểm các chỉ số lipid máu giữa nhóm đột biến dị hợp tử và không đột biến**

Đột biến	TC	LDL-C	HDL-C	TG
	$\bar{X} \pm SD$ (mmol/L)			
(1) Đột biến dị hợp tử kết hợp (n=1)	24,7	20,6	1,3	1,2
(2) Có đột biến dị hợp tử (n= 10)	$7,36 \pm 2,08$	$5,67 \pm 1,93$	$1,47 \pm 0,38$	$1,22 \pm 0,43$
(3) Không phát hiện đột biến (n= 4)	$3,78 \pm 0,73$	$1,75 \pm 0,38$	$1,25 \pm 0,17$	$1,27 \pm 0,44$
$p^{(2)\&(3)}$	0,00	0,00	0,45	0,65

Bảng 3.12 cho thấy nhóm đột biến dị hợp tử trên exon 4, exon 9 gen *LDLR* có kết quả 2 chỉ số TC và LDL-C trong máu cao, lần lượt các giá trị là 7,36 mmol/L và 5,67 mmol/L. Trong khi đó nhóm không có đột biến có kết quả TC và LDL-C trong giới hạn bình thường, sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh 2 chỉ số này ở 2 nhóm có đột biến dị hợp tử và không có đột biến ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.2. Phả hệ gia đình bệnh nhi MS03

#### Chẩn đoán bệnh nhi MS03

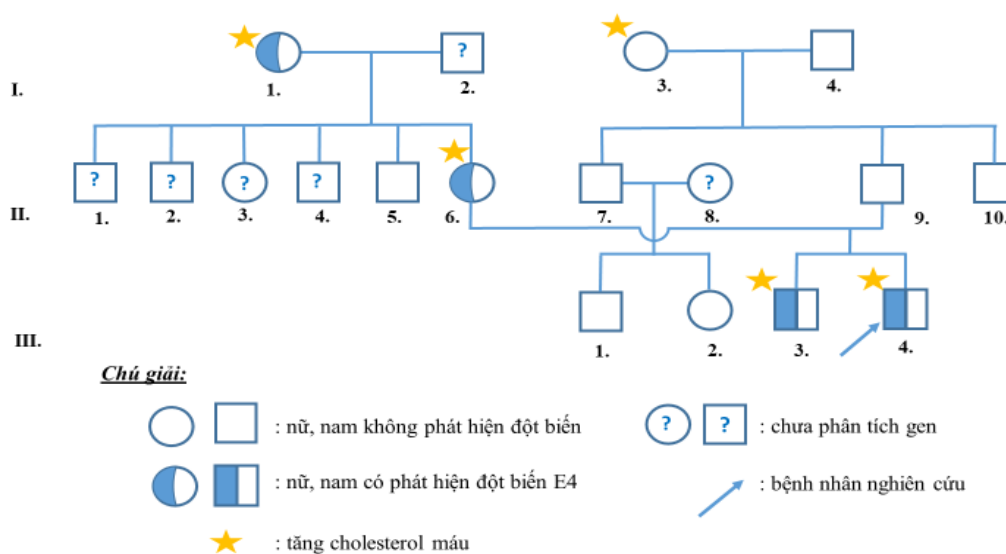
Bệnh nhân nam, sinh năm 2011, bệnh nhi vào viện vì xuất hiện 1 vài u vàng dưới da cánh tay, khuỷu tay. Bệnh nhi MS03 xuất hiện u vàng vào năm 5 tuổi. Kết quả xét nghiệm máu thời điểm lúc vào viện: TC 8,5 mmol/L; LDL-C 6,7 mmol/L.



**Hình 3.14. Hình ảnh u vàng ở da bệnh nhi MS03  
(vùng khuỷu tay và cánh tay)**

Tiến hành giải trình tự 5 exon (exon 3, 4, 9, 13, 14) gen *LDLR* của bệnh nhi MS03 phát hiện có đột biến c.664T>C dị hợp tử trên exon 4, đột biến này đã được công bố và được cho là đột biến gây bệnh [105]. Tiếp theo nhóm nghiên cứu phân tích xác định loại đột biến này trên exon 4 gen *LDLR* ở các thành viên còn lại trong gia đình bệnh nhi MS03.

**Phả hệ gia đình bệnh nhi MS03**



**Hình 3.15. Đột biến trên exon 4 phả hệ gia đình bệnh nhi MS03**

Hình 3.15 cho thấy phả hệ 3 thế hệ trong gia đình bệnh nhi MS03 (III.4) gồm 18 thành viên trong đó có 12 thành viên tham gia nghiên cứu. Các thành viên tham gia nghiên cứu được thực hiện xét nghiệm một số chỉ số hóa sinh máu và phân tích xác định đột biến trên exon 4 gen *LDLR*. Do điều kiện địa lý

và hoàn cảnh gia đình nên có 4 thành viên trong phả hệ gia đình có mối quan hệ bậc 2 với bệnh nhi MS03 không tham gia nghiên cứu (II.1; II.2; II.3 và II.4). Tỷ lệ di truyền bệnh trong phả hệ tính ở 5/12 thành viên, kết quả giải trình tự xác định đột biến có 4 thành viên trong phả hệ gia đình mang đột biến dị hợp tử trên exon 4 gen *LDLR*. Bệnh nhân MS03 nhận đột biến c.664

T>C dị hợp tử theo họ mẹ điển hình di truyền gen trội trên nhiễm sắc thể thường. Bà ngoại (I.1), mẹ (II.6) và anh trai (III.3) bệnh nhi đều mang đột biến cùng loại và có tăng cholesterol máu.

Đột biến dị hợp tử trên exon 4 gen *LDLR* ở phả hệ gia đình bệnh nhi MS03 được phát hiện ở 3 thành viên có quan hệ huyết thống bậc 1, 2 với bệnh nhi, cụ thể: Họ hàng bậc 1 gồm có bệnh nhân II.6 và III.3; cả 2 thành viên này đều mang đột biến (100%); họ hàng bậc 2 gồm có bệnh nhân I.1 và II.5; có 1/2 thành viên mang đột biến (50%).

**Bảng 3.13. Một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS03**

STT	Mã	Tuổi	Giới	Lipid máu (mmol/L)				U vàng	Đau ngực/ NMCT	THA
				TC	LDL-C	HDL-C	TG			
1	I.1	75	Nữ	8,1	4,7	0,8	7,33	-	-	-
2	I.3	67	Nữ	7,4	5,2	1,2	3,28	-	-	-
3	I.4	69	Nam	4,5	2,9	0,7	2,82	-	-	-
4	II.5	49	Nam	4,8	3,1	0,9	3,23	-	-	-
5	II.6	35	Nữ	7,0	5,0	1,4	1,1	-	-	-
6	II.7	42	Nam	6,83	4,82	1,49	0,92	-	-	-
7	II.9	39	Nam	6,0	3,8	1,1	3,56	-	-	-
8	II.10	34	Nam	5,7	4,1	1,2	1,49	-	-	-
9	III.1	4	Nữ	3,5	2,1	1,3	0,98	-	-	-
10	III.2	2	Nữ	5,0	3,5	1,4	1,71	-	-	-
11	III.3	11	Nam	7,57	6,06	0,85	1,43	-	-	-
12	III.4 (MS03)	5	Nam	7,35	5,48	1,03	2,03	+	-	-

Bảng 3.13 cho thấy trong 4 thành viên tính theo tỉ lệ di truyền bệnh của phá hệ gia đình bệnh nhi MS03 có 3 thành viên mang đột biến trên exon 4 gen *LDLR* nhưng không có biểu hiện triệu chứng trên lâm sàng như tăng huyết áp, u vàng, đau ngực hay NMCT, chỉ có duy nhất bệnh nhi MS03 (III.4) có biểu hiện u vàng trên lâm sàng với số lượng ít và chủ yếu ở vùng cánh tay và khuỷu tay. Ở cả 3 thế hệ đều có các thành viên có tăng các chỉ số lipid máu với mức độ gấp 2-3 lần so với giá trị bình thường. Cả 4 thành viên mang đột biến dị hợp tử trên exon 4 gen *LDLR* đều tăng TC và LDL-C. Một thành viên bên họ nội của bệnh nhi (I.3) tăng TC máu nhưng không tìm thấy đột biến trên exon 4 gen *LDLR*.

### 3.3.3. Phá hệ gia đình bệnh nhi MS15

#### Chẩn đoán bệnh nhi MS15

Bệnh nhân nữ sinh năm 2011 vào viện vì xuất hiện nhiều u vàng dưới da vùng mông và khớp gối 2 bên, cổ tay và khuỷu tay 2 bên. Khoảng 1 tuổi bệnh nhi đã xuất hiện u vàng dưới da.



**Hình 3.16. Hình ảnh u vàng ở da bệnh nhi MS15**  
(vùng mông, đầu gối, khuỷu tay)

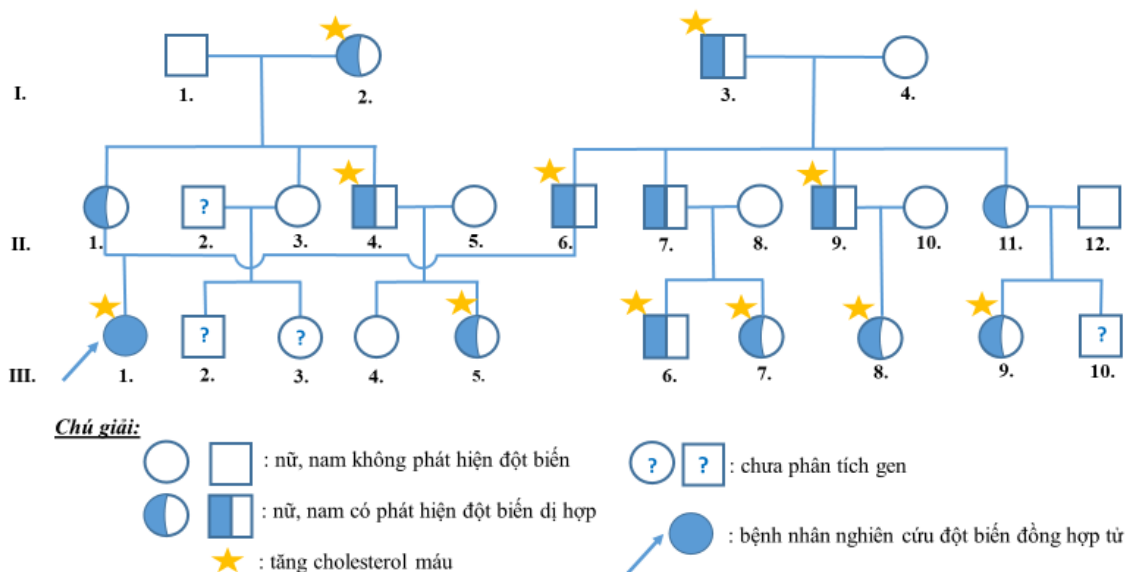
Tình trạng bệnh nhi MS15 lúc vào viện: Có nhiều u vàng dưới da khớp gối, vùng mông, cổ tay và khuỷu tay 2 bên. Kết quả xét nghiệm máu thời điểm vào viện: TC máu tăng cao (19,1 mmol/L); LDL-C tăng cao (15,4

mmol/L). Bệnh nhi MS15 thỏa mãn các tiêu chuẩn Simon Broome và được chẩn đoán mắc bệnh FH.

Tiến hành giải trình tự 5 exon (exon 3, 4, 9, 13 và 14) gen *LDLR* của bệnh nhi MS15 phát hiện có đột biến c.664T>C đồng hợp tử trên exon 4, đây là đột biến đã được công bố và được cho là đột biến gây bệnh [105]. Tiến hành phân tích xác định loại đột biến này trên exon 4 gen *LDLR* ở các thành viên còn lại trong gia đình bệnh nhi MS15. Kết quả phân tích lâm sàng, cận lâm sàng được trình bày ở bảng 3.14 và kết quả xác định đột biến gen theo phả hệ ở hình 3.17.

#### Phả hệ gia đình bệnh nhân MS15

Phả hệ gia đình bệnh nhi MS15 gồm 3 thế hệ với 26 thành viên, trong đó có 22 thành viên tham gia nghiên cứu, tỉ lệ di truyền bệnh trong phả hệ tính ở 16/22 thành viên. Do điều kiện địa lý và hoàn cảnh gia đình nên có 3 thành viên trong phả hệ gia đình có mối quan hệ bậc 3 với bệnh nhi MS15 không tham gia nghiên cứu (III.2; III.3; và III.10). Các thành viên tham gia nghiên cứu được thực hiện xét nghiệm một số chỉ số hóa sinh máu và phân tích xác định đột biến trên exon 4 gen *LDLR*.



**Hình 3.17. KQ đột biến Exon 4 của phả hệ gia đình bệnh nhi MS15**

Hình 3.17 cho thấy phả hệ có 14 thành viên đều mang cùng 1 loại đột biến (c.664T>C), trong đó 13 thành viên mang đột biến dị hợp tử, 1 thành viên mang đột biến đồng hợp tử, mô tả chi tiết kiểu di truyền của loại đột biến này trong phả hệ như sau:

Bên nội có ông của bệnh nhi (I.3) mang đột biến dị hợp tử trên exon 4 gen *LDLR* di truyền cho tất cả các con bao gồm: bố (II.6), 2 chú (II.7 và II.9) và cô (II.11) của bệnh nhi. Thế hệ tiếp theo bao gồm bệnh nhi MS15 (III.1) và các em họ (III.6; III.7; III.8; III.9) đều nhận đột biến từ bố, chú hoặc cô của bệnh nhi MS15.

Bên ngoại của bệnh nhi: Phát hiện đột biến dị hợp c.664T>C trên bà ngoại bệnh nhi (I.2), đột biến này di truyền lại cho mẹ (II.1) của bệnh nhi và cậu ruột (II.4), di truyền cho thế hệ tiếp theo là bệnh nhi MS15 và người em họ (III.5) của bệnh nhi. Bệnh nhi MS15 (III.1) nhận đột biến từ cả bố và mẹ nên mang đột biến ở dạng đồng hợp tử trên exon 4 gen *LDLR*. Ba thành viên có quan hệ huyết thống bậc 2 với bệnh nhi không phát hiện có đột biến, bao gồm: Ông ngoại (I.1), bà nội (I.4) và dì ruột (II.3) của bệnh nhi. 1 thành viên có quan hệ huyết thống bậc 3 với bệnh nhi không phát hiện có đột biến, đó là em họ (III.4) con cậu ruột của bệnh nhi.

Sơ đồ phả hệ thể hiện 13 thành viên có quan hệ huyết thống bậc 1, 2, 3 với bệnh nhi MS15, cụ thể: họ hàng bậc 1 gồm có 2 thành viên (II.1 và II.6); cả 2 thành viên mang đột biến (100%). Họ hàng bậc 2 gồm có 7 thành viên (I.2; I.3; II.3; II.4; II.7; II.9; II.11); có 6/7 thành viên mang đột biến (85,7%); 2 trong 6 thành viên mang đột biến nhưng không tăng lipid máu. Họ hàng bậc 3 gồm có 6 thành viên (III.4; III.5; III.6; III.7; III.8; III.9); có 5/6 thành viên mang đột biến (83,3%).

**Bảng 3.14. Một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS15**

STT	Mã số	Tuổi	Giới	TC	LDL-C	HDL-C	TG	U vàng	Đau ngực/ NMCT	THA
				mmol/L						
1	I.1	59	Nam	5,7	3,8	1,1	2,99	-	-	-
2	I.2	56	Nữ	9,1	7,6	1,4	0,97	-	-	-
3	I.3	52	Nam	8,4	6,8	1,2	1,62	-	-	-
4	I.4	52	Nữ	4,4	3,0	1,3	0,73	-	-	-
5	II.1	31	Nữ	6,0	4,4	1,2	0,8	-	-	-
6	II.3	30	Nữ	4,3	2,3	1,8	0,66	-	-	-
7	II.4	28	Nam	8,2	6,5	1,0	1,91	-	-	-
8	II.5	21	Nữ	5,3	3,5	1,9	0,71	-	-	-
9	II.6	28	Nam	6,5	5,0	1,1	0,9	-	-	-
10	II.7	30	Nam	5,4	4,4	1,1	0,87	-	-	-
11	II.8	25	Nữ	4,5	3,2	1,5	0,61	-	-	-
12	II.9	28	Nam	8,3	6,2	0,9	4,79	-	-	-
13	II.10	28	Nữ	4,5	3,0	1,2	1,4	-	-	-
14	II.11	26	Nữ	5,9	4,8	1,1	0,56	-	-	-
15	II.12	28	Nam	5,2	3,4	1,3	4,13	-	-	-
16	III.1 (MS15)	5	Nữ	19,1	15,4	1,72	1,3	+	-	-
17	III.4	4	Nữ	3,8	2,4	1,2	0,79	-	-	-
18	III.5	2	Nữ	6,1	4,7	1,3	0,83	-	-	-
19	III.6	3	Nam	7,0	5,6	1,3	1,65	-	-	-
20	III.7	2	Nữ	5,3	4,5	0,8	1,02	-	-	-
21	III.8	3	Nữ	6,9	5,3	1,1	1,85	-	-	-
22	III.9	3	Nữ	7,3	6,1	1,2	1,14	-	-	-

Tỉ lệ di truyền bệnh trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS15 tính ở 16/22 thành viên, có 14 thành viên mang đột biến trên exon 4 gen *LDLR*, trong đó 13/14 thành viên mang đột biến dị hợp tử nhưng không có biểu hiện triệu chứng trên lâm sàng như: tăng huyết áp, u vàng, đau ngực và NMCT, chỉ có duy nhất bệnh nhi MS15 (III.1) mang đột biến đồng hợp tử có biểu hiện u vàng trên lâm sàng với diện rộng và ở nhiều vị trí trên cơ thể. Ở cả 3 thế hệ đều có các thành viên có tăng các chỉ số lipid máu với mức độ gấp 2-3 lần so với giá trị bình thường. Trong số 14 thành viên mang đột biến trên exon 4 gen *LDLR* có 3 thành viên không tăng hoặc tăng nhẹ lipid máu (TC và LDL-C) và chưa đạt theo tiêu chuẩn của Simon Broome (II.1; II.7 và II.11)

**Bảng 3.15. Đặc điểm về chỉ số lipid máu ở nhóm đột biến dị hợp tử và không đột biến của phả hệ MS15 (mmol/L)**

Đột biến	TC	LDL-C	HDL-C	TG
	$\bar{X} \pm SD$ (mmol/L)			
Có đột biến trên exon 4 gen <i>LDLR</i> (n= 13)	<b>6,95±1,23</b>	<b>5,53±1,03</b>	1,13 ± 0,17	1,45 ± 1,09
Không có đột biến trên exon 4 gen <i>LDLR</i> (n= 8)	4,71±0,63	3,07±0,52	1,41±0,29	1,5 ± 1,33
<b>p</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>	<b>0,30</b>

Bảng 3.15 cho thấy nhóm có đột biến dị hợp tử trên exon 4 gen *LDLR* có kết quả các chỉ số lipid máu cao, lần lượt giá trị TC và LDL-C là 6,95 mmol/L và 5,53 mmol/L, trong khi đó nhóm không có đột biến có kết quả TC và LDL-C trong giới hạn bình thường. Sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh 2 chỉ số này ở 2 nhóm có đột biến và không có đột biến trên exon 4 gen *LDLR* ( $p < 0,01$ ).



## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

Bệnh tăng cholesterol có tính chất gia đình là một bệnh di truyền trội nhiễm sắc thể thường đặc trưng bởi nồng độ LDL-cholesterol (LDL-C) trong máu tăng cao bất thường. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy hơn 1.000 đột biến của gen *LDLR* đã được xác định ở bệnh nhân tăng cholesterol có tính chất gia đình. Đây là bệnh di truyền đơn gen, nguyên nhân có thể do đột biến ở các gen: *LDLR*, *ApoB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, trong đó chủ yếu liên quan đến đột biến gen *LDLR* với tỷ lệ đột biến trên 80% [5].

Tăng cholesterol đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành, phát triển và nứt vỡ của mảng xơ vữa, làm tăng các nguy cơ mắc bệnh tim mạch (Coronary Heart Disease: CHD) nguyên phát và tử vong. Bệnh mạch vành là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong những năm gần đây [6],[7]. Tăng cholesterol trong máu có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau: Chế độ ăn giàu cholesterol, ít vận động, do hậu quả của 1 số bệnh rối loạn chuyển hóa. Một nguyên nhân vô cùng quan trọng là do đột biến gen gây nên.

Bệnh tăng cholesterol máu có tính chất gia đình là một bệnh lý diễn biến thầm lặng và triệu chứng lâm sàng không đặc hiệu, đặc biệt đối với các thể bệnh FH dị hợp tử, chính vì vậy tỉ lệ bệnh nhân FH không được chẩn đoán sớm vẫn còn cao dẫn đến việc điều trị và dự phòng biến chứng cho bệnh nhân còn hạn chế. Hầu hết các bệnh nhân FH chỉ được chẩn đoán khi đã xuất hiện các biến chứng như NMCT hay đột quy.

Viện quốc gia về y tế và lâm sàng của Anh (NICE) đã đưa ra khuyến cáo về sàng lọc phân tầng đối với những người thân có quan hệ huyết thống gần với bệnh nhân đã được chẩn đoán lâm sàng FH, giúp giảm tỉ lệ bệnh tật và tử

vong do bệnh tim mạch ở những người FH thông qua chẩn đoán bệnh sớm và quản lý bệnh hiệu quả [26].

Ở Việt Nam, hiện nay các nghiên cứu về gen liên quan tới bệnh nhân FH còn hạn chế, đặc biệt chưa có nghiên cứu về các đột biến trên một số gen gây bệnh FH ở đối tượng trẻ em – đối tượng đang trong độ tuổi phát triển có nhu cầu dinh dưỡng cao. Tuy nhiên bệnh nhi FH nếu không được chẩn đoán sớm để có sự kiểm soát dinh dưỡng phù hợp và điều trị kịp thời, có thể dẫn đến các biến cố tim mạch ở độ tuổi rất trẻ, nhất là các bệnh nhi FH nguyên nhân do thể đột biến phức tạp. Để góp phần hiểu rõ về mối liên quan giữa bệnh với các dạng đột biến của gen *LDLR* giúp hỗ trợ chẩn đoán và đưa ra các biện pháp điều trị sớm, giúp giảm thiểu các biến cố tim mạch và đem lại chất lượng cuộc sống tốt hơn cho bệnh nhân, nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện trên 26 bệnh nhi được chẩn đoán FH theo tiêu chuẩn Simon Broome và 45 thành viên trong phả hệ 3 gia đình bệnh nhi có đột biến nhằm xác định đột biến gen *LDLR* trên một số exon có tỉ lệ đột biến cao [60],[95],[93]. Nghiên cứu đã thu được một số kết quả thú vị về đột biến mới chưa từng được công bố trên thế giới cũng như mối liên quan giữa đột biến với các biểu hiện cận lâm sàng. Những kết quả được bàn luận trong tổng hòa kết quả của các nghiên cứu trong khu vực và trên thế giới. Dưới đây chúng tôi sẽ bàn luận toàn bộ kết quả nghiên cứu thu được theo hai mục tiêu chính: (1) Xác định đột biến trên một số vùng gen *LDLR* ở bệnh nhi tăng cholesterol máu có tính chất gia đình; (2) Phát hiện đột biến gen *LDLR* và một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở các thành viên trong phả hệ của bệnh nhi FH mang đột biến gen.

#### 4.1. Bàn luận về các đột biến và SNP tìm được trên bệnh nhi FH

Đối tượng nghiên cứu là 26 bệnh nhi được chẩn đoán bệnh FH dựa trên tiêu chuẩn chẩn đoán của Simon Broome. Độ tuổi trung bình của nhóm 26 bệnh nhi FH là  $6,66 \pm 3,92$  tuổi, cao nhất là 15 tuổi, thấp nhất là 1,2 tháng. 25/26 bệnh nhi FH vào viện Nhi Trung ương khám với lý do có u vàng trên lâm sàng với các mức độ khác nhau, tại thời điểm đó các bệnh nhi được khám và lấy máu xét nghiệm, một bệnh nhi tuy không có biểu hiện các triệu chứng trên lâm sàng như: U vàng, đau ngực hay tăng huyết áp nhưng có tiền sử gia đình điển hình (anh trai có biểu hiện u vàng và tăng lipid máu). Nghiên cứu thực hiện lấy số liệu trong 3 năm tại bệnh viện Nhi Trung ương, chỉ có 26 bệnh nhi đáp ứng đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH của Simon Broome và đồng ý tham gia nghiên cứu. Số lượng này để tính tỉ lệ bệnh FH ở quần thể người Việt Nam thì chưa chính xác. Trong thực tế, ở Việt Nam cũng chưa có nhiều nghiên cứu để đưa ra tỉ lệ mắc bệnh FH trong cộng đồng với số liệu cụ thể. Vì điều kiện kinh tế xã hội và nhận thức của người dân về bệnh FH còn hạn chế, tâm lý e ngại, dấu bệnh di truyền, nên có thể tỉ lệ bệnh FH trong cộng đồng khá cao nhưng số bệnh nhân đến khám và điều trị thì rất thấp. Trong quá trình nghiên cứu, khi phân tích gen của các thành viên gia đình bệnh nhi mang đột biến gen *LDLR*, chúng tôi phát hiện thêm 9 trẻ mang đột biến gen này. 9 trẻ có độ tuổi trung bình khi được phát hiện bệnh FH (thời điểm xét nghiệm phát hiện có đột biến) là  $5,33 \pm 3,3$  tuổi, thấp hơn so với độ tuổi trung bình của 26 bệnh nhi FH trong nghiên cứu. Gia đình của 9 trẻ này hoàn toàn không biết trẻ có mắc bệnh, các trẻ đều không có biểu hiện triệu chứng u vàng, đau ngực... trên lâm sàng. Kết quả xét nghiệm TC và LDL-C ở 9 trẻ có tăng nhưng chưa cao như tiêu chuẩn của Simon Broome hoặc không tăng. Điều này cho thấy việc xác định đột biến gen giúp phát hiện bệnh sớm

từ độ tuổi còn rất nhỏ. Một số nghiên cứu trên thế giới thực hiện sàng lọc với số lượng lớn bệnh nhi FH cho kết quả độ tuổi trung bình thấp hơn so với độ tuổi trung bình của nhóm 26 bệnh nhi FH trong nghiên cứu của chúng tôi. Nghiên cứu của Groselj (2018) trên 280 bệnh nhi FH có độ tuổi trung bình là  $5,61 \pm 0,68$  tuổi [106]. Kết quả sàng lọc 100 bệnh nhi FH ở Pháp của Benlian (2009) có độ tuổi trung bình của bệnh nhi trong nghiên cứu là  $6,1 \pm 3,5$  tuổi [107]. Hai nghiên cứu trên được thực hiện ở các nước châu Âu có điều kiện kinh tế phát triển, có sự đầu tư lớn về kinh phí cho các dự án, chiến lược sàng lọc bệnh FH, chính vì vậy việc khám và chẩn đoán bệnh FH ở trẻ em hoàn toàn chủ động và trẻ được phát hiện bệnh ở độ tuổi còn rất nhỏ, dẫn đến độ tuổi trung bình thấp hơn hẳn so với các bệnh nhi FH trong nghiên cứu của chúng tôi. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy chủ động sàng lọc giúp phát hiện sớm bệnh FH có vai trò rất quan trọng trong việc tư vấn, điều trị và dự phòng các biến cố có thể xảy ra.

Tập hợp nhóm nghiên cứu ban đầu là 26 bệnh nhi và 9 bệnh nhi được phát hiện thêm trong nghiên cứu thì tỉ lệ giới tính nam và nữ lần lượt là 57,1% và 42,9%. Kết quả này không tương đồng với một số kết quả nghiên cứu trên thế giới, như ở Italy của Guardamagna (2009) trên 264 bệnh nhân cho kết quả với tỉ lệ nam và nữ tương ứng là 50,76% và 49,24% [108]. Theo nghiên cứu ở Anh trên 207 bệnh nhân của Ramaswami (2017) có tỉ lệ nam là 45,41% và tỉ lệ nữ chiếm 54,59% [109]. Nghiên cứu của Minicocci ở Italy (2017) trên 39 bệnh nhân FH cũng đưa ra tỉ lệ nam và nữ là 43,6% và 56,4% [110]. Một nghiên cứu tổng hợp lấy số liệu từ 8 nước châu Âu cũng cho thấy hầu hết kết quả tỉ lệ về giới ở các bệnh nhi FH từ 42 – 51% là nam và 49 – 58% là nữ [111]. Nguyên nhân của sự không tương đồng này có thể do các nghiên cứu này thực hiện ở các nước châu Âu nên tỉ lệ giới tính ở trẻ em không tương đồng với châu Á (tỉ lệ trẻ nam cao hơn trẻ nữ), cỡ mẫu trong các nghiên cứu

này cũng lớn hơn so với cỡ mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi, chính vì vậy phân bố về giới trong nghiên cứu của chúng tôi có sự chênh lệch so với hai nghiên cứu trên.

***Đặc điểm về xét nghiệm lipid máu ở nhóm bệnh nhi FH ban đầu***

26 bệnh nhi FH đến bệnh viện Nhi Trung ương khám với triệu chứng u vàng trên lâm sàng, biểu hiện số lượng và các mức độ khác nhau, kết quả xét nghiệm lipid trung bình trong máu tăng cao ở 2 chỉ số TC và LDL-C. Nồng độ hai chỉ số lipid máu này cũng tăng cao ở nhiều bệnh nhân FH và được thể hiện ở kết quả của nhiều nghiên cứu trên thế giới và trong khu vực.

***Bảng 4.1. Chỉ số lipid máu ở một số nghiên cứu***

Tác giả	Chủng tộc	n	TC mmol/L	LDL-C mmol/L	TG mmol/L	HDL-C mmol/L
<b>Hoàng Thị Yến</b>	<b>Việt Nam</b>	<b>26</b>	<b>12,45± 4,88</b>	<b>9,85±4,06</b>	<b>2,44±4,44</b>	<b>1,1±0,37</b>
Fairoozy [112]	Iran	16	16,3±5,7	12,0±4,6	-	-
Ramaswami [109]	Anh	207	7,61±1,48	5,67±1,46	-	-
Guardamagna [108]	Italia	264	7,65	5,79	0,9	1,37
Groselj U [106]	Slovenia	280	7,36±1,46	5,56±1,48	-	1,4±0,27
Klančar G [113]	Slovenia	155	7,3±1,2	5,4±1,3		1,4±0,4
Ramaswami và cộng sự [111]	Norway	250	7,26±1,39	5,35±1,34	0,93±0,48	1,46±0,36
	UK	298	7,45±1,51	5,51±1,49	1,04±0,54	1,4±0,33
	The Netherlands	343	7,02±1,56	5,3±1,5	1,0±0,53	1,34±0,42
	Belgium	171	7,41±1,48	5,51±1,41	1,06±0,65	1,43±0,38
	Czech Republic	647	7,48±1,49	5,63±1,44	1,03±0,56	1,39±0,39
	Austria	64	6,76±1,74	4,87±1,61	0,95±0,52	1,39±0,35
	Portugal	291	7,23±1,55	5,3±1,46	1,0±0,55	1,46±0,4
	Greece	1000	8,13±1,22	6,21±1,25	0,83±0,39	1,51±0,29

Bảng 4.1 cho thấy nồng độ chỉ số TC ( $12,45 \pm 4,88$  mmol/L) và LDL-C ( $9,85 \pm 4,06$  mmol/L) của nhóm 26 bệnh nhi FH ban đầu trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Fairoozy và cộng sự (2017) với cỡ mẫu 16 bệnh nhi ở Iran; nhưng kết quả của chúng tôi cao hơn hẳn so với kết quả nghiên cứu của Ramaswani (2009), Guardamagna (2017), Groselj (2018), Klančar (2015) và đặc biệt so với kết quả nghiên cứu trên 3064 bệnh nhi FH từ 8 nước châu Âu (2020). Sự không tương đồng giữa các nghiên cứu trên về kết quả 2 chỉ số TC và LDL-C có thể:

(1) Do sự khác biệt về điều kiện kinh tế, xã hội ở các nước thực hiện nghiên cứu: Các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn được thực hiện ở các nước phát triển ở châu Âu có điều kiện về kinh tế, xã hội phát triển, nhận thức của người dân về y tế và chăm sóc sức khỏe cao hơn hẳn so với Việt Nam và Iran, nên có nhiều đầu tư kinh phí thực hiện xét nghiệm sàng lọc phân tầng đối với thành viên có quan hệ huyết thống với bệnh nhân FH cũng như các dự án sàng lọc bệnh FH thực hiện ở cộng đồng. Chính vì vậy đối tượng được phát hiện bệnh FH thường sớm, ở độ tuổi còn rất trẻ, 2 chỉ số TC và LDL-C trong máu có thể biến đổi chưa nhiều. Trong khi đó nhóm 26 bệnh nhi trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ được xét nghiệm và chẩn đoán bệnh FH khi đến bệnh viện khám và đã có biểu hiện triệu chứng u vàng trên lâm sàng.

(2) Do sự khác biệt về cỡ mẫu nghiên cứu: Các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn có chỉ số TC và LDL-C gần tương đương nhau.

Kết quả bảng 3.1 và bảng 3.5 cho thấy 9 bệnh nhi được phát hiện chủ động qua sàng lọc phân tầng từ 3 bệnh nhi FH chỉ điểm ban đầu (MS02, MS03, MS15) cũng có độ tuổi thấp hơn so với nhóm 26 đối tượng bệnh nhi FH, khi so sánh 2 chỉ số TC và LDL-C ở 2 nhóm bệnh nhi này thấy sự khác biệt có ý nghĩa với  $p < 0,05$ . Đồng thời kết hợp với bảng 4.1 cho thấy chỉ số

TC và LDL-C trung bình trong máu của 9 bệnh nhi FH được phát hiện chủ động qua sàng lọc phân tầng từ nghiên cứu của chúng tôi có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả Guardamagna [108], Groselj U [106], Klančar G [113], Ramaswami và cộng sự [111]. Điều này lý giải bởi vai trò của sàng lọc phân tầng trong việc phát hiện sớm bệnh nhân FH trong cộng đồng, những bệnh nhân FH được chủ động phát hiện sớm từ bệnh nhân FH chỉ điểm trong gia đình dẫn đến việc kết quả xét nghiệm TC và LDL-C trên bệnh nhân FH có đột biến có thể tăng nhẹ hoặc thậm chí không tăng so với tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH.

### ***Bàn luận về các đột biến, SNP trên nhóm bệnh nhi FH***

Để phát hiện các đột biến trên gen *LDLR* ở các đối tượng trong nghiên cứu, chúng tôi đã lựa chọn và sử dụng một số kỹ thuật tách chiết DNA và phân tích gen tiên tiến. Toàn bộ quá trình từ việc lấy mẫu, bảo quản vận chuyển và tách chiết mẫu cần được tuân thủ tuyệt đối theo một quy trình đã chuẩn hóa. Khi mẫu máu được xử lý, giai đoạn tách chiết DNA là khâu đầu tiên đóng vai trò quan trọng. Nếu các phân tử DNA được tách chiết tốt, không bị đứt gãy, không bị nhiễm thì các phản ứng tiếp theo mới có độ chính xác cao. Các mẫu máu toàn phần của nhóm bệnh nhi FH và nhóm các thành viên trong phả hệ 3 gia đình bệnh nhi có đột biến được tiến hành tách chiết theo kit thương mại của hãng Gene All (Hàn Quốc). Ưu điểm của việc sử dụng phương pháp tách chiết theo kit này đó là quy trình đơn giản, dễ thực hiện, thu được kết quả DNA khá đồng đều và có độ tinh sạch cao so với phương pháp tách thủ công bằng ethanol/chloroform [114]. Nồng độ và độ tinh sạch được đo bằng máy quang phổ với nồng độ thấp nhất là 34,7 ng/ $\mu$ l, cao nhất là 114,1 ng/ $\mu$ l, độ tinh sạch thể hiện qua giá trị A260/A280 luôn nằm trong khoảng 1,8-2,0.

Tiếp đó khuếch đại đoạn DNA đích với cặp mồi được thiết kế đặc hiệu cho 5 exon: 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR*. Những cặp mồi này được thiết kế tuân theo nguyên tắc thiết kế mồi, được kiểm tra kỹ lưỡng các đặc tính vật lý [104] cũng như khả năng bắt cặp, khuếch đại đặc hiệu cho đoạn exon đích của gen *LDLR* trực tiếp bằng phần mềm hỗ trợ NCBI [101]. Đặc biệt đoạn gen đích với exon 14, cặp mồi được thiết kế bao trùm toàn bộ exon 13 do 2 exon trên gen *LDLR* gần nhau và kích thước 2 exon không lớn, do đó đoạn sản phẩm đích có thể đánh giá được toàn bộ exon 14, intron 13 và exon 13. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi tiến hành dò nhiệt độ gắn mồi, nồng độ các thành phần phản ứng PCR nhằm tối ưu hóa từng phản ứng PCR. Đánh giá kết quả đoạn gen thu được từ phản ứng PCR khuếch đại thông qua các vạch điện di trên gel agarose 1,5%. Các vạch điện di đều hiển thị rõ nét, đúng kích thước và không có sản phẩm phụ. Điều này chứng minh rằng cặp mồi chúng tôi thiết kế là đặc hiệu và các phản ứng PCR của chúng tôi đã được tối ưu hóa, sản phẩm đủ điều kiện tham gia phản ứng giải trình tự tiếp theo (hình 3.1 đến hình 3.4).

Để xác định đột biến gen *LDLR* chúng tôi sử dụng giải trình tự trực tiếp do có nhiều ưu điểm: Cho phép phát hiện các đột biến điểm, xóa đoạn, chèn đoạn ngắn phù hợp với phân bố các loại đột biến gen *LDLR*, giá thành hợp lý. Đây cũng là phương pháp có thể phát hiện đột biến điểm một cách chính xác - loại đột biến chiếm tỉ lệ cao trong các đột biến gen *LDLR* và được lựa chọn trong nhiều nghiên cứu về đột biến gen *LDLR*. Các mẫu giải trình tự được thực hiện trực tiếp trên hệ thống máy tự động Prism 3730xl – ABI (Mỹ). Các kết quả giải trình tự gen được phân tích trực tiếp với các phần mềm hỗ trợ BioEdit, ApE và trình tự gốc lấy từ NCBI. Nếu tín hiệu giải trình tự không đảm bảo, các tín hiệu nền nhiều hoặc nghi ngờ, chúng tôi sẽ thực hiện và đánh



giá lại mẫu. Nghiên cứu chỉ chấp nhận các kết quả không bị nhiễu, tín hiệu nền rõ. Các kết quả giải trình tự phát hiện đột biến sẽ được tiến hành giải trình tự với mỗi còn lại để khẳng định. Các kết quả đột biến đã phát hiện sẽ được tra cứu trực tiếp trên các hệ thống dữ liệu đột biến có sẵn Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), The Human Gene Mutation Database – HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/LDLR>) để xác định đột biến đã từng được công bố, tiềm năng gây bệnh. Với các đột biến mới, chúng tôi tiến hành sử dụng các phần mềm dự đoán tiềm năng gây bệnh. Nhược điểm của phương pháp giải trình tự không phát hiện được các đột biến xóa đoạn, chèn đoạn lớn, do đó trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ tập trung xác định những đột biến điểm trên nhóm bệnh nhi được chẩn đoán bệnh FH.

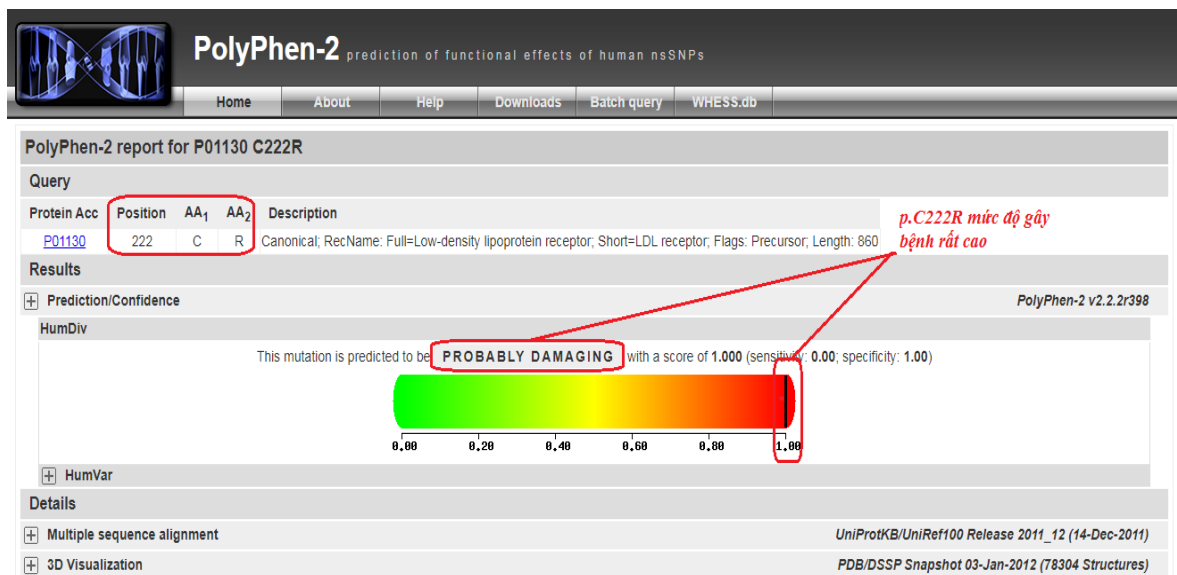
Đột biến gen *LDLR* dẫn đến việc thiếu các thụ thể có chức năng (LDLr) trên bề mặt tế bào. Điều này gây ra sự giảm hấp thu LDL-C vào tế bào của các tổ chức, đặc biệt là tế bào gan, dẫn đến tăng LDL-C huyết thanh, từ đó làm suy yếu sự thanh thải LDL-C. Hậu quả quá trình này làm giảm sự ức chế tổng hợp cholesterol nội bào và tích tụ LDL-C trong lòng mạch [115]. Đột biến gen *LDLR* được chia làm 5 loại dựa trên các nghiên cứu về đặc điểm sinh hóa và chức năng của thụ thể. Đột biến loại 1: Ngăn cản sự tổng hợp LDLr; đột biến loại 2: Đột biến gây nên toàn bộ (loại 2A) hoặc một phần (loại 2B) thụ thể được tổng hợp không thể tách rời lưới nội sinh chất; đột biến loại 3: Đột biến gây nên tình trạng thụ thể không gắn được với LDL-C; đột biến loại 4: Các thụ thể không thể nội hóa được LDL-C, do đó không vận chuyển được LDL-C vào trong màng tế bào; đột biến loại 5: Không giải phóng và tái sử dụng được LDLr [116],[117],[118].

**Đột biến gen *LDLR*:** Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện 7 bệnh nhi mang 4 loại đột biến khác nhau trên gen *LDLR*, đó là: Đột biến c.664T>C, đột biến c.1285G>A, đột biến c.1335C>T và đột biến c.1978C>T.

*Đột biến c.664T>C:* Đột biến trên exon 4 tại vị trí nucleotide 664 Thymin được thay bằng Cytosin, dẫn đến làm biến đổi a.a Cysteine ở vị trí 222 thành a.a Arginine. Đột biến đã được phát hiện và công bố ở nghiên cứu của Sozen M.M (2005) [105]. Trong nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện có 5 bệnh nhi mang đột biến này. Đây là loại đột biến sai nghĩa có sự thay thế a.a, do vậy làm ảnh hưởng đến hoạt động của protein và liên quan tới việc gắn LDL-C với LDLr. Exon 4 mã hóa cho vùng phối tử của LDLr làm trung gian cho sự tương tác với lipoprotein. Đột biến trên exon 4 là một đột biến gặp với tỉ lệ cao trong nhiều kết quả nghiên cứu [26],[33],[91],[93],[95]. Lý do của hiện tượng này một phần do sự trội hơn của các trình tự CpG ở trên exon này [11], một lý do khác đây là vị trí duy nhất mã hóa cho cả đoạn gắn ApoB và ApoE, các đoạn trong vùng gắn phối tử chỉ mã hóa cho đoạn gắn ApoB, vì vậy các đột biến ở vùng chìa khóa này thường ảnh hưởng có hại một cách rõ rệt đến chức năng của LDLr, dẫn tới những cá thể mang các đột biến này thường biểu hiện rối loạn lipid điển hình, từ đó bệnh nhân dễ được phát hiện hơn và exon 4 cũng là exon dài nhất trong 18 exon của gen *LDLR*.

Để dự đoán khả năng gây bệnh đối với đột biến sai nghĩa có thay đổi a.a, có thể sử dụng 3 phần mềm dự đoán đó là: Chương trình PolyPhen 2 (Polymorphism Phenotyping version 2), phần mềm MutationTaster và phần mềm SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), 3 phần mềm này đã được sử dụng để dự đoán khả năng gây bệnh FH của nhiều đột biến mới được phát hiện trong các nghiên cứu trên thế giới [105],[119], [120], [121].

Chương trình PolyPhen 2 dựa trên chiến lược kết hợp; phân tích ký tự chuỗi (ví dụ: Liên kết disulphide, vị trí liên kết), so sánh tương đồng, đường kính cấu trúc (ví dụ: cấu trúc thứ cấp) và các vị trí tiếp xúc với các vị trí (ví dụ: Phôi tử hoặc tiểu đơn vị peptide) để dự đoán sự tác động của việc thay thế a.a đến tính ổn định và chức năng của protein người [122]. Dự đoán kết quả bằng phần mềm dự đoán khả năng gây bệnh chương trình Polyphen-2 cho kết quả đột biến c.664T>C hầu như chắc chắn gây bệnh với điểm số tối đa là 1 (độ đặc hiệu 100% - hình 4.1);



**Hình 4.1. Dự đoán khả năng gây bệnh đột biến c.664T>C bằng phần mềm Polyphen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/ggi/ggi2.cgi>)**

Phần mềm MutationTaster tích hợp thông tin từ các cơ sở dữ liệu y sinh khác nhau và sử dụng các công cụ phân tích đã được thiết lập. Phân tích bao gồm bảo tồn tiến hóa, thay đổi vị trí ghép nối, mất tính năng protein và thay đổi có thể ảnh hưởng đến lượng mRNA. Sử dụng phần mềm MutationTaster sẽ mang lại độ chính xác và tốc độ nhanh về phân tích dữ liệu để dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến [123].

Sử dụng phần mềm MutationTaster dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến c.664T>C trên exon 4 gen *LDLR* cũng cho kết quả tương tự với kết quả gây bệnh, điểm số độ bảo tồn a.a là 194 với độ tin cậy cao (hình 4.2);

**MutationTaster** [documentation](#)

**mutation t@sting**

**Prediction** **disease causing** Model: *simple\_aae*, prob: 1 [\(explain\)](#)

**Summary** [hyperlink](#)

- amino acid sequence changed
- Known disease mutation at this position (HGMD CM055385)
- Known disease mutation at this position (HGMD CM995133)
- Known disease mutation at this position (HGMD CX108058)
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr19:11216246T>C <a href="#">show variant in all transcripts</a> <a href="#">IGV</a>
HGNC symbol	<a href="#">LDLR</a>
Ensembl transcript ID	<a href="#">ENST00000538518</a>
Genbank transcript ID	<a href="#">NM_000527</a>
UniProt peptide	<a href="#">P01130</a>
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.664T>C cDNA.851T>C p.16209T>C
AA changes	C222R Score: 180 <a href="#">(chain score(s))</a>
position(s) of altered AA	222
#AA alteration in CDS	1
frameshift	no
known variant	Reference ID: <a href="#">rs577934998</a>

**Hình 4.2. Dự đoán khả năng gây bệnh đột biến c.664T>C bằng phần mềm MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>)**

SIFT (Scale-Invariant Feature Transform) tính toán một số điểm kết hợp có được từ sự phân bố các a.a tại một vị trí nhất định trong sự liên kết trình tự của các a.a từ đó đưa ra dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến [124]; tương tự như 2 phần mềm trên khi sử dụng phần mềm SIFT dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến c.664T>C cũng đưa ra kết luận về khả năng cao gây bệnh với đột biến này (hình 4.3).

RefSeq Protein ID	Known Protein ID	Substitution	Region	dbSNP ID	SNP Type	Prediction	Score	Median Info	# Seqs at position	Gene Name	Gene Desc	Protein Family ID	Protein Family Desc
NP_001182731		C101R	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.77	97	LDLR	low density lipoprotein receptor isoform 5		
	B4DII3	C75R	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.78	95				
NP_001182728	B4DTQ3	C181R	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.76	98	LDLR	low density lipoprotein receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:6547]	ENSMFM00500000269677	LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR RECEPTOR
NP_001182727	Q59FQ3	C222R	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.81	95	LDLR	low density lipoprotein receptor isoform 2		
NP_000518	C0JYF3	C222R	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.81	95	LDLR	low density lipoprotein receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:6547]	ENSMFM00500000269677	LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR RECEPTOR

**Hình 4.3. Dự đoán khả năng gây bệnh đột biến c.664T>C bằng phần mềm SIFT ([https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT\\_seq\\_submit2.html](https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html))**

**Đột biến c.1285G>A:** Đột biến trên exon 9 thay thế Guanin thành Adenin tại vị trí c.1285 làm thay đổi bộ ba mã hóa cho a.a Valine tại vị trí 429 thành Methionine. Trong nghiên cứu chúng tôi phát hiện có 01 bệnh nhi mang đột biến này và đây là đột biến đã từng được phát hiện và công bố từ kết quả nghiên cứu của Ranheim T (2006). Exon 9 mã hóa cho vùng giống như EGF (yếu tố phát triển biểu mô), khi pH nội bào thấp sẽ tác động vào vùng này và LDLr sẽ tách ra khỏi phức hợp LDLr - LDL, sau đó LDLr sẽ được tái sử dụng trong một vòng tuần hoàn mới. Valine là một a.a không phân cực, kỵ nước khi bị thay thế bởi a.a Methionine là một a.a phân cực sẽ làm thay đổi sự phân cực về mặt cấu trúc của vùng giống như EGF này. Đột biến c.1285G>A là một đột biến sai nghĩa đã được khẳng định là gây bệnh bởi vì các lipoprotein liên kết với LDLr, được nội hóa nhưng không thể tái chế, do khiếm khuyết tái chế ở thụ thể đột biến [125],[126]. Nếu quá trình tái chế không xảy ra, tất cả các LDLr sẽ bị tiêu thụ trong vòng 10 phút sau khi tiếp xúc với LDL-C [93]. Nghiên cứu của Ranheim T và cộng sự (2006) mô tả các đặc điểm kiểu hình của một số đột biến gen *LDLR* bằng cả kính hiển vi và các xét nghiệm tế bào

dòng chảy trên hệ thống mô hình tế bào CHO và HepG2 đã cho thấy, đột biến c.1285G>A [125]:

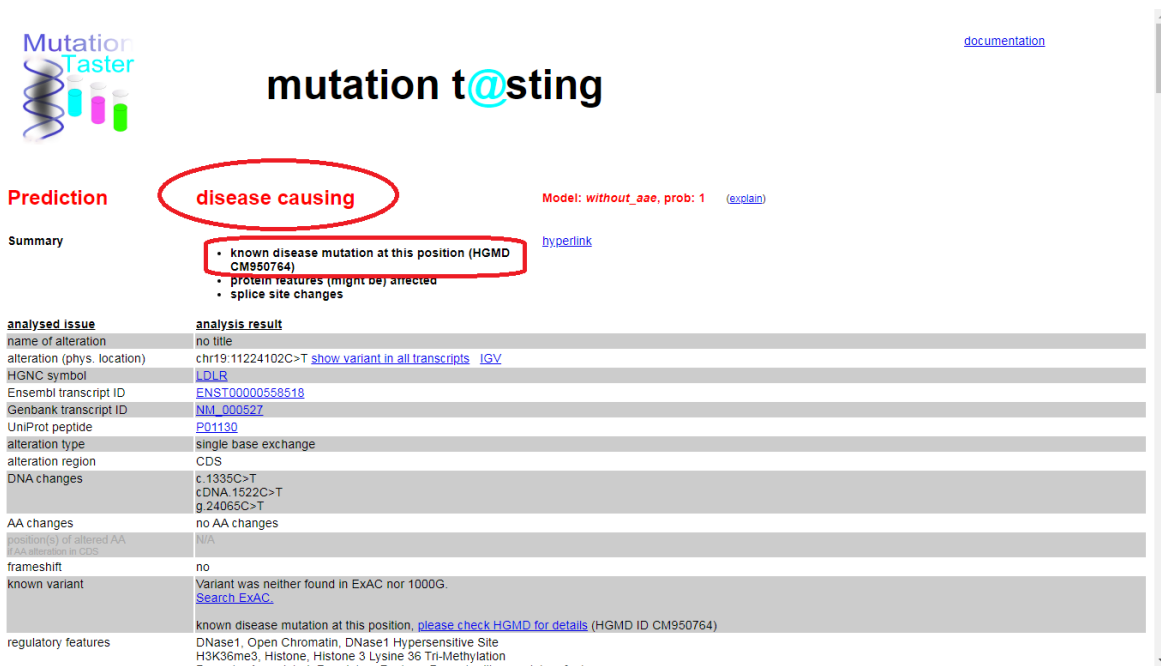
- Được xác định là đột biến loại 5 không phải loại 2 (tích tụ các tín hiệu LDLr được tạo ra bởi biến thể c.1285G>A trong các endosome sớm).

- Khi nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể đặc hiệu và đánh giá qua các tín hiệu tế bào cho thấy c.1285G>A mã hóa cho một protein chỉ nằm trong nội bào.

- Các tín hiệu LDLr trưởng thành được tạo bởi biến thể xuất hiện trong vòng 1 giờ, sau đó cường độ tín hiệu giảm dần và biến mất.

Chính vì vậy đột biến c.1285G>A được khẳng định là đột biến gây bệnh FH; đột biến này được tìm thấy trên bệnh nhi MS02 trong nghiên cứu của chúng tôi, không những thế bệnh nhi MS02 này đồng phát hiện đột biến c.664T>C trên exon 4; các triệu chứng về lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân xuất hiện sớm và rất rõ ràng. Đây là một trường hợp kết hợp 2 đột biến gây bệnh dạng dị hợp tử và là thể bệnh nặng, nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân tích sàng lọc phân tầng tất cả các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS02.

*Đột biến c.1335C>T*: Đột biến trên exon 9 gen *LDLR*, đây là đột biến mới được phát hiện trong nghiên cứu và có 1 bệnh nhi FH mang đột biến này. Đột biến có sự thay thế nucleotide Cytosin thành Thymin tại vị trí c.1335 làm thay đổi bộ ba mã hóa GAC thành GAU. Tuy có sự thay đổi về nucleotide, nhưng 2 bộ ba mã hóa GAU và GAC đều mã hóa cho a.a Aspartat.



**Prediction** **disease causing** Model: *without\_aae*, prob: 1 [\(explain\)](#)

**Summary** [byperlink](#)

- Known disease mutation at this position (HGMD CM950764)
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr19:11224102C>T <a href="#">show variant in all transcripts</a> <a href="#">IGV</a>
HGNC symbol	<a href="#">LDLR</a>
Ensembl transcript ID	<a href="#">ENST00000558518</a>
Genbank transcript ID	<a href="#">NM_000527</a>
UniProt peptide	<a href="#">P01130</a>
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.1335C>T cDNA.1522C>T g.24065C>T
AA changes	no AA changes
position(s) of altered AA (AA alteration in CDS)	N/A
frameshift	no
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. <a href="#">Search ExAC</a>
regulatory features	known disease mutation at this position, <a href="#">please check HGMD for details</a> (HGMD ID CM950764) DNase1, Open Chromatin, DNase1 Hypersensitive Site H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 35 Tri-Methylation <a href="#">Genetic Association, Regulator/Target, Regulator/Target Feature</a>

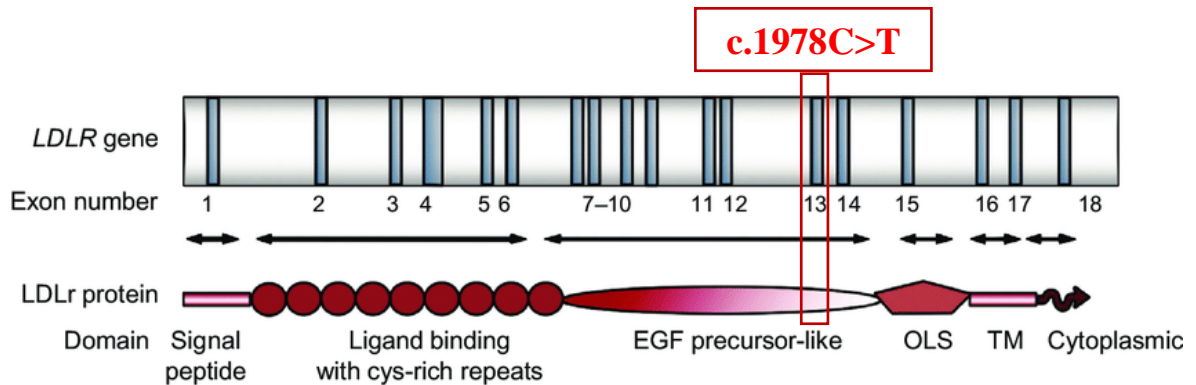
**Hình 4.4. Dự đoán khả năng gây bệnh đột biến c.1335C>T bằng phần mềm MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>)**

Đa phần các đột biến không làm thay đổi a.a đều là các dạng đột biến trung tính, tuy nhiên khi sử dụng phần mềm dự đoán khả năng đột biến MutationTaster cho thấy c.1335C>T là một đột biến có khả năng gây bệnh (hình 4.4) và được cho là gây bệnh tại vị trí CM950764 đã được công bố trong ngân hàng dữ liệu đột biến gen ở người (The Human Gene Mutation Database - HGMD:

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=LDLR&accession=CM950764>)

Mặc dù các thuật toán dự đoán về khả năng gây bệnh có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tuy nhiên vẫn cần các thí nghiệm in vivo và in vitro để khẳng định đột biến trên có phải gây bệnh hay không.

**Đột biến c.1978C>T:** Đột biến trên exon 13 gen *LDLR* ở dạng dị hợp tử, đây là đột biến mới được phát hiện trên 01 bệnh nhi FH với biểu hiện u vàng và xét nghiệm lipid máu tăng cao điển hình.



**Hình 4.5. Vị trí đột biến *c.1978C>T* tạo mã stop codon và vùng mã hóa cho protein LDLr tương ứng.**

Ở người bình thường, tại vị trí nucleotide số 1978 trên exon 13 gen *LDLR* là nucleotide Cytosin, trong quá trình dịch mã để tổng hợp protein LDLr sẽ tạo ra bộ 3 mã hóa CAG tại vị trí a.a 660. Khi xuất hiện đột biến thay thế nucleotide Cytosin bằng Thymin tại vị trí nucleotide số 1978 thì quá trình dịch mã tại vị trí a.a 660 sẽ bị thay đổi thành bộ 3 mã hóa UAG là một trong ba bộ 3 kết thúc (UAG, UAA, UGA), ngay lập tức quá trình dịch mã bị dừng lại và kết thúc quá trình tổng hợp protein LDLr tại vị trí này. Việc dừng lại quá trình dịch mã khiến cho các cấu trúc phía sau vị trí đột biến của protein LDLr (bao gồm 1 phần của vùng giống EGF, vùng OLS, vùng xuyên màng TM và vùng trong bào tương) không được hình thành, tạo nên một protein bất thường và gây đột biến vô nghĩa. Những đột biến dạng vô nghĩa thường được khẳng định là đột biến gây bệnh [127],[128]. Các nghiên cứu cho thấy tình trạng phân rã mRNA qua trung gian đột biến vô nghĩa (Nonsense-mediated mRNA decay - NMD) là một trong nhiều cơ chế kiểm soát bởi các tế bào để ngăn chặn tác dụng độc hại của các peptid bị cắt cụt hoặc bị biến đổi so với protein được sinh ra bình thường [129],[130]. Các đột biến vô nghĩa nằm ở vị trí dài hơn 50 - 55 bp so với vị trí nối chức năng exon-exon (hướng về phía vùng promoter và các exon, intron trước) thường gây ra tình

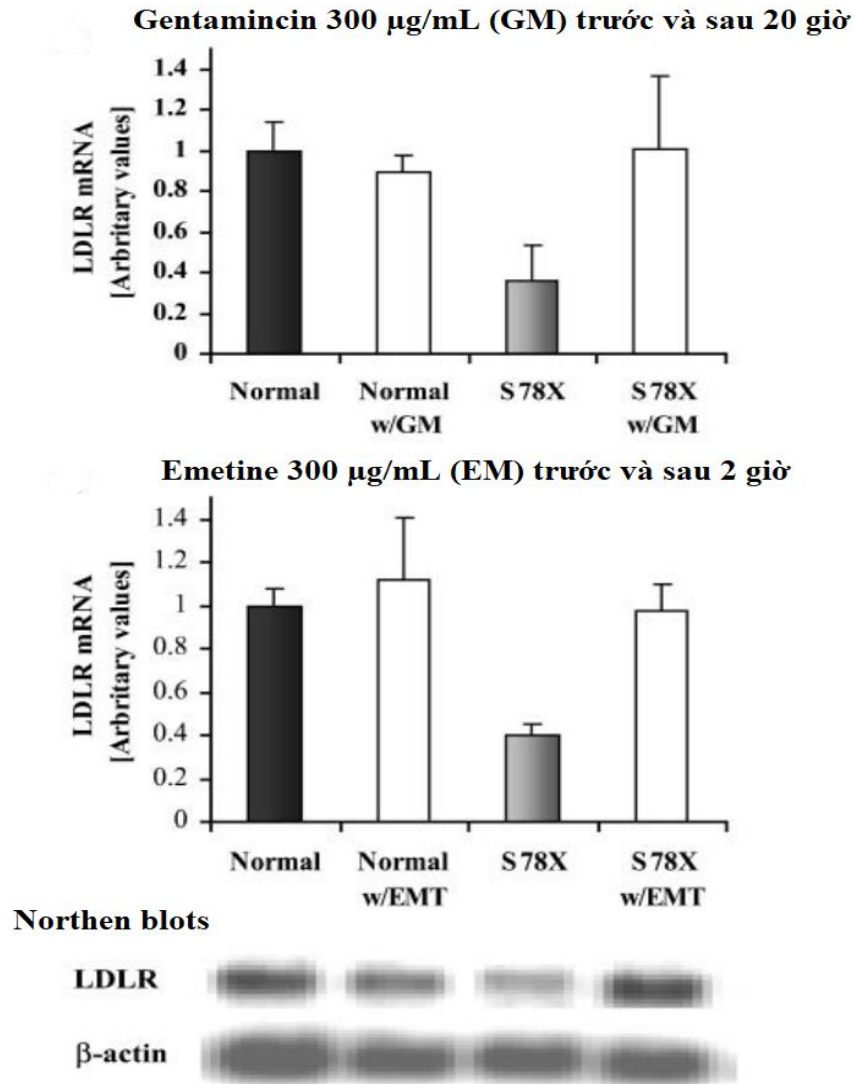


trạng phân rã mRNA qua trung gian đột biến vô nghĩa (NMD) [131]. Nghiên cứu của Weiss (2000) và Dedoussis (2004) đã chứng minh nhóm bệnh nhân mang đột biến vô nghĩa dạng dị hợp tử ở gen *LDLR* đã loại bỏ hoàn toàn chức năng của thụ thể và TC, LDL-C khi chưa điều trị cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm khiếm khuyết thụ thể trong nhóm bệnh nhân FH có u vàng [132],[133]. Đột biến vô nghĩa c.1978C>T trong nghiên cứu của chúng tôi nằm ở vị trí 133 bp so với vị trí nối chức năng exon-exon, do đó đột biến có khả năng gây ra tình trạng phân rã mRNA qua trung gian đột biến vô nghĩa và gây thiếu hụt protein LDLr có chức năng mặc dù là dạng đột biến dị hợp tử. Øystein Lunde Holla và cộng sự (2009) đã thực nghiệm với 4 loại đột biến vô nghĩa dị hợp trên gen *LDLR* trên tế bào cho thấy lượng thụ thể LDLr và tình trạng hấp thu LDL-C vào trong tế bào giảm có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  và  $p < 0,005$  tương ứng [134].

Shu H và cộng sự (2017) đã chứng minh các ảnh hưởng tới LDLr bởi đột biến tạo mã kết thúc tại exon 13 bằng thực nghiệm trên dòng tế bào Hep G2. Đột biến trên đã tạo ra protein đột biến có khối lượng 120 kDa do không được trải qua quá trình glycosyl hóa, do đó thụ thể được hình thành không thể vận chuyển từ lưới nội sinh chất tới bộ máy Golgi (thiếu hụt một phần – đột biến loại 2B). Khi được nhuộm đánh giá bằng miễn dịch huỳnh quang cho thấy lượng LDLr trên màng giảm đáng kể, quá trình vận chuyển LDL-C vào trong tế bào cũng giảm rõ rệt [135]. Đột biến vô nghĩa này được xếp vào nhóm 1 (nhóm đột biến vô nghĩa, dịch khung, vị trí nối, đột biến bất hoạt vùng promoter) nên nồng độ LDL-C cao hơn và đòi hỏi điều trị liều Atorvastatin cao hơn so với các nhóm đột biến còn lại [136]. Bệnh nhi MS23 phát hiện đột biến c.1978C>T vào viện với biểu hiện u vàng ở vùng khuỷu, móng, đầu gối; các xét nghiệm ban đầu có nồng độ TC và LDL-C tăng rất cao. Hiện tại bệnh nhi được điều trị đều với Simvastatin liều 10mg/ngày, kết hợp với kiểm soát

chế độ ăn và tập thể dục, kết quả xét nghiệm lipid máu vào tháng 10.2019 nồng độ TC là 15,29 mmol/L; LDL-C là 12,93 mmol/L;

Theo một hướng dẫn điều trị áp dụng gần đây với những bệnh nhân FH dạng đồng hợp tử/dị hợp tử kết hợp/đột biến vô nghĩa, mục tiêu LDL-C trong máu cần đạt <2,5 mmol/L, mục tiêu điều trị ở trẻ em có phần cao hơn (<3,5 mmol/L) hoặc <1,8 mmol/L ở người lớn bị XVĐM [137],[138], thì kết quả điều trị ở bệnh nhi MS23 cho thấy không đạt hiệu quả điều trị và phù hợp với kết quả nghiên cứu của Schuff-Werner (2012) về hiệu quả điều trị trên bệnh nhân FH dạng đột biến phức tạp (đồng hợp tử/dị hợp tử kết hợp /đột biến vô nghĩa) [139]. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Øystein Lunde Holla và cộng sự (2009) trên các chủng tế bào có chứa các đột biến vô nghĩa dị hợp tử lại cho thấy hiệu quả điều trị của các chất ức chế các phức hợp ribosome RNA nhận biết các vùng stop codon sớm như Emetine, Cycloheximide và Gentamicin [134]. Thục nghiệm tiến hành với chủng tế bào có đột biến vô nghĩa tạo mã stop codon sớm c.296C>G cho thấy với liều lượng Gentamicin (300 µg/mL) sau 20 giờ điều trị và Emetine (300 µg/mL) sau 2 giờ điều trị thì *LDLR* mRNA và protein LDLr tăng lên ngang bằng với tế bào bình thường (hình 4.6). Do đó, kết quả xét nghiệm xác định đột biến gen kết hợp với những hiểu biết về tình trạng NMD và các chất ức chế NMD vô cùng quan trọng với điều trị lâm sàng khi các can thiệp di truyền ngày càng phát triển. Đối với bệnh nhân MS23 nhóm nghiên cứu có thể tư vấn với bác sỹ điều trị lâm sàng cân nhắc sử dụng thử nghiệm các nhóm thuốc trên khi thất bại với các thuốc điều trị khác và theo dõi hiệu quả điều trị.



**Hình 4.6. Hiệu quả của chất ức chế NMD trên hiệu quả dịch mã của LDLR mRNA được xác định với Realtime-PCR và Northern blots được thực nghiệm trên tế bào bình thường và tế bào có đột biến vô nghĩa dị hợp tử *c.296C>G* [134].**

#### **Đa hình thái đơn (SNP)**

2 SNP rs5925 và rs1003723 xuất hiện với tỉ lệ cao trong nghiên cứu của chúng tôi tương ứng là 26,92% (7/26) và 42,31% (11/26). SNP rs1003723 được tìm thấy với tần xuất cao trong cộng đồng người Đan Mạch (44%) được chứng minh có liên quan đến sự bảo tồn hiệu quả ghép nối khi biểu hiện trên

in vitro [140]. Hai SNP này đã từng được công bố có liên quan tới tình trạng tăng triglyceride và cholesterol trước đây.

SNP rs1003723 (c.1359-30C>T hay IVS9-30C>T) phát hiện trên intron 9 gen *LDLR* trong nghiên cứu đã được nhiều nghiên cứu chứng minh nhóm mang alen T (CT hoặc TT) có liên quan tới tình trạng tăng TC và LDL-C cao hơn so với kiểu gen CC có ý nghĩa thống kê với  $p=0,002$  và  $p=0,01$  tương ứng [141]. Một điều đáng quan tâm là người mang alen T của rs1003723 được tìm thấy trong nghiên cứu của chúng tôi từng được chứng minh có liên quan đến nguy cơ mắc ung thư đường mật cao gấp 1,5 lần so với nhóm CC [142]. Tình trạng tăng TC và LDL-C cũng đã được chỉ ra có liên quan đến nguy cơ ung thư đường mật trước đó [143]. Do đó, mối liên quan giữa SNP rs1003723 và ung thư ống mật một phần liên quan đến ảnh hưởng của SNP này đối với tổng lượng cholesterol và LDL. Điều đáng lưu ý là SNP rs1003723 là biến thể duy nhất vẫn có ý nghĩa thống kê sau khi kiểm soát nhiều so sánh từ các nghiên cứu, điều này càng làm nổi bật tầm quan trọng của SNP rs1003723. Do vậy dấu ấn này cần được lưu ý trên những cá thể có mang SNP với kiểu alen T trong nhóm nghiên cứu với tình trạng TC và LDL-C tăng cao.

SNP rs5925 (c.1959T>C) được phát hiện trên một số bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi, SNP này với kiểu alen T (TT hoặc TC) có liên quan tới nồng độ triglyceride trong máu thấp hơn ở nhóm bệnh nhân rối loạn lipid máu, tăng huyết áp [144]. Ở cộng đồng người Trung Quốc, kiểu hình alen này còn liên quan trực tiếp tới nồng độ thấp hơn của các chỉ số TC, LDL-C, triglyceride trong máu so với kiểu alen CC [145],[146].

Trong 14 bệnh nhân phát hiện có đột biến, SNP: 7 bệnh nhân mang rs5925 kiểu alen TC (giảm nguy cơ) và 11 bệnh nhân mang rs1003723 với kiểu alen CT (tăng nguy cơ). Trong đó có bệnh nhân MS15 không những

mang đột biến đồng hợp c.664T>C exon 4 còn phát hiện đồng thời 2 SNP rs5925 (kiểu alen CC) và rs1003723 (kiểu alen TT). Đây có thể là nguyên nhân càng làm nặng lên và khó kiểm soát tình trạng rối loạn lipid máu ở bệnh nhân này. Tuy nhiên để đánh giá được chính xác hơn sự tác động giữa kiểu alen của các SNP với kiểu hình bệnh, cần có các nghiên cứu sâu hơn trên nhóm bệnh với nhóm chứng với cỡ mẫu lớn.

Các nghiên cứu tại khu vực châu Á như Hàn Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ và các nghiên cứu khác trên thế giới chỉ ra rằng, đột biến gen *LDLR* phát hiện chủ yếu tại exon 3, exon 4, exon 9, exon 13, exon 14 [60],[95],[93],[92],[91]. Trong nghiên cứu của chúng tôi có 14/26 bệnh nhân phát hiện đột biến, SNP chiếm tỉ lệ 53,85%. Đột biến và SNP xảy ra chủ yếu ở exon 4, exon 9, intron 9 và exon 13. Các dạng đột biến sai nghĩa, vô nghĩa, không thay đổi a.a, các đa hình thái đơn - SNP và trong nhóm các đột biến gây bệnh, đột biến trên exon 4 chiếm tỉ lệ cao nhất. Tuy nhiên có 12/26 bệnh nhân không phát hiện các đột biến, SNP tại các exon, intron trên. Kết quả nghiên cứu cũng không phát hiện có các đột biến trên exon 3 và exon 14, mặc dù tất cả các bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu đều có các triệu chứng điển hình và đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH theo tiêu chuẩn Simon Broome. Lý giải cho vấn đề này có thể do kinh phí nghiên cứu còn hạn chế nên chưa thực hiện khảo sát trên toàn bộ các exon gen *LDLR* cũng như các gen khác có liên quan đến cơ chế bệnh FH (*ApoB*, *PSCK9*) [147]. Do đó 12 bệnh nhân còn lại có thể có đột biến nhưng trên các vùng, các gen chưa được thực hiện. Mặt khác sự phân bố các dạng đột biến không đồng nhất giữa các khu vực địa lý, lãnh thổ. Tại Nhật Bản, đột biến xuất hiện chủ yếu là đột biến p.K790X trên exon 17 chiếm 27,7% [148], hay tại Nam Phi gặp đột biến c.368C>G chiếm 65% các đột biến xuất hiện trên gen *LDLR* [149]. Kết quả của chúng tôi cũng tương đương

với kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Minh Huyền năm 2016 các đột biến được tìm thấy chủ yếu trên exon 4 trong đó có đột biến c.664T>C [96].

### **Bàn luận về chỉ số lipid máu giữa nhóm có đột biến và không đột biến**

26 bệnh nhi trong nghiên cứu thỏa mãn các tiêu chuẩn về lâm sàng và cận lâm sàng để chẩn đoán bệnh FH của Simon Broome được khám, xét nghiệm các chỉ số lipid máu và phân tích xác định đột biến trên một số exon thường gặp như exon 3, 4, 9, 13, 14 [93],[92],[91]. Kết quả cho thấy hầu hết các chỉ số về TC và LDL-C trong nhóm nghiên cứu đều tăng cao, chỉ số TC và LDL-C ở nhóm có đột biến tăng cao đáng kể so với nhóm không có đột biến (tổng) trên 5 exon: 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR*, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở cả 2 thông số TC và LDL-C với  $p > 0,05$  (bảng 3.8).

Một số kết quả nghiên cứu trên bệnh nhân FH cũng không có sự khác biệt giữa nhóm có đột biến và không đột biến ở chỉ số TC và LDL-C. Kết quả nghiên cứu của Fairoozy và cộng sự tại Iran (2017) thực hiện trên 16 bệnh nhân, trong đó 9 bệnh nhân có đột biến và 7 bệnh nhân không phát hiện có đột biến trên gen *LDLR* thấy rằng: Nồng độ TC ở nhóm có đột biến ( $18.4 \pm 4.6$  mmol/L) không có sự khác biệt với nhóm không phát hiện có đột biến ( $13.7 \pm 6.7$  mmol/L) với  $p = 0,1$  và cũng không có sự khác biệt giữa nồng độ LDL-C ở 2 nhóm này với kết quả tương ứng ở nhóm có đột biến và nhóm không phát hiện thấy có đột biến là  $13.6 \pm 3.8$  mmol/L và  $9.6 \pm 5.0$  mmol/L với  $p = 0,09$  [112]. Nghiên cứu của Xiang R (2017) trên 219 bệnh nhân FH ở Trung Quốc, kết quả xác định được 158 bệnh nhân FH có đột biến, nhóm có đột biến cho thấy mức TC rõ ràng cao hơn ( $11,89 \pm 4,32$  mmol/L so với  $9,24 \pm 1,78$  mmol/L) và LDL ( $9,13 \pm 4,19$  mmol/L so với  $6,24 \pm 1,23$  mmol/L) so với nhóm không có đột biến, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê [119]. Nghiên cứu của Maria Diakou (2011) trên 169 bệnh nhân FH có đột biến và 85 bệnh nhân không có đột biến, nồng độ TC và LDL-C giữa 2 nhóm này

không có sự khác biệt ( $p < 0,05$ ) [150]. Các nghiên cứu trên phân tích xác định đột biến trên cả 3 gen: *LDLR*, *ApoB* và *PCSK9* nhưng nghiên cứu thực hiện ở người lớn - đối tượng có chỉ số lipid máu chịu ảnh hưởng bởi thói quen ăn uống và sinh hoạt. Chính vì vậy, đây có thể là nguyên nhân làm cho chỉ số lipid máu ở các nghiên cứu này cũng không có sự khác biệt giữa nhóm có đột biến và không đột biến.

Tuy nhiên, một số nghiên cứu lại chỉ ra sự khác biệt về nồng độ TC và LDL-C ở nhóm có và không có đột biến: Một nghiên cứu được thực hiện ở Slovenia của Groselj trên 280 bệnh nhi FH, sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) khi so sánh chỉ số TC và LDL-C giữa 2 nhóm có đột biến và không có đột biến gen *LDLR* [106]. Sàng lọc phân tầng bằng xét nghiệm gen *LDLR* ở Italy (2009) của Guardamagna cũng chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa ở 2 chỉ số lipid này giữa 2 nhóm có đột biến và không đột biến gen ở bệnh nhi FH ( $p < 0,05$ ) [108]. Lý giải cho sự không tương đồng này có thể do:

(1) Sự thay đổi hình thái LDLr phụ thuộc vào nhiều yếu tố: Sự tác động của yếu tố môi trường, yếu tố di truyền từ các gen có ảnh hưởng đến cơ chế sinh bệnh FH, tuy nhiên trong khuôn khổ nghiên cứu này chúng tôi chỉ xác định các đột biến điểm trên gen *LDLR* ở một số exon có tỉ lệ đột biến cao.

(2) Có thể cỡ mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi chưa đủ lớn (26 bệnh nhi FH và 45 thành viên trong phả hệ 3 gia đình bệnh nhi có đột biến).

Tại thời điểm được chẩn đoán bệnh FH, một số bệnh nhi trong nghiên cứu không phát hiện có đột biến trên 5 exon: 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR* nhưng có chỉ số lipid máu rất cao như MS06 (mang 2 SNP dị hợp tử) TC là 18,95 mmol/L, LDL-C 15,4 mmol/L; MS14 (mang 2 SNP dị hợp tử) có nồng độ TC là 17,92 mmol/L, LDL-C là 15,23 mmol/L, rất có thể những bệnh nhi này mang đột biến trên các exon khác của gen *LDLR* hoặc ở các gen khác cũng có mối liên quan ảnh hưởng đến cơ chế sinh bệnh FH.

Bảng 3.8 cũng cho thấy khi so sánh chỉ số TC và LDL-C giữa nhóm có đột biến và nhóm không có đột biến không có SNP thì sự khác biệt có ý nghĩa với  $p < 0,05$ ; phải chăng trên bệnh nhân không có đột biến nhưng có SNP thì có thể là yếu tố làm tăng cao nồng độ TC và LDL-C trong máu so với nhóm không có đột biến không có SNP. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu triển khai trên số lượng lớn mẫu bệnh nhân FH và mẫu chứng thì mới có thể xác định được vai trò của các SNP trong bệnh FH.

Chính vì vậy, trong tương lai thực hiện các nghiên cứu với phạm vi bao phủ toàn diện hơn về các gen có liên quan đến cơ chế sinh bệnh FH như gen *LDLR*, *ApoB*, *PCSK9* ở các vùng miền, dân tộc khác nhau là rất cần thiết để cung cấp cái nhìn sâu sắc hơn về tác động của các gen này đối với nồng độ lipid máu ở bệnh nhân FH.

Một điểm đặc biệt ở bệnh nhi MS04 (1 tháng tuổi) ngoài 2 chỉ số TC và LDL-C tăng cao, chỉ số TG cũng tăng cao rõ rệt (23,8 mmol/L), tuy nhiên kết quả phân tích không thấy xuất hiện đột biến ở 5 exon (3, 4, 9, 13, 14) gen *LDLR* trên bệnh nhi này. Tăng triglyceride máu trên bệnh nhi thường tăng nguyên phát và chủ yếu là do đột biến mất chức năng ở các gen liên quan đến quá trình dị hóa của lipoprotein giàu triglyceride, các khiếm khuyết di truyền chức năng của gen dẫn đến sự phân giải lipid chylomicron và do đó tích lũy triglyceride. Những đột biến này chủ yếu tập trung ở gen Lipoprotein lipase (LPL). Một số nghiên cứu trong khu vực và trên thế giới xét nghiệm đột biến gen trên bệnh nhân có tăng triglyceride máu đã xác định nguyên nhân có thể do các đột biến gây bệnh trên gen *LPL*, cũng như ở các protein khác, chẳng hạn như Apolipoprotein C-II và Apolipoprotein A-V (chất kích hoạt LPL), GPIHBP1 (một yếu tố cần thiết cho sự hình thành nội bào của LPL hoạt động). Nghiên cứu ở Trung Quốc (2017) của Lun Y đã mô tả một cách có hệ thống hai đột biến mất chức năng mới trên gen *LPL* (c.928 T>C trên exon 6



và c.1187A>T trên exon 8) từ một gia đình Trung Quốc, trong đó các bệnh nhân bị ảnh hưởng được biểu hiện bằng tăng triglyceride máu nặng và viêm tụy tái phát [151]. Nghiên cứu của Kassner U ở Đức (2015) trên bệnh nhân nam 57 tuổi tăng triglyceride máu quá mức (23,97 mmol/L), kết quả xác định được 2 đột biến mới trên exon 8 gen *LPL* đó là đột biến c.1302A>T và c.1306G>A đều có khả năng gây bệnh khi được dự đoán bằng phần mềm polyphen-2 và MutationTaster [152]. Nghiên cứu của Buonuomo P.S (2017) thực hiện trên 5 bệnh nhi tăng triglyceride máu rõ rệt, kết quả xác định 3 trẻ mang đột biến dị hợp tử gen *LPL*, 1 trẻ có đột biến đồng hợp tử của gen *ApoA5* và 1 trẻ có đột biến trên gen *LIPC* [153].

Phải chăng bệnh nhi MS04 trong nghiên cứu của chúng tôi là một dạng kết hợp giữa một đột biến gen gây tăng cholesterol máu gia đình và một đột biến gen gây tăng triglyceride máu như gen *LPL*. Để trả lời cho câu hỏi này rất cần có những nghiên cứu thực hiện trên những bệnh nhân tăng triglyceride nhằm đưa ra những kết quả tổng quan và đầy đủ về những gen có liên quan đến rối loạn thoái hóa quá trình thủy phân triglyceride.

### **Bàn luận về chỉ số lipid máu giữa nhóm đột biến dạng nặng và nhóm đột biến dị hợp tử**

Từ năm 1960, Khachadurian khi nghiên cứu trên một dòng họ ở Li Băng đã mô tả sự khác biệt về kiểu hình giữa dạng đồng hợp tử và dị hợp tử, ông chỉ ra rằng dựa vào nồng độ TC huyết thanh có thể chia thành 2 nhóm nghiên cứu: Nhóm đồng hợp tử có nồng độ TC cao gấp 4 lần bình thường, nhóm dị hợp tử cao gấp 2 lần bình thường [11]. Những năm tiếp theo, nhiều kết quả nghiên cứu đã cho thấy phần lớn những trường hợp mắc bệnh FH là dị hợp tử (được di truyền từ một đột biến gây bệnh) và bệnh nhân thường có mức TC và LDL-C tăng gấp 2 lần 3 so với mức bình thường trong huyết tương, tương ứng là 9 - 14 mmol/L và 5 - 10 mmol/L, một tỉ lệ nhỏ hơn là dạng dị hợp tử

phức tạp (được di truyền một bản sao của từng cặp hai đột biến khác nhau) và dạng đồng hợp tử là những bệnh nhân được di truyền từ hai đột biến gây bệnh giống nhau và do đó có sự gia tăng mức TC và LDL-C gấp 6 - 8 lần mức bình thường trong máu tương ứng khoảng 17 - 26 mmol/L và 15,5 mmol/L.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm bệnh nhi mang đột biến có chỉ số TC và LDL-C giữa hai nhóm đột biến dị hợp tử và nhóm đột biến dạng nặng (đột biến đồng hợp tử, đột biến dị hợp tử kết hợp, đột biến tạo mã kết thúc) có sự khác biệt với  $p=0,004$  và  $p=0,014$  tương ứng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn tương đồng với nhiều nghiên cứu trên thế giới và trong khu vực. Kết quả nghiên cứu của Kuan-Rau Chiou và cộng sự năm 2016 tại Trung Quốc 2 chỉ số TC và LDL-C giữa 2 nhóm đột biến dị hợp tử và đột biến đồng hợp tử cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  [154]. Một nghiên cứu khác cũng thực hiện tại Trung Quốc năm 2015 của Long Jiang và cộng sự cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở 2 chỉ số TC và LDL-C giữa 2 nhóm đột biến dị hợp tử và đồng hợp tử với  $p < 0,05$  [6]. Hai chỉ số TC và LDL-C giữa 2 nhóm đột biến đồng hợp tử và dị hợp tử sự khác biệt có ý nghĩa thống kê còn được chỉ ra ở kết quả nghiên cứu của Durst R (2017) ở Israel [121]. Nghiên cứu của Di Taranto (2020) tại Italy thực hiện trên 724 bệnh nhân FH, kết quả chỉ số TC và LDL-C giữa nhóm đột biến đồng hợp tử ( $n_1=3$ ) và đột biến dị hợp tử ( $n_2=19$ ) sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  [155]. Một nghiên cứu lớn được thực hiện tại Hà Lan của Luirink (2019) trên 1903 bệnh nhi FH, sự khác biệt có ý nghĩa ở cả 2 chỉ số TC và LDL-C giữa 2 nhóm đột biến đồng hợp và dị hợp tử [156]. Nghiên cứu của Besseling (2014) được thực hiện theo chương trình sàng lọc FH quốc gia ở Hà Lan trên 14.283 bệnh nhân FH, kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra sự khác biệt giữa 2 nhóm đột biến đồng hợp tử và dị hợp tử ở cả 2 chỉ số TC và LDL-C [157]. Một nghiên cứu của Hartgers (2019) thực hiện sàng lọc phân tử xác

định đột biến gen trên 1191 bệnh nhân FH đã cho thấy những bệnh nhân đột biến dạng nặng như: Đột biến đồng hợp tử hay đột biến 2 dị hợp tử kết hợp có chỉ số TC và LDL-C tương đương nhau và khác biệt rất có ý nghĩa với nhóm đột biến dị hợp tử [158]. Như vậy, hầu hết kết quả của các nghiên cứu trên bệnh nhân FH đều cho thấy chỉ số TC và LDL-C giữa 2 nhóm đột biến dạng nặng và đột biến dị hợp tử có sự khác biệt với  $p < 0,05$ .

Tăng cholesterol máu gia đình đồng hợp tử, một trong những dạng nặng nhất của tăng cholesterol máu gia đình. Bệnh gây ra bởi sự hiện diện của một biến thể gây bệnh ở trạng thái đồng hợp tử hoặc hai biến thể gây bệnh ở trạng thái dị hợp tử trong các gen *LDLR*, *ApoB*, *PCSK9* và việc phát hiện sớm, điều trị tích cực và theo dõi sát sao là vô cùng quan trọng, giúp ngăn cản quá trình tiến triển sớm các biến cố tim mạch [11].

#### **4.2. Phả hệ gia đình bệnh nhi có đột biến gen *LDLR***

Trong nhóm bệnh nhi FH ban đầu, chúng tôi phát hiện 7 bệnh nhân xuất hiện các đột biến gây bệnh hoặc có tiềm năng gây bệnh, trong đó có 3 bệnh nhân phát hiện các đột biến gây bệnh mức độ nặng như bệnh nhân MS02 với 2 đột biến dị hợp tử kết hợp, bệnh nhân MS15 với đột biến đồng hợp tử và bệnh nhân MS23 với đột biến tạo mã kết thúc. Tuy nhiên trong quá trình tiến hành lấy mẫu, nhóm nghiên cứu gặp phải không ít những khó khăn trong việc thu thập các mẫu máu trong phả hệ, một phần do các thành viên trong gia đình sống và làm việc tại khắp các tỉnh thành trên cả nước, một phần do những hiểu biết còn hạn chế và một số gia đình còn chưa thực sự hiểu rõ được hết ý nghĩa đối với việc sàng lọc bệnh. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu chỉ tiến hành phân tích 3 phả hệ được thu thập tương đối đầy đủ và được sự chấp thuận hoàn toàn của cả 3 phả hệ gia đình bệnh nhân MS02, MS03 và MS15.

### ***Phả hệ gia đình MS02***

Bệnh nhi MS02 là bệnh nhân nam, được chẩn đoán bệnh FH năm 10 tuổi với các tổn thương u vàng tại các vùng da khuỷu, mông, đầu gối 2 bên. Xét nghiệm máu thời điểm vào viện: TC tăng cao (24,7 mmol/L); LDL-C tăng cao (20,6 mmol/L). Trong gia đình có bố và ông ngoại của bệnh nhi bị NMCT phải can thiệp hoặc dùng thuốc tiêu sợi huyết. Tại thời điểm đó em gái của bệnh nhi tuy không có các biểu hiện tổn thương u vàng trên da, nhưng khi lấy máu xét nghiệm thấy TC tăng (10,4 mmol/L); LDL-C tăng cao (8,7 mmol/L) do đó em gái bệnh nhi cũng đủ tiêu chuẩn chẩn đoán FH và được đưa vào nhóm nghiên cứu.

Bệnh nhi MS02 và MS08 được tiến hành phân tích xác định đột biến trên 5 exon: 3, 4, 9, 13, 14 gen *LDLR* ngay sau đó. Kết quả là bệnh nhi MS02 có 2 đột biến dị hợp tử kết hợp: c.664T>C trên exon 4 và c.1285G>A trên exon 9 gen *LDLR*; bệnh nhi MS08 có đột biến dị hợp tử c.664T>C trên exon 4 gen *LDLR*. Phân tích đột biến gen *LDLR* ở cả 2 exon 4 và exon 9 trên bố, mẹ của bệnh nhi MS02 cho thấy bố của bệnh nhi (có NMCT) xuất hiện đột biến dị hợp tử c.1285G>A trên exon 9 gen *LDLR* và mẹ bệnh nhi xuất hiện đột biến dị hợp tử c.664T>C trên exon 4 gen *LDLR*.

Tiến hành giải trình tự xác định đột biến trên exon 4 và exon 9 gen *LDLR* ở các thành viên còn lại trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS02.

Bên gia đình họ nội có ông nội, cô ruột và không may mắn là cả 2 em (con cô ruột của bệnh nhi) đều mang đột biến dị hợp tử c.1285G>A trên exon 9 gen *LDLR* giống như bố của bệnh nhi MS02. Thời điểm hiện tại ngoài ông nội của bệnh nhi MS02 với chỉ số TC, LDL-C trong máu tăng cao và tăng huyết áp, nhưng chỉ duy trì điều trị thuốc hạ huyết áp, còn có 3 thành viên trong gia đình họ nội phát hiện có đột biến dị hợp tử trên exon 9 gen *LDLR* nhưng các chỉ số TC và LDL-C trong máu đều không cao, thậm chí khỏe

mạnh hoàn toàn. Một số nghiên cứu trên thế giới cũng đưa ra kết quả có 1 tỉ lệ nhỏ bệnh nhân FH mang đột biến nhưng các chỉ số TC và LDL-C hoàn toàn bình thường. Nghiên cứu của Ibarretxe (2018) ở Tây Ban Nha sàng lọc sinh học phân tử trên bệnh nhân FH kết quả có 7 trẻ (10%) có đột biến nhưng 2 chỉ số TC và LDL-C hoàn toàn bình thường [159]. Một nghiên cứu ở Slovenia của Groselj (2018) trên 280 bệnh nhân FH, kết quả cho thấy có một tỉ lệ đáng kể bệnh nhân FH có đột biến gen *LDLR* hay *ApoB* nhưng chỉ số TC < 4,5 mmol/L và LDL-C < 3,0 mmol/L [106]. Kết quả nghiên cứu sàng lọc phân tầng từ bệnh nhân FH của Vohnout (2016) ở Slovakia cho thấy có thành viên trong phả hệ có đột biến nhưng chỉ số TC và LDL-C hoàn toàn bình thường giá trị tương ứng là 4,8 mmol/L và 2,9 mmol/L [160]. Từ kết quả của các nghiên cứu trên cho thấy tầm quan trọng của sàng lọc di truyền trong việc phát hiện sớm các bệnh nhân FH mang đột biến nhưng không có biểu hiện tăng lipid máu. Mặt khác, nếu phương pháp sàng lọc có hệ thống và chủ động bị bỏ qua, số lượng bệnh nhân FH được phát hiện sẽ giảm đáng kể.

Mặc dù chưa đánh giá đầy đủ được các yếu tố nguy cơ, các tác động từ môi trường, tuy nhiên việc tư vấn về chế độ ăn uống, sinh hoạt và theo dõi kiểm tra định kỳ các thông số lipid máu để phòng ngừa biến cố là vô cùng cần thiết với 4 thành viên có đột biến trong gia đình họ nội của bệnh nhân MS02.

Đột biến c.1285G>A trên exon 9 gen *LDLR* là dạng đột biến gây giảm số lượng thụ thể chức năng. Bố của bệnh nhân MS02 mang gen bệnh dị hợp tử với đột biến c.1285G>A trên exon 9 gen *LDLR* chưa từng có hoặc không quan tâm phát hiện các biểu hiện trên lâm sàng, cùng với thói quen ăn uống không kiểm soát do đặc thù công việc làm doanh nghiệp thường xuyên uống rượu bia, hút thuốc lá có thể là nguyên nhân xuất hiện sớm các biến cố tim mạch ở bố của bệnh nhân MS02, bố của bệnh nhân MS02 cũng chưa từng điều trị cho tới năm 36 tuổi xuất hiện NMCT.

Ông ngoại của bệnh nhi MS02 mang đột biến dị hợp tử c.664T>C trên exon 4 gen *LDLR*, bị NMCT, đã đặt stent và đang sử dụng thuốc điều trị tăng lipid máu (Rosuvastatin 20mg) và thuốc hạ huyết áp duy trì đều đặn hàng ngày. Mẹ và anh họ đều nhận đột biến từ ông ngoại của bệnh nhi MS02, có tăng TC và LDL-C trong máu, tuy nhiên 2 thành viên này chưa sử dụng thuốc điều trị tăng lipid máu. Bác của bệnh nhi MS02 có 2 chỉ số TC và LDL-C trong máu tăng nhẹ nhưng chưa đạt theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Simon Broome mặc dù có mang đột biến c.664T>C. Chính vì vậy, việc theo dõi kiểm tra định kỳ các chỉ số lipid máu để phòng ngừa biến cố là vô cùng cần thiết đối với 3 thành viên trên trong gia đình họ ngoại của bệnh nhi MS02.

Sau khi có kết quả phân tích xác định đột biến và lập sơ đồ đột biến phả hệ, các thành viên có đột biến trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 đã được tư vấn về kiểm soát chế độ sinh hoạt, ăn uống cũng như thuốc điều trị duy trì đều đặn và cần phải được theo dõi, kiểm tra định kỳ bằng các xét nghiệm cận lâm sàng: Xét nghiệm lipid máu, siêu âm mạch... để phòng ngừa các biến cố mà 2 thành viên trong phả hệ MS02 đã mắc phải (bố và ông ngoại của bệnh nhi MS02).

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.11 cho thấy không có sự khác biệt về chỉ số TC và LDL-C giữa 2 nhóm đột biến ở exon 4 và đột biến ở exon 9 ( $p > 0,05$ ). Một số kết quả nghiên cứu trên thế giới cũng không nhận thấy có mối liên quan rõ ràng giữa các đột biến trên các exon gen *LDLR* và nồng độ lipid, đặc điểm trên lâm sàng của bệnh XVĐM [33].

Kết quả xác định đột biến ở phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 cho thấy: Trong 12 thành viên, tính theo tỉ lệ di truyền bệnh trong phả hệ có 11 thành viên mang đột biến trên exon 4, exon 9 gen *LDLR*; trong đó bệnh nhi MS02 mang 2 đột biến dị hợp tử trên cả exon 4 và exon 9; 5 thành viên mang đột biến dị hợp tử trên exon 9 (họ nội); 5 thành viên mang đột biến dị hợp tử trên

exon 4 (họ ngoại). 10 thành viên được xác định có đột biến dị hợp tử trên exon 4 hoặc exon 9 đều chưa được chẩn đoán bệnh FH tại thời điểm tiến hành nghiên cứu. Kết quả xét nghiệm TC và LDL-C trong máu của các thành viên trong gia đình hoàn toàn phù hợp với kết quả xác định đột biến gen *LDLR*, với mức TC trung bình là 7,36 mmol/L và mức LDL-C trung bình là 5,67 mmol/L. Kết quả phân tích đột biến phù hợp với bệnh cảnh lâm sàng tại thời điểm được chẩn đoán bệnh FH và phù hợp với đặc điểm về di truyền của đột biến: Di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với nhiều nghiên cứu trên thế giới về tỉ lệ di truyền gen gây bệnh FH khi thực hiện sàng lọc phân tầng. Nghiên cứu của Setia (2018) thực hiện sàng lọc phân tầng trên 133 thành viên gia đình có bệnh nhân FH mang đột biến, kết quả 88 thành viên ở các thế hệ có mối quan hệ họ hàng bậc 1, 2, 3 với bệnh nhân FH (66,16%) có đột biến [161].

Mặc dù tiên bộ y tế rất lớn, nhưng nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam, bệnh FH vẫn chưa được chẩn đoán sớm dẫn đến sự chậm trễ trong điều trị. Chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời, những bệnh nhân này có thể sống lâu hơn và có chất lượng sống tốt hơn. Chẩn đoán bệnh FH rất quan trọng không chỉ đối với tiên lượng của bệnh nhân mà còn có ý nghĩa vô cùng quan trọng đối với các thành viên trong gia đình cùng mắc thể bệnh FH. Đặc biệt đối với 2 đối tượng nghiên cứu I.1 và II.4 trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS02 nếu được phát hiện sớm bệnh FH sẽ có sự kiểm soát tốt về chế độ ăn uống, sinh hoạt và thuốc điều trị, giúp phòng ngừa các biến cố NMCT, nguy cơ tử vong đồng thời nâng cao chất lượng sống cho 2 đối tượng nghiên cứu này.

Nghiên cứu của Sturm (2018) ở Mỹ cho thấy những bệnh nhân FH có đột biến nhưng chỉ số LDL-C thấp < 3,36 mmol/L vẫn có nguy cơ gây ra biến cố bệnh tim mạch đến 2,2% [81]. Do đó, tư vấn di truyền và sàng lọc phân tầng các thành viên trong gia đình của bệnh nhi đóng một vai trò quan trọng

trong việc phát hiện và điều trị bệnh sớm kể cả trong các trường hợp thành viên trong phả hệ không có biểu hiện u vàng trên lâm sàng và không tăng lipid máu [162],[163],[164]. Vai trò của xét nghiệm di truyền bệnh FH đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới đề cập và nhấn mạnh, đồng thời Tổ chức FH tại Mỹ phối hợp với Hội chuyên gia Quốc tế đã đánh giá tiện ích của xét nghiệm di truyền bệnh FH với các lý do:

- 1) Giúp cho việc chẩn đoán xác định sớm bệnh FH
- 2) Các đột biến gây bệnh cho thấy nguy cơ gây bệnh tim mạch cao hơn, điều này cho thấy nhu cầu tiềm năng hạ lipid mạnh hơn trong việc điều trị bệnh nhân FH.
- 3) Tăng số bệnh nhân FH được chẩn đoán sớm từ đó gia tăng sự khởi đầu và tuân thủ điều trị bệnh FH.
- 4) Giúp phát hiện sớm người thân có nguy cơ mắc bệnh FH từ bệnh nhân FH ban đầu.

Hội đồng cũng khuyến nghị xét nghiệm di truyền trở thành tiêu chuẩn trong chiến lược quản lý bệnh nhân mắc bệnh FH và người thân bệnh nhân FH có nguy cơ mắc bệnh. Xét nghiệm di truyền phải được thực hiện trên các gen *LDLR*, *ApoB* và *PCSK9*; các gen khác cũng có thể cần được xem xét để phân tích dựa trên kiểu hình của bệnh nhân [81].

### ***Phả hệ gia đình MS03***

Bệnh nhân nam MS03, đi khám vì biểu hiện u vàng dưới da vùng cánh tay, khuỷu tay, xét nghiệm có tăng lipid máu: TC: 7,35 mmol/L, LDL-C: 5,48 mmol/L, bệnh nhi đủ tiêu chuẩn chẩn đoán FH theo tiêu chuẩn Simon Broome.

Tiến hành phân tích gen *LDLR* trên 5 exon: 3, 4, 9, 13, 14 chúng tôi phát hiện bệnh nhi mang đột biến c.664T>C dị hợp tử trên exon 4. Sau khi tư vấn cho gia đình về bệnh FH, chúng tôi đã lấy được phả hệ ở 3 thế hệ của gia đình bệnh nhi MS03 với 12 người (bao gồm cả bệnh nhi), xét



nghiệm nồng độ lipid máu và phân tích gen bằng phương pháp giải trình tự xác định đột biến trên exon 4 gen *LDLR* cho 11 thành viên trong phả hệ đồng thời thu thập các đặc điểm lâm sàng liên quan đến bệnh FH ở các thành viên trong phả hệ gia đình.

Kết quả cho thấy cả 2 bên họ nội, ngoại của bệnh nhi đều có thành viên tăng lipid máu, tuy nhiên thành viên họ ngoại (mẹ, bà ngoại) và anh trai của bệnh nhi có nồng độ lipid máu cao hơn tương ứng với kết quả phát hiện có đột biến (đột biến c.664T>C trên exon 4 gen *LDLR*). Chúng tôi đã tư vấn cho các thành viên còn lại trong gia đình họ ngoại của bệnh nhi đi khám kiểm tra các chỉ số lipid máu. Tất cả thành viên trong gia đình đều không có biểu hiện đau ngực, tăng huyết áp. Một số thành viên trong gia đình không phát hiện có đột biến nhưng có tăng chỉ số TC và LDL-C, ví dụ như bà nội của bệnh nhi có tăng lipid máu đủ tiêu chuẩn chẩn đoán FH; bố và bác trai của bệnh nhi có mức lipid máu tăng nhẹ nhưng chưa đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH (tiêu chuẩn Simon Broome), sở dĩ tình trạng này là do chế độ ăn uống sinh hoạt thuận lợi cho tăng lipid máu: Bố và bác trai với đặc thù nghề nghiệp thường xuyên uống rượu, chế độ ăn không kiểm soát nhiều dầu mỡ, hút thuốc lá và không có chế độ luyện tập thường xuyên, hoặc cũng có thể trong khuôn khổ nghiên cứu này mới tiến hành khảo sát trên 5 exon gen *LDLR*, do đó cần thực hiện thêm những nghiên cứu sâu hơn, mở rộng phân tích xác định đột biến trên toàn bộ 18 exon gen *LDLR* và một số gen có liên quan đến bệnh FH như *ApoB* và *PCSK9*.

Ở Việt Nam, việc phát hiện sớm bệnh FH, công tác tư vấn và chiến lược sàng lọc cho các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhân FH còn rất hạn chế. Cụ thể bệnh nhi MS03: Do sự xuất hiện u vàng trên da nên đi khám bệnh da liễu, tuy nhiên tại thời điểm đó bệnh nhi MS03 không được phát hiện và tư vấn điều trị về tình trạng rối loạn lipid máu cho đến khi khám tại Bệnh viện

Nhi Trung ương mới được phát hiện và tư vấn bệnh FH. Bệnh FH là một bệnh âm thầm, biểu hiện trên da có thể bị bỏ qua nếu không quá ảnh hưởng đến thẩm mỹ, thậm chí có thể đi khám da liễu nhưng cũng không được chú trọng bệnh lý này, khi xuất hiện các cơn đau ngực hay NMCT mới phát hiện được bệnh FH đôi khi là quá muộn, rất khó khăn và tốn kém trong điều trị, do đó cần phát hiện và điều trị sớm cho bệnh nhân.

Trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS03 có 4 thành viên mang đột biến trên exon 4 gen *LDLR*, tuy nhiên chỉ bệnh nhi được phát hiện có u vàng lúc 5 tuổi trong khi các thành viên khác không có u vàng. Có thể sự xuất hiện của u vàng phụ thuộc vào từng cá thể với mức độ hoạt động hay ức chế biểu hiện của đột biến và sự tác động của chế độ ăn uống, sinh hoạt. Sự không xuất hiện u vàng cũng là 1 lý do làm cho các bệnh nhân FH phát hiện bệnh muộn, không xét nghiệm để phát hiện và điều trị sớm tình trạng tăng lipid máu, dẫn tới nguy cơ xuất hiện các biến cố tim mạch, gây ảnh hưởng tới chất lượng sống cũng như làm tăng nguy cơ tử vong cho bệnh nhân FH.

Bởi lợi ích của việc chẩn đoán và điều trị sớm bệnh FH là rất có ý nghĩa, giúp giảm tỉ lệ mắc và tử vong do bệnh mạch vành đến 44% và chi phí điều trị giảm lipid máu thấp hơn nhiều so với điều trị các biến chứng bằng can thiệp mạch, phẫu thuật bắc cầu chủ vành, lọc mỡ máu, thuốc tiêu sợi huyết hay các chi phí khác trong hồi sức cấp cứu. Do đó, các quốc gia trên thế giới đã có nhiều chương trình sàng lọc bệnh FH trong cộng đồng. Tại Anh với tiêu chuẩn chẩn đoán Simon Broome và tại Hà Lan cũng đưa ra các tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH nhằm quản lý bệnh nhân FH, chiến lược sàng lọc đã được thực hiện rộng rãi trong cộng đồng và các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhân FH. Với chiến lược sàng lọc này đã giúp phát hiện, tư vấn, điều trị và phòng ngừa sớm các biến cố do bệnh FH gây ra, mang lại chất lượng cuộc sống tốt hơn cho bệnh nhân FH cũng như giảm thiểu gánh nặng chi phí điều

trị các biến cố của bệnh FH cho xã hội [165]. Tại Mỹ, tổ chức MEDPED với ý nghĩa “chẩn đoán sớm để đẩy lùi cái chết sớm” được thành lập, website là nơi kết nối những đối tượng có nồng độ cholesterol máu đạt tiêu chuẩn MEDPED đăng kí vào chương trình, có thể được phân tích gen xác định đột biến và tư vấn điều trị [166]. Tại Nhật Bản, trong nửa thế kỉ nghiên cứu và quản lí bệnh FH đã lập ra tiêu chuẩn chẩn đoán đặc thù cho người dân gồm hạt xanthoma kèm tăng lipid máu (TC>225mg/dL, LDL-C>162mg/dL) hoặc tăng lipid máu ở người có quan hệ huyết thống bậc 1 hoặc bậc 2 với bệnh nhân FH. Đối với thể đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kết hợp mức cholesterol tăng gấp 3-4 lần so với giá trị bình thường; độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ tiêu chuẩn này lên đến 98%, bằng chứng trong xét nghiệm gen vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng ngay cả khi không tăng cholesterol máu. Sàng lọc phân tầng là sàng lọc có chủ đích từ các ca bệnh chỉ điểm ban đầu giúp tiết kiệm chi phí hơn và thu thập được số lượng lớn bệnh nhân FH trong dân số. Nghiên cứu của chúng tôi kết hợp giữa sàng lọc cơ hội, xác định các ca bệnh chỉ điểm sau đó sàng lọc phân tầng, điều này có ưu điểm tiết kiệm và thu được nhiều ca bệnh chỉ điểm và mở rộng được mạng lưới FH nhanh chóng. Tác giả Trương Thanh Hương bằng phân tích phả hệ chỉ từ 5 bệnh nhân ở thể đồng hợp tử giúp phát hiện 56 bệnh nhân FH từ việc xét nghiệm gen 107 thành viên gia đình [167].

### ***Phả hệ gia đình MS15***

Bệnh nhi MS15 (III.1) mang đột biến đồng hợp tử exon 4 gen *LDLR*: 1 gen đột biến nhận từ bố (II.6) và 1 gen đột biến nhận từ mẹ (II.1), bệnh nhi MS15 biểu hiện trên lâm sàng rất điển hình với u vàng ở nhiều vị trí và diện rộng trên cơ thể cùng với nồng độ TC và LDL-C tăng cao trong máu (bảng 3.14), lúc vào viện chưa có biểu hiện tăng huyết áp và NMCT.

Cả bố và mẹ bệnh nhi MS15 đều có cùng loại đột biến dị hợp tử trên exon 4, thế hệ con sinh ra có khả năng đột biến đồng hợp tử exon 4 là 25%, mang đột biến dị hợp tử là 50%, còn 25% còn lại là trường hợp bình thường. Bệnh nhi MS15 trong nghiên cứu của chúng tôi hiện tại là con gái đầu lòng và là đứa con duy nhất đến thời điểm hiện tại nhưng thật không may mắn, bệnh nhi lại nhận đột biến dị hợp tử từ cả bố và mẹ.

Mức độ trầm trọng và tiên lượng ở những bệnh nhân FH thể đồng hợp tử phụ thuộc mức độ hoạt động của thụ thể được đánh giá trong nguyên bào sợi được nuôi cấy, nếu < 2% hoạt động bình thường (âm tính) thường khó sống qua được 20 tuổi, tuy nhiên nhóm 2-25% thụ thể hoạt động bình thường (nhóm thiếu hụt) thường tiên lượng tốt hơn nhóm trên và thường xuất hiện bệnh lý mạch vành năm 30 tuổi [115]. Những bệnh nhân ở dạng đồng hợp tử thường đáp ứng rất kém với các biện pháp điều trị thông thường như thay đổi chế độ sinh hoạt, điều trị kết hợp các nhóm thuốc statin. Thường phải cân nhắc một cách nghiêm túc trong vấn đề ghép gan hoặc các biện pháp lọc loại bỏ LDL-C ra khỏi máu [127]. Hiện tại bệnh nhi MS15 đang được điều trị với statin và Ezetimibe với chế độ ăn được kiểm soát, tuy nhiên mức độ cải thiện đáp ứng vẫn chưa tốt thể hiện trên kết quả xét nghiệm TC và LDL-C định kỳ. Khuyến cáo các biện pháp điều trị tích cực và theo dõi sát (siêu âm mạch đánh giá mức độ xơ vữa, xét nghiệm lipid máu...) là vô cùng cần thiết và quan trọng với bệnh nhi MS15 trong việc ngăn ngừa NMCT và nguy cơ tử vong sớm.

Kết quả xét nghiệm TC và LDL-C trong máu của các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS15 hoàn toàn phù hợp với kết quả xác định đột biến, trong 16 thành viên tính theo tỉ lệ di truyền bệnh trong phả hệ có 14 thành viên mang đột biến c.664T>C trên exon 4 gen *LDLR*, trong đó bệnh nhi MS15 mang đột biến đồng hợp tử; 13 thành viên mang đột biến dị hợp tử với

mức TC trung bình là 6,95 mmol/L và LDL-C trung bình là 5,53 mmol/L. 13 thành viên này đều chưa được chẩn đoán bệnh FH tại thời điểm tiến hành nghiên cứu và cũng chưa bao giờ được xét nghiệm kiểm tra các chỉ số lipid máu, cho nên tới thời điểm hiện tại tất cả 13 thành viên mang đột biến dị hợp tử đều không có chế độ dinh dưỡng cũng như chế độ luyện tập phù hợp. Tiếp theo, chúng tôi tiến hành tư vấn cho các thành viên này về chế độ ăn, sinh hoạt cũng như khuyến cáo các thành viên tới bệnh viện khám, điều trị và theo dõi phòng ngừa các biến cố. Tất cả 13 thành viên mang đột biến dị hợp tử ở exon 4 gen *LDLR* đều không có biểu hiện trên lâm sàng: U vàng, tăng huyết áp, đau ngực hay NMCT, 10/13 thành viên mang đột biến này có kết quả chỉ số TC và LDL-C trong máu tăng theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Simon Broome, 3/13 thành viên có 2 chỉ số lipid chỉ tăng nhẹ và chưa đạt theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Simon Broome, bao gồm mẹ, cô ruột và chú ruột của bệnh nhi MS15.

Nhằm phát hiện và ngăn ngừa sớm các biến cố của bệnh FH đối với các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS15, vấn đề cần được đưa ra đó là:

(1) Điều trị và kiểm soát chặt chẽ bằng xét nghiệm lipid máu, siêu âm mạch định kỳ phát hiện xơ vữa đối với bệnh nhi MS15.

(2) Tư vấn chế độ ăn uống, sinh hoạt cũng như thuốc điều trị đối với các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS15 có đột biến dị hợp tử và có tăng lipid máu.

(3) Tư vấn về chế độ ăn uống và xét nghiệm lipid máu định kỳ đối với 3 thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS15 có đột biến trên exon 4 gen *LDLR* nhưng chưa tăng lipid máu.

Nghiên cứu trước đây trên nhóm các bệnh nhân FH tại khu vực phía Bắc Việt Nam [96], [97] cũng phát hiện đột biến dị hợp tử c.664T>C giống như trong nghiên cứu của chúng tôi. Bệnh nhi MS15 nhận 2 đột biến dị hợp tử

c.664T>C từ bố và mẹ, gia đình ông bà nội và ông bà ngoại ở cách nhau khoảng 5km (Nghệ An), trong quá trình nghiên cứu chúng tôi đã khai thác yếu tố dịch tễ và tiền sử kết hôn trong gia đình, tuy nhiên chưa xác định được mối liên quan về các mối quan hệ họ hàng trong phả hệ phát hiện đột biến trên. Đột biến này ở dạng dị hợp tử cũng được tìm thấy ở gia đình họ ngoại của bệnh nhi MS02 (Lạng Sơn). Chính vì vậy, chúng tôi dự đoán rằng có thể đột biến này đã tồn tại trong cộng đồng người Việt Nam từ trước đây rất lâu và cụ thể là trong cộng đồng miền Bắc, miền Trung Việt Nam.

Từ kết quả nghiên cứu của các thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhi MS15 càng nhấn mạnh rằng mặc dù tiên bộ y tế rất lớn, nhưng tại nhiều nước trên thế giới bệnh FH vẫn chưa được chú trọng trong chẩn đoán một cách đúng mực, dẫn tới sự chậm trễ trong điều trị, kết quả nghiên cứu trên thế giới cho thấy chỉ có khoảng 10% bệnh nhân FH được phát hiện [162]. Nếu được chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời, những bệnh nhân này có thể sống lâu hơn và có chất lượng sống tốt hơn. Chẩn đoán bệnh FH rất quan trọng không chỉ đối với tiên lượng của bệnh nhân mà còn có ý nghĩa vô cùng quan trọng đối với các thành viên gia đình cùng mắc thể bệnh FH. Tại Việt Nam, đại gia đình thường sống gần nhau, dễ thu thập mẫu thuận lợi cho việc lấy mẫu sàng lọc phân tầng, tuy nhiên rất khó khăn trong vấn đề xã hội, e ngại sự xa lánh và lộ thông tin sức khỏe với cộng đồng cũng như chưa có hiểu biết về bệnh FH. Đây cũng là vấn đề chúng tôi gặp phải khi tiếp cận lấy mẫu nghiên cứu phả hệ gia đình các bệnh nhi FH. Do đó việc tổ chức các chương trình nâng cao sự hiểu biết về bệnh FH và xét nghiệm sàng lọc lipid máu cũng như sàng lọc di truyền cho cộng đồng, cho Bác sĩ điều trị và việc thành lập cơ quan quản lí FH, các nhóm hỗ trợ gia đình có bệnh nhân FH là rất cần thiết [168].

Mặc dù sàng lọc di truyền là không cần thiết để chẩn đoán và quản lý lâm sàng bệnh nhân FH (nghiên cứu báo cáo 5-20% bệnh nhân FH không xác

định thấy có đột biến), tuy nhiên nó có thể làm tăng các chiến lược sàng lọc và giúp dự đoán nguy cơ tim mạch nếu có thể xác định được sự bất thường di truyền cụ thể [169],[170],[171].

Trong một nghiên cứu nhóm lớn gần 30.000 người Hà Lan, các bệnh nhân phát hiện có đột biến gen *LDLR* gây bệnh FH gần như làm tăng gấp ba lần nguy cơ mắc bệnh tim mạch so với bệnh nhân không phát thấy có đột biến ( $P < 0,001$ ), dữ liệu cũng cho thấy độ nhạy của chẩn đoán di truyền được cải thiện so với chẩn đoán dựa trên phân phối LDL-C dịch tể học [170].

Một nghiên cứu trên 26.000 cá nhân ở Hà Lan, LDL-C trên phân vị thứ 90 cung cấp độ nhạy 68,5% trong khi xét nghiệm di truyền đột biến LDLr cho thấy độ nhạy 91,3%. Sau khi bệnh nhân được chẩn đoán chính xác FH bằng xét nghiệm di truyền, việc sàng lọc phân tầng cho tất cả người thân của bệnh nhân là tối quan trọng [172].

Việc quản lý và điều trị bệnh nhân FH vẫn còn là một khoảng trống lớn đối với nền y tế Việt Nam hiện nay. Theo nghiên cứu của Trương Thanh Hương và cộng sự tại Bệnh viện Tim mạch trung ương (2018) [167], mặc dù các nỗ lực trong việc phát hiện các trường hợp chẩn đoán bệnh FH mới, tuy nhiên chỉ có 9% trong số đó được bắt đầu điều trị với liệu pháp giảm lipid trong máu. Những lý do cho vấn đề này là:

- (1) Thiếu hiểu biết của bệnh nhân về tình trạng của họ;
- (2) Thiếu kiến thức của các bác sĩ địa phương quản lý bệnh nhân FH;
- (3) Chi phí điều trị, thuốc điều trị hạ lipid máu statin còn cao so với thu nhập trung bình ở Việt Nam đặc biệt trong trường hợp sử dụng statin liều cao có kết hợp thêm Ezetimibe và các kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh như: Siêu âm các mạch ngoại vi xác định xơ vữa, thêm các khó khăn liên quan đến việc kê thuốc, bảo hiểm, chi phí đi lại càng khiến các nhóm bệnh nhân được chẩn đoán FH gặp khó khăn nhiều hơn trong tiếp cận điều trị. Ngoài ra còn thiếu

nhận thức và kiến thức về bệnh FH giữa các chuyên gia y tế và cộng đồng nói chung tại Việt Nam.

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện một cách công phu với khảo sát khoa học về các biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng kết hợp với phân tích các đột biến, SNP ở 26 bệnh nhi FH, từ đó đưa ra kế hoạch tỉ mỉ về thời gian tiếp cận để khảo sát, nghiên cứu 45 thành viên của 3 phả hệ gia đình bệnh nhi FH có đột biến ở rải rác trên 10 tỉnh thành trong cả nước. Tuy nhiên kết quả thu được rất hữu ích, nghiên cứu đã phát hiện những đột biến mới chưa từng công bố trên thế giới ở bệnh nhi FH, đã phát hiện và chẩn đoán sớm bệnh FH cho nhiều đối tượng là thành viên trong 3 phả hệ, từ đó nhóm nghiên cứu đã tư vấn điều trị, dự phòng biến chứng cho bệnh nhân FH mới. Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy, những người thân bệnh nhân FH thế hệ hợp tử thường không có triệu chứng, thường không hiểu khái niệm phòng ngừa và việc thuyết phục họ về giá trị của các thuốc giảm lipid máu là một thách thức; đặc biệt với chi phí và thời gian liên quan đến điều trị và theo dõi lâu dài. Mặc dù một số bác sĩ đa khoa, bác sĩ tim mạch và bác sĩ Nhi khoa được đào tạo rất tốt trong việc phát hiện và quản lý bệnh nhân FH, nhưng thiếu kiến thức về bệnh FH trong các bác sĩ nói chung còn rất trầm trọng [173]. So với một số quốc gia khác trong khu vực châu Á, các bác sĩ Việt Nam có sự thiếu hụt rất lớn về kiến thức và nhận thức về bệnh FH [174],[175]. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc thực hiện các chương trình giáo dục và nâng cao nhận thức ở Việt Nam sẽ thúc đẩy hiệu quả của việc quản lý và điều trị với các bệnh nhân được chẩn đoán FH.



## KẾT LUẬN

### 1. Các đột biến và SNP trên một số vùng gen *LDLR* ở bệnh nhi FH

✚ 4 loại đột biến gặp ở 7/26 bệnh nhi FH (26,92%):

- Hai đột biến đã công bố gây bệnh:

+ Đột biến c.664T>C trên exon 4: Có 5 bệnh nhi, trong đó 4 bệnh nhi mang đột biến dị hợp tử; 1 bệnh nhi mang đột biến đồng hợp tử.

+ Đột biến c.1285G>A trên exon 9: Có 1 bệnh nhi MS02 mang đột biến c.1285G>A (đồng thời mang cả đột biến c.664T>C trên exon 4);

- Hai đột biến mới chưa công bố nhưng có khả năng gây bệnh:

+ Đột biến c.1335C>T trên exon 9

+ Đột biến c.1978C>T trên exon 13

✚ Hai SNP rs1003723 và rs5925 có liên quan đến bệnh FH gặp ở 12/26 bệnh nhi.

### 2. Tính di truyền và một số đặc điểm của bệnh FH

Bệnh FH ở phả hệ 3 gia đình bệnh nhi có đột biến đều tuân theo quy luật di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường (Các thành viên trong phả hệ mang đột biến chiếm tỉ lệ cao và không liên quan tới giới tính). Một số thành viên xuất hiện biến cố NMCT do không được phát hiện và điều trị kịp thời, tuy nhiên có những thành viên có đột biến nhưng không có biểu hiện tăng lipid máu.

- **Gia đình bệnh nhi MS02:** Bệnh nhi MS02 mang đột biến gây bệnh thể dị hợp tử c.664T>C trên exon 4 và c.1285G>A trên exon 9.

Đột biến dị hợp tử cùng loại trên exon 9 di truyền theo họ nội, đột biến này phát hiện ở bố bệnh nhi, có tiền sử NMCT (họ hàng bậc 1). Ông nội phát hiện đột biến, tăng lipid máu, cô ruột có đột biến lipid máu bình thường (2/2 người họ hàng bậc 2). Cả 2 em bên nội đều có đột biến và không tăng lipid máu (2/2 người họ hàng bậc 3).

Đột biến dị hợp tử cùng loại trên exon 4 di truyền theo họ ngoại, gặp ở mẹ và em gái ruột cùng có tăng lipid máu (2/2 người họ hàng bậc 1). Ông ngoại có THA, tiền sử NMCT cũ phát hiện có đột biến, bác gái có đột biến nhưng không tăng lipid máu (2/2 người họ hàng bậc 2). Một trong hai người con của bác gái phát hiện đột biến trên kèm theo tăng lipid máu (1/2 họ hàng bậc 3).

- **Gia đình bệnh nhi MS03:** Bệnh nhi MS03 mang đột biến gây bệnh c.664T>C trên exon 4, đột biến cùng loại này cũng phát hiện được ở mẹ và anh trai có kèm theo tăng lipid máu (2/2 họ hàng bậc 1); ở họ hàng bậc 2 hiện có bà ngoại phát hiện đột biến kèm tăng cholesterol (chiếm 1/2 thành viên), bà nội có tăng lipid máu nhưng không phát hiện có đột biến, 5 thành viên trong gia đình ngoại không phân tích được đột biến.

- **Gia đình bệnh nhi MS15:** Bệnh nhi MS15 mang đột biến gây bệnh đồng hợp tử c.664T>C trên exon 4. Đột biến dị hợp tử c.664T>C trên exon 4 được phát hiện trên một số thành viên trong gia đình, cụ thể ở cả bố (tăng lipid máu) và mẹ (2/2 họ hàng bậc 1). Đột biến dị hợp tử trên được phát hiện ở 6/7 thành viên họ hàng bậc 2 trong đó chỉ có chú ruột, cô ruột (2/6 người mang đột biến) không tăng lipid máu. Ở họ hàng bậc 3 có 5/6 các em họ phát hiện đột biến và đều tăng cholesterol máu, 1 em con cậu không phát hiện đột biến, 3 người em còn lại chưa phân tích được gen.

## KIẾN NGHỊ

1. Mở rộng phạm vi phát hiện đột biến bằng các nghiên cứu với số lượng lớn hơn trên toàn bộ gen *LDLR*, gen *ApoB*, gen *PCSK9* cho các bệnh nhân FH, nhằm hướng tới xây dựng bản đồ đột biến của một số gen liên quan đến bệnh FH trên cơ sở kết quả mà tác giả đã thu được ở nghiên cứu này.
2. Triển khai xét nghiệm lipid máu và sàng lọc phân tầng bằng xét nghiệm sinh học phân tử cho tất cả các thành viên trong phả hệ gia đình có bệnh nhân mang đột biến, xây dựng chiến lược quản lí FH cộng đồng nhằm sớm ngăn ngừa biến chứng.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC  
ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Bài 1: Tăng cholesterol máu có tính chất gia đình nhân một ca bệnh điển hình. *Tạp chí Y học Thực hành*, 2019, số 9: 97-100.
2. Bài 2: Đột biến dị hợp tử kép gen *LDLR* trong phả hệ bệnh nhân tăng cholesterol máu có tính chất gia đình. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 2019, tập 484, tháng 11, số: 01.
3. Bài 3: Xác định đột biến trên 1 số exon trọng điểm gen *LDLR* ở bệnh nhân tăng cholesterol máu có tính chất gia đình. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 2019, tập 484, tháng 11, số: 01.
4. Bài 4: Đột biến đồng hợp tử c.664T>C gen *LDLR* trong phả hệ bệnh nhân tăng cholesterol máu có tính chất gia đình. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 2020, tập 125, tháng 3, số: 01.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hajjghasemi S, Mahdavi Gorabi A, Bianconi V et al (2019). A review of gene- and cell-based therapies for familial hypercholesterolemia. *Pharmacol Res*, 143, 119-132.
2. Defesche J.C, Lansberg P.J and et al (2004). Advanced method for the identification of patients with inherited hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med*, 4(1), 59-65.
3. Vallejo-Vaz A.J and Ray K.K (2018). Epidemiology of familial hypercholesterolaemia: Community and clinical. *Atherosclerosis*, 277, 289-297.
4. Ned R.M and Sijbrands E.J (2011). Cascade Screening for Familial Hypercholesterolemia (FH). *PLoS Curr*, 3, Rrn1238.
5. Knowles J.W, Rader D.J and Khoury M.J (2017). Cascade Screening for Familial Hypercholesterolemia and the Use of Genetic Testing. *Author manuscript*, 318(4), 381–382.
6. Long J, Li Y.S and Yan F.D (2015). The distribution and characteristics of LDL receptor mutations in China: A systematic review. *Sci Rep*(5), 17272.
7. Goldberg A.C, Hopkins P.N and Toth P.P (2011). Familial Hypercholesterolemia: Screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients. *J Clin Lipidol*, 5(3)(S1–S8).
8. Raal F.J and Santos R.D (2012). Homozygous familial hypercholesterolemia: current perspectives on diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*, 223(2), 262-268.

9. Raal F.J, Sjouke B, Hovingh G.K et al (2016). Phenotype diversity among patients with homozygous familial hypercholesterolemia: A cohort study. *Atherosclerosis*, 248, 238-244.
10. Müller C (1938). Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med Scand*, 89, 75–84.
11. Khachadurian A.K (1964). The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med*, 37, 402-7.
12. Fredrickson D.S, Levy R.I and Lees R.S (1967). Fat transport in lipoproteins—an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med*, 276, 215–225.
13. Ott J, Schrott H.G, Goldstein J.L et al (1974). Linkage studies in a large kindred with familial hypercholesterolemia. *Am J Hum Genet*, 26(5), 598–603.
14. Elston R.C, Namboodiri K.K, Go R.C et al (1976). Probable linkage between essential familial hypercholesterolemia and third complement component (C3). *Cytogenet Cell Genet*, 16, 294–297.
15. Berg K and Heiberg A (1978). Linkage between familial hypercholesterolemia with xanthomatosis and the C3 polymorphism confirmed. *Cytogenet Cell Genet*, 22, 621–623.
16. Brown M.S and Goldstein J.L (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232 (4746), 34-47.
17. Naoumova R.P, Neuwirth C, Lee P et al (2004). Autosomal recessive hypercholesterolemia: long-term follow up and response to treatment. *Atherosclerosis*, 174(1), 165-72.
18. Hopkins P.N, Toth P.P, Ballantyne C.M et al (2011). Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*, 5(3 Suppl), S9-17.

19. Austin M.A, Hutter C.M, Zimmern R.L et al (2004). Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol*, 160(5), 407-420.
20. Slack J (1979). Inheritance of familial hypercholesterolemia. *Atheroscler Rev*, 5, 35–66.
21. Seftel H, Baker S, Sandler M et al (1980). A host of hypercholesterolaemic homozygotes in South Africa. *Br Med J*, 281, 633–636.
22. Slimane M, Pousse H, Maatoug F et al (1993). Phenotypic expression of familial hypercholesterolaemia in central and southern Tunisia. *Atherosclerosis*, 104, 153–158.
23. Moorjani S, Roy M, Gagne C et al (1989). Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec Province. *Arteriosclerosis*, 9, 211–216.
24. Neil H. A, Hammond T, Huxley R et al (2000). Extent of underdiagnosis of familial hypercholesterolaemia in routine practice: prospective registry study. *BMJ*, 321(7254), 148.
25. Williams R (1996). *MEDPED: An Integrated Genetic Strategy for Preventing Early Deaths, in Genetic Approaches to Noncommunicable Diseases*, Springer Verlag, Berlin, 35-46.
26. DeMott K, Nherera L, Shaw E et al (2008). *Clinical Guidelines and Evidence Review for Familial hypercholesterolaemia: the identification and management of adults and children with familial hypercholesterolaemia*, London: National Collaborating Centre for Primary Care and Royal College of General Practitioners.
27. Marks D, Wonderling D, Thorogood M et al (2000). Screening for hypercholesterolaemia versus case finding for familial hypercholesterolaemia: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess*, 4 (29), 1-123.

28. Marks D, Wonderling D, Thorogood M et al (2002). Cost effectiveness analysis of different approaches of screening for familial hypercholesterolaemia. *BMJ*, 324(7349), 1303
29. Neil A, Cooper J, Betteridge J et al (2008). Reductions in all-cause, cancer, and coronary mortality in statin-treated patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *Eur Heart J*, 29(21), 2625-2633.
30. Datta B.N, McDowell I.F and Rees A (2010). Integrating provision of specialist lipid services with cascade testing for familial hypercholesterolaemia. *Curr Opin Lipidol*, 21(4), 366-371.
31. Umans-Eckenhausen M.A, Defesche J.C, Sijbrands E.J et al (2001). Review of first 5 years of screening for familial hypercholesterolaemia in the Netherlands. *Lancet*, 357(9251), 165-168.
32. Hovingh G.K, Davidson M.H, Kastelein J.J et al (2013). Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*, 34(13), 962-971.
33. Khoo K.L, Acker V.P, Defesche J.C et al (2000). Low-density lipoprotein receptor gene mutations in a Southeast Asian population with familial hypercholesterolemia. *Clin Genet*, 58(2), 98-105.
34. Nordestgaard B, Chapman M, Humphries S et al (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*, 34, 3478–3490a.
35. Zhao P.J, Ban M.R, Iacocca M.A et al (2019). Genetic Determinants of Myocardial Infarction Risk in Familial Hypercholesterolemia. *CJC Open*, 1(5), 225-230.



36. Li X, Fang P, Li Y et al (2016). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Lysophosphatidylcholine-Induced Endothelial Cell Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36(6), 1090-1100.
37. Lan N.S.R, Martin A.C, Brett T et al (2019). Improving the detection of familial hypercholesterolaemia. *Pathology*, 51(2), 213-221.
38. O'Gara P.T, Kushner F.G, Ascheim D.D et al (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, 127 (4), e362-425.
39. Lee C, Cui Y, Song J et al (2019). Effects of familial hypercholesterolemia-associated genes on the phenotype of premature myocardial infarction. *Lipids Health Dis*, 18(1), 95.
40. Kivimaki M, Nyberg S.T, Batty G.D et al (2012). Job strain as a risk factor for coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *Lancet*, 380(9852), 1491-1497.
41. Bays H.E, Jones P.H, Orringer C.E et al (2016). National Lipid Association Annual Summary of Clinical Lipidology 2016. *J Clin Lipidol*, 10(1 Suppl), S1-43.
42. Bérard E, Bongard V, Haas B et al (2019). Prevalence and Treatment of Familial Hypercholesterolemia in France. *Can J Cardiol*, 35(6), 744-752.
43. Gidding S.S (2019). Special Commentary: Is diet management helpful in familial hypercholesterolemia? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 22(2), 135-140.
44. Hodson L, Skeaff C.M and Chisholm W.A (2001). The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. *Eur J Clin Nutr*, 55(10), 908-915.

45. Daniels S.R and Greer F.R (2008). Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics*, 122 (1), 198-208.
46. Versmissen J, Oosterveer D.M, Yazdanpanah M et al (2008). Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study. *BMJ*, 337, a2423.
47. Binh An.P.Phan, Thomas D.D and Peter P.T (2012). Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vasc Health Risk Manag*, 8, 415–427.
48. Austin M.A, Zimmern R.L and Humphries S.E (2002). High "population attributable fraction" for coronary heart disease mortality among relatives in monogenic familial hypercholesterolemia. *Genet Med*, 4(4), 275-278.
49. McCrindle B.W, Urbina E.M, Dennison B.A et al (2007). Drug therapy of high-risk lipid abnormalities in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth Committee, Council of Cardiovascular Disease in the Young, with the Council on Cardiovascular Nursing. *Circulation*, 115(14), 1948-1967.
50. Kavey R.E, Allada V, Daniels S.R et al (2006). Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: a scientific statement from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; the Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*, 114(24), 2710-2738.

51. Jansen A.C, Wissen S.V, Defesche J.C et al (2002). Phenotypic variability in familial hypercholesterolaemia: an update. *Curr Opin Lipidol*, 13(2), 165-171.
52. Jansen A.C, Aalst-Cohen E.S, Tanck M.W et al (2004). The contribution of classical risk factors to cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: data in 2400 patients. *J Intern Med*, 256(6), 482-490.
53. Rader D.J and Hobbs H.H (2005). *Disorders of Lipoprotein Metabolism*, Harrison's principles of Internal medicine sixteenth edition, 2287 – 2298.
54. Reyes-Soffer G, Pavlyha M, Ngai C et al (2017). Effects of PCSK9 Inhibition With Alirocumab on Lipoprotein Metabolism in Healthy Humans. *Circulation*, 135 (4), 352-362.
55. Costet P, Krempf M and Cariou B (2008). PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci*, 33(9), 426-434.
56. Sposito A.C, Lemos P.A, Santos R.D et al (2004). Impaired intravascular triglyceride lipolysis constitutes a marker of clinical outcome in patients with stable angina undergoing secondary prevention treatment: a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol*, 43 (12), 2225-2232.
57. Carneiro M.M, Miname M.H, Gagliardi A.C et al (2012). The removal from plasma of chylomicrons and remnants is reduced in heterozygous familial hypercholesterolemia subjects with identified LDL receptor mutations: study with artificial emulsions. *Atherosclerosis*, 221(1), 268-274.

58. Varret P.R.M and Rabes J.P (2012). *Missense Mutation in the LDLR gene: A Wide Spectrum in the Severity of Familial Hypercholesterolemia*, *Mutations in Human Genetic Disease*, 55-70.
59. Tolleshaug H, Goldstein J.L, Schneider W.J et al (1982). Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell*, 30(3), 715-724.
60. Henderson R, O'Kane M, McGilligan V et al (2016). The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *J Biomed Sci*, 23, 39.
61. Soutar A.K and Naoumova R.P (2007). Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 4(4), 214-225.
62. Koeijvoets K.C, Wiegman A, Rodenburg J et al (2005). Effect of low-density lipoprotein receptor mutation on lipoproteins and cardiovascular disease risk: a parent-offspring study. *Atherosclerosis*, 180 (1), 93-99.
63. Fouchier S.W, Kastelein J.J and Defesche J.C (2005). Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat*, 26(6), 550-556.
64. Lander E.S (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470 (7333), 187-97.
65. Kelemen A, Vasilakos A.V and Liang Y (2009). Computational intelligence in bioinformatics: SNP/haplotype data in genetic association study for common diseases. *IEEE Trans Inf Technol Biomed*, 13(5), 841-7.
66. Dinu I, Mahasirimongkol S, Liu Q et al (2012). SNP-SNP interactions discovered by logic regression explain Crohn's disease genetics. *PLoS One*, 7(10), e43035.

67. Onay V.U, Briollais L, Knight J.A et al (2006). SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility. *BMC Cancer*, 6, 114.
68. Rader D.J, Cohen J and Hobbs H.H (2003). Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest*, 111 (12), 1795-1803.
69. H. Pamplona-Cunha, E. Campos, M. V. de Oliveira et al (2018). Genetic polymorphisms and variants in the LDL receptor associated with familial hypercholesterolemia: cascade screening and identification of the variants 666C>A, 862G>A, 901G>A, and 919G>A of a Brazilian family. *Clin Chem Lab Med*, 57(2), e23-e26.
70. Lamiquiz-Moneo I, Pérez-Ruiz M.R, Jarauta E et al (2018). Single Nucleotide Variants Associated With Polygenic Hypercholesterolemia in Families Diagnosed Clinically With Familial Hypercholesterolemia. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 71(5), 351-356.
71. Talmud P.J, Shah S, Whittall R et al (2013). Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet*, 381(9874), 1293-1301.
72. De Castro Orós I, Pocoví M and iveira F (2013). The fine line between familial and polygenic hypercholesterolemia. *Clinical Lipidology*, 8, 303-306.
73. Futema M, Bourbon M, Williams M et al (2018). Clinical utility of the polygenic LDL-C SNP score in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 277, 457-463.
74. Sandhu M.S, Waterworth D.M, Debenham S.L et al (2008). LDL-cholesterol concentrations: a genome-wide association study. *Lancet*, 371(9611), 483-49.

75. Sanna S, Li B, Mulas A et al (2011). Fine mapping of five loci associated with low-density lipoprotein cholesterol detects variants that double the explained heritability. *PLoS Genet*, 7(7), e1002198.
76. Teslovich T.M, Musunuru K, Smith A.V et al (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*, 466(7307), 707-713.
77. van Zyl T, Jerling J.C, Conradie K.R et al (2014). Common and rare single nucleotide polymorphisms in the LDLR gene are present in a black South African population and associate with low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hum Genet*, 59(2), 88-94.
78. Rafiq S, Ahmed N, Soutar A et al (2011). The genetic characterization of familial hypercholesterolemia in Pakistan. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 7, 21-25.
79. Levenson A.E and de Ferranti S.D (2000). *Familial Hypercholesterolemia*. Endotext, South Dartmouth (MA).
80. Knowles J.W, Rader D.J and Khoury M.J (2017). Cascade Screening for Familial Hypercholesterolemia and the Use of Genetic Testing. *Jama*, 318(4), 381-382.
81. Sturm A.C, Knowles J.W, Gidding S.S et al (2018). Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*, 72(6), 662-680.
82. Ademi Z, Watts G.F, Pang J et al (2014). Cascade screening based on genetic testing is cost-effective: evidence for the implementation of models of care for familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*, 8(4), 390-400.

83. Rosso A, Pitini E, D'Andrea E et al (2017). The Cost-effectiveness of Genetic Screening for Familial Hypercholesterolemia: a Systematic Review. *Ann Ig Med Prev E Comunita*, 29(5), 464–480.
84. Humphries S.E, Whittall R.A, Hubbart C.S et al (2006). Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet*, 43(12), 943–949.
85. Heath K.E, Humphries S.E, Middleton-Price H et al (2001). A molecular genetic service for diagnosing individuals with familial hypercholesterolaemia (FH) in the United Kingdom. *Eur J Hum Genet*, 9(4), 244-252.
86. Maglio C, Mancina R.M, Motta B.M et al (2014). Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia by targeted next-generation sequencing. *J Intern Med*, 276(4), 396–403.
87. Jannes C.E, Santos R.D, de Souza Silva P.R et al (2015). Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis*, 238(1), 101–107.
88. Fouchier S.W, Defesche J.C, Umans-Eckenhausen M.W et al (2001). The molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Genet*, 109(6), 602-615.
89. Ekrami M, Torabi M, Ghafouri-Fard S et al (2018). Genetic Analysis of Iranian Patients with Familial Hypercholesterolemia. *Iran Biomed J*, 22(2), 117–122.
90. Mak Y.T, Pang C.P, Tomlinson B et al (1998). Mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in Chinese familial hypercholesterolemia patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(10), 1600-1605.

91. Ashavaid T.F, Kondkar A.A and Nair K.G (2000). Identification of two LDL-receptor mutations causing familial hypercholesterolemia in Indian subjects by a simplified rapid PCR-heteroduplex method. *Clin Chem*, 46(8 Pt 1), 1183-1185.
92. Yu W, Nohara A, Higashikata T et al (2002). Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. *Atherosclerosis*, 165(2), 335-342.
93. Chang J.H, Pan J.P, Tai D.Y et al (2003). Identification and characterization of LDL receptor gene mutations in hyperlipidemic Chinese. *J Lipid Res*, 44(10), 1850-1858.
94. Khan S.P, Ghani R, Ahmed K.Z et al (2011). Two novel mutations in exon 3 and 4 of low density lipoprotein (LDL) receptor gene in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Coll Physicians Surg Pak*, 21(7), 403-406.
95. Han S.M, Hwang B, Park T.G et al (2015). Genetic testing of Korean familial hypercholesterolemia using whole-exome sequencing. *PLoS One*, 10(5), e0126706.
96. Pham Thi Minh Huyen, Dang Quang Huy, Nguyen Quynh Giao et al (2016). Identification of Mutations in exon 3 and 4 of the LDL-receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia. *Medical Research*, 2354(7), 39-46.
97. Lê Thị Yên, Vũ Đức Anh, Phạm Thị Minh Huyền và cs (2019). Xác định đột biến exon 14 gen LDLR trên bệnh nhân tăng cholesterol máu có tính chất gia đình. *Tạp chí y học Việt Nam*, 482(65), 178-185.
98. Slatko B.E, Gardner A.F and Ausubel F.M (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*, 122(1), e59.



99. Tạ Thành Văn (2010). *PCR và một số kỹ thuật y sinh học phân tử*, Nhà xuất bản Y học.
100. Klose G, Laufs U, Marz W et al (2014). Familial hypercholesterolemia: developments in diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 111 (31-32), 523-529.
101. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I et al (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.
102. Dieffenbach C.W, Lowe T.M and Dveksler G.S (1993). General Concepts for PCR Primer Design. *Genome Research*, 3(3), S30-7.
103. Smith D.R (2015). Buying in to bioinformatics: an introduction to commercial sequence analysis software. *Brief Bioinform*, 16(4), 700-709.
104. <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
105. Sozen M.M, Whittall R, Oner C et al (2005). The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis*, 180(1), 63-71.
106. Groselj U, Kovac J, Sustar U et al (2018). Universal screening for familial hypercholesterolemia in children: The Slovenian model and literature review. *Atherosclerosis*, 277, 383-391.
107. Benlian P, Turquet A, Carrat F et al (2009). Diagnosis scoring for clinical identification of children with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 48(4), 456-63.
108. Guardamagna O, Restagno G, Rolfo E et al (2009). The type of LDLR gene mutation predicts cardiovascular risk in children with familial hypercholesterolemia. *J Pediatr*, 155 (2), 199-204.e192.

109. Ramaswami U, Cooper J and Humphries S. E (2017). The UK Paediatric Familial Hypercholesterolaemia Register: preliminary data. *Arch Dis Child*, 102(3), 255-260.
110. Minicocci I, Pozzessere S, Prisco C et al (2017). Analysis of Children and Adolescents with Familial Hypercholesterolemia. *J Pediatr*, 183, 100-107.e3.
111. Ramaswami U, Futema M, Bogsrud M.P et al (2020). Comparison of the characteristics at diagnosis and treatment of children with heterozygous familial hypercholesterolaemia (FH) from eight European countries. *Atherosclerosis*, 292, 178-187.
112. Fairoozy R.H, Futema M, Vakili R et al (2017). The Genetic Spectrum of Familial Hypercholesterolemia (FH) in the Iranian Population. *Sci Rep*, 7 (1), 17087.
113. Klančar G, Grošelj U, Kovač J et al (2015). Universal Screening for Familial Hypercholesterolemia in Children. *J Am Coll Cardiol*, 66(11), 1250-1257.
114. Tan S.C and Yiap B.C (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 574398.
115. Fauci A.S, Braunwald E, Kasper D.L et al (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition*, McGraw-Hill Education.
116. Hobbs H.H, Russell D.W, Brown M.S et al (1990). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*, 24, 133-70.
117. Wang H, Xu S, Sun L et al (2014). Functional characterization of two low-density lipoprotein receptor gene mutations in two Chinese patients with familial hypercholesterolemia. *PLoS One*, 9(3), e92703.

118. Strøm T.B, Tveten K, Laerdahl J.K et al (2014). Mutation G805R in the transmembrane domain of the LDL receptor gene causes familial hypercholesterolemia by inducing ectodomain cleavage of the LDL receptor in the endoplasmic reticulum. *FEBS Open Bio*, 4, 321-7.
119. Xiang R, Fan L.L, Lin M.J et al (2017). The genetic spectrum of familial hypercholesterolemia in the central south region of China. *Atherosclerosis*, 258, 84-88.
120. Fan L.L, Lin M.J, Chen Y.Q et al (2015). Novel mutations of low-density lipoprotein receptor gene in China patients with familial hypercholesterolemia. *Appl Biochem Biotechnol*, 176(1), 101-9.
121. Durst R, Ibe U.K, Shpitzen S et al (2017). Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Israel-revisited. *Atherosclerosis*, 257, 55-63.
122. 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.
123. Schwarz J.M, Rödelsperger C, Schuelke M et al (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*, 7(8), 575-6.
124. Leigh S.E, Foster A.H, Whittall R.A et al (2008). Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann Hum Genet*, 72(Pt 4), 485-98.
125. Ranheim T, Kulseth M.A, Berge K.E et al (2006). Model system for phenotypic characterization of sequence variations in the LDL receptor gene. *Clin Chem*, 52(8), 1469-1479.

126. Goldstein J.L, Anderson R.G and Brown M.S (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 279(5715), 679-85.
127. Jayaram S, Meera S, Kadi S et al (2012). An Interesting Case of Familial Homozygous Hypercholesterolemia-A Brief Review. *Indian J Clin Biochem*, 27(3), 309-13.
128. Keeling K.M, Xue X, Gunn G et al (2014). Therapeutics based on stop codon readthrough. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 15, 371-94.
129. Culbertson M.R (1999). RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet*, 15(2), 74-80.
130. Byers P.H (2002). Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest*, 109(1), 3-6.
131. Nagy E and Maquat L.E (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci*, 23(6), 198-9.
132. Weiss N, Binder G and Keller C (2000). Mutations in the low-density-lipoprotein receptor gene in German patients with familial hypercholesterolaemia. *J Inherit Metab Dis*, 23(8), 778-90.
133. Dedoussis G.V, Skoumas J, Pitsavos C et al (2004). FH clinical phenotype in Greek patients with LDL-R defective vs. negative mutations. *Eur J Clin Invest*, 34(6), 402-9.
134. Holla Ø.L, Kulseth M.A, Berge K.E et al (2009). Nonsense-mediated decay of human LDL receptor mRNA. *Scand J Clin Lab Invest*, 69(3), 409-17.
135. Shu H, Chi J, Li J et al (2017). A novel indel variant in LDLR responsible for familial hypercholesterolemia in a Chinese family. *PLoS one*, 12(12), e0189316.

136. Santos P.C, Morgan A.C, Jannes C.E et al (2014). Presence and type of low density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 233(1), 206-10.
137. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg H.N et al (2014). Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*, 35(32), 2146-57.
138. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg H.N et al (2015). Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 43 Suppl 1, 1-14.
139. Schuff-Werner P, Fenger S and Kohlschein P (2012). Role of lipid apheresis in changing times. *Clin Res Cardiol Suppl*, 7(Suppl 1), 7-14.
140. Webb J.C, Patel D.D, Shoulders C.C et al (1996). Genetic variation at a splicing branch point in intron 9 of the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene: a rare mutation that disrupts mRNA splicing in a patient with familial hypercholesterolaemia and a common polymorphism. *Hum Mol Genet*, 5(9), 1325-31.
141. Andreotti G, Menashe I, Chen J et al (2009). Genetic determinants of serum lipid levels in Chinese subjects: a population-based study in Shanghai. *China. Eur J Epidemiol*, 24 ((12), 763-774.

142. Andreotti G, Chen J, Gao Y.T et al (2008). Polymorphisms of genes in the lipid metabolism pathway and risk of biliary tract cancers and stones: a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(3), 525-34.
143. Andreotti G, Chen J, Gao Y.T et al (2008). Serum lipid levels and the risk of biliary tract cancers and biliary stones: A population-based study in China. *Int J Cancer*, 122(10), 2322-9.
144. Ríos-González B.E, Ibarra-Cortés B, Ramírez-López G et al (2014). Association of polymorphisms of genes involved in lipid metabolism with blood pressure and lipid values in mexican hypertensive individuals. *Dis Markers*, 2014, 150358.
145. Liu A.P, Zhan S.Y, Li L.M et al (2003). [Association between AvaII exon 13 polymorphism at the LDL receptor gene different and serum lipid levels in normotensives and essential hypertensives in Shanghai]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 24(7), 542-6.
146. Long X.J, Yin R.X, Li K.L et al (2011). Low density lipoprotein receptor gene Ava II polymorphism and serum lipid levels in the Guangxi Bai Ku Yao and Han populations. *Lipids Health Dis*, 10, 34.
147. Al-Allaf F.A, Athar M, Abduljaleel Z et al (2015). Next generation sequencing to identify novel genetic variants causative of autosomal dominant familial hypercholesterolemia associated with increased risk of coronary heart disease. *Gene*, 565(1), 76-84.
148. Mabuchi H (2017). Half a Century Tales of Familial Hypercholesterolemia (FH) in Japan. *J Atheroscler Thromb*, 24(3), 189-207.
149. Bamimore M.A, Zaid A, Banerjee Y et al (2015). Familial hypercholesterolemia mutations in the Middle Eastern and North African region: a need for a national registry. *J Clin Lipidol*, 9(2), 187-94.

150. Diakou M, Miltiadous G, Xenophontos S.L et al (2011). Spectrum of LDLR gene mutations, including a novel mutation causing familial hypercholesterolaemia, in North-western Greece. *Eur J Intern Med*, 22(5), e55-9.
151. Lun Y, Sun X, Wang P et al (2017). Severe hypertriglyceridemia due to two novel loss-of-function lipoprotein lipase gene mutations (C310R/E396V) in a Chinese family associated with recurrent acute pancreatitis. *Oncotarget*, 8(29), 47741-47754.
152. Kassner U, Salewsky B, Wühle-Demuth M et al (2015). Severe hypertriglyceridemia in a patient heterozygous for a lipoprotein lipase gene allele with two novel missense variants. *Eur J Hum Genet*, 23(9), 1259-61.
153. Buonomo P.S, Rabacchi C, Macchiaiolo M et al (2017). Incidental finding of severe hypertriglyceridemia in children. Role of multiple rare variants in genes affecting plasma triglyceride. *J Clin Lipidol*, 11(6), 1329-1337.e3.
154. Chiou K.R and Charng M.J (2016). Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in Han Chinese. *J Clin Lipidol*, 10(3), 490-6.
155. Di Taranto M.D, Giacobbe C, Buonaiuto A et al (2020). A Real-World Experience of Clinical, Biochemical and Genetic Assessment of Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Med*, 9(1).
156. Luirink I.K, Braamskamp Mjam, Wiegman A et al (2019). The clinical and molecular diversity of homozygous familial hypercholesterolemia in children: Results from the GeneTics of clinical homozygous hypercholesterolemia (GoTCHA) study. *J Clin Lipidol*, 13(2), 272-278.

157. Besseling J, Kindt I, Hof M et al (2014). Severe heterozygous familial hypercholesterolemia and risk for cardiovascular disease: a study of a cohort of 14,000 mutation carriers. *Atherosclerosis*, 233(1), 219-23.
158. Hartgers M.L, Defesche J.C, Langslet G et al (2018). Alirocumab efficacy in patients with double heterozygous, compound heterozygous, or homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*, 12(2), 390-396.e8.
159. Ibarretxe D, Rodríguez-Borjabad C, Feliu A et al (2018). Detecting familial hypercholesterolemia earlier in life by actively searching for affected children: The DECOPIN project. *Atherosclerosis*, 278, 210-216.
160. Vohnout B, Gabcova D, Huckova M et al (2016). Genetic testing of familial hypercholesterolemia in a real clinical setting. *Wien Klin Wochenschr*, 128(23-24), 916-921.
161. Setia N, Saxena R, Sawhney J.P.S et al (2018). Familial Hypercholesterolemia: Cascade Screening in Children and Relatives of the Affected. *Indian J Pediatr*, 85(5), 339-343.
162. Fahed A.C and Nemer G.M (2011). Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes? *Nutr Metab (Lond)*, 8(1), 23.
163. Irigoyen Cucalón L (2019). Familial hypercholesterolemia: Experience in the Lipid Clinic of Alava. *Clin Investig Arterioscler*, 31(5), 244.
164. Singh S and Bittner V (2015). Familial hypercholesterolemia--epidemiology, diagnosis, and screening. *Curr Atheroscler Rep*, 17(2), 482.
165. Al-Rasadi K, Al-Waili K, Al-Sabti H.A et al (2014). Criteria for Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Comprehensive Analysis of the Different Guidelines, Appraising their Suitability in the Omani Arab Population. *Oman Med J*, 29(2), 85-91.



166. Youngblom E, Pariani M and Knowles J.W (2016). *Familial Hypercholesterolemia*. GeneReviews, University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
167. Truong T.H, Kim N.T, Nguyen M.N.T et al (2018). Homozygous familial hypercholesterolaemia in Vietnam: Case series, genetics and cascade testing of families. *Atherosclerosis*, 277, 392-398.
168. Bell D.A, Pang J and Burrows S (2015). Effectiveness of genetic cascade screening for familial hypercholesterolaemia using a centrally co-ordinated clinical service: an Australian experience. *Atherosclerosis*, 239(1), 93–100.
169. Huijgen R, Kindt I, Defesche J.C et al (2012). Cardiovascular risk in relation to functionality of sequence variants in the gene coding for the low-density lipoprotein receptor: a study among 29,365 individuals tested for 64 specific low-density lipoprotein-receptor sequence variants. *Eur Heart J*, 33(18), 2325-30.
170. Van der Graaf A, Avis H.J, Kusters D.M et al (2011). Molecular basis of autosomal dominant hypercholesterolemia: assessment in a large cohort of hypercholesterolemic children. *Circulation*, 123(11), 1167-73.
171. Berberich A.J and Hegele R.A (2019). The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Cardiol*, 16(1), 9-20.
172. Huijgen R, Hutten B.A, Kindt I et al (2012). Discriminative ability of LDL-cholesterol to identify patients with familial hypercholesterolemia: a cross-sectional study in 26,406 individuals tested for genetic FH. *Circ Cardiovasc Genet*, 5(3), 354-9.
173. Azraii A.B, Ramli A.S, Ismail Z et al (2018). Knowledge, awareness and practice regarding familial hypercholesterolaemia among primary care physicians in Malaysia: The importance of professional training. *Atherosclerosis*, 277, 508-516.

174. Pang J, Hu M, Lin J et al (2017). An enquiry based on a standardised questionnaire into knowledge, awareness and preferences concerning the care of familial hypercholesterolaemia among primary care physicians in the Asia-Pacific region: the "Ten Countries Study". *BMJ Open*, 7(10), e017817.
175. Pang J, Sullivan D.R, Harada-Shiba M et al (2015). Significant gaps in awareness of familial hypercholesterolemia among physicians in selected Asia-Pacific countries: a pilot study. *J Clin Lipidol*, 9(1), 42-8.

## PHỤ LỤC 1

### BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

#### BỆNH TĂNG CHOLESTEROL MÁU CÓ TÍNH CHẤT GIA ĐÌNH

*Mã nghiên cứu:*.....

*Mã Bệnh án:*.....

#### **I, Hành chính:**

1, Họ và tên:.....

2, Ngày, tháng, năm sinh:.....

3, Giới: Nam  Nữ

4, Nghề nghiệp:.....

5, Địa chỉ:.....

6, Điện thoại:.....

#### **II, Lý do vào viện**

#### **III, Tiền sử:**

1, Bản thân: Tăng huyết áp  ĐTĐ  CHD  NMCT

2, Gia đình: Tăng cholesterol máu  THA  ĐTĐ

CHD  NMCT

#### **IV, Triệu chứng lâm sàng:**

Tăng huyết áp:  ĐTN:

U vàng:  NMCT:

Xanthoma gân:

BMI:

Cân nặng:            Chiều cao:

## **V, Cận lâm sàng:**

- Các xét nghiệm hóa sinh máu:

Cholesterol total (mmo/L)

Triglycerid (mmo/L)

LDL-C (mmo/L)

HDL-C (mmo/L)

AST (U/L)

ALT (U/L)

Ure (mmo/L)

Creatine ( $\mu$ mo/L)

Glucose (mmo/L)

FT4

TSH

- Các xét nghiệm cận lâm sàng khác:

## **VI, Kết quả xác định đột biến:**

1, Nồng độ DNA

2, Độ tinh sạch

3, Kết quả giải trình tự gen

## **VII, Chẩn đoán**

## **VIII, Điều trị**

## KÝ HIỆU CÁC ACID AMIN

Alanine	ala	A
Arginine	arg	R
Asparagine	asn	N
Aspartic acid	asp	D
Cysteine	cys	C
Glutamic acid	glu	E
Glutamine	gln	Q
Glycine	gly	G
Histidine	his	H
Isoleucine	ile	I
Leucine	leu	L
Lysine	lys	K
Methionine	met	M
Phenyl alanine	phe	F
Proline	pro	P
Serine	ser	S
Threonine	thr	T
Tryptophan	trp	W
Tyrosine	tyr	Y
Valine	val	V

## PHỤ LỤC 2

**Kết quả đo độ tinh sạch và nồng độ DNA tách từ máu ngoại vi của 45 đối tượng nghiên cứu thuộc phả hệ 3 gia đình bệnh nhi MS02, MS03, MS15**

Bệnh nhân (mã số)	Nồng độ DNA ng/ $\mu$ l)	Độ tinh sạch (A260/A280)	Bệnh nhân (mã số)	Nồng độ DNA ng/ $\mu$ l)	Độ tinh sạch (A260/A280)
<b>Phả hệ gia đình MS02, MS08 (n=13)</b>					
II.4	51,5	1,84	II.6	65,6	1,88
II.3	48,1	1,82	II.5	66,4	1,83
I.4	55,2	1,87	II.2	59,9	1,88
I.3	47,5	1,81	III.6	61,5	1,87
I.1	50,5	1,81	III.5	51,8	1,8
I.2	43,7	1,87	III.2	49,7	1,85
			III.1	58,4	1,86
<b>Phả hệ gia đình MS03 (n=11)</b>					
I.1	61,2	1,9	II.8	101,7	1,98
I.3	37,6	1,88	II.9	86,4	1,87
I.4	40,5	1,83	III.1	59,0	1,9
II.4	42,7	1,91	III.3	78,2	1,86
II.5	39,3	1,97	III.4	49,9	1,91
II.6	45,5	1,84			
<b>Phả hệ gia đình MS15 (n=21)</b>					
II.6	44,2	1,81	II.8	87,9	1,85
II.1	54,9	1,82	II.7	62,4	1,8
I.4	102,3	1,88	II.3	89,6	1,87
I.3	66,5	1,82	II.4	57,9	1,82
I.1	97,8	1,84	II.5	88,6	1,89
I.2	60,2	1,93	III.9	69,7	1,82
II.12	78,6	1,84	III.8	64,8	1,83
II.11	50,6	1,8	III.7	58,6	1,8
II.10	62,2	1,86	III.6	65,3	1,8
II.9	67	1,82	III.4	103,7	1,83
			III.5	56,6	1,81

## **PHỤ LỤC 3**

### **KỸ THUẬT ĐIỆN DI SẢN PHẨM PCR**

#### **CHUẨN BỊ GEL AGAROSE 1,5 %**

Cân 0,8g agarose hòa tan trong 40ml boric acid EDTA 1X (TBE) đun sôi trong lò vi sóng, lắc đều đến khi agarose hòa tan hoàn toàn. Để nguội 55-60°C.

- Đổ gel từ từ vào khuôn.
- Chờ gel khô (sau 20 phút) rút lược và đặt bản gel vào máy điện di.

#### **KỸ THUẬT ĐIỆN DI**

- Đổ dung dịch TBE 1X vào bể điện di cho ngập gel
- Tra mẫu vào giếng (5 µl/giếng)
- Máy điện di Mupid (Nhật Bản): Điện di trong 30 phút, hiệu điện thế 120v
- Sản phẩm điện di được nhuộm bằng dung dịch ethidium bromide, sau đó được chụp hình bằng máy chụp gel.

## **PHỤ LỤC 4**

### **KỸ THUẬT TINH SẠCH SẢN PHẨM PCR GIẢI TRÌNH TỰ**

Thêm vào ống PCR có sẵn 10 $\mu$ l DNA (sau PCR): 5 $\mu$ l EDTA 0,125M và 60 $\mu$ l cồn tuyệt đối (tổng thể tích là 75  $\mu$ l).

Lắc nhẹ 3-4 lần, để trong tối khoảng 15 phút để phản ứng xảy ra tốt hơn

Ly tâm 15000 vòng/phút trong 15 phút ở 4<sup>0</sup>C

Sau khi ly tâm xong, hút bỏ dịch nổi, thu cặn

Thêm tiếp 200 $\mu$ l cồn 70%. Ly tâm 15000 vòng/phút trong 10 phút ở 4<sup>0</sup>C.

Ly tâm xong, hút bỏ dịch nổi, thu cặn (thao tác này nhanh tránh DNA tủa bị hòa tan)

Làm khô tự nhiên hoặc để ở nhiệt độ 56<sup>0</sup>C.

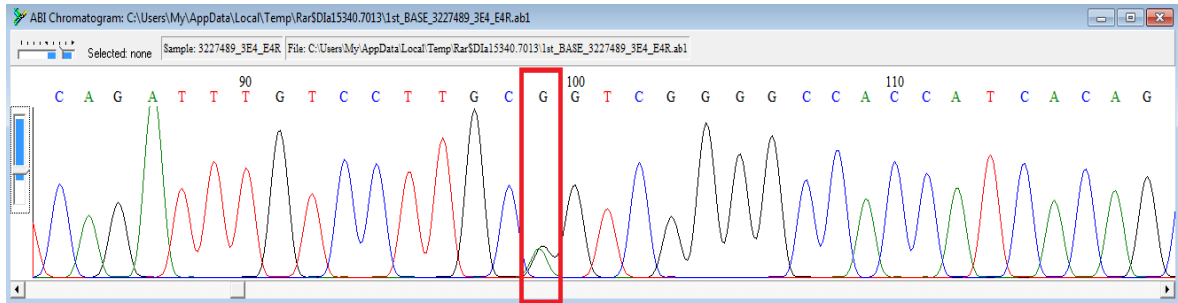
Hòa tan DNA tủa trong 20 $\mu$ l Hi-di và làm nóng 95<sup>0</sup>C trong vòng 5 phút.

Để ngay vào nhiệt độ -20<sup>0</sup>C

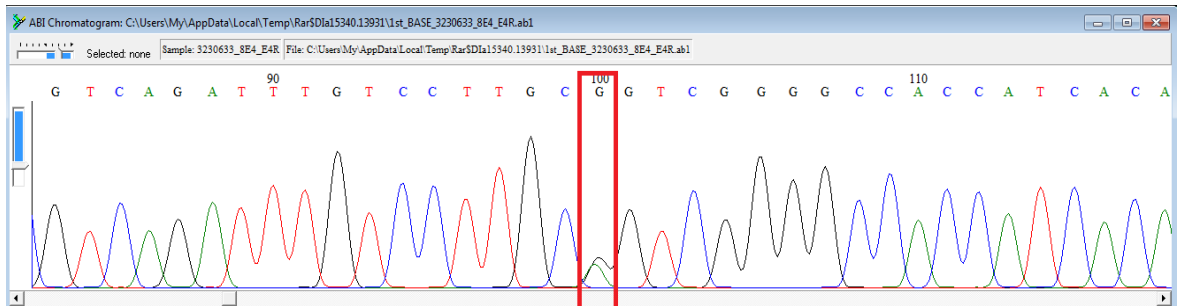


## PHỤ LỤC 5

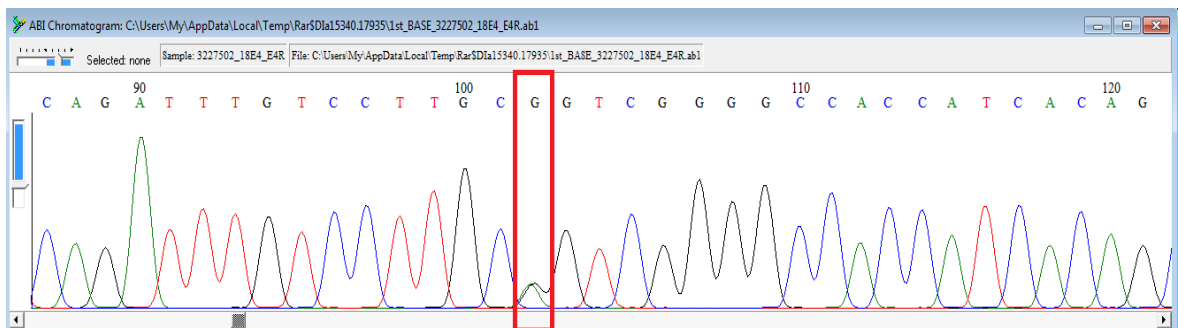
Hình ảnh đột biến Exon 4 bệnh nhi MS03 (Mỗi ngược)



Hình ảnh đột biến Exon 4 bệnh nhi MS08 (Mỗi ngược)



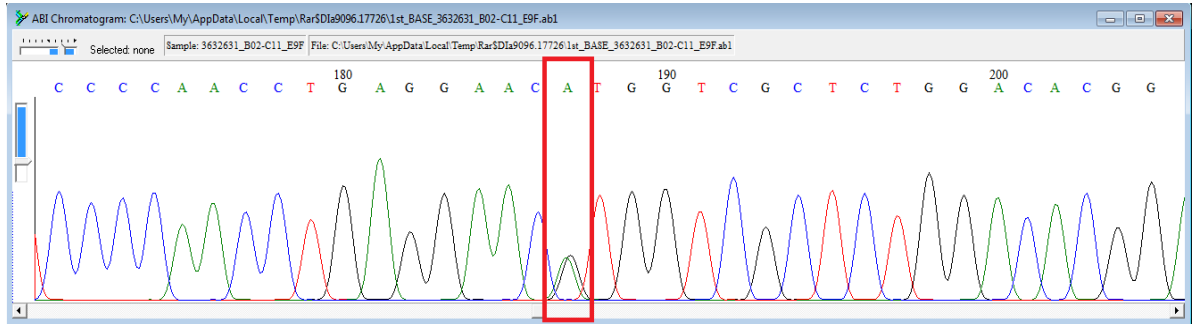
Hình ảnh đột biến Exon 4 bệnh nhi MS18 (Mỗi ngược)



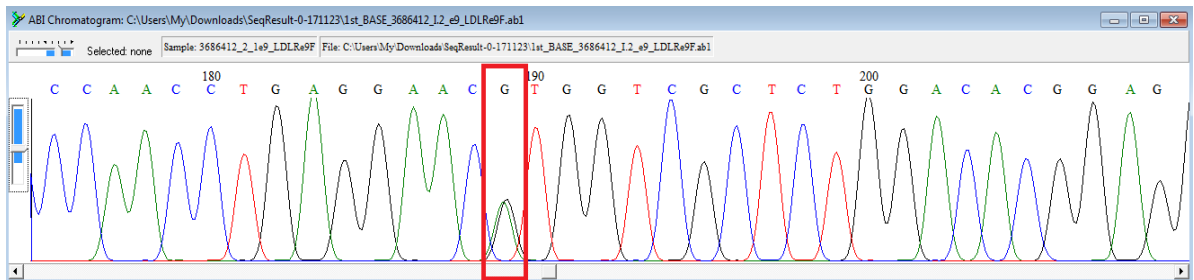
## Đột biến phủ hệ gia đình bệnh nhi MS02

### 1. Đột biến trên exon 9: c.1285G>A

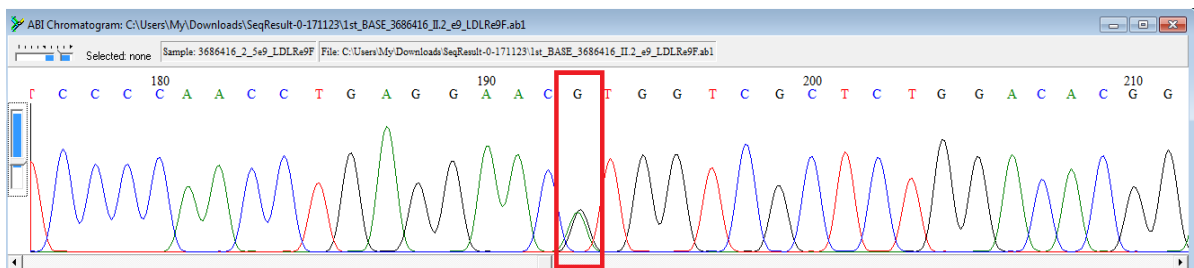
Bố bệnh nhi – II.4



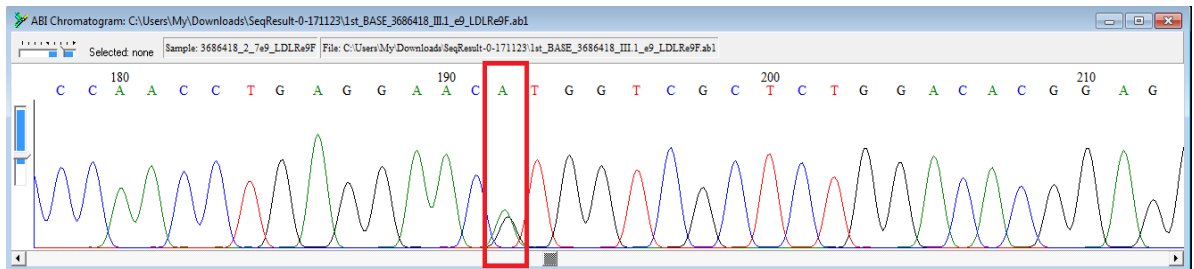
### Ông nội bệnh nhi - I.3



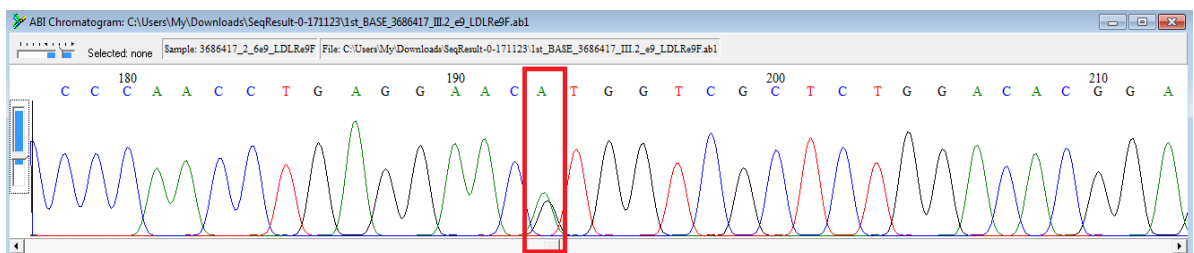
### Cô ruột bệnh nhi - II.5



### Em họ con cô ruột - III.5

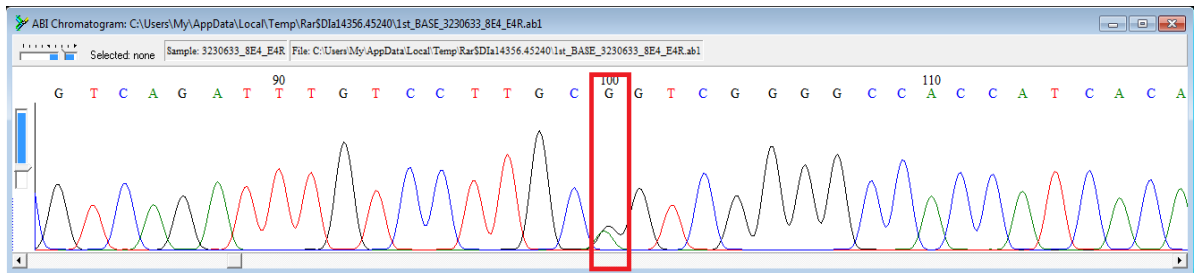


### Em họ con cô ruột - III.6

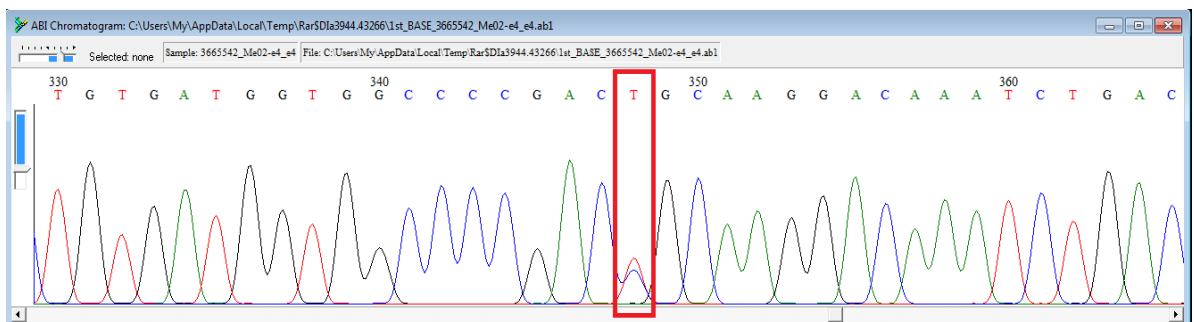


## 2. Đột biến trên exon 4: c.664T>C

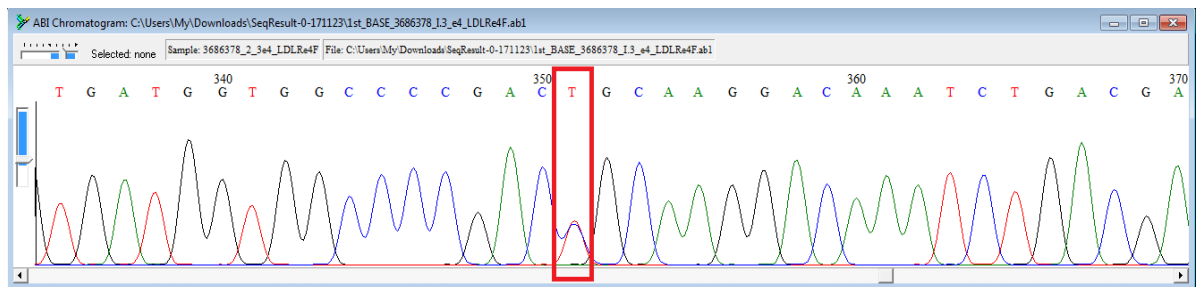
### Em gái ruột bệnh nhi – III.4



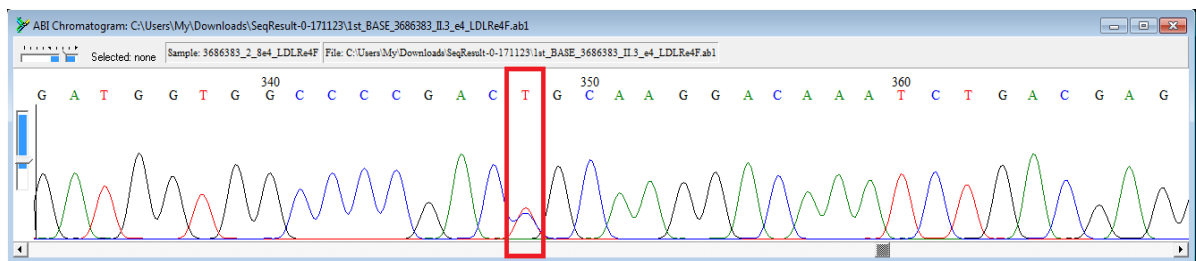
### Mẹ bệnh nhi – II.3



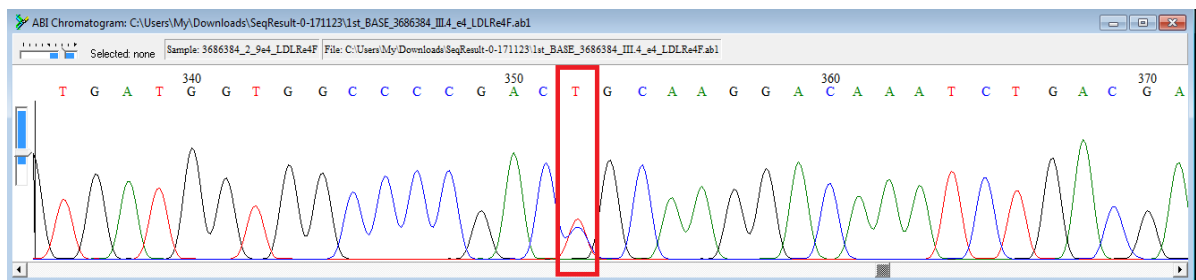
## Ông ngoại bệnh nhi - I.1



## Bác gái của bệnh nhi - II.2



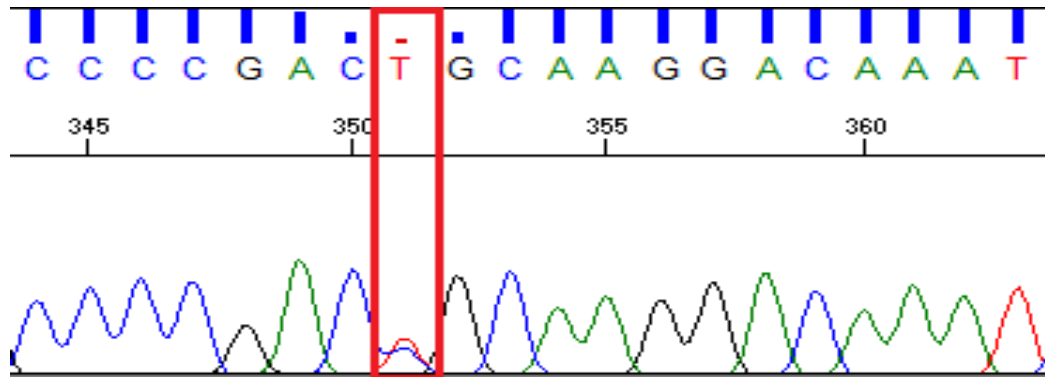
## Anh họ con bác - III.1



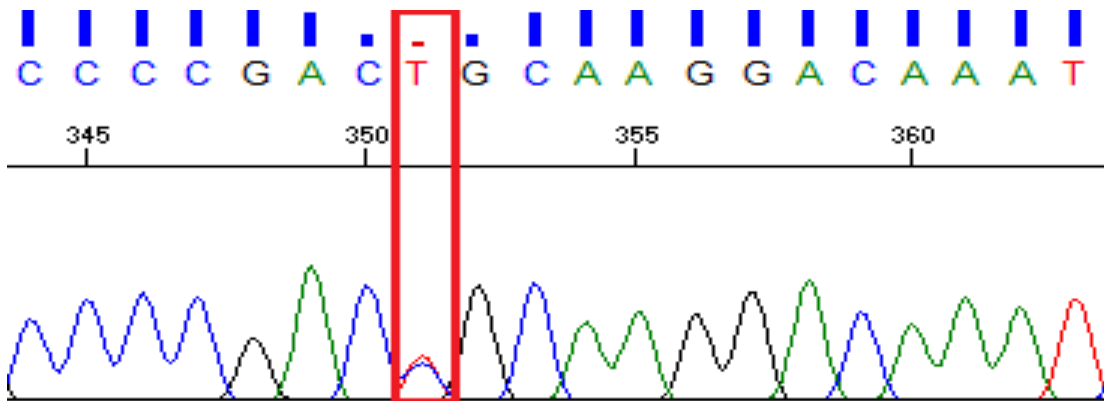
## Đột biến phổ hệ gia đình bệnh nhi MS03

(đều là đột biến c.664T>C dị hợp tử)

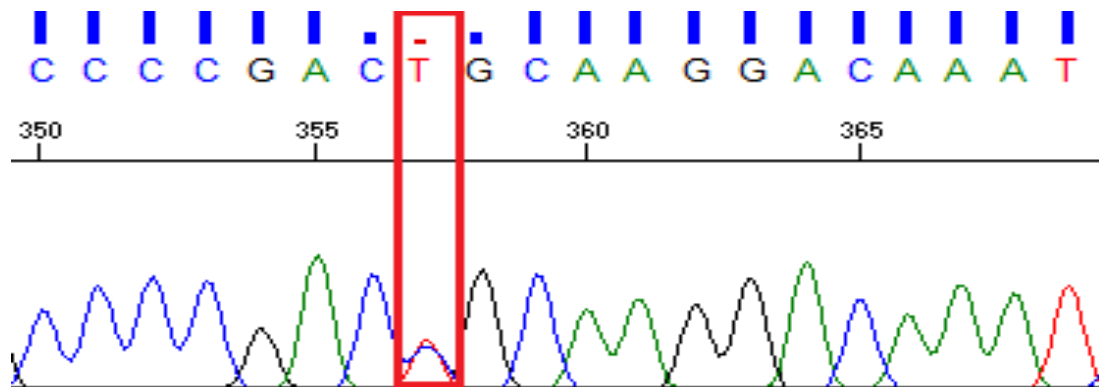
Mẹ bệnh nhi – II.6



Anh bệnh nhi – III.3



Bà ngoại bệnh nhi – I.1

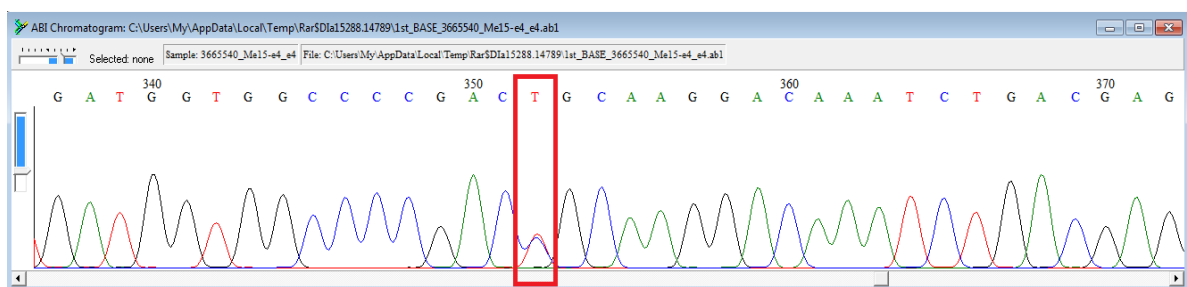


## Đột biến phủ hệ gia đình bệnh nhi MS15

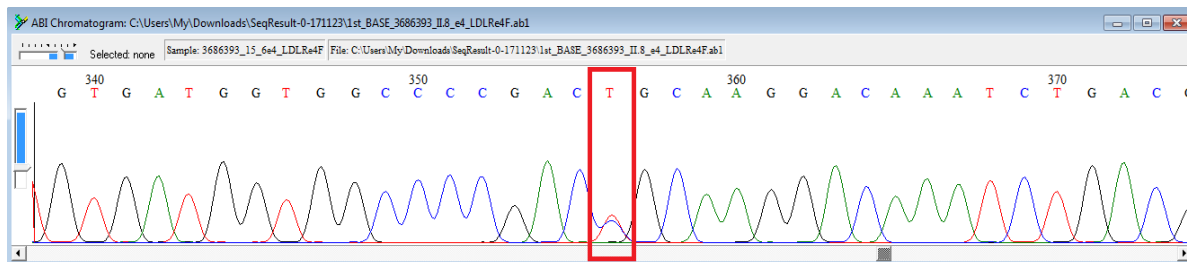
(đều là đột biến c.664T>C dị hợp tử)

### 1. Bên ngoài

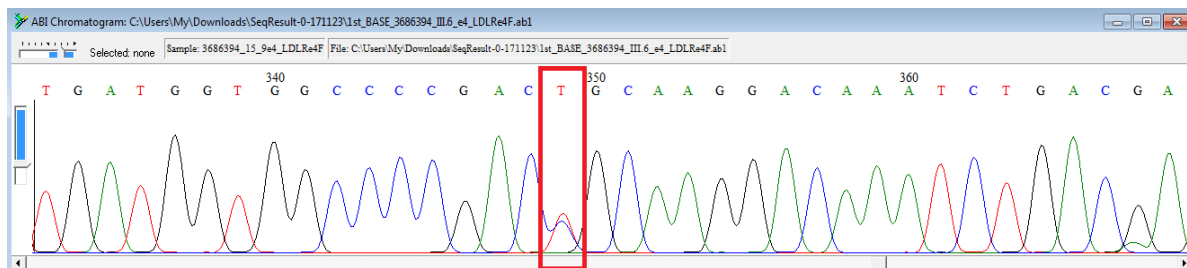
Mẹ bệnh nhi – II.1



Cậu ruột bệnh nhi II.4

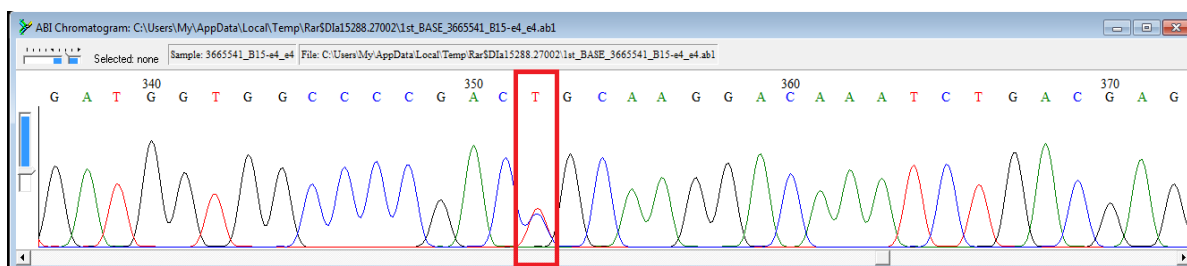


Em con cậu ruột - III.5

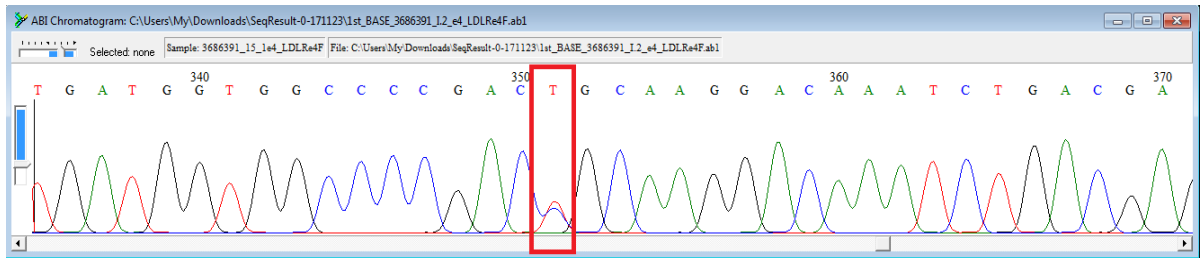


### 2. Bên nội

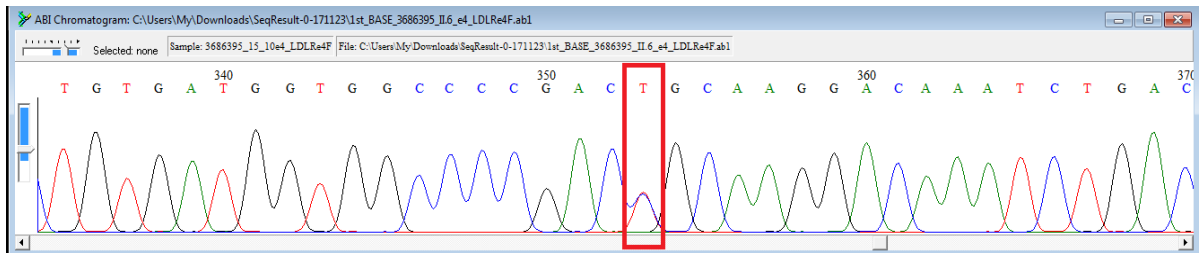
Bố bệnh nhi – II.6



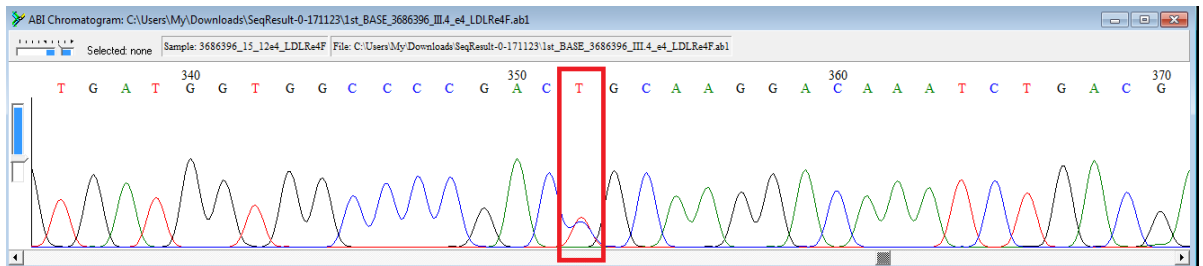
## Ông nội bệnh nhi - I.2



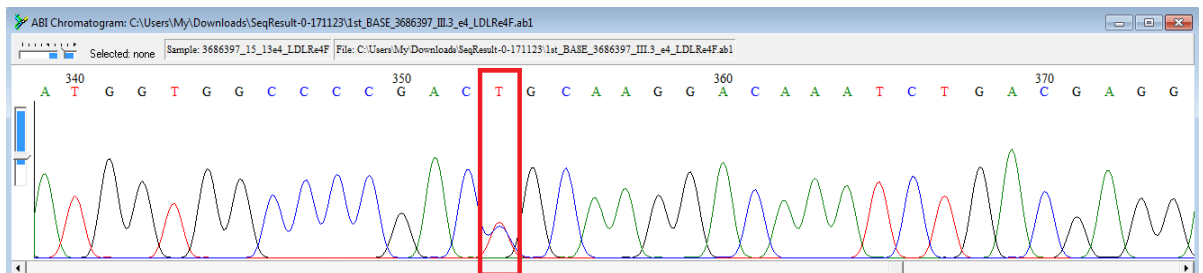
## Chú ruột thứ nhất của bệnh nhi - II.7



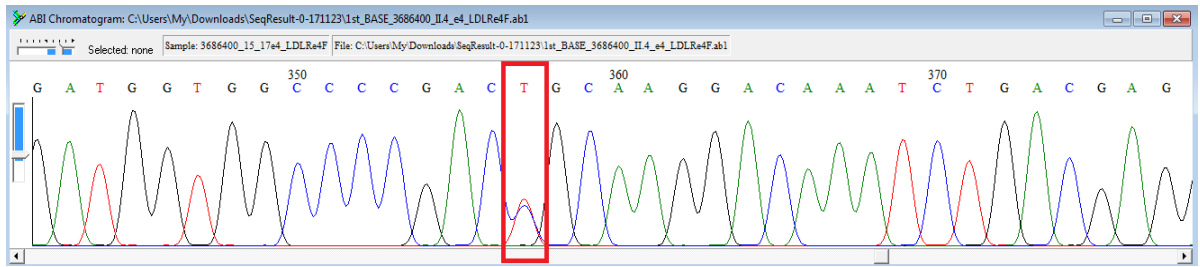
## Em họ con chú thứ nhất - III.6



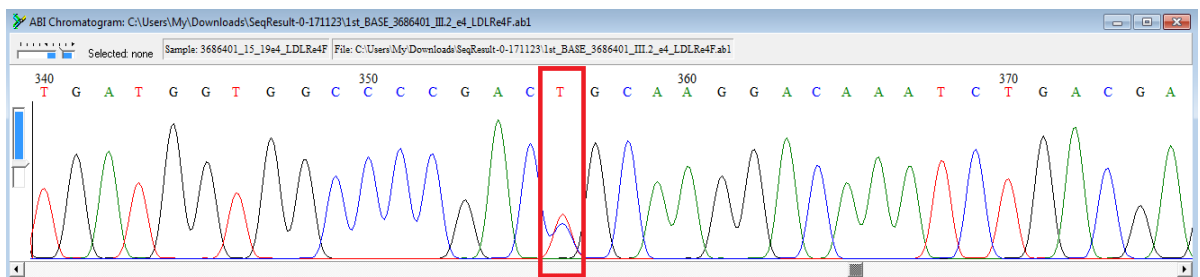
## Em họ con chú thứ nhất - III.7



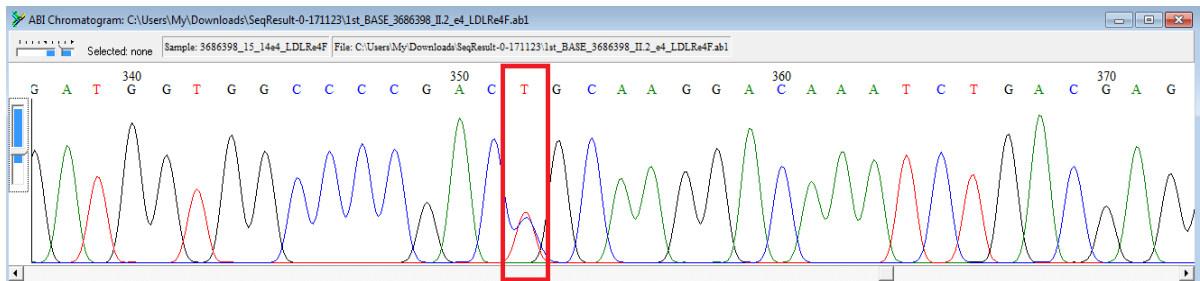
## Chú ruột thứ 2 của bệnh nhi - II.9



## Con chú ruột thứ 2 của bệnh nhi - III.8



## Cô ruột bệnh nhi - II.11



## Con cô ruột bệnh nhi - III.9

