

SÀNG LỌC DI TRUYỀN TIỀN LÀM TỔ BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI CHO BỆNH DI TRUYỀN HIẾM GẶP LY THƯỢNG BÌ BÓNG NƯỚC: BÁO CÁO MỘT TRƯỜNG HỢP

Nguyễn Trương Thái Hà¹, Nguyễn Bảo Trâm², Hà Nhật Anh¹

¹IVFMD, Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức

²IVFMDPN, Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận

TÓM TẮT

Ly thượng bì bóng nước vùng kết nối (Junctional epidermolysis bullosa-JEB) là một bệnh di truyền hiếm gặp khiến làn da dễ hình thành các mụn nước hoặc phỏng rộp khi có ma sát nhẹ trên da. Dạng nghiêm trọng có thể khởi phát ngay từ khi mới sinh ra, các vết phỏng rộp xuất hiện diện rộng trên cơ thể, thậm chí xuất hiện trong lớp niêm mạc như trong khoang miệng hoặc đường tiêu hoá. Khi cả bố và mẹ đều là người lành mang đột biến gen sẽ có 25% khả năng sinh con mắc hội chứng JEB. Sàng lọc di truyền phôi tiền làm tổ (Preimplantation Genetic testing-PGT) là phương pháp được lựa chọn để các gia đình mang gen tránh mang thai và sinh bé mắc bệnh. Một cặp vợ chồng đã có con mắc bệnh lý thượng bì bóng nước được xét nghiệm di truyền bằng kỹ thuật NGS. Kết quả di truyền cho thấy người con mắc bệnh mang đột biến dị hợp tử kép trên gen *LAMA3*, đột biến dị hợp trên gen *LAMC2* và cặp vợ chồng đều là người lành mang đột biến gen *LAMA3*, *LAMC2*. Chỉ định thực hiện PGT bằng kỹ thuật giải trình tự gen thể hệ mới trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm nhằm sàng lọc phôi mang đột biến dị hợp kép gen *LAMA3*, đột biến dị hợp gen *LAMC2* di truyền từ bố và mẹ. Chỉ có một trong bốn phôi được thực hiện PGT cho kết quả không mang đột biến *LAMA3* di truyền từ mẹ và không mang bất thường nhiễm sắc thể, được chuyển vào tử cung người mẹ. Bệnh nhân mang thai và sinh một bé gái khoẻ mạnh, không có triệu chứng của bệnh JEB bẩm sinh. Sàng lọc di truyền phôi tiền làm tổ là phương pháp hiệu quả cho các cặp vợ chồng đều là người lành mang gen gây bệnh ly thượng bì bóng nước vùng kết nối mà không phải chấm dứt thai kỳ hay sinh bé mắc bệnh.

Từ khóa: Giải trình tự gen thể hệ mới, JEB, *LAMA3*, *LAMC2*, ly thượng bì bóng nước, PGT, thụ tinh trong ống nghiệm.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ly thượng bì bóng nước vùng kết nối (Junctional epidermolysis bullosa-JEB) là một bệnh di truyền hiếm gặp khiến làn da cực kỳ mỏng manh, dễ bị rách, hình thành các vết loét, mụn nước hoặc phỏng rộp khi có ma sát nhẹ như gãi hoặc cọ sát khi chuyển động, hoặc chấn thương nhẹ. Dạng nghiêm trọng (Herlitz-Junctional Epidermolysis Bullosa-H-JEB) mất hoàn toàn vùng kết nối giữa các lớp da, khởi phát ngay từ khi mới sinh ra, các vết phỏng rộp xuất hiện diện rộng trên cơ thể, thậm chí xuất hiện trong lớp niêm mạc như trong khoang miệng, thực quản, trực tràng, dạ dày, ruột... gây khó ăn uống và khó tiêu hoá khiến trẻ suy dinh dưỡng, chậm phát triển. Sự phỏng rộp lan rộng dẫn đến hình thành sẹo và các mảng mô hạt. Mô hạt dễ chảy máu khiến trẻ sơ sinh dễ bị nhiễm trùng nghiêm trọng. Ngoài ra, sự tích tụ mô hạt trong khí quản có thể dẫn đến tiếng kêu yếu, khàn và khó thở. Trẻ mắc bệnh H-JEB còn gặp các biến chứng khác bao gồm sự dính khớp của ngón tay và ngón chân, các bất thường ở móng tay và móng chân, biến dạng khớp, hạn chế cử động, rụng tóc men răng mỏng. Trẻ sơ sinh mắc bệnh này thường không thể sống sót sau năm đầu đời do các biến chứng nặng hoặc nhiễm trùng nặng (Kiritsi *et al.*, 2013). Dạng nhẹ hơn (Non-Herlitz Junctional Epidermolysis Bullosa-NH-JEB) có thể có thời điểm khởi phát bệnh muộn hơn, các vết phỏng rộp ban đầu chỉ xuất hiện giới hạn ở bàn tay, bàn chân, đầu gối, khuỷu tay và thường cải thiện sau thời kỳ sơ sinh. Các đặc điểm đặc trưng khác của dạng NH-JEB lại không đồng nhất về mức độ nghiêm trọng và ảnh hưởng khác nhau ở các mô khác nhau, tuy hầu hết những người bị ảnh hưởng không có sẹo hoặc không hình thành mô hạt rộng, do đó khó thở và các biến chứng nghiêm trọng khác hiếm gặp hơn. Người mắc bệnh NH-JEB có thể sống sót đến thời kỳ trưởng thành (Has *et al.*, 2020). Ngoài ra còn có một phân nhóm của bệnh JEB là hội chứng Laryngo-onycho-cutaneous (LOC) gây ra các bất thường ở thanh quản (Laryngo), móng tay hoặc móng chân (Onycho), da (cutaneous). Hội chứng này chỉ do đột biến trên gen *LAMA3*, được phát hiện trong cộng đồng người Hồi giáo Punjabi và được đặc trưng bởi sự hình thành và phát triển quá mức của mô hạt trên niêm mạc thanh quản, kết mạc, vùng da bị chấn thương do cơ chế tự làm lành vết thương lặp đi lặp lại. Khi mô hạt hình thành quá nhiều có thể gây mù loà hoặc tắt đường thở dẫn đến tử vong (Kiritsi *et al.*, 2013).

Nguyên nhân gây bệnh JEB do protein Laminin 332 bị giảm hoặc mất chức năng. Laminin là một nhóm protein tham gia điều hoà phát triển, vận động và gắn kết của tế bào, đồng thời tham gia vào việc hình thành và tổ chức

các màng đáy, là những cấu trúc mỏng dạng tấm giúp ngăn cách và hỗ trợ các tế bào trong nhiều mô. Laminin 332 có vai trò đặc biệt quan trọng trong cấu trúc màng đáy của lớp biểu bì của da (lớp ngoài cùng), lớp màng nang mang lại sức mạnh và khả năng phục hồi cho da, đồng thời tạo ra một rào cản giữa cơ thể và môi trường xung quanh. Laminin 332 là thành phần chính của các sợi gọi là sợi neo, có chức năng kết nối hai lớp màng đáy và giúp gắn kết cấu trúc da lại với nhau. Các nghiên cứu cho thấy laminin 332 có vai trò rất quan trọng trong chữa lành vết thương. Laminin 332 được cấu thành từ 3 tiểu đơn vị $\alpha 3$, $\beta 3$ và $\gamma 2$. Gen *LAMA3* (OMIM#600805) mã hoá tổng hợp tiểu đơn vị $\alpha 3$, gen *LAMB2* (OMIM#150325) mã hóa tổng hợp tiểu đơn vị $\beta 3$ và gen *LAMC2* (OMIM#150292) mã hoá tổng hợp tiểu đơn vị $\gamma 2$. Khi có đột biến xảy ra trên gen *LAMA3*, *LAMB2* hoặc *LAMC2* dẫn đến không tổng hợp các tiểu đơn vị hoặc tiểu đơn vị giảm chức năng sẽ khiến laminin 332 khiếm khuyết hoặc mất chức năng sẽ gây nên bệnh JEB (Schneider *et al.*, 2007). Trong một số trường hợp, đột biến gen *COL17A1* (OMIM#113811), mã hóa collagen loại XVII một cấu trúc trong các mô liên kết, cũng gây ra bệnh JEB (Has *et al.*, 2020).

Bệnh JEB di truyền theo cơ chế lặn trên nhiễm sắc thể thường nghĩa là người mắc hội chứng này có cả hai bản sao của một trong các gen *LAMA3*, hoặc *LAMB2*, hoặc *LAMC2* hoặc *COL17A1* trong mỗi tế bào đều có mang đột biến. Tần suất mắc bệnh là 3/1.000.000 trẻ sinh ra, thuộc nhóm bệnh di truyền đơn gen hiếm gặp (Kelly-Mancuso *et al.*, 2014). Bố mẹ của một trẻ mắc bệnh JEB thường mang một bản sao của gen đột biến, nhưng họ thường không biểu hiện các dấu hiệu và triệu chứng của hội chứng này, họ được gọi là người lành mang gen bệnh. Theo lý thuyết, mỗi cặp vợ chồng là người lành mang đột biến gen *LAMA3*, hoặc *LAMB2*, hoặc *LAMC2* hoặc *COL17A1* có 25% khả năng sinh con mắc bệnh JEB.

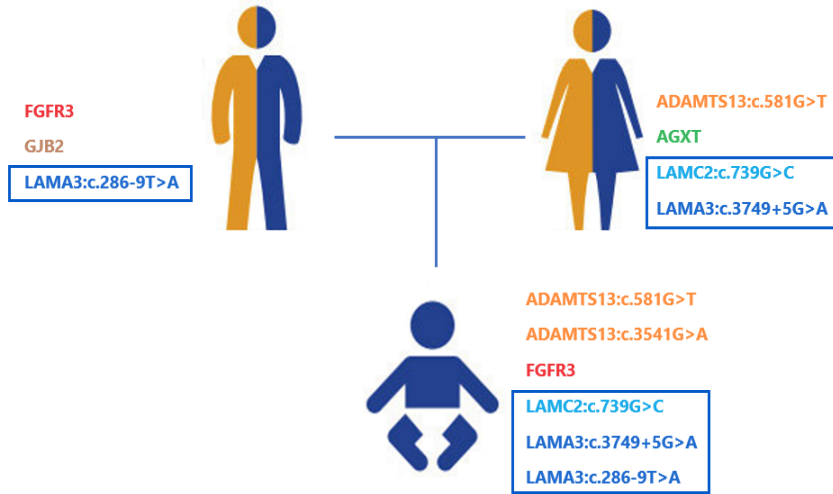
Ứng dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới (NGS Next-Generation Sequencing) kết hợp với kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) đã đưa ra một phương pháp lựa chọn phôi không mang gen bệnh đã xác định, giúp hạn chế tình trạng trẻ sinh mắc bệnh cũng như hạn chế tình trạng sảy thai hoặc chấm dứt thai kỳ giữa chừng do bệnh lý di truyền. Phương pháp này được gọi là PGT-M (preimplantation genetic testing for monogenic) sàng lọc di truyền tiền làm tổ cho bệnh đơn gen. Trong thực hành lâm sàng, xét nghiệm PGT-M thường được chỉ định cùng với xét nghiệm PGT-A (Preimplantation genetic testing for aneuploidy) sàng lọc di truyền tiền làm tổ cho bất thường nhiễm sắc thể để đánh giá toàn diện bộ nhiễm sắc thể của phôi, tăng tỷ lệ thành công cho một chu kỳ hỗ trợ sinh sản, tránh chuyển những phôi mang lệch bội số lượng hoặc cấu trúc nhiễm sắc thể.

Báo cáo này về trường hợp ứng dụng thành công kỹ thuật PGT-A kết hợp PGT-M cho gia đình có tiền sử sinh con mắc bệnh JEB.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng

Một cặp vợ chồng (sinh năm 1988 và 1983) có một con trai (sinh năm 2019) với những triệu chứng lâm sàng xuất hiện từ khi sinh bao gồm: bóng nước rải khắp toàn thân, trong móng tay, nhiều giả mạc, niêm mạc má. Chẩn đoán: Ly thượng bì bóng nước. Tiến hành xét nghiệm di truyền để tìm nguyên nhân với gói xét nghiệm G4500 của Viện Di truyền Y học. Kết quả xét nghiệm gen lần đầu phát hiện người con mang một số biến thể gồm biến thể dị hợp NM_005562.2(*LAMC2*):C.739G>C (p.Asp247His), biến thể dị hợp kép NM_139025.4 (*ADAMTS13*):c.581G>T(p.Gly194Val) và NM_139025.4(*ADAMTS13*):c.3541G>A (p.Gly1181Arg), biến thể dị hợp NM_000142.4 (*FGFR3*):c.1537G>A (p.Asp513Asn). Trong số đó chỉ có đột biến gen *LAMC2* liên quan đến bệnh JEB phù hợp triệu chứng lâm sàng nhưng biến thể c.739G>C thuộc nhóm biến thể chưa rõ chức năng và là biến thể dị hợp, chưa đủ thông tin để kết luận là nguyên nhân gây bệnh ở người con. 6 tháng sau khi sinh, người con mắc bệnh JEB mất do bội nhiễm. 1 năm sau vợ chồng khám chuyên khoa và được chỉ định thực hiện xét nghiệm G4500, kết quả người vợ phát hiện biến thể dị hợp dị hợp NM_005562.2(*LAMC2*):C.739G>C (p.Asp247His), biến thể dị hợp NM_139025.4(*ADAMTS13*):c.581G>T (p.Gly194Val), và biến thể dị hợp NM_000030.3(*AGXT*):c.32C>G (p.Pro11Arg); người chồng phát hiện các biến thể dị hợp NM_000142.5(*FGFR3*):c.1537G>A (p.Asp513Asn) và biến thể dị hợp NM_004004.6(*GJB2*):c.109G>A (p.Val37Ile); vẫn chưa xác định được gen di truyền gây bệnh JEB. Đến năm 2022, sau khi cơ sở dữ liệu gen quốc tế được cập nhật, các kết quả được tiến hành phân tích lần 2 đã phát hiện biến thể mới bao gồm: người vợ phát hiện biến thể dị hợp NM_000227.5(*LAMA3*):c.3749+5G>A (chr18: 23931206); người chồng phát hiện biến thể dị hợp NM_000227.5(*LAMA3*):c.286-9T>A (chr18: 23881927); người con mắc bệnh phát hiện biến thể dị hợp kép NM_000227.5(*LAMA3*):c.3749+5G>A và NM_000227.5 (*LAMA3*):c.286-9T>A. Tổng hợp các kết quả cho thấy biến thể gen *LAMA3* và *LAMC2* liên quan đến bệnh JEB, phù hợp triệu chứng lâm sàng, ở người con di truyền cả hai biến thể *LAMA3* của bố và mẹ tạo thành dạng dị hợp kép gây bệnh JEB, có khả năng bao gồm tương tác gen với biến thể trên gen *LAMC2* (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ di truyền gia đình có con mắc hội chứng ly thượng bì bóng nước

Phương pháp

Quy trình tư vấn di truyền và chỉ định điều trị

Cặp vợ chồng đều là người lành mang đột biến gen *LAMA3*, *LAMC2* sẽ có nguy cơ tiếp tục sinh con mắc bệnh JEB ở lần mang thai tiếp theo nên được tư vấn di truyền và chỉ định thực hiện TTTON kết hợp PGT-M để sàng lọc phôi mang tổ hợp đột biến gen *LAMA3* và đột biến gen *LAMC2* có liên quan đến JEB. Bệnh nhân được tư vấn về các bước thực hiện quy trình TTTON, hiểu và ký xác nhận đồng thuận thực hiện TTTON. Bệnh nhân được tư vấn di truyền về lợi ích, nguy cơ cũng như hạn chế khi sinh thiết phôi và giải trình tự tế bào sinh thiết để tiến hành sàng lọc phôi PGT-M kết hợp PGT-A gồm khả năng làm giảm chất lượng phôi vì sinh thiết là một kỹ thuật xâm lấn; mẫu sinh thiết phôi chỉ 5-10 tế bào lá nuôi phôi (trophectoderm) nên kết quả PGT không thể đại diện cho toàn bộ phôi vì tế bào lá nuôi phôi lớp tế bào phát triển thành nhau thai trong khi khối tế bào bên trong (inner cell mass) phát triển thành thai nhi; xét nghiệm PGT-A chỉ đánh giá được mất và thêm đoạn nhiễm sắc thể >5Mb, không phát hiện chuyển đoạn cân bằng hay đảo đoạn nhiễm sắc thể; xét nghiệm PGT-M chỉ được chỉ định khi xác định đột biến đơn gen di truyền từ bố và mẹ, trong trường hợp này là đột biến gen *LAMA3* và đột biến gen *LAMC2* không xác định được đột biến gen khác; hiện tượng Allelic Drop-out khi không khuếch đại ngẫu nhiên của một trong hai allele trong bộ gen của tế bào phôi sinh thiết có thể gây âm tính giả trong kết quả PGT-M; nguy cơ không có phôi chuyển khi các phôi đều có bất thường và bệnh nhân phải thực hiện một chu kỳ tiếp theo, nguy cơ sinh thiết lại khi mẫu sinh thiết lần đầu không đủ chất lượng để đánh giá PGT-M kết hợp PGT-A. Bệnh nhân hiểu và ký đồng thuận thực hiện sàng lọc phôi PGT-M kết hợp PGT-A.

Quy trình thực hiện TTTON kết hợp PGT-M và PGT-A

Vợ chồng được khám sức khỏe sinh sản tổng quát cho kết quả nằm trong giới hạn bình thường, được thực hiện quy trình TTTON thường quy tại IVFMD – bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức (Hồ Chí Minh) với phát đồ kích thích buồng trứng GnRH antagonist, chọc hút noãn, tiến hành tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, theo dõi thụ tinh và nuôi phôi đến ngày 5. Phôi nang ngày 5 sẽ được sinh thiết 5-10 tế bào lá nuôi phôi (trophectoderm) để thực hiện giải trình tự gen PGT-M kết hợp PGT-A. Phôi sau sinh thiết được đông lạnh phôi toàn bộ trong nitơ lỏng chờ kết quả di truyền. Tế bào phôi sinh thiết được đông lạnh -80°C và chuyển đến phòng xét nghiệm Di truyền-Công ty Hopegene. Mẫu sinh thiết được khuếch đại toàn bộ bộ gen, giải trình tự NGS (Illumina, Hoa Kỳ) để đánh giá bất thường nhiễm sắc thể và chạy các đoạn DNA mỗi đặc hiệu cho đột biến NM_000227.5(*LAMA3*):c.3749+5G>A, NM_000227.5(*LAMA3*):c.286-9T>A và NM_005562.2(*LAMC2*):c.739G>C trên NGS để tầm soát đột biến gen.

Quy trình chọn lựa phôi chuyển, theo dõi thai kỳ và xét nghiệm gen bé sinh

Bệnh nhân được tư vấn thứ tự phôi chuyển dựa vào kết quả sàng lọc phôi PGT-M kết hợp PGT-A, hiểu rõ và ra quyết định lựa chọn phôi chuyển, ký xác nhận đồng thuận chuyển phôi. Bệnh nhân được chuẩn bị nội mạc tử cung, chuyển phôi trữ, thử thai và theo dõi thai kỳ được thực hiện thường quy.

KẾT QUẢ

Kết quả TTTON và kết quả di truyền phôi

Bệnh nhân chọc hút được 19 noãn, trong đó 16 noãn trưởng thành tiến hành tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, có 13 noãn thụ tinh và nuôi phôi đến ngày 5 được 6 phôi nang trong đó có 4 phôi đủ chất lượng để tiến hành sinh

thiết sàng lọc phôi PGT-M kết hợp PGT-A cho đột biến gen *LAMA3*, *LAMC2* và đánh giá bất thường nhiễm sắc thể, mã hóa từ E1 đến E4.

Bảng 1. Kết quả di truyền sinh thiết phôi nang

Mã phôi	Kết quả quả di truyền		Hình thái phôi	Thứ tự ưu tiên chuyển phôi
	Bất thường ghi nhận (PGT-A)	Bất thường ghi nhận (PGT-M)		
E1	Phát hiện bất thường nhiễm sắc thể: -8 (30%), -14 (30%), -17 (40%), +19 (30%)	Phát hiện đột biến dị hợp tử <i>LAMC2</i> (c.739G>C)	Loại 1	2
E2	Chưa phát hiện bất thường	Phát hiện đột biến dị hợp tử <i>LAMC2</i> (c.739G>C); dị hợp tử kép <i>LAMA3</i> (c.3749+5G>A và c.286-9T>A)	Loại 2	Khuyến cáo hủy phôi
E3	Chưa phát hiện bất thường	Phát hiện đột biến dị hợp tử kép <i>LAMA3</i> (c.3749+5G>A và c.286-9T>A)	Loại 2	Khuyến cáo hủy phôi
E4	Chưa phát hiện bất thường	Phát hiện đột biến dị hợp tử <i>LAMC2</i> (c.739G>C); dị hợp <i>LAMA3</i> (c.3749+5G>A)	Loại 2	1

Mục tiêu thực hiện PGT-M để loại phôi mang các tổ hợp đột biến có thể biểu hiện kiểu hình JEB nặng. Như vậy xét trên kết quả PGT-M, phôi E2 và E3 bị loại vì mang các tổ hợp đột biến được di truyền từ cả bố và mẹ, tương tự con bệnh. Phôi E1, E4 không mang tổ hợp 3 đột biến này nên có thể cân nhắc sử dụng. Về phôi E1, tuy chỉ mang đột biến c.739G>C trên gen *LAMC2* nhưng lại mang bất thường số lượng nhiễm sắc thể dạng đa khảm, gây giảm khả năng làm tổ của phôi E1. Hơn nữa, nếu khối tế bào phát triển thành thai của phôi E1 thực sự mang monosomy 14 dạng khảm, thai không sảy thì lại có nguy cơ sinh ra em bé bị dị tật và xuất hiện thể UPD. Vì vậy, phôi E1 là phôi hạn chế sử dụng. Phôi E4 là phôi chưa phát hiện bất thường về cả số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể. Xét về đột biến gen, phôi E4 mang tổ hợp đột biến đã được ghi nhận trên mẹ, mà người mẹ không biểu hiện bất cứ triệu chứng nào của JEB. Nên phôi E4 được ưu tiên chuyển.

Kết quả chuyển phôi và thai kỳ

Phôi E4 được rã đông phôi và chuyển vào tử cung bệnh nhân ngày 30/05/2022. Kết quả beta hCG ngày 12/06/2022 là 543.7 mIU/mL. Các xét nghiệm tiền sản trong suốt thai kỳ không ghi nhận bất thường. Ngày 27/02/2023, bệnh nhân mổ lấy thai lúc 39 tuần tại bệnh viện Phương Châu, bé gái cân nặng 4040 gr, chỉ số Apgar 8/9. Sức khỏe ổn định, bệnh nhân từ chối xét nghiệm gen lại cho bé do bé sinh không có triệu chứng bệnh JEB giống bé sinh trước đó.

Thời điểm khởi phát bệnh JEB thể nặng rất sớm, thường ngay khi sinh ra hoặc sau 2-3 tháng tuổi (Kiritsi *et al.*, 2013), bé bệnh trước cũng phát bệnh ngay từ khi mới sinh. Quan sát tại các mốc thời gian 3 tháng tuổi, 6 tháng tuổi, 9 tháng tuổi và 1 năm tuổi bé đều không xuất hiện triệu chứng liên quan JEB. Tính đến hiện tại, bé sanh được 15 tháng tuổi, hoàn toàn không quan sát thấy phỏng rộp, bóng nước trên da/nhiêm mạc, các chỉ số phát triển được đánh giá ổn định, bé phát triển khỏe mạnh. Như vậy, có thể khẳng định em bé sinh ra từ phôi E4 không biểu hiện bệnh JEB.

Mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh JEB phức tạp bởi sự tương tác giữa các đột biến trên các gen khác nhau. Việc xác định một đột biến trong một gen là không đủ để xác định cơ sở di truyền của JEB (Hammersen *et al.*, 2016). Đã ghi nhận trường hợp ca bệnh JEB có tương tác gen khi mang 2 đột biến dị hợp kép trên gen *COL17A1* và 1 đột biến dị hợp trên gen *LAMA3* (Floeth and Bruckner-Tuderman, 1999). Một trường hợp khác về tương tác gen trong bệnh JEB cũng được ghi nhận mang 2 đột biến gồm 1 đột biến dị hợp trên gen *LAMA3* và 1 đột biến dị hợp trên gen *LAMB3* (Riahi *et al.*, 2021). Tổ hợp các đột biến trên 2 gen làm giảm đáng kể lượng lamini 332 gây nên triệu chứng bệnh JEB. Trong trường hợp này, người con mắc bệnh JEB mang đột biến dị hợp kép trên gen *LAMA3* và đột biến dị hợp trên gen *LAMC2*. Y vẫn chưa ghi nhận trường hợp tương tự nhưng *LAMA3* và *LAMC2* là 2 tiểu đơn vị cấu thành nên lamini 332, đột biến trên cả 2 gen này làm thay đổi chuỗi polypeptide, thay đổi cấu trúc, độ tích điện của tiểu đơn vị cấu thành nên lamini 332, dẫn đến giảm lượng lamini 332. Tuy ở người mẹ có mang đột biến gen *LAMA3* và *LAMC2* không biểu hiện kiểu hình bệnh nhưng không loại bỏ khả năng gây bệnh khi có sự kết hợp giữa đột biến gen *LAMC2* từ mẹ và đột biến gen *LAMA3* từ bố. Do đó chỉ định PGT-M trong trường hợp này được thực hiện trên tổ hợp 3 đột biến gen *LAMA3* và gen *LAMC2*. Các trường hợp phôi không được sử dụng gồm:

- Phôi mang tổ hợp cả 3 đột biến gen *LAMA3* và gen *LAMC2* di truyền từ cả bố và mẹ, tương tự bé bệnh trước đó.
- Phôi mang tổ hợp đột biến gen *LAMA3* di truyền từ mẹ và đột biến gen *LAMA3* di truyền từ bố tạo thành dị hợp kép trên gen *LAMA3*.
- Phôi mang tổ hợp đột biến gen *LAMA3* di truyền từ bố và đột biến gen *LAMC2* di truyền từ mẹ.

Đối với riêng bệnh JEB, tính đến hiện nay chưa có báo cáo về sàng lọc phôi tiền làm tổ cho các đột biến gây bệnh liên quan, chỉ có báo cáo về sàng lọc trước sinh cho các đột biến gen *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* (Christiano *et al.*, 1997; Takizawa *et al.*, 1998). Có trường hợp đặc biệt khi thai phụ mang song thai lại sàng lọc trước sinh đột biến gen *LAMB3* cho thấy một trong hai thai nhi mắc bệnh JEB, tiến hành chấm dứt có chọn lọc đối với thai nhi mắc bệnh, thai nhi không mắc bệnh tiếp tục phát triển và thành công sinh một bé gái khỏe mạnh (Fassihi *et al.*, 2005). Trong các trường hợp này, sàng lọc trước sinh có thể ngăn được việc sinh trẻ mắc bệnh nhưng thai phụ phải đối diện với lựa chọn chấm dứt thai kỳ khi phát hiện thai nhi mắc bệnh.

Việc ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen trong sàng lọc phôi tiền làm tổ đã giúp hạn chế sử dụng những phôi có khả năng mang đột biến gen gây bệnh di truyền từ cả bố và mẹ khi bố và mẹ là người lành mang gen bệnh, mang lại nhiều lợi ích cho bệnh nhân, giảm bớt gánh nặng về tâm lý cho bệnh nhân khi phải đối diện với lựa chọn khó khăn chấm dứt thai kỳ hay sinh con mắc bệnh. Tuy nhiên, xét nghiệm sàng lọc phôi tiền làm tổ vẫn còn khá nhiều hạn chế. Để thực hiện giải trình tự gen PGT-M, cặp vợ chồng mang gen bắt buộc phải thực hiện TTTON, kinh phí để thực hiện TTTON là khoảng chi phí đáng kể. Tuy nhiên, khi đã thực hiện TTTON phải có phôi nang ngày 5 hoặc ngày 6 đủ chất lượng vì phôi chất lượng kém không thể sinh thiết hoặc ảnh hưởng chất lượng tế bào sinh thiết gây sai lệch kết quả di truyền. PGT-M cũng chỉ phát hiện được đột biến gen di truyền từ bố và mẹ đã xác định trước, không phát hiện được các đột biến gen khác, do đó để thực hiện sàng lọc gen bệnh hiệu quả cần xác định đúng và đủ các đột biến là nguyên nhân gây bệnh, tránh tình trạng đã sàng lọc gen trên phôi tiền làm tổ vẫn sinh bé mắc bệnh do bỏ sót nguyên nhân. Do đó, việc tư vấn di truyền là thực sự quan trọng và cần thiết để giúp bệnh nhân hiểu rõ được căn bệnh của mình, tìm được nguyên nhân gây bệnh, hiểu rõ các phương án sàng lọc tiền làm tổ hoặc tiền sản về lợi ích và hạn chế để có thể có lựa chọn phù hợp.

KẾT LUẬN

Ứng dụng thụ tinh trong ống nghiệm kết hợp công nghệ giải trình tự gen để sàng lọc phôi là một công cụ hữu ích để giúp các gia đình mang bệnh di truyền đơn gen có cơ hội sinh con khỏe mạnh thông qua việc phát hiện và loại bỏ những phôi mang gen bệnh được di truyền từ bố và mẹ. Đồng thời, xuyên suốt quá trình điều trị, việc tư vấn di truyền thực sự cần cho bệnh nhân có đủ hiểu biết và có kết quả điều trị thành công.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Christiano AM, Pulkkinen L, McGrath JA, Uitto J (1997). Mutation-based prenatal diagnosis of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Prenat Diagn* 17(4):343-354
- Fassihi H, Ashton GH, Denyer J, Mellerio JE, Mason G, McGrath JA (2005). Prenatal diagnosis of Herlitz junctional epidermolysis bullosa in nonidentical twins. *Clin Exp Dermatol* 30(2):180-182.
- Floeth M, and Bruckner-Tuderman L (1999). Digenic Junctional Epidermolysis Bullosa: Mutations in *COL17A1* and *LAMB3* Genes. *American Journal of Human Genetics* 65 (6): 1530–37.
- Hammersen J, Has C, Naumann-Bartsch N, Stachel D, Kiritsi D, Söder S, Tardieu M, Metzler M, Bruckner-Tuderman L, Schneider H (2016). Genotype, Clinical Course, and Therapeutic Decision Making in 76 Infants with Severe Generalized Junctional Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 136(11):2150-2157.
- Kelly-Mancuso G, Kopelan B, Azizkhan RG, Lucky AW (2014). Junctional epidermolysis bullosa incidence and survival: 5-year experience of the Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association of America (DebRA) nurse educator, 2007 to 2011. *Pediatr Dermatol* 31(2):159-162.
- Kiritsi D, Has C, Bruckner-Tuderman L (2013). Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adh Migr* 7(1):135-41.
- Riahi K, Ghanbari Mardasi F, Talebi F, Jasemi F, Mohammadi Asl J. P (2021). Digenic Mutations in Junctional Epidermolysis Bullosa in An Iranian Family. *Cell J* 23(5):598-602.
- Schneider H, Mühle C, Pacho F (2007). Biological function of laminin-5 and pathogenic impact of its deficiency. *Eur J Cell Biol* 86(11-12):701-717.
- Takizawa Y, Shimizu H, Pulkkinen L, Hiraoka Y, McGrath JA, Suzumori K, Aiso S, Uitto J, Nishikawa T (1998). Novel mutations in the *LAMB3* gene shared by two Japanese unrelated families with Herlitz junctional epidermolysis bullosa, and their application for prenatal testing. *J Invest Dermatol* 110(2):174-8.

PREIMPLANTATION GENETIC TESTING BY NEXT GENERATION SEQUENCING FOR RARE GENETIC DISEASE-JUNCTIONAL EPIDERMOLYSIS BULLOSA

Ha TT Nguyen^{1*}, Tram B Nguyen², Anh N Ha¹

¹IVFMD, My Duc Hospital

²IVFMD Phu Nhuan, My Duc Phu Nhuan Hospital

SUMMARY

Junctional epidermolysis bullosa (JEB) is a group of rare hereditary diseases that make the skin and mucous membranes very fragile and blister easily although with minor injury or friction, such as rubbing or scratching. In JEB generalized severe, blisters are present at birth. Infants with this condition usually do not survive beyond the first year of life. JEB is inherited in an autosomal recessive manner. A couple who were both carriers of genes related to JEB have 25% affected children. Application in-vitro fertilization (IVF) combines preimplantation genetic testing for monogenic (PGT-M), the only available option for families at risk for the recurrence of the disorder without having to terminate an ongoing pregnancy. The couple had a child with JEB generalized severe: blisters spread all over the body, in the nails, in the buccal mucosa, and the child died at six months old by superinfection. The genetic results showed that the index child has double-heterozygous intron and splice-junction mutations in the *LAMA3* gene, and heterozygous missense mutation in the *LAMC2*. Both parents are healthy carriers of the variants of the *LAMA3* and *LAMC2* genes. IVF combines PGT-M and preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) was indicated to be performed on the blastocysts to eliminate embryos carrying recessive all *LAMA3* and *LAMC2* mutations. Four embryos would go through NGS-based preimplantation screening for chromosomal abnormalities. Two novel *LAMA3* mutations and one *LAMC2* mutation were used to design primers for the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the segment spanning the mutation in the family and their four embryos. Then, the PCR products were sequenced with NGS to detect the alteration in the allele. Based on the results of PGT-M, 1 in 4 embryos detected all mutant alleles, 1 in 4 embryos appeared to have double-heterozygous mutations in the *LAMA3* gene, and 2 in 4 embryos inherited at least one pathogenic allele from the father. The embryo showed no chromosomal abnormalities and did not carry variants on the *LAMA3* gene preferentially to the mother, was recommended to be transferred into the mother's uterus. As a result, the patient became pregnant and gave birth to a healthy baby. The combination of IVF and PGT-M is helpful to couples who are both carriers of JEB recessive genetic disease to have healthy children.

Keywords: Next generation sequencing, JEB, *LAMA3*, *LAMC2*, Junctional epidermolysis bullosa, PGT, *in vitro* fertility.

* Author for correspondence: Tel: 0933091130; Email: thaiha.nt@myduchospital.vn