

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

PHAN DUY BÁ HOÀNH

NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA CÁC  
ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIDE VÙNG GEN  
INTERFERON REGULATORY FACTOR 6 (*IRF6*)  
VỚI DỊ TẬT BẨM SINH KHE HỖ MÔI - VÒM  
MIỆNG KHÔNG HỘI CHỨNG Ở NGƯỜI VIỆT

NGÀNH: RĂNG – HÀM – MẶT

MÃ SỐ: 9720501

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

TP. Hồ Chí Minh, Năm 2023

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Hoàng Anh Vũ

PGS.TS. Lâm Hoài Phương

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường

hợp tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

vào hồi      giờ      ngày      tháng      năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP. HCM
- Thư viện Đại học Y Dược TP. HCM

## GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

### **Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu:**

Khe hở môi / vòm miệng (KHM/VM) là một dị tật bẩm sinh phổ biến có nguyên nhân phức tạp. Trong bối cảnh tỉ lệ dị tật KHM/VM ở nước ta cao, ảnh hưởng nặng nề và lâu dài về tài chính đối với trẻ mắc KHM/VM, tạo một gánh nặng cho xã hội nước ta và hiện chưa có nhiều nghiên cứu để xác định cơ chế bệnh sinh của dị tật này, điều này cho thấy sự cấp thiết nghiên cứu để tìm ra nguyên nhân của KHM/VM ở người Việt.

Các biến thể của gen *IRF6* (là gen mã hóa cho yếu tố điều hoà interferon 6) có liên quan một cách nhất quán với KHM/VM trong nhiều nghiên cứu ở các quần thể khác nhau trên thế giới. Đột biến gen *IRF6* được xác định là nguyên nhân gây ra hội chứng van der Woude di truyền trội trên NST thường, bệnh bao gồm KHM/VM và/hoặc chỉ khe hở vòm miệng (KHVM) cùng với những bất thường về răng và môi. Các nghiên cứu trên nhiều quần thể khác nhau trên thế giới đã cho thấy mối liên quan giữa các đa hình đơn nucleotide (SNP) trên gen *IRF6* với dị tật bẩm sinh KHM/VM không hội chứng, tuy nhiên kết quả còn nhiều mâu thuẫn ở những quần thể khác nhau trên thế giới. Do đó, nghiên cứu này nhằm xác định mối liên quan biến thể gen *IRF6* với KHM/VM không hội chứng ở người Việt.

### **Mục tiêu nghiên cứu:**

**Mục tiêu tổng quát:** Xác định mối liên quan giữa các đa hình đơn nucleotide mục tiêu của gen *IRF6* với dị tật bẩm sinh khe hở môi / vòm miệng ở người Việt.

**Mục tiêu chuyên biệt:**

1. Khảo sát đặc điểm lâm sàng và phân loại kiểu hình khe hở môi / vòm miệng.
2. Xác định tần suất alen và kiểu gen các đa hình đơn nucleotide mục tiêu của gen *IRF6* ở người Việt khỏe mạnh và người mắc dị tật khe hở môi / vòm miệng.
3. Phân tích mối liên quan mỗi đa hình đơn nucleotide mục tiêu với dị tật bẩm sinh khe hở môi / vòm miệng ở người Việt.
4. Phân tích mối liên quan các haplotype (kiểu gen đơn bội) của các đa hình đơn nucleotide mục tiêu của gen *IRF6* với dị tật bẩm sinh khe hở môi/vòm miệng ở người Việt.

**Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn:**

Từ kết quả thu được có thể hướng tới việc ứng dụng vào tư vấn di truyền trước sinh và gia tăng hiểu biết về hệ di truyền của bệnh nhân và cơ chế bệnh sinh của dị tật KHM/VM. Đó cũng là một mục tiêu của y học cá thể hoá, góp phần vào mục tiêu chung giảm thiểu tỉ lệ trẻ sinh ra bị dị tật KHM/VM ở người Việt.

**Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:**

Nghiên cứu bệnh chứng trên bệnh nhân người Việt bị KHM/VM.

**Bố cục của luận án:**

Luận án gồm 91 trang: phần mở đầu 2 trang, tổng quan tài liệu 27 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 12 trang, kết quả nghiên cứu 27 trang, bàn luận 21 trang, kết luận và kiến nghị 2 trang. Luận án có 28 bảng, 25 hình, 107 tài liệu tham khảo.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1 Dịch tễ học của dị tật KHM/VM

KHM/VM là dị tật bẩm sinh có tỉ lệ trên toàn thế giới khoảng 1/700 trẻ được sinh ra. Quần thể người châu Á và châu Mỹ có tỉ lệ mắc dị tật này cao nhất, khoảng 1/500 trẻ được sinh ra, quần thể người châu Âu khoảng 1/1000, quần thể người châu Phi khoảng 1/2000. Tỷ lệ KHM/VM ở Việt Nam là 1%.

### 1.2 Nguyên nhân

Những nghiên cứu này cho thấy nhiều vị trí gen trên NST có thể là nguyên nhân gây ra dị tật bẩm sinh KHM/VM, bao gồm:

- Vị trí trên NST 1, 2, 4, 6, 14, 17, 19 (các gen *MTHFR*, *TGF- $\alpha$* , *D4S175*, *F13A1*, *TGF- $\beta$ 3*, *D17S250*, *APOC2*).
- Một số gen có chức năng tăng trưởng (*TGF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 3*), những yếu tố phiên mã (*MSX1*, *IRF6*, *TBX22*), hoặc những nhân tố chuyển hóa chất lạ (*CYP1A1*, *GSTM1*, *NAT2*), chuyển hóa chất dinh dưỡng (*MTHFR*, *RARA*) hoặc đáp ứng miễn dịch (*PVRL1*, *IRF6*). Trong đó gen *IRF6* đã được chứng minh là nguyên nhân gây dị tật bằng phương pháp GWAS.

### 1.3 Cơ chế hình thành KHM/VM

Quá trình phát triển phôi thai học của mặt vẫn còn nhiều điều bí ẩn. Từ những bằng chứng ít ỏi đã có được, không thể giải thích chính xác khe hở vùng hàm mặt đã được hình thành như thế nào. Có hai thuyết chính được đưa ra để giải thích sự hình thành KHM/VM là thuyết hợp nhất các nụ mặt (fusion of facial

prominences theory) và thuyết trung bì lắng đọng (mesodermal penetration theory).

#### **1.4 Phân loại kiểu hình**

Có nhiều cách phân loại KHM/VM khác nhau, được sử dụng phổ biến hiện nay là phân loại theo Kernahan và Start (1958) xem lỗ răng cửa như là một ranh giới để phân loại gồm khe hở tiên phát (khe hở môi và khe hở cung hàm) và khe hở thứ phát (khe hở vòm miệng).

#### **1.5 Ảnh hưởng lên sức khỏe toàn thân**

Những trẻ bị KHM/VM vừa ảnh hưởng đến thẩm mỹ vừa ảnh hưởng đến chức năng, tạo nên tâm lý không tốt cho trẻ ngay từ khi còn nhỏ. Đặc biệt khi trẻ lớn lên với khuôn mặt dị dạng và phát âm không rõ tiếng làm cho trẻ tự ti, mặc cảm.

#### **1.6 Điều trị**

Nguyên tắc điều trị KHM/VM cần sự phối hợp của nhiều chuyên khoa như tạo hình thẩm mỹ, phẫu thuật hàm mặt, chỉnh hình răng mặt, tai mũi họng, phát âm trị liệu, tâm lý trị liệu, ... đó là một quá trình điều trị toàn diện từ khi trẻ mới sinh cho đến tuổi trưởng thành.

#### **1.7 Nghiên cứu di truyền KHM/VM**

Tới nay, các cách tiếp cận về di truyền đối với KHM/VM không hội chứng bao gồm: phân tích liên kết, phân tích những cặp song sinh có liên quan bị ảnh hưởng, phân tích tương quan ba thể hệ trong cùng một gia đình hoặc nghiên cứu bệnh - chứng, xác định bất thường hoặc mất đoạn nhỏ NST ở những ca bệnh, và giải trình tự trực tiếp mẫu DNA từ người bệnh. Xác định kiểu

hình chính xác là điều quan trọng vì lực thống kê để xác định ảnh hưởng sẽ yếu khi các phân nhóm khác nhau được nghiên cứu như một nhóm duy nhất.

Nghiên cứu di truyền ba thế hệ từ nhiều quần thể đối với dị tật KHM/VM đã xác nhận lại gen *IRF6*, với bằng chứng về sự liên kết và mối liên quan của những marker ở gen *IRF6* mạnh đối với 3 thế hệ gia đình nguồn gốc châu Á.

Gen *IRF6* nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể số 1, ở vị trí 1q32.2, có 10 exon, trong đó exon 1, 2, 10 không mã hóa, kích thước 20552 base. Gen *IRF6* có vị trí phân tử nằm trên nhiễm sắc thể số 1 từ cặp base 209.785.623 tới 209.806.175.

*IRF6* thuộc một nhóm các yếu tố phiên mã có chung vùng liên kết DNA xoắn – ngoặt – xoắn (helix-turn-helix) được bảo tồn cao và vùng liên kết protein ít được bảo tồn gọi là SMIR (SMAD-IRF-binding domain).

Đột biến ở gen *IRF6* được xác định đầu tiên là nguyên nhân gây ra hội chứng van der Woude di truyền trội trên NST thường, bệnh bao gồm KHM/VM và/hoặc chỉ KHVM cùng với những bất thường về răng và sứt môi. Những nghiên cứu bổ sung đã cho thấy các alen phổ biến trên gen *IRF6* có liên quan đến KHM/VM không hội chứng. Zuccherro và cộng sự (2004) đã phát hiện sự di truyền quá mức của đa hình V274I (rs2235371), ban đầu được xác định bởi Kondo và cộng sự (2002), ở những bệnh nhân bị KHM/VM không hội chứng, đặc biệt là người châu Á và Nam Mỹ. Zuccherro cho rằng *IRF6* là yếu tố di truyền có ý nghĩa nhất đối với dị tật KHM/VM, các biến thể của gen đóng góp 12%

yếu tố di truyền vào KHM/VM và tăng gấp 3 nguy cơ tái phát ở những gia đình đã có 1 con bị ảnh hưởng.

### **1.8 Kỹ thuật xác định biến thể gen *IRF6***

Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để xác định các biến thể gen *IRF6*.

Phương pháp giải trình tự Sanger – Coulson dựa trên sự tổng hợp các đoạn DNA từ mạch DNA khuôn có chiều dài hơn kém nhau một nucleotide, có các đầu tận cùng là dideoxynucleotide (ddNTP). Thực hiện 4 phản ứng tổng hợp ADN riêng biệt với thành phần gồm phần chung là DNA cần giải trình tự (khuôn mẫu), môi (oligonucleotid bắt cặp bổ sung với phần đầu trình tự cần giải), các thành phần khác của phản ứng tổng hợp DNA như đệm, ion  $Mg^{2+}$ , dNTP, polymerase; và 4 phản ứng khác nhau do có thêm 1% ddNTP khác nhau (T có ddATP, A có ddTTP, C có ddGTP, G có ddCTP). Mỗi hoặc dNTP hoặc ddNTP sẽ được đánh dấu bằng phóng xạ để hiện hình sản phẩm bằng tự xạ ký. Mỗi ống sản phẩm được nạp vào một giếng điện di. Kết quả điện di sẽ được hiện hình nhờ kỹ thuật tự xạ ký và được đọc thành trình tự DNA cần giải.

Năm 1986, Leroy Hood đã cải tiến phương pháp Sanger – Coulson để có thể tự động hóa hoàn toàn bằng cách gắn các đầu huỳnh quang khác nhau cho 4 loại ddNTP.

## **CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1 Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu cắt ngang mô tả, thiết kế bệnh chứng

### **2.2 Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Thời gian thực hiện nghiên cứu: từ tháng 12/2019 đến tháng 12/2022.

Địa điểm: Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM và Trung tâm Y Sinh học Phân tử - Đại học Y Dược TP.HCM

### **2.3 Đối tượng nghiên cứu**

#### **2.3.1 Dân số nghiên cứu**

Nhóm bệnh là bệnh nhân mắc KHM/VM được khám tại bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM trong chương trình ‘Phẫu thuật nụ cười’ do tổ chức Operation smile và bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM phối hợp tổ chức. Nhóm chứng là những người không mắc dị tật KHM/VM là tình nguyện viên tại Đại học Y Dược TP.HCM và bổ sung từ hệ gen bình thường của người Việt.

#### **2.3.2 Tiêu chí chọn mẫu**

Tiêu chí chọn mẫu bệnh là:

- Bệnh nhân mắc dị tật KHM/VM không hội chứng
- Có đầy đủ hồ sơ bệnh án và thông tin cá nhân của bệnh nhân
- Bệnh nhân hoặc người bảo hộ đồng ý tham gia nghiên cứu
- Bệnh nhân là người Việt
- Bệnh nhân không có sự phân biệt về tuổi và giới tính
- Bệnh nhân không phân biệt đã phẫu thuật hay chưa phẫu thuật

Tiêu chí chọn mẫu chứng là:

- Những người không mắc dị tật KHM/VM hay các dị tật sọ mặt bao gồm KHM/VM.
- Có sự tương ứng về giới tính với nhóm bệnh (bởi vì nhóm chúng được lấy từ dữ liệu gen ở người bình thường với tỉ lệ nam:nữ là tương đương nhau, và tỉ lệ nam:nữ trong nhóm bệnh cũng tương đương nhau nên có sự tương ứng về giới tính giữa 2 nhóm).
- Nghiên cứu không xét đến sự tương ứng về độ tuổi với nhóm bệnh bởi vì trong nghiên cứu về di truyền của các SNP và mối liên hệ với dị tật thì các SNP không thay đổi theo thời gian ở mỗi cá thể từ lúc được sinh ra.

### **2.3.3 Tiêu chuẩn loại trừ**

- Loại bỏ những mẫu không xác định rõ nguồn gốc dân tộc trong lúc chọn mẫu.
- Loại bỏ những mẫu thuộc các hội chứng bẩm sinh của vùng hàm mặt trong lúc chọn mẫu.

## **2.4 Cỡ mẫu của nghiên cứu**

Nghiên cứu đã thu thập số lượng mẫu là 264 trong đó 132 mẫu của bệnh nhân mắc dị tật KHM/VM và 132 mẫu từ người không bị dị tật KHM/VM (tỉ lệ bệnh chứng là 1:1).

## **2.5 Các biến số độc lập và phụ thuộc**

### **2.5.1 Biến số độc lập**

- Tuổi, giới tính của bệnh nhân tham gia nghiên cứu.
- Các đa hình đơn nucleotide mục tiêu của gen *IRF6*.

### **2.5.2 Biến số phụ thuộc**

Các phân nhóm kiểu hình của dị tật bẩm sinh KHM/VM.

## 2.6 Quy trình nghiên cứu

Thu nhận mẫu máu nhóm bệnh và nhóm chứng -> tách chiết DNA -> PCR các đoạn có chứa đa hình đơn mục tiêu trên gen *IRF6* -> điện di -> tinh sạch sản phẩm PCR -> Cycle sequencing PCR -> rửa với ethanol -> đọc trình tự DNA tự động theo kỹ thuật Sanger -> Phân tích kết quả.

## 2.7 Phương pháp phân tích dữ liệu

Tính toán tần suất alen và tần suất kiểu gen sau khi đã giải trình tự gen *IRF6* thành công các mẫu. Phân tích kết quả dựa trên quy luật Hardy-Weinberg. Sau đó kiểm định mối liên quan giữa các SNP mục tiêu với bệnh KHM/VM. Phân tích haplotype và mất cân bằng liên kết (linkage disequilibrium) được tính toán để xác định mối liên quan giữa các dạng liên kết đa hình đơn mục tiêu với bệnh. Nghiên cứu sử dụng phần mềm R 4.2.0, Package SNPassoc để phân tích dữ liệu. Phân tích mối liên quan giữa các đa hình đơn nucleotide mục tiêu và dị tật KHM/VM được thực hiện với 6 mô hình di truyền: mô hình alen (allelic model), mô hình đồng hợp tử (homozygote model), mô hình dị hợp tử (heterozygote model), mô hình trội (dominant model), mô hình lặn (recessive model) và mô hình siêu trội (overdominant model).

## 2.8 Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu đã được chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, Đại học Y Dược TP.HCM.

Nghiên cứu được thực hiện sau khi người tham gia hoặc người giám hộ ký xác nhận trên giấy đồng ý tham gia nghiên cứu.

## **CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ**

### **3.1 Đặc điểm lâm sàng và phân loại kiểu hình**

Trong 132 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, có 71 nam (53,8 %) và 61 nữ (46,2 %). Độ tuổi trung vị của nhóm mẫu trong nghiên cứu là 6 tuổi (trong khoảng 1 – 58 tuổi). Kiểu hình của dị tật được chia làm 4 loại: Khe hở môi có/không khe hở vòm miệng (132 mẫu, viết tắt là KHM/VM), khe hở môi kèm theo khe hở vòm miệng (87 mẫu, viết tắt là KHM-VM), chỉ có khe hở môi (26 mẫu, viết tắt là KHM), chỉ có khe hở vòm miệng (19 mẫu, viết tắt là KHVM).

### **3.2 Tần suất alen và tần suất kiểu gen của các SNP mục tiêu**

rs2073487 có tần suất kiểu gen C/C, T/C, T/T lần lượt là 28%, 40,9%, 31,1%, tần suất alen C, T lần lượt là 48%, 52% trong quần thể bệnh; tần suất kiểu gen C/C, T/C, T/T lần lượt là 22%, 57,6%, 20,4%, tần suất alen C, T lần lượt là 51%, 49% trong quần thể chứng.

rs861019 có tần suất kiểu gen A/A, A/G, G/G lần lượt là 51,5%, 39,4%, 9,1%, tần suất alen A, G lần lượt là 71%, 29% trong quần thể bệnh; tần suất kiểu gen A/A, A/G, G/G lần lượt là 51,5%, 40,9%, 7,6%, tần suất alen A, G lần lượt là 72%, 28% trong quần thể chứng.

rs2236907 có tần suất kiểu gen A/A, A/C, C/C lần lượt là 25%, 41,7%, 33,3%, tần suất alen A, C lần lượt là 46%, 54% trong quần thể bệnh; tần suất kiểu gen A/A, A/C, C/C lần lượt là

22,7%, 57,6%, 19,7%, tần suất alen A, C lần lượt là 52%, 48% trong quần thể chúng.

rs2013162 có tần suất kiểu gen A/A, A/C, C/C lần lượt là 25%, 41,7%, 33,3%, tần suất alen A, C lần lượt là 46%, 54% trong quần thể bệnh; tần suất kiểu gen A/A, A/C, C/C lần lượt là 22,7%, 56,8%, 20,4%, tần suất alen A, C lần lượt là 51%, 49% trong quần thể chúng.

rs595918 có tần suất kiểu gen G/G, G/A, A/A lần lượt là 55,3%, 40,1%, 4,6%, tần suất alen G, A lần lượt là 75%, 25% trong quần thể bệnh; tần suất kiểu gen G/G, G/A, A/A lần lượt là 56,8%, 40,1%, 3,1%, tần suất alen G, A lần lượt là 77%, 23% trong quần thể chúng.

rs2235375 có tần suất kiểu gen C/C, C/G, G/G lần lượt là 28%, 37,9%, 34,1%, tần suất alen C, G lần lượt là 47%, 53% trong quần thể bệnh; tần suất kiểu gen C/C, C/G, G/G lần lượt là 22%, 57,6%, 20,4%, tần suất alen C, G lần lượt là 51%, 49% trong quần thể chúng.

rs2235371 có tần suất kiểu gen C/C, T/C, T/T lần lượt là 43,2%, 40,9%, 15,9%, tần suất alen C, T lần lượt là 64%, 36% trong quần thể bệnh; tần suất kiểu gen C/C, T/C, T/T lần lượt là 46,2%, 43,9%, 9,8%, tần suất alen C, T lần lượt là 68%, 32% trong quần thể chúng.

rs2235373 có tần suất kiểu gen G/G, G/A, A/A lần lượt là 38,6%, 37,1%, 24,3%, tần suất alen G, A lần lượt là 57%, 43% trong quần thể bệnh; tần suất kiểu gen G/G, G/A, A/A lần lượt là

31,8%, 54,5%, 13,7%, tần suất alen G, A lần lượt là 59%, 41% trong quần thể chúng.

### **3.3 Môi liên quan giữa các SNP mục tiêu và dị tật KHM/VM**

#### **3.3.1 SNP rs2073487**

Kiểu gen TC của đa hình đơn nucleotide rs2073487 ở mô hình siêu trội làm giảm nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh KHM/VM chỉ còn một nửa ở người Việt ( $OR_{TC/CC-TT} = 0,51$ , 95%CI 0,31-0,83,  $p = 0,01$ ). Yếu tố nguy cơ (OR) của alen C so với alen T ở nhóm bệnh và các phân nhóm kiểu hình KHM/VM so với nhóm chứng xấp xỉ bằng 1, như vậy vai trò của 2 alen C và T là như nhau đối với bệnh ( $OR_{T/C} = 1,1$ , 95%CI 0,78-1,54,  $p = 0,6$ ).

#### **3.3.2 SNP rs861019**

Kết quả phân tích thống kê theo 6 mô hình di truyền là đồng hợp tử, mô hình dị hợp tử, mô hình trội, mô hình lặn, mô hình siêu trội và mô hình alen đã cho thấy yếu tố nguy cơ (OR) của kiểu gen / alen của nhóm bệnh so với nhóm chứng xấp xỉ bằng 1 ở tất cả các mô hình di truyền ( $OR_{GG/AA} = 1,20$ , 95%CI 0,49-2,96,  $p = 0,69$ ;  $OR_{AG/AA} = 0,96$ , 95%CI 0,58-1,60,  $p = 0,06$ ;  $OR_{AG-GG/AA} = 1,00$ , 95%CI 0,62-1,62,  $p = 1,00$ ;  $OR_{GG/AA-AG} = 1,22$ , 95%CI 0,51-2,93,  $p = 0,66$ ;  $OR_{AG/AA-GG} = 0,94$ , 95%CI 0,57-1,54,  $p = 0,8$ ;  $OR_{G/A} = 1,04$ , 95%CI 0,71-1,51,  $p = 0,85$ ). Kết quả cho thấy rs861019 không có mối liên hệ nào với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

#### **3.3.3 SNP rs2236907**

Kết quả phân tích thống kê theo mô hình alen, đồng hợp tử, dị hợp tử và trội đã không cho thấy sự liên quan có ý nghĩa thống kê về nguy cơ gây ra dị tật KHM/VM do  $p > 0,05$  ( $OR_{C/A} = 1,26$ , 95%CI 0,89-1,77,  $p = 0,19$ ;  $OR_{CC/AA} = 1,54$ , 95%CI 0,77-3,07,  $p = 0,22$ ;  $OR_{CA/AA} = 0,66$ , 95%CI 0,36-1,20,  $p = 0,17$ ;  $OR_{CA-CC/AA} = 0,88$ , 95%CI 0,5-1,55,  $p = 0,67$ ). Tuy nhiên, phân tích theo mô hình lặn cho thấy kiểu gen C/C làm tăng nguy cơ bệnh lên gấp đôi với kết quả có ý nghĩa thống kê do  $p < 0,05$  ( $OR_{CC/AA-CA} = 2,04$ , 95%CI 1,16-3,57,  $p = 0,01$ ). Phân tích theo mô hình siêu trội cho thấy kiểu gen C/A làm giảm nguy cơ bệnh 0,53 lần, kết quả có ý nghĩa thống kê do  $p < 0,05$  ( $OR_{CA/CC-AA} = 0,53$ , 95%CI 0,32-0,86,  $p = 0,01$ ). Kiểu gen CC của đa hình đơn nucleotide rs2236907 ở mô hình lặn làm tăng nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh khe hở môi – vòm miệng lên gấp đôi ở người Việt.

### 3.3.4 SNP rs2013162

Kết quả phân tích thống kê theo mô hình alen, đồng hợp tử, dị hợp tử và trội đã không cho thấy sự liên quan có ý nghĩa thống kê về nguy cơ gây ra dị tật KHM/VM do  $p > 0,05$  ( $OR_{C/A} = 1,24$ , 95%CI 0,88-1,74,  $p = 0,22$ ;  $OR_{CC/AA} = 1,48$ , 95%CI 0,74-2,95,  $p = 0,26$ ;  $OR_{CA/AA} = 0,67$ , 95%CI 0,36-1,22,  $p = 0,19$ ;  $OR_{CA-CC/AA} = 0,88$ , 95%CI 0,5-1,55,  $p = 0,67$ ). Tuy nhiên, phân tích theo mô hình lặn cho thấy kiểu gen C/C làm tăng nguy cơ bệnh lên gần gấp đôi với kết quả có ý nghĩa thống kê do  $p < 0,05$  ( $OR_{CC/AA-CA} = 1,94$ , 95%CI 1,11-3,39,  $p = 0,02$ ). Phân tích theo mô hình siêu trội cho thấy kiểu gen C/A làm giảm nguy cơ bệnh 0,54 lần, kết quả có ý nghĩa thống kê do  $p < 0,05$  ( $OR_{CA/CC-AA} =$

0,54, 95%CI 0,33-0,88,  $p = 0,01$ ). Kiểu gen CC của đa hình đơn nucleotide rs2013162 ở mô hình lặn làm tăng nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh khe hở môi – vòm miệng lên gấp đôi ở người Việt.

### 3.3.5 SNP rs595918

Kết quả phân tích thống kê theo 6 mô hình di truyền là mô hình đồng hợp tử, dị hợp tử, mô hình trội, mô hình lặn, mô hình siêu trội và mô hình alen đã cho thấy yếu tố nguy cơ (OR) của kiểu gen / alen của nhóm bệnh so với nhóm chứng xấp xỉ bằng 1 ở tất cả các mô hình di truyền và kết quả không có ý nghĩa thống kê ( $OR_{AA/GG} = 1,54$ , 95%CI 0,42-5,69,  $p = 0,52$ ;  $OR_{GA/GG} = 1,03$ , 95%CI 0,62-1,69,  $p = 0,92$ ;  $OR_{GA-AA/GG} = 1,06$ , 95%CI 0,65-1,73,  $p = 0,8$ ;  $OR_{AA/GG-GA} = 1,52$ , 95%CI 0,42-5,53,  $p = 0,52$ ;  $OR_{GA/AA-GG} = 1$ , 95%CI 0,61-1,64,  $p = 1$ ;  $OR_{A/G} = 1,1$ , 95%CI 0,72-1,68,  $p = 0,67$ ). Kết quả cho thấy rs595918 không có mối liên hệ nào với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

### 3.3.6 SNP rs2235375

Kiểu gen GG của đa hình đơn nucleotide rs2235375 ở mô hình lặn làm tăng nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh KHM/VM lên gấp đôi ở người Việt ( $OR_{GG/CC-GC} = 2,01$ , 95%CI 1,15-3,51,  $p = 0,01$ ). Yếu tố nguy cơ (OR) của alen C so với alen G ở nhóm bệnh và các phân nhóm kiểu hình KHM/VM so với nhóm chứng xấp xỉ bằng 1, như vậy vai trò của 2 alen C và G là như nhau đối với bệnh ( $OR_{G/C} = 1,16$ , 95%CI 0,83-1,64,  $p = 0,38$ ).

### 3.3.7 SNP rs2235371

Kết quả phân tích thống kê theo 6 mô hình di truyền là mô hình đồng hợp tử, dị hợp tử, mô hình trội, mô hình lặn, mô

hình siêu trội và mô hình alen đã cho thấy yếu tố nguy cơ (OR) của kiểu gen / alen của nhóm bệnh so với nhóm chứng xấp xỉ bằng 1 ở tất cả các mô hình di truyền và kết quả không có ý nghĩa thống kê ( $OR_{TT/CC} = 1,73$ , 95%CI 0,79-3,77,  $p = 0,17$ ;  $OR_{CT/CC} = 1$ , 95%CI 0,59-1,67,  $p = 0,99$ ;  $OR_{CT-TT/CC} = 1,13$ , 95%CI 0,70-1,84,  $p = 0,62$ ;  $OR_{TT/CC-CT} = 1,73$ , 95%CI 0,83-3,62,  $p = 0,14$ ;  $OR_{CT/CC-TT} = 0,88$ , 95%CI 0,54-1,44,  $p = 0,62$ ;  $OR_{T/C} = 1,21$ , 95%CI 0,85-1,72,  $p = 0,28$ ). Kết quả cho thấy rs2235371 không có mối liên hệ nào với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

### 3.3.8 SNP rs2235373

Kết quả phân tích thống kê theo mô hình đồng hợp tử đã cho thấy kiểu gen A/A của rs2235373 làm gia tăng nguy cơ bệnh lên 1,46 lần tuy nhiên kết quả không có ý nghĩa thống kê do  $p > 0,05$  ( $OR_{AA/GG} = 1,46$ , 95%CI 0,72-2,97,  $p = 0,29$ ). Phân tích theo mô hình dị hợp tử cho thấy kiểu gen G/A làm giảm nguy cơ bệnh 0,56 lần, kết quả có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  ( $OR_{GA/GG} = 0,56$ , 95%CI 0,32-0,97,  $p = 0,04$ ). Phân tích theo mô hình trội cho thấy kiểu gen G/A-A/A làm giảm nguy cơ bệnh 0,74 lần, kết quả không có ý nghĩa thống kê do  $p > 0,05$  ( $OR_{GA-AA/GG} = 0,74$ , 95%CI 0,45-1,23,  $p = 0,25$ ). Phân tích theo mô hình lặn cho thấy kiểu gen A/A làm tăng nguy cơ bệnh 2,03 lần, kết quả có ý nghĩa thống kê do  $p < 0,05$  ( $OR_{AA/GG-GA} = 2,03$ , 95%CI 1,07-3,83,  $p = 0,03$ ). Yếu tố nguy cơ (OR) của alen A so với alen G ở nhóm bệnh và các phân nhóm kiểu hình KHM/VM so với nhóm chứng xấp xỉ bằng 1, như vậy vai trò của 2 alen A và G là như nhau đối với bệnh ( $OR_{A/G} = 1,08$ , 95%CI 0,77-1,51,  $p = 0,67$ ).

### 3.4 **Mối liên quan giữa các haplotype với KHM/VM**

Với những dữ liệu thu được, thực hiện phân tích mất cân bằng liên kết của từng cặp đa hình đơn nucleotide trong tám SNP mục tiêu. Kết quả cho thấy có sự liên kết mạnh nhất giữa cặp SNP rs2013162 và rs2236907 với mức độ liên kết chặt tới 99%. Ngoài ra các cặp SNP khác cũng có sự liên kết chặt như rs2236907 và rs2073487 (87%), rs2013162 và rs2073487 (88%), rs2235375 và rs2073487 (90%), rs2235375 và rs2236907 (87%), rs2235375 và rs2013162 (88%). Ngoài ra 2 SNP rs2235371 và rs2235373 có mức liên kết trung bình khoảng 70%. Còn các cặp SNP còn lại trong 8 SNP mục tiêu có mức độ liên kết yếu.

Theo mô hình di truyền cộng gộp, mỗi đa hình đơn có thể có tác động rất nhỏ đến bệnh hoặc không hề ảnh hưởng đến sự biểu hiện ra kiểu hình của bệnh, nhưng khi nhiều SNP kết hợp lại với nhau thì có thể gia tăng mức độ ảnh hưởng lên rất nhiều lần. Việc phân tích haplotype luôn luôn cần thiết để đánh giá được toàn diện và chính xác hơn ảnh hưởng của các biến thể di truyền và sự kết hợp của chúng lên bệnh. Do đó, để đánh giá ảnh hưởng của 8 SNP mục tiêu lên dị tật KHM/VM một cách toàn diện và chính xác đã thực hiện phân tích haplotype của 8 SNP mục tiêu. Ngoài ra cũng thực hiện phân tích các dạng haplotype của các nhóm SNP nhỏ hơn như nhóm 7-SNP, 6-SNP, 5-SNP, 4-SNP, 3-SNP và 2-SNP, từ đó đưa ra một bức tranh toàn cảnh về mối liên quan giữa haplotype của các đa hình đơn nucleotide mục tiêu với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

Kết quả phân tích haplotype cho thấy haplotype dạng 5 SNP rs2236907-rs2013162-rs2235375-rs2235373-rs2235371 GCGCC làm tăng nguy cơ mắc dị tật lên 23,64 lần, haplotype ATCAA làm tăng nguy cơ mắc dị tật lên 38,21 lần, haplotype ACCAA làm tăng nguy cơ mắc dị tật lên 17,83 lần, haplotype GCCCC làm tăng nguy cơ mắc dị tật lên 15,29 lần, haplotype ATGAA làm tăng nguy cơ mắc dị tật lên 22,93 lần, các kết quả đều có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$  ( $OR_{GCGCC/GCCAA} = 23,64$ , 95% CI 12,28–45,49,  $p < 0,0001$ ;  $OR_{ATCAA/GCCAA} = 38,21$ , 95% CI 18,00–81,11,  $p < 0,0001$ ;  $OR_{ACCAA/GCCAA} = 17,83$ , 95% CI 5,90–53,94,  $p < 0,0001$ ;  $OR_{GCCCC/GCCAA} = 15,29$ , 95% CI 2,56–91,23,  $p = 0,0028$ ;  $OR_{ATGAA/GCCAA} = 22,93$ , 95% CI 2,23–235,84,  $p = 0,0084$ ). Khi nhóm bệnh được chia thành những phân nhóm kiểu hình là KHM, KHVM và KHM-VM, thì có một xu hướng kết quả tương tự về sự gia tăng nguy cơ của các haplotype này. Ngoài ra, nghiên cứu sử dụng phương pháp phân tích haplotype của sổ trượt để biểu thị một cách trực quan mối liên hệ giữa các haplotype của 5 SNP rs2236907, rs2013162, rs2235375, rs2235373 và rs2235371 với dị tật bẩm sinh KHM/VM. Phương pháp này tập trung vào giá trị  $p$  với  $p < 0,05$  cho mỗi liên quan có ý nghĩa thống kê. Kết quả cho thấy có tổng cộng 25 tổ hợp haplotype có thể xảy ra từ 5 SNP mục tiêu, trong đó có tới 20 haplotype có mối liên quan có ý nghĩa thống kê với dị tật (biểu thị bằng ô màu đỏ với giá trị  $p < 0,001$ ) và chỉ có 5 haplotype không có mối liên quan với dị tật (biểu thị bằng ô màu xanh).

## CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

### 4.1 Đặc điểm lâm sàng và phân loại kiểu hình

Tỉ lệ nam/nữ trong các nhóm là tương đương nhau và không giới hạn độ tuổi tham gia nghiên cứu. Như vậy giữa nhóm bệnh và nhóm chứng có sự tương đồng về giới tính và chủng tộc, còn về độ tuổi của người tham gia nghiên cứu thì không giới hạn bởi vì trong nghiên cứu về di truyền của các SNP và mối liên hệ với dị tật thì các SNP không thay đổi theo thời gian ở mỗi cá thể từ lúc được sinh ra cho nên sự tương đồng về độ tuổi là không cần thiết giữa 2 nhóm.

### 4.2 Tần suất alen và tần suất kiểu gen của các SNP mục tiêu

Phân tích cân bằng Hardy – Weinberg cho 8 SNP mục tiêu cho thấy có 5 SNP có sự cân bằng di truyền trong quần thể cả nhóm bệnh và nhóm chứng là rs861019, rs2235371, rs2236907, rs2013162 và rs595918 với giá trị p ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng đều lớn hơn 0,05. Trong khi đó 3 SNP rs2235373, rs2235375 và rs2073487 chỉ có sự cân bằng di truyền trong quần thể nhóm chứng. Tuy nhiên khi tiến hành phân nhóm các loại kiểu hình của nhóm bệnh thì cả 8 SNP mục tiêu này đều có cân bằng Hardy – Weinberg trong cả hai quần thể nhóm bệnh và nhóm chứng. Như vậy, cân bằng Hardy - Weinberg chỉ ra rằng kết quả về tần suất kiểu gen và tần suất alen của các SNP mục tiêu cùng mối liên quan của các SNP này với dị tật bẩm sinh KHM/VM được tính trên bộ quần thể bệnh – chứng 264 mẫu có thể đại diện được cho người Việt. Và do đó, các kết quả phân tích

ở các SNP này là đáng tin cậy và phản ánh được mối liên quan giữa các SNP mục tiêu với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

So sánh với dữ liệu từ dự án quốc tế nghiên cứu bộ gen người 1000Genomes cho thấy tần suất alen ở người Đông Á tương tự tần suất alen của các SNP mục tiêu trên quần thể người Việt. Điều này chứng tỏ các SNP mục tiêu có xu hướng di truyền tương tự nhau tại các quần thể ở khu vực Đông Á (Trung Quốc, Hàn Quốc, Việt Nam, Nhật Bản).

### **4.3 Mối liên quan giữa các SNP mục tiêu và dị tật KHM/VM**

Kiểu gen TC của đa hình đơn nucleotide rs2073487 ở mô hình siêu trội làm giảm nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh KHM/VM chỉ còn một nửa ở người Việt.

Kết quả cho thấy rs861019 không có mối liên hệ nào với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

Kiểu gen CC của đa hình đơn nucleotide rs2236907 ở mô hình lặn làm tăng nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh khe hở môi – vòm miệng lên gấp đôi ở người Việt.

Kiểu gen CC của đa hình đơn nucleotide rs2013162 ở mô hình lặn làm tăng nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh khe hở môi – vòm miệng lên gấp đôi ở người Việt.

Kết quả cho thấy rs595918 không có mối liên hệ nào với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

Kiểu gen GG của đa hình đơn nucleotide rs2235375 ở mô hình lặn làm tăng nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh KHM/VM lên gấp đôi ở người Việt.

Kết quả cho thấy rs2235371 không có mối liên hệ nào với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

Kiểu gen AA của đa hình đơn nucleotide rs2235373 ở mô hình lặn làm tăng nguy cơ mắc dị tật bẩm sinh khe hở môi – vòm miệng lên gấp đôi ở người Việt.

#### **4.4 Mối liên quan giữa các haplotype với KHM/VM**

Dickson và cộng sự cho rằng đối với những bệnh phức tạp và không đồng nhất như KHM/VM thì tác động cộng gộp của những alen nhỏ trong mô hình haplotype có tác động mạnh hơn là những gen nguyên nhân đơn lẻ. Do đó việc thực hiện phân tích các dạng haplotype của những SNP mục tiêu là cần thiết.

Khi thực hiện phân tích haplotype của toàn bộ 8 SNP mục tiêu, do số lượng lớn SNP và trong đó có một số SNP có liên kết rất yếu nên xác suất tồn tại các tổ hợp haplotype dạng 8-SNP không nhiều và một số haplotype có tần suất xuất hiện rất nhỏ (< 5%) được xếp vào loại haplotype hiếm. Trong 8 SNP mục tiêu, có 4 SNP có kiểu gen làm gia tăng nguy cơ dị tật KHM/VM lên gấp đôi ở mô hình di truyền lặn với kết quả có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) là rs2236907, rs2013162, rs2235375, rs2235373 nên nghiên cứu tập trung vào phân tích haplotype của 4 SNP mục tiêu này để tìm ra nguyên nhân gây gia tăng nguy cơ của dị tật KHM/VM ở trẻ em Việt Nam cùng với SNP thứ 5 là rs2235371 (là SNP được nghiên cứu nhiều nhất ở các quần thể khác nhau

trên thế giới và là SNP đầu tiên được phát hiện có mối liên quan có ý nghĩa với dị tật này được báo cáo trên thế giới). Kết quả đúng như nhận định về sự kết hợp cộng gộp theo mô hình di truyền lặn đã cho thấy sự gia tăng nguy cơ dị tật bẩm sinh KHM/VM của các haplotype tổ hợp từ 5 SNP này.

Chúng tôi cũng phân tích chức năng (in silico) của các SNP làm tăng nguy cơ mắc dị tật. Trong một nghiên cứu GWAS của tác giả Xing-Bo Mo năm 2019 ở người Hán, tác giả đã phát hiện được rs2013162 có liên quan mạnh với mức độ biểu hiện của gen *IRF6*, và mức độ biểu hiện gia tăng của gen *IRF6* làm tăng nguy cơ đột quy thiếu máu não cục bộ. Và trong nghiên cứu này, rs2013162 cũng làm gia tăng nguy cơ mắc dị tật KHM/VM. Điều này đã chứng minh rs2013162 có vai trò ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protein thông qua việc gia tăng mức biểu hiện của gen *IRF6*. Như vậy, mặc dù rs2013162 là một biến thể đồng nghĩa (silent variant), nó có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của protein IRF6 thông qua một cơ chế điều hòa chưa rõ, do đó làm tăng nguy cơ mắc dị tật KHM/VM. Ngoài ra, nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên phát hiện được rs2236907 có mối liên kết chặt chẽ với rs2013162, 2 SNP này di truyền cùng nhau với mức độ gần như tuyệt đối. Điều này cho thấy vai trò chức năng của rs2236907 tương tự với rs2013162, và kết quả đã chứng minh nhận định này là chính xác khi SNP này cũng làm gia tăng nguy cơ mắc dị tật KHM/VM. Mặc dù rs2235373 nằm trên intron 7, tác giả Nasroen năm 2017 trên quần thể người Indonesia đã phát hiện được kiểu gen TT của SNP này làm cho mRNA có biểu hiện

quá mức đối với kiểu hình KHM-VM toàn bộ 1 bên, trong khi đó kiểu gen CT lại làm giảm mức độ biểu hiện mRNA đối với kiểu hình KHM-VM toàn bộ 2 bên. Điều này đã cho thấy được chức năng của rs2235373 đối với dị tật này, và kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi khi rs2235373 làm gia tăng nguy cơ mắc KHM/VM lên gấp đôi. Một SNP khác làm gia tăng nguy cơ dị tật là rs2235375 cũng nằm trên intron, tuy vậy nghiên cứu của tác giả Zhang 2010 sử dụng DNA chiết xuất từ tiểu não được tử thi của 153 cá thể có nguồn gốc châu Âu xác định kiểu gen và phân tích quá trình methyl hóa CpG, đã báo cáo về mối liên hệ quan trọng giữa SNP và tình trạng methyl hóa tại các vị trí CpG, trong vị trí cis hoặc trans. Kết quả cho thấy mối liên quan giữa SNP ở vùng intron là rs2235375 (liên quan đến KHM/VM và nằm trên nhiễm sắc thể 1) và quá trình methyl hóa / biểu hiện gen *IRF6*. Alen C của rs2235375 làm gia tăng quá trình methyl hóa và giảm mức biểu hiện của gen *IRF6*. Điều này đã cho thấy một vai trò chức năng của rs2235375 với dị tật KHM/VM.

Như vậy, các dạng haplotype của 5 SNP rs2236907, rs2013162, rs2235375, rs2235373, rs2235371 làm gia tăng nguy cơ mắc dị tật KHM/VM lên từ 15 đến 38 lần, đồng thời chức năng của các SNP và gen *IRF6* đối với dị tật KHM/VM cũng được xác nhận trên nhiều nghiên cứu khác nhau của thế giới, từ đó khẳng định lại vai trò của biến thể gen *IRF6* đối với KHM/VM ở người Việt.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Sau khi phân tích những dữ liệu có được, nghiên cứu đưa ra các kết luận như sau:

#### 1. Tần suất alen và kiểu gen của các SNP mục tiêu vùng gen *IRF6* ở người Việt

Khảo sát 8 SNP trên 264 mẫu trong đó có 132 người mắc dị tật bẩm sinh KHM/VM và 132 người bình thường cho thấy 5 SNP có phân bố cân bằng Hardy – Weinberg trong quần thể và phân bố tần suất alen và kiểu gen tương tự người Đông Á (Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản).

#### 2. Mối liên quan giữa mỗi SNP mục tiêu với dị tật bẩm sinh KHM/VM

SNP rs2073487 có kiểu gen T/C ở mô hình siêu trội làm giảm nguy cơ bệnh còn một nửa ở người Việt.

SNP rs861019, rs595918, rs2235371 không có sự liên hệ nào với dị tật bẩm sinh KHM/VM ở người Việt.

SNP rs2236907, rs2013162 có kiểu gen C/C làm gia tăng nguy cơ mắc dị tật KHM/VM ở người Việt lên gấp đôi trong mô hình di truyền lặn.

SNP rs2235375 có kiểu gen G/G ở mô hình di truyền lặn làm gia tăng nguy cơ mắc dị tật KHM/VM ở người Việt lên gấp đôi.

SNP rs2235373 có kiểu gen A/A ở mô hình di truyền lặn làm gia tăng nguy cơ mắc dị tật KHM/VM ở người Việt lên gấp đôi.

### **3. Mối liên quan giữa các dạng haplotype của các SNP mục tiêu với KHM/VM**

Các dạng haplotype làm gia tăng nguy cơ mắc dị tật lên từ 15 đến 38 lần, cụ thể là:

+ Các haplotype dạng 5 SNP rs2235373-rs2235371-rs2235375- rs2013162 -rs2236907 GCGCC, ATCAA, ACCAA, GCCCC và ATGAA.

+ Các haplotype dạng 4 SNP rs2235373-rs2235371-rs2235375-rs2013162 GCGC, ATCA, ACCA, GCCC và ATGA, rs2235373-rs2235375- rs2013162-rs2236907 GGCC, ACAA, GCCC, AGAA, ACCC.

+ Các haplotype dạng 3 SNP rs2235371-rs2235375-rs2013162 CGC, TCA, CCC, TGA; rs2235373-rs2235371-rs2235375 GCG, ATC, ACC; rs2235373-rs2235375-rs2013162 GGC, ACA, GCC, AGA, ACC.

+ Các haplotype dạng 2 SNP rs2235373-rs2013162 GC, AA; rs2235371-rs2013162 CC, TA; rs2235371-rs2235375 CG, TC; rs2235373-rs2235375 GG, AC.

#### **KIẾN NGHỊ**

Đề nghị nên thực hiện nghiên cứu tiếp theo như sau:

+ Áp dụng phân loại kiểu hình cụ thể hơn với các phân nhóm kiểu hình dưới lâm sàng.

+ Đánh giá tác động của yếu tố môi trường đối với dị tật bẩm sinh KHM/VM.

+ Xác định cây phả hệ di truyền 3 thế hệ của những gia đình có bệnh nhân mắc dị tật KHM/VM.