

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Hội chứng Prader-Willi (Prader-Willi Syndrome - PWS) là hội chứng bệnh di truyền gây nên do mất hoạt động chức năng của các gen trên nhánh dài gần tâm nhiễm sắc thể (NST) số 15 vị trí q11-q13 có nguồn gốc từ bố. PWS là hội chứng bệnh hiếm gặp với tỷ lệ mắc trong quần thể ước tính 1/10.000 - 1/30.000. Trên thế giới hiện nay có khoảng 350.000 - 400.000 bệnh nhân được chẩn đoán mắc PWS.

Các triệu chứng thường gặp trong hội chứng này là: giảm cử động thai, giảm trương lực cơ, bộ mặt bất thường, béo phì, chậm phát triển tâm thần vận động, tầm vóc thấp, chân tay nhỏ, thiếu năng sinh dục, và hầu hết đều vô sinh.

Các gen quy định PWS trên NST 15q11-q13 hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền (genetic imprinting) - di truyền đơn alen (monoallelic), là cơ chế di truyền phức tạp. Các gen này chỉ hoạt động trên NST 15 nguồn gốc bố, không hoạt động trên NST 15 nguồn gốc mẹ.

Chẩn đoán PWS dựa trên các tiêu chuẩn chẩn đoán trên lâm sàng và được chẩn đoán xác định bằng các xét nghiệm di truyền tế bào và di truyền phân tử.

Biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân PWS nặng, đa dạng, gặp ở nhiều chuyên khoa, hầu hết bệnh nhân được chẩn đoán muộn. Do vậy việc nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng và biến đổi di truyền của PWS để từ đó hướng cho các bác sỹ lâm sàng chỉ định các xét nghiệm di truyền chẩn đoán xác định PWS sớm, điều trị và quản lý bệnh nhân, nhằm cải thiện các triệu chứng nặng, giảm tỷ lệ biến chứng, nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân PWS là cần thiết.

2. Mục tiêu của đề tài

1. Mô tả đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi.

2. Xác định biến đổi di truyền tế bào và phân tử của bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Lâm sàng: PWS là một bệnh hiếm, bệnh có biểu hiện lâm sàng đa dạng, nặng nề, triệu chứng biểu hiện ở nhiều cơ quan, thay đổi theo từng giai đoạn phát triển của trẻ. Bệnh tuân theo cơ chế dấu ấn di truyền, yêu cầu các xét nghiệm di truyền chẩn đoán xác định.

Điểm mới trong nghiên cứu này là mô tả các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân PWS, nhận xét các đặc điểm lâm sàng theo từng giai đoạn phát triển của trẻ, đặc biệt ở giai đoạn sơ sinh là những dấu hiệu chỉ điểm cho bác sỹ lâm sàng hướng tới chỉ định xét nghiệm di truyền chẩn đoán xác định PWS. Mục đích quan trọng là chẩn đoán được bệnh trong giai đoạn sớm đặc biệt trước 6 tháng là thời điểm khuyến cáo điều trị Hormon tăng trưởng cho bệnh nhân.

Kỹ thuật chẩn đoán: lựa chọn và hoàn chỉnh được các kỹ thuật xét nghiệm di truyền tế bào và phân tử để chẩn đoán PWS cho 101 bệnh nhân:

- Kỹ thuật phân tích NST băng G đã phát hiện 4 trường hợp chuyển đoạn NST 15 với NST khác gây mất đoạn NST 15q11-q13.
- Kỹ thuật FISH đã phát hiện 85/101 bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11.2.
- Kỹ thuật MS-PCR áp dụng trên 16/101 bệnh nhân không mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH, kết quả 16 bệnh nhân đều có bất thường methyl hóa, chẩn đoán xác định PWS, thuộc nhóm mUPD, ID.
- Kỹ thuật MS-MLPA: triển khai đầu tiên tại Việt Nam, áp dụng trên 14 bệnh nhân đã chẩn đoán xác định PWS bằng kỹ thuật FISH hoặc MS-PCR, kết quả xác định 4 trường hợp mất đoạn typ 1, 3 trường hợp mất đoạn typ 2, 1 trường hợp mất đoạn không điển hình, 6 trường hợp do mUPD hoặc đột biến điểm trung tâm dấu ấn di truyền

IC, không phát hiện bệnh nhân nào mang đột biến mất đoạn trung tâm đầu ấn di truyền IC.

Nghiên cứu các biến đổi di truyền tế bào và phân tử của bệnh nhân PWS có vai trò quan trọng trong việc lựa chọn các xét nghiệm di truyền để chẩn đoán xác định bệnh. Đối chiếu các biến đổi di truyền và các dấu hiệu lâm sàng có ý nghĩa tiên lượng bệnh, hiệu quả của việc điều trị. Xác định các trường hợp gia đình bệnh nhân PWS có nguy cơ cao sinh con mắc PWS trong những lần sinh sau, tư vấn di truyền và chỉ định chẩn đoán trước sinh cho những lần sinh con sau của các gia đình đó.

4. Cấu trúc luận án

Luận án được trình bày trong 126 trang (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án chia làm 7 phần:

- Đặt vấn đề: 2 trang
- Chương 1: Tổng quan tài liệu 33 trang
- Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 24 trang
- Chương 3: Kết quả nghiên cứu 34 trang
- Chương 4: Bàn luận 29 trang
- Kết luận: 2 trang
- Kiến nghị: 1 trang

Luận án gồm 32 bảng, 34 hình và 2 biểu đồ. Sử dụng 168 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt, tiếng Anh.

Phần phụ lục gồm: danh sách bệnh nhân, mẫu bệnh án nghiên cứu, bảng đánh giá chỉ số IQ, DQ.

Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. Khái niệm

Hội chứng Prader-Willi (PWS) là hội chứng bệnh di truyền biểu hiện trên nhiều hệ cơ quan, thay đổi qua các giai đoạn, biểu hiện bệnh lý phức tạp, với các triệu chứng chính như giảm trương lực cơ, bộ mặt bất thường, chậm phát triển tâm thần vận động, béo phì, tầm vóc thấp, thiếu năng sinh dục, hầu hết vô sinh.

Tỷ lệ mắc PWS trong quần thể ước tính 1/10.000 - 1/30.000. Tại Việt Nam chưa có thống kê tỷ lệ mắc PWS, tại bệnh viện nhi Trung ương, PWS được đưa vào chẩn đoán từ 2007, mỗi năm có 10 - 12 bệnh nhân mới nhập viện.

Hội chứng Prader-Willi là hội chứng bệnh di truyền theo cơ chế dấu ấn di truyền (genetic imprinting), nghĩa là sự biểu hiện của alen thuộc một locus gen phụ thuộc vào NST có chứa locus đó có nguồn gốc từ bố hay mẹ, bệnh biểu hiện khi mất chức năng đoạn NST 15q11-q13 nguồn gốc bố.

1.2. Đặc điểm lâm sàng

Đặc điểm lâm sàng thay đổi theo từng giai đoạn.

- Tiền sử thai nghén: giảm cử động thai do giảm trương lực cơ gây tăng tỷ lệ đẻ mổ.

- Giảm trương lực cơ: là triệu chứng nặng, điển hình của bệnh, có ở hầu hết bệnh nhân PWS. Giảm trương lực cơ khiến trẻ cần phải được hỗ trợ cho ăn ngay sau sinh. Viêm đường hô hấp kéo dài và tái diễn nhiều lần, là nguyên nhân gây tử vong ở giai đoạn sơ sinh và trẻ nhỏ. Trẻ đạt các mốc phát triển thể chất chậm hơn so với trẻ bình thường, gây tình trạng cong vẹo cột sống ở giai đoạn trẻ lớn.

- Phát triển tâm thần vận động (PTTTVD): 90% - 100% bệnh nhân PWS có chậm PTTTVD, chủ yếu ở mức độ nhẹ và trung bình.

- Ăn không kiểm soát và béo phì: là các triệu chứng nặng của bệnh, tăng dần theo tuổi, gây nhiều biến chứng ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống bệnh nhân và là nguyên nhân chính của tình trạng tử vong của những bệnh nhân PWS giai đoạn trẻ lớn và người trưởng thành.

- Bộ mặt bất thường đặc trưng PWS: sống mũi hẹp, trán cao hẹp, mắt hình quả hạnh, cằm nhỏ, môi trên mỏng, môi dưới trễ.

- Thiếu năng sinh dục biểu hiện thiếu sản cơ quan sinh dục ngoài, ỉn tinh hoàn, dương vật nhỏ ở trẻ trai, thiếu sản âm vật, môi lớn, môi bé ở trẻ gái, chậm dậy thì, hầu hết vô sinh.

- Tầm vóc thấp.

- Rối loạn giấc ngủ ở giai đoạn trẻ nhỏ.
- Rối loạn hành vi ở giai đoạn trẻ lớn.
- Cong vẹo cột sống.
- Da giảm sắc tố, tóc nhạt màu, bàn tay, bàn chân nhỏ.
- Tỷ lệ tử vong: trung bình 3 % mỗi năm.

1.3. Cơ chế di truyền của hội chứng Prader-Willi

Trên NST 15q11-q13 chứa 2,5Mb vật liệu di truyền liên quan đến cơ chế dấu ấn di truyền trong PWS và AS (Angelman Syndrome - hội chứng Angelman). Trên NST 15 nguồn gốc bố vị trí q11-q13 chứa một số gen gọi là vùng gen Prader-Willi (Prader-Willi Critical region - PWCR), mất sự hoạt động của các gen này gây PWS. Các gen thuộc vùng này hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền (genetic imprinting) - cơ chế di truyền đơn alen (monoallelic), nghĩa là sự biểu hiện hay không biểu hiện của alen thuộc locus gen đó phụ thuộc vào NST có chứa locus là nguồn bố hay mẹ. Ở người bình thường trên NST 15 nguồn gốc từ bố có vùng gen Prader-Willi hoạt động, ngược lại trên NST 15 nguồn gốc từ mẹ có vùng gen Prader-Willi bị bất hoạt và vùng gen Angelman hoạt động. Khi giảm phân tạo giao tử sẽ có sự khởi động (switched-on) và bất hoạt (switched-off) trạng thái hoạt động của các gen để đảm bảo người con sẽ nhận được vùng gen Prader-Willi hoạt động trên NST 15 có nguồn gốc từ bố và vùng gen Angelman hoạt động trên NST 15 có nguồn gốc từ mẹ.

Cơ chế của quy luật dấu ấn di truyền là sự methyl hóa DNA tại các base Cytosin. Các gen không bị methyl hóa sẽ ở trạng thái hoạt động, các gen bị methyl hóa sẽ bị bất hoạt.

Có 4 nhóm nguyên nhân gây hội chứng Prader-Willi:

- Mất đoạn trên NST số 15 nguồn gốc từ bố vị trí 15q11-q13, tỷ lệ 65% - 75%.
- Hai NST 15 đều có nguồn gốc từ mẹ (maternal uniparental disomy - mUPD), tỷ lệ 20% - 30%.

- Khiếm khuyết dấu ấn di truyền (imprinting defect - ID), tỷ lệ 1% - 5%.
- Chuyển đoạn tương hỗ giữa NST số 15 và NST khác gây mất đoạn NST số 15 vị trí 15q11-q13, tỷ lệ dưới 1%.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra biểu hiện lâm sàng của nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 nặng nề hơn nhóm bệnh nhân PWS do mUPD, ID.

1.4. Một số kỹ thuật di truyền có thể ứng dụng để chẩn đoán hội chứng Prader-Willi

Kỹ thuật di truyền tế bào: phân tích NST băng G, phát hiện các bất thường NST trong đó có chuyển đoạn NST 15 chứa PWCR với các NST khác gây mất đoạn NST 15q11-q13.

Kỹ thuật lai giữa di truyền tế bào và phân tử: kỹ thuật FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) phát hiện mất đoạn NST 15q11.2 là nhóm nguyên nhân chiếm tỷ lệ cao nhất gây PWS, chiếm tỷ lệ 70% - 75%.

Kỹ thuật di truyền phân tử:

+ aCHG (array Comparative Genome Hybridization) chẩn đoán PWS do mất đoạn NST 15q11-q13, chiếm tỷ lệ 70% -75%, ưu điểm so với kỹ thuật FISH là kỹ thuật này xác định được kích thước đoạn mất.

+ Southern Blot, MS-PCR (Methylation Specific Polymerase Chain Reaction) xác định bất thường methyl hóa chẩn đoán xác định > 99% PWS, tuy nhiên hai kỹ thuật này không phân biệt được nguyên nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 hay mUPD, ID.

+ MS-MLPA (Methylation Specific Multiplex Ligation dependent Probe Amplification) phát hiện bất thường methyl hóa và mất đoạn NST 15q11-q13, chẩn đoán xác định được > 99% các trường hợp PWS. Kỹ thuật này phân biệt được PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1, typ 2, mất đoạn không điển hình, đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC, tuy nhiên không phân biệt được các trường hợp mUPD và đột biến điểm vùng IC trong nhóm ID.

- + Phân tích microsatellite xác định các trường hợp mUPD.
- + Giải trình tự gen xác định các đột biến điểm vùng trung tâm đầu ấn di truyền IC.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu và cỡ mẫu

101 bệnh nhân gồm 66 nam, 35 nữ được chẩn đoán lâm sàng mắc hội chứng Prader-Willi tại Bệnh viện nhi trung ương trong thời gian 2009 - 2018, nghiên cứu tiền cứu và hồi cứu. Các bệnh nhân được tiến hành các xét nghiệm di truyền tế bào và phân tử để chẩn đoán PWS.

Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân: các bệnh nhân nghi ngờ mắc PWS trên lâm sàng được đánh giá theo bảng điểm của Holm và cộng sự (1993), kết quả như sau:

* Trẻ ≤ 3 tuổi: 5 điểm trở lên, trong đó phải có ít nhất 4 triệu chứng nặng.

* Trẻ > 3 tuổi: 8 điểm trở lên, trong đó phải có ít nhất 5 triệu chứng nặng.

7 triệu chứng nặng, 1 triệu chứng nặng = 1 điểm gồm: giảm trương lực cơ; cần phải hỗ trợ cho ăn; tăng cân nhanh hơn so với chiều cao trong giai đoạn 1 - 6 tuổi, béo phì trung tâm; các đặc điểm khuôn mặt điển hình của hội chứng Prader-Willi; thiếu sản sinh dục; chậm phát triển tâm thần vận động; chứng ăn không kiểm soát.

9 triệu chứng nhẹ, 1 triệu chứng nhẹ = 0,5 điểm gồm: giảm vận động trong thời kỳ bào thai; rối loạn hành vi; rối loạn giấc ngủ; tầm vóc thấp; giảm sắc tố da; bàn tay, bàn chân nhỏ; bất thường mắt; giảm tiết nước bọt; bất thường phát triển ngôn ngữ.

Tiêu chuẩn loại trừ: i/ các bệnh nhân không được đánh giá đầy đủ các triệu chứng lâm sàng và các xét nghiệm theo mẫu bệnh án; ii/ các bệnh nhân bỏ nghiên cứu.

Cỡ mẫu: hội chứng Prader-Willi là bệnh hiếm, chọn mẫu theo phương pháp thuận tiện, nghiên cứu một loạt các ca bệnh (case series study) đủ tiêu chuẩn nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân PWS

- Hồi bệnh và tiền sử: xác định thời điểm khởi phát bệnh, các dấu hiệu lâm sàng khi vào viện, thói quen ăn uống, đặc điểm tính cách, tiền sử thai sản.

- Khám lâm sàng:

+ Đánh giá phát triển thể chất: đo chiều cao, cân nặng, đánh giá chỉ số BMI theo tiêu chuẩn WHO 2006.

+ Đánh giá phát triển tâm thần vận động: trẻ dưới 6 tuổi đánh giá bằng chỉ số DQ, trẻ trên 6 tuổi đánh giá bằng chỉ số IQ.

+ Khám trương lực cơ, phản xạ gân xương.

+ Khám cơ quan sinh dục ngoài và đặc tính sinh dục phụ: trẻ nam phát hiện ản tinh hoàn, đo chiều dài dương vật, đánh giá bìu thiếu sản và nhạt màu, đo thể tích tinh hoàn; trẻ nữ phát hiện thiếu sản môi lớn, môi bé, âm vật.

+ Mô tả đặc điểm bộ mặt bất thường.

+ Khám chuyên khoa cột sống, chuyên khoa mắt.

2.2.2. Nghiên cứu đặc điểm di truyền của bệnh nhân PWS

Mẫu bệnh phẩm: 2ml máu tĩnh mạch có chống đông heparin để thực hiện kỹ thuật nhuộm sắc thể đồ và xét nghiệm lai tại chỗ huỳnh quang FISH; 2ml máu tĩnh mạch chống đông EDTA, tách chiết DNA thực hiện các xét nghiệm di truyền phân tử: MS-PCR và MS-MLPA.

Xét nghiệm phân tích NST, FISH, MS-MLPA được tiến hành tại khoa Di truyền và sinh học phân tử - Bệnh viện nhi trung ương, Xét nghiệm MS-PCR tiến hành tại Trung tâm di truyền y học - Trung tâm y học Aasn - Seoul - Hàn Quốc.

Kỹ thuật FISH trong chẩn đoán PWS sử dụng bộ kit với các đầu dò: đầu dò đánh dấu vào các gen *SNRPN*, họ gen *snoRNA* và gen *UBE3A* tại vị trí 15q11.2, tín hiệu lai màu đỏ (red - R). Đầu dò *PML* tại vị trí NST 15q24, tín hiệu lai màu xanh (green - G). Đầu dò vùng tâm (centromere), tín hiệu lai màu aqua (aqua - A). Bệnh nhân được chẩn

đoán PWS do mất đoạn NST 15q11.2 có kết quả FISH mang 1 tín hiệu màu đỏ: 1R2G2A, người bình thường kết quả FISH: 2R2G2A.

Kỹ thuật MS-PCR: phát hiện các gen đột biến bị methyl hóa, sử dụng các DNA bị biến đổi bằng muối bisulfite, sản phẩm PCR thu được sẽ được sử dụng phương pháp cắt enzyme giới hạn HhaI để phân biệt tình trạng methyl hóa. Bệnh nhân được chẩn đoán PWS có kết quả MS-PCR bất thường methyl hóa các gen vùng NST 15q11-q13. Với kỹ thuật MS-PCR, bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13, do hai NST 15 cùng nguồn gốc từ mẹ (mUPD) hay do khiếm khuyết di truyền (ID) đều cho kết quả hình ảnh điện di sản phẩm PCR như nhau: chỉ xuất hiện băng sản phẩm methyl hóa, do vậy không phân biệt được các nhóm bệnh nhân này với nhau.

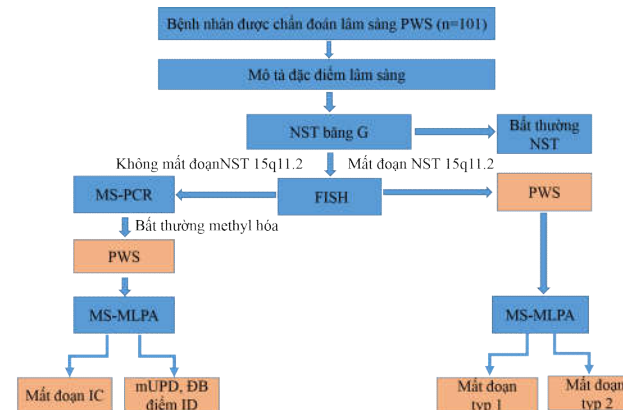
Kỹ thuật MS-MLPA: Sử dụng kit ME028-C1 của MRC-Holland bao gồm: 47 đầu dò trong đó 33 đầu dò đặc hiệu cho vùng NST15q11-q13 để khảo sát sự thay đổi số lượng bản sao. Trong 33 đầu dò này có 6 đầu dò có chứa các enzyme cắt giới hạn nhận diện điểm nhạy cảm với methyl hóa: enzyme HhaI để khảo sát quá trình methyl hóa. Bệnh nhân được chẩn đoán PWS có kết quả MS-MLPA thể hiện mất đoạn NST 15q11-q13 hoặc có bất thường methyl hóa. Kỹ thuật MS-MLPA phân biệt được mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1, typ 2, mất đoạn không điển hình kích thước rất nhỏ; xác định được đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC.

Trong nhóm bệnh nhân PWS do mUPD và khiếm khuyết dấu ấn di truyền do các đột biến điểm vùng trung tâm dấu ấn di truyền IC, kết quả MS-MLPA cho hình ảnh giống nhau thể hiện: không mất đoạn NST 15q11-q13 và có bất thường methyl hóa vùng NST 15q11-q13, do vậy không phân biệt được hai nhóm bệnh nhân này với nhau.

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành với sự tuân thủ về mặt y đức, được chấp thuận của hội đồng đạo đức của bệnh viện nhi trung ương, được sự đồng ý của bố mẹ hoặc người giám hộ của các bệnh nhi.

2.4. Sơ đồ nghiên cứu



Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

101 bệnh nhân: 35 nữ, 66 nam. Tuổi chẩn đoán trung bình: $30,18 \pm 0,39$ tháng, 66 bệnh nhân được chẩn đoán trước 2 tuổi (65,3%). 33 bệnh nhân đờ thường (32,7%), 68 bệnh nhân đờ mỡ (67,3%). 19 bệnh nhân cân nặng lúc sinh thấp (18,8%).

3.2. Đặc điểm lâm sàng

Bảng 3.6. Bảng tổng hợp các triệu chứng nặng theo tiêu chuẩn Holm

Triệu chứng nặng	Số lượng	Tỷ lệ %
Bộ mặt bất thường	98/101	97,0
Thiếu sản CQSD ngoài	95/101	94,1
Giảm trương lực cơ	93/101	92,1
Hỗ trợ ăn uống	93/101	92,1
Ham ăn uống	51/63	81,1
Chậm PTTTVĐ	36/46	78,3
Thừa cân béo phì	22/101	21,8

Bảng 3.7. Mô tả một số triệu chứng nặng theo nhóm tuổi

Nhóm tuổi	Bộ mặt bất thường	Thiếu sản CQSD ngoài	Giảm trương lực cơ	Thừa cân, béo phì	Tổng

< 2 tuổi	66 (100%)	65 (98,5%)	66 (100%)	0	66
2 – 6 tuổi	23 (100%)	20 (87%)	4 (17,4%)	12 (52,2%)	23
6 – 12 tuổi	9 (75%)	10 (83,3%)	1 (8,3%)	10 (83,3%)	12

Nhận xét: triệu chứng giảm trương lực cơ và thừa cân béo phì thay đổi nhiều theo từng giai đoạn.

Bảng 3.8. Bảng tổng hợp các triệu chứng nhẹ theo tiêu chuẩn Holm

Triệu chứng nhẹ	Số lượng	Tỷ lệ %
Giảm cử động thai	101/101	100
Rối loạn hành vi	35/35	100
Bàn tay, bàn chân nhỏ	93/101	92,1
Giảm sắc tố da	89/101	88,1
Chậm nói	28/35	80
Rối loạn giấc ngủ	66/101	65,3
Tâm vóc thấp	25/101	24,8
Bất thường mắt	15/101	14,9

Bảng 3.9. Tỷ lệ một số triệu chứng nhẹ theo nhóm tuổi

Nhóm tuổi	Rối loạn giấc ngủ	Tâm vóc thấp	Bất thường mắt	Tổng
< 2 tuổi	59 (89,4%)	7 (10,6%)	9 (13,6%)	66
2 – 6 tuổi	6 (26,1%)	8 (34,7%)	4 (17,4%)	23
6 – 12 tuổi	1 (8,3%)	10 (83,3%)	2 (16,6%)	12

Nhận xét: triệu chứng rối loạn giấc ngủ, tâm vóc thấp thay đổi theo từng giai đoạn.

3.2.1. Một số đặc điểm lâm sàng giai đoạn sơ sinh

Các triệu chứng của bệnh nhân ở giai đoạn sơ sinh hầu hết là các triệu chứng nặng, yêu cầu cần phải can thiệp điều trị tại cơ sở y tế. Trong nghiên cứu này, tại giai đoạn sơ sinh 98/101 (97%) có bộ mặt đặc trưng PWS; 93/101 (92,1%) có giảm trương lực cơ và cần hỗ trợ ăn uống; 95/101 (94,1%) có thiếu sản cơ quan sinh dục ngoài. Tỷ lệ bệnh nhân viêm đường hô hấp cần nhập viện sau sinh: 62/101 (61,4%).

3.2.2. Chỉ số khối cơ thể BMI (Body Mass Index)

Bảng 3.10. Chỉ số khối cơ thể lúc chẩn đoán

BMI	n	Tỷ lệ (%)
Thấp cân	60	58,8
Bình thường	19	18,6
Thừa cân	10	9,8
Béo phì	12	11,8
Tổng	101	100

Nhận xét: tại thời điểm chẩn đoán số lượng bệnh nhân thuộc nhóm thiếu cân chiếm tỷ lệ cao 58,8%; có 11,8% số bệnh nhân bị béo phì.

3.2.3. Chậm phát triển tâm thần vận động

34/89 bệnh nhân dưới 6 tuổi được đánh giá mức độ phát triển tâm thần vận động, các bệnh nhân chủ yếu thuộc nhóm chậm phát triển tâm thần vận động mức độ trung bình và nhẹ chiếm 58,9%. 12 bệnh nhân trên 6 tuổi được đánh giá mức độ phát triển tâm thần vận động bằng chỉ số IQ, kết quả các bệnh nhân chủ yếu thuộc nhóm chậm phát triển tâm thần vận động mức độ trung bình và nhẹ chiếm 83,3% (33,3% và 50%).

So sánh trung bình chỉ số IQ, DQ theo giới tính kết quả không có sự khác biệt về mức độ phát triển tâm thần vận động ở bệnh nhân nam và bệnh nhân nữ.

3.2.4. Thiếu sản cơ quan sinh dục ngoài

3.2.4.1. Ấn tinh hoàn ở bệnh nhân nam

Bảng 3.15. Tỷ lệ ấn tinh hoàn

Biến số	n	Tỷ lệ (%)
Ấn tinh hoàn 1 bên	11	16,7
Ấn tinh hoàn 2 bên	51	77,3
Không ấn tinh hoàn	4	6,1
Tổng	66	100

Nhận xét: trong 66 bệnh nhân nam chỉ có 4 bệnh nhân không bị ẩn tinh hoàn, số trẻ nam bị ẩn tinh hoàn 2 bên chiếm tỷ lệ cao 77,3%. 1 bệnh nhân nam có biểu hiện dậy thì sớm.

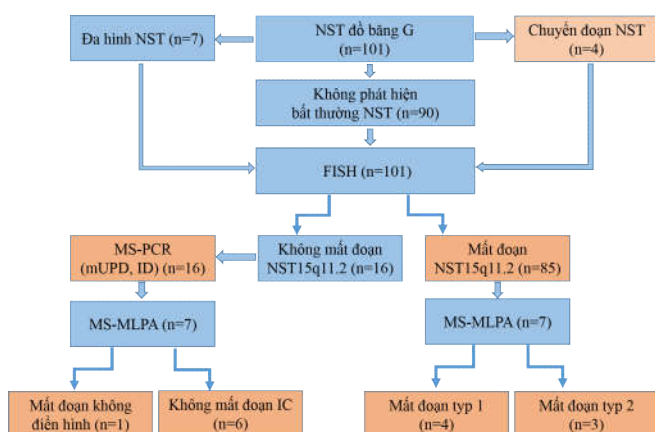
3.2.4.2. Thiếu sản cơ quan sinh dục ngoài ở bệnh nhân nữ

Trong 35 bệnh nhân nữ, có 29/35 (82,9%) bệnh nhân thiếu sản âm vật, môi lớn, môi bé.

3.2.6. Tỷ lệ tử vong

Trong 9 năm từ 2009 đến 2018, có 10 bệnh nhân trong nghiên cứu bị tử vong chiếm tỷ lệ 9,9%.

3.3. Các biến đổi di truyền



Hình 3.1. Tóm tắt quá trình thực hiện và kết quả các xét nghiệm di truyền

3.3.1. Kết quả phân tích nhiễm sắc thể đồ

Thực hiện kỹ thuật phân tích NST đồ băng G trên 101 bệnh nhân, kết quả như sau:

Bảng 3.17. Kết quả phân tích nhiễm sắc thể đồ (n=101)

Kết quả NST đồ	Số lượng	Tỷ lệ %
Chuyển đoạn	4	3,96
Đa hình NST	7	6,93
Không bất thường NST	90	89,11
Tổng	101	100

Nhận xét: 4 bệnh nhân mang chuyển đoạn giữa NST số 15 và 1 NST khác, chiếm tỷ lệ 3,96%. 8 bệnh nhân có đa hình NST, trong đó có 1 bệnh nhân mang chuyển đoạn t(15;22) và đa hình NST số 1 kèm theo.

4 bệnh nhân mang chuyển đoạn giữa NST số 15 được chỉ định làm nhiễm sắc thể đồ của bố mẹ, kết quả như sau:

Bảng 3.18. Kết quả phân tích NST đồ của 4 bệnh nhân mang chuyển đoạn NST 15 và NST đồ của bố mẹ bệnh nhân

Mã số bệnh nhân	Karyotyp bệnh nhân	Karyotyp bố bệnh nhân	Karyotyp mẹ bệnh nhân
45PWS	45,XY,der(10)t(10;15)(q26;q12),-15	46,XY	46,XX
126PWS	45,XY,der(22)t(15;22)(q12;p13),1qh+,-15	46,XY,1qh+	46,XX,1qh+
117PWS	46,XX,der(20)t(15;20)(q12;q12)pat	46,XY,t(15;20)(q12;q12)	46,XX
146PWS	45,X,der(X)t(X;15)(q28;q12),-15	46,XY	46,XX

Nhận xét: 1 bệnh nhân mã số 117PWS nhận bất thường NST từ bố, 3 bệnh nhân mang chuyển đoạn NST thuộc dạng đột biến mới.

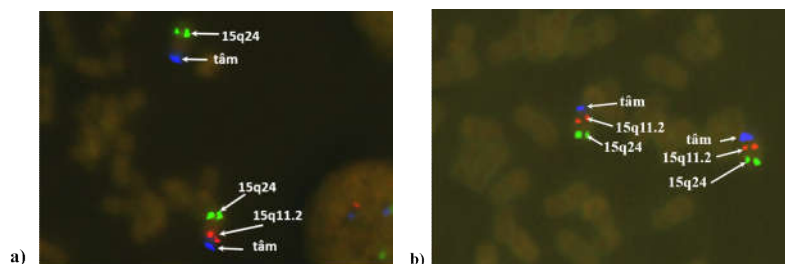
Bốn bệnh nhân này, đều có đầy đủ các đặc điểm lâm sàng điển hình của bệnh nhân mắc PWS.

3.3.2. Kết quả xét nghiệm lai tại chỗ huỳnh quang (FISH)

Bảng 3.19. Kết quả phân tích kỹ thuật FISH

Kết quả KT FISH	Số lượng (n = 101)	Tỷ lệ %
1R2G2A	81	80,20
1R2G1A	4	3,96
2R2G2A	16	15,84
Tổng	101	100

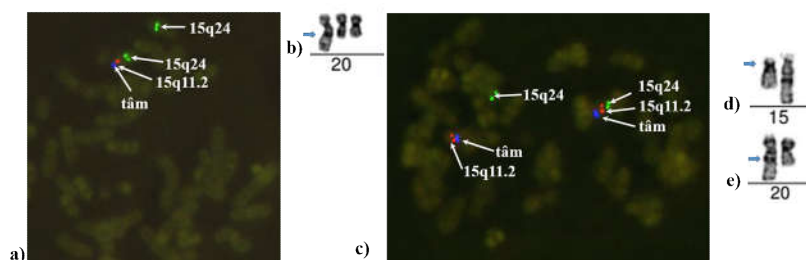
Có 81 bệnh nhân kết quả 1R2G2A: mất đoạn NST 15q11.2; 4 bệnh nhân có kết quả 1R2G1A: mất đoạn NST 15q11.2 và mất vùng tâm do chuyển đoạn NST 15 với 1 NST khác gây mất đoạn NST 15q11-q13; 16 bệnh nhân có kết quả: 2R2G2A: không mất đoạn NST 15q11.2.



Hình 3.7. Bệnh nhân mã số 103PWS
Kết quả mất đoạn NST 15q11.2

Hình 3.8. Bệnh nhân mã số 23PWS
Kết quả không mất đoạn NST 15q11.2

Nhận xét: a) Bệnh nhân mã số 103PWS, trên kết quả FISH là 1R2G2A, trong nghiên cứu có 81 bệnh nhân có mang hình ảnh kết quả FISH giống bệnh nhân mã số 103PWS, kết luận bệnh nhân mắc PWS do mất đoạn NST15q11.2. b) Bệnh nhân mã số 23PWS, trên kết quả FISH là 2R2G2A, trong nghiên cứu có 16 bệnh nhân mang hình ảnh kết quả FISH giống bệnh nhân mã số 23PWS, kết luận không mất đoạn 15q11.2.



Hình 3.11. Kết quả FISH, NST của bệnh nhân mã số 117PWS và bố bệnh nhân

Nhận xét: a), b) Hình ảnh FISH và NST bất thường tương ứng của bệnh nhân mã số 117PWS mang NST 20 chuyển đoạn der(20)t(15;20)(q12;q12), kết quả FISH là 1R2G1A thể hiện đoạn cuối nhánh dài NST 15 chuyển sang đoạn cuối nhánh dài NST 20,

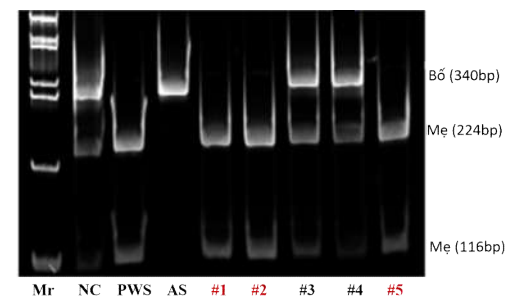
kết luận mất đoạn NST 15q11.2 và vùng tâm. Hình ảnh NST có trisomy một phần nhánh ngắn và tâm NST 20. 3 bệnh nhân có chuyển đoạn NST 15 và 1 NST khác mã số: 45PWS, 126PWS, 146PWS đều có kết quả FISH giống bệnh nhân này.

c), d), e) Hình ảnh FISH và NST bất thường tương ứng của bố bệnh nhân mã số 117PWS: kết quả FISH là 2R2G2A. Người bố này mang chuyển đoạn cân bằng giữa NST 15 và NST 20, hậu quả đưa con nhận NST der(20)t(15;20)(q12;q12) mang mất đoạn NST 15q11.2, mắc PWS.

Như vậy bằng kỹ thuật FISH đã xác định được 4 bệnh nhân mang chuyển đoạn NST 15 với NST khác có mất đoạn NST 15q11.2, chẩn đoán xác định bệnh nhân mắc PWS.

3.3.3. Kết quả phân tích tình trạng Methyl hóa với kỹ thuật chuỗi đặc hiệu methyl hóa (Methylation Specific Polymerase Chain Reaction-MS-PCR)

Trong nghiên cứu, 16 bệnh nhân không mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH được chỉ định làm MS-PCR, đều có hình ảnh sản phẩm điện di giống hình ảnh của các bệnh nhân 1, 2, 5 (hình 3.12), kết quả chẩn đoán xác định PWS nguyên nhân do mUPD hoặc ID.



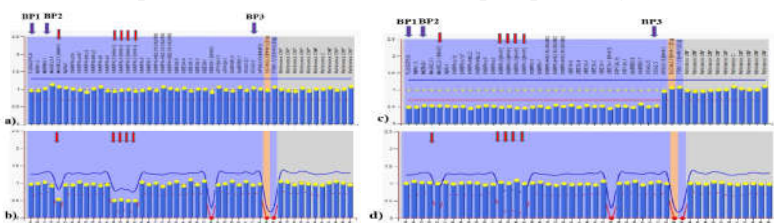
Hình 3.12. Hình ảnh điện di sản phẩm của kỹ thuật MS-PCR

1, 2, 5: các bệnh nhân có hình ảnh điện di giống mẫu chứng dương (PWS), được chẩn đoán mắc PWS

3.3.4. Kết quả phân tích kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò đặc hiệu methyl hóa (Methylation - Specific Multiplex Ligation - Dependent Probe Amplification - MS-MLPA)

Áp dụng kỹ thuật MS-MLPA cho 14 bệnh nhân mục đích xác định typ mất đoạn hoặc mất đoạn IC: 7/85 bệnh nhân đã được chẩn đoán PWS do mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH gồm 3 bệnh nhân mang chuyển đoạn NST 15 và 4 bệnh nhân lựa chọn ngẫu nhiên. 7/16 bệnh nhân đã được chẩn đoán PWS bằng kỹ thuật MS-PCR, lựa chọn ngẫu nhiên.

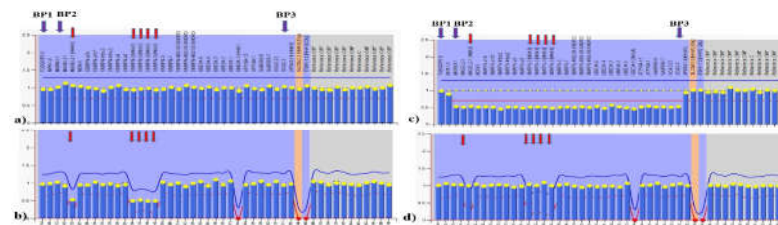
3.3.4.1. Kết quả xác định mất đoạn NST 15q11-q13 bằng kỹ thuật MS-MLPA



Hình 3.13. Kết quả MS-MLPA bệnh nhân mã số 86PWS mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1 (BP1-BP3)

Nhận xét: a, b là hình ảnh MS-MLPA của người bình thường: a) Đỉnh tín hiệu các gen vùng NST 15q11-q13 ở ngưỡng 1; b) Tại các vị trí đầu dò gắn enzyme HhaI (mũi tên màu đỏ), đỉnh tín hiệu ở ngưỡng 0,5; c, d là hình ảnh MS-MLPA của bệnh nhân: c) Hình ảnh mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1 (BP1-BP3), đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 0,5; d) Hình ảnh bất thường methyl hóa, tại các vị trí mũi tên màu đỏ đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 1.

Trong 7 bệnh nhân bị mất đoạn NST 15q11.2 có 4 bệnh nhân có hình ảnh MS-MLPA giống của bệnh nhân mã số 86PWS trong đó có 3 bệnh nhân mang chuyển đoạn NST 15, các bệnh nhân này được kết luận mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1.

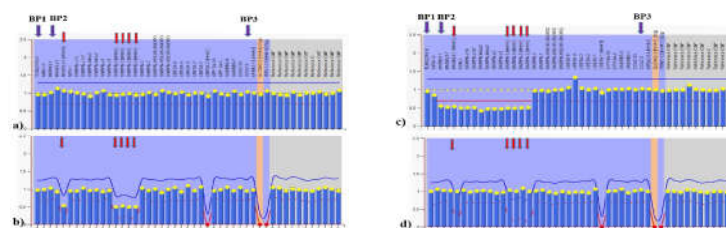


Hình 3.14. Kết quả MS-MLPA bệnh nhân mã số 141PWS mất đoạn NST 15q11-q13 typ 2 (BP2-BP3)

3 bệnh nhân có hình ảnh MS-MLPA giống bệnh nhân mã số 141PWS, các bệnh nhân được kết luận mất đoạn NST 15q11-q13 typ 2.

3.3.4.2. Kết quả xác định bất thường quá trình methyl hóa bằng kỹ thuật MS-MLPA

Trong 16 bệnh nhân được chẩn đoán mắc PWS với kỹ thuật MS-PCR thực hiện kỹ thuật MS-MLPA cho 7 bệnh nhân, mục đích để xác định những trường hợp do mất đoạn IC cần tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho những lần sinh sau. Kết quả: 1 bệnh nhân có mất đoạn NST15q11-q13 không điển hình và 6 bệnh nhân thuộc nhóm mUPD hoặc ID do đột biến điểm, không phát hiện bệnh nhân nào có mất đoạn IC.

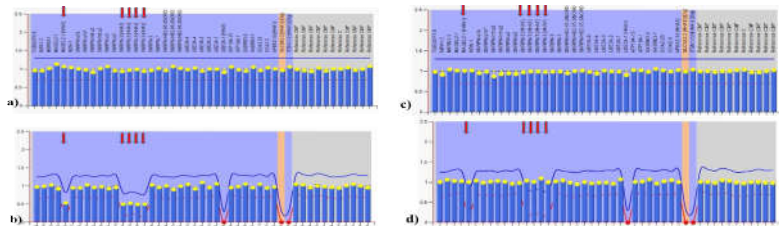


Hình 3.15. Kết quả MS-MLPA bệnh nhân mã số 133PWS mang mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình

Nhận xét: a), b) Hình ảnh MS-MLPA của người bình thường. c) Hình ảnh mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình, đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 0,5 bao gồm các gen: MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN tại vùng upstream (vùng trung tâm đầu ấn di truyền IC), intron 2, intron 5 và exon 3. Những vị trí mất của gen SNRPN nằm ngoài vùng đánh dấu

của đầu dò sử dụng trong kỹ thuật FISH, do vậy không phát hiện được mất đoạn ở trường hợp này. **d)** Hình ảnh bất thường methyl hóa.

6 bệnh nhân còn lại có hình ảnh MS-MLPA như hình 3.16, kết luận PWS do mUPD hoặc đột biến điểm vùng IC, thể hiện không mất đoạn NST 15q11-q13 và có bất thường methyl hóa vùng gen này.



Hình 3.16. Kết quả MS-MLPA của bệnh nhân mã số 33PWS

3.4. Mối liên hệ giữa biểu hiện lâm sàng và các biến đổi di truyền

So sánh biểu hiện lâm sàng theo biến đổi di truyền mất đoạn NST 15q11-q13 và mUPD, ID thấy có các điểm khác biệt như sau:

Ở nhóm mất đoạn NST 15q11-q14 tỷ lệ bệnh nhân có triệu chứng thừa cân, béo phì và giảm sắc tố da, tóc nhạt màu cao hơn ở nhóm do mUPD, ID, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Chỉ số IQ của nhóm bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13 thấp hơn so với nhóm mUPD, ID, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt giữa chỉ số DQ của hai nhóm di truyền.

Tuổi trung bình lúc chẩn đoán của nhóm bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13 thấp hơn so với nhóm do mUPD, ID, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Trung bình tuổi mẹ lúc sinh con PWS ở nhóm mUPD và ID cao hơn 3,64 tuổi so với trung bình tuổi mẹ ở nhóm do mất đoạn 15q11-q13, kết quả này có ý nghĩa thống kê với $t_{100} = -3.51$; $p < 0,05$.

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Tuổi chẩn đoán trung bình của bệnh nhân trong nghiên cứu là $30,18 \pm 0,39$ tháng. So với các nghiên cứu khác độ tuổi chẩn đoán này muộn hơn khá nhiều. Tỷ lệ bệnh nhân đẻ mổ và non tháng tương tự các nghiên cứu PWS khác trên thế giới. Tỷ lệ trẻ cân nặng thấp $< 2500g$ trong nghiên cứu là 18,8% tương ứng với tỷ lệ trẻ đẻ non 17,8%. Theo WHO, tỷ lệ trẻ đẻ non ở các nước châu Á là 15%, như vậy so với tỷ lệ đẻ non trung bình trong quần thể, tỷ lệ đẻ non trong nhóm bệnh nhân PWS trong nghiên cứu này cao hơn.

4.2. Đặc điểm lâm sàng

Đặc điểm lâm sàng của PWS thay đổi theo từng giai đoạn, nghiên cứu về các đặc điểm này có ý nghĩa trong thực hành lâm sàng chẩn đoán PWS, đặc biệt xác định chẩn đoán sớm ngay sau sinh, từ đó đưa ra được kế hoạch điều trị, quản lý bệnh nhân, hạn chế triệu chứng nặng, giảm biến chứng và nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân PWS. Mô tả đặc điểm lâm sàng trên 101 bệnh nhân PWS tại Việt Nam, hướng tới chẩn đoán PWS những bệnh nhân mang các đặc điểm lâm sàng theo từng giai đoạn như sau:

Giai đoạn trẻ < 2 tuổi:

Giảm trương lực cơ, biểu hiện tiền sử giảm cử động thai, tăng tỷ lệ đẻ mổ, cân nặng lúc sinh thấp. Trẻ phải hỗ trợ cho ăn ngay sau đẻ do không tự bú được. Tỷ lệ trẻ phải vào viện do viêm đường hô hấp kéo dài, tái phát nhiều lần. Rối loạn giấc ngủ, cơn ngừng thở khi ngủ. Bộ mặt bất thường với các nét đặc trưng của PWS như môi trên mỏng, môi dưới trễ, mắt hình quả hạnh, có thể có giảm sắc tố da, tóc nhạt màu. Thiếu sản cơ quan sinh dục ngoài, thể hiện trẻ trai có ản tinh hoàn một bên hoặc hai bên, trẻ gái có thiếu sản âm vật, môi lớn, môi bé.

Giai đoạn trẻ từ 2 đến 6 tuổi:

Tiền sử có giảm trương lực cơ. Chậm phát triển tâm thần vận động mức độ nhẹ hoặc trung bình. Bắt đầu có dấu hiệu ham muốn ăn uống,

thừa cân béo phì. Rối loạn hành vi với các đặc điểm tính cách ngang bướng, khó bảo. Bàn tay, bàn chân nhỏ rõ rệt so với trẻ cùng tuổi.

Giai đoạn trẻ > 6 tuổi:

Tiền sử có giảm trương lực cơ. Chậm PTTTVĐ thể hiện rõ, biểu hiện kém tập trung, khó khăn trong giao tiếp, giảm trí nhớ ngắn hạn và dài hạn, tính cách ngang bướng, khó bảo. Béo phì trung tâm, tầm vóc thấp. Đa số các trẻ có dậy thì muộn.

4.3. Biến đổi di truyền của bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi

4.3.1. Mất đoạn nhiễm sắc thể 15q11-q13

86/101 bệnh nhân PWS trong nghiên cứu do mất đoạn NST 15q11-q13, tỷ lệ 85,1% trong đó 85 bệnh nhân được xác định mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH, 1 bệnh nhân có mất đoạn NST 15 kích thước rất nhỏ, dạng không điển hình phát hiện bằng kỹ thuật MS-MLPA. So với y văn tỷ lệ bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 trung bình từ 70% - 75%, tỷ lệ nhóm bệnh nhân này trong nghiên cứu chúng tôi cao hơn.

Đối với trường hợp bệnh nhân mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình, kích thước đoạn mất rất nhỏ từ gen *MKRN3* đến exon 3 của gen *SNRPN*, bệnh nhân mang các đặc điểm lâm sàng điển hình của PWS như bộ mặt bất thường đặc trưng PWS, giảm trương lực cơ, ấn tinh hoàn, chậm PTTTVĐ, tuy nhiên một số các triệu chứng khác có chiều hướng nhẹ hơn như không thừa cân, không rối loạn hành vi, không giảm sắc tố da, tóc không nhạt màu, không có biểu hiện tự hại bản thân.

Nghiên cứu này phát hiện 4 bệnh nhân do chuyển đoạn NST 15, tỷ lệ 3,96%, trong đó có 1 trường hợp có nguồn gốc bố, gia đình đã được tư vấn nguy cơ sinh con PWS ở những lần sinh con sau.

4.3.3. Hai NST15 nguồn gốc mẹ (maternal uniparental disomy- mUPD)

Việc chẩn đoán xác định các bệnh nhân PWS do mUPD có ý nghĩa tiên lượng về biểu hiện lâm sàng và xác định nguy cơ sinh con tái mắc ở những lần sinh sau. So sánh tỷ lệ bệnh nhân PWS do mUPD, ID giữa các nghiên cứu thấy tỷ lệ bệnh nhân PWS do mUPD trong các nghiên cứu ở Châu

Âu và Hoa Kỳ cao hơn rõ rệt so với các nghiên cứu ở châu Á trong đó có nghiên cứu này.

4.3.4. Khiếm khuyết dấu ấn di truyền (imprinting defect- ID)

Khiếm khuyết dấu ấn di truyền là nguyên nhân của 1-3% các trường hợp mắc PWS, trong đó 15% - 20% là do đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC (imprinting center), 80% - 85% các trường hợp còn lại do các đột biến điểm hoặc ngoại đột biến (epimutation). Các trường hợp bệnh nhân mang đột biến mất đoạn IC hầu hết có nguồn gốc bố, nguy cơ sinh con mắc PWS trong gia đình đó là 50%, điều này có ý nghĩa quan trọng trong tư vấn di truyền, chỉ định chẩn đoán trước sinh những lần sinh con sau. Mất đoạn IC có thể phát hiện được bằng KT MS-MLPA.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và biến đổi di truyền của 101 bệnh nhân được chẩn đoán mắc PWS tại bệnh viện Nhi Trung Ương từ 2009 đến 2018, chúng tôi có một số kết luận sau:

1. Mô tả đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân PWS

Trong tổng số 101 bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng mắc PWS có 66 nam, 35 nữ. Tuổi chẩn đoán trung bình $30,18 \pm 0,39$ tháng. Tất cả các bệnh nhân đều có giảm trương lực cơ với tiền sử giảm cử động thai. 97 % có bộ mặt bất thường đặc trưng PWS, 94,1 % có thiếu sản CQSD ngoài. 61,4% phải nhập viện ngay sau sinh chủ yếu do viêm đường hô hấp. Tỷ lệ tử vong 9,9%.

Một số đặc điểm lâm sàng thay đổi theo từng giai đoạn phát triển của bệnh nhân PWS, cụ thể như sau:

- Nhóm bệnh nhân < 2 tuổi: 100% có giảm trương lực cơ, 89,4% có rối loạn giấc ngủ, 10,6% bệnh nhân có chiều cao thấp so với tuổi, không có bệnh nhân nào có triệu chứng thừa cân béo phì.

- Nhóm bệnh nhân từ 2 - 6 tuổi: tất cả bệnh nhân có rối loạn hành vi, 17,4% có giảm trương lực cơ, 52,2% có thừa cân béo phì, tỷ lệ rối loạn giấc ngủ (26,1%), tỷ lệ bệnh nhân có tầm vóc thấp 34,7%. 17,4% có cong vẹo cột sống.

- Nhóm bệnh nhân từ 6 - 12 tuổi: tỷ lệ giảm trương lực cơ và rối loạn giấc ngủ giảm thấp (8,3%), tỷ lệ thừa cân, béo phì, tầm vóc thấp tăng cao (83,3%), tỷ lệ cong vẹo cột sống tăng (25%), tất cả các bệnh nhân đều có rối loạn hành vi.

Sơ sánh đặc điểm của hai nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 và mUPD, ID thấy một số triệu chứng khác biệt như sau:

- Tỷ lệ bệnh nhân có thừa cân béo phì, giảm sắc tố da, tóc nhạt màu ở nhóm mất đoạn NST 15q11-q13 cao hơn nhóm mUPD, ID.

- Chỉ số IQ trung bình của nhóm bệnh nhân do mUPD, ID cao hơn của nhóm bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13.

- Trung bình tuổi mẹ của nhóm bệnh nhân mUPD, ID cao hơn của nhóm mất đoạn NST15q11-q13.

2. Xác định các biến đổi di truyền tế bào và phân tử của bệnh nhân PWS

Bằng các kỹ thuật xét nghiệm di truyền áp dụng trong nghiên cứu này bao gồm: phân tích NST đồ băng G, FISH, MS-PCR, MS-MLPA, 101 bệnh nhân được chẩn đoán xác định PWS với các biến đổi di truyền như sau:

- 86/101 (85,1%) thuộc nhóm mất đoạn NST 15q11-q13, trong đó 4 bệnh nhân có mang chuyển đoạn NST 15 với 1 NST khác, 1 bệnh nhân mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình.

- 15/101 (14,9%) thuộc nhóm mUPD, ID.

KIẾN NGHỊ

Lâm sàng: hướng tới chẩn đoán PWS đối với những bệnh nhân mang các đặc điểm lâm sàng đặc trưng cho từng nhóm tuổi.

Kỹ thuật xét nghiệm: khuyến cáo hai lựa chọn chỉ định xét nghiệm di truyền để chẩn đoán xác định PWS như sau:

Cách 1: chỉ định kỹ thuật MS-MLPA, chẩn đoán được hầu hết (> 99%) các trường hợp mắc PWS, xác định được các trường hợp mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1, typ 2, mất đoạn không điển hình, mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC.

Cách 2:

Bước 1: chỉ định kỹ thuật FISH, xác định được hơn 70% các bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11.2. Bước 2: chỉ định kỹ thuật MS-MLPA xác định những trường hợp PWS do mUPD, ID, mất đoạn nhỏ không điển hình.

Tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh: đối với những gia đình có nguyện vọng sinh con lần tiếp theo, cần tư vấn di truyền và chỉ định chẩn đoán trước sinh những trường hợp: mất đoạn NST 15q11-q13 do chuyển đoạn NST 15 có nguồn gốc từ bố; đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC.

ĐÓNG GÓP MỚI

Nghiên cứu tương đối toàn diện và hệ thống về hội chứng Prader-Willi:

- **Lâm sàng:** mô tả được các đặc điểm lâm sàng của bệnh, nhận định được sự khác nhau của các đặc điểm lâm sàng theo lứa tuổi, từ đó định hướng cho các bác sỹ lâm sàng chỉ định các xét nghiệm di truyền chẩn đoán xác định PWS, đặc biệt chẩn đoán sớm trước 6 tháng, nhằm đưa ra được kế hoạch quản lý điều trị bệnh nhân, hạn chế triệu chứng nặng, giảm biến chứng và nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân PWS.

- **Kỹ thuật xét nghiệm:** áp dụng thành công các kỹ thuật xét nghiệm di truyền chẩn đoán xác định PWS bao gồm: KT phân tích NST đồ băng G, KT FISH, KT MS-PCR, KT MS-MLPA. Trong đó kỹ thuật MS-MLPA là kỹ thuật tiên tiến ưu việt nhất hiện nay, lần đầu tiên áp dụng tại Việt Nam để chẩn đoán PWS. Kỹ thuật này chẩn đoán được > 99% các trường hợp PWS, phân biệt được các nhóm nguyên nhân di truyền mất đoạn NST 15q11-q13: typ1, typ2, mất đoạn không điển hình, mất đoạn IC; mUPD và ID.

- Phát hiện 1 trường hợp bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình, làm phong phú hơn những hiểu biết về các nguyên nhân gây PWS tại Việt Nam.

- **Tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh:** các trường hợp gia đình bệnh nhân PWS có nguy cơ cao sinh con mắc PWS ở những lần sinh con sau là các trường hợp mang chuyển đoạn NST 15 nguồn gốc bố và các trường hợp do đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC.

MINISTRY OF EDUCATION & TRAINING MINISTRY OF HEALTH
HANOI MEDICAL UNIVERSITY



AN THUY LAN

**STUDY OF CLINICAL AND GENETIC FEATURES OF
PRADER-WILLI SYNDROME**

Speciality : Medical Biology and Genetics
Code : 62.72.01.11

SUMMARY OF MEDICAL PhD THESIS

HA NOI - 2019

**THE STUDY HAS BEEN COMPLETED AT
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

Scientific Supervisors:

A/Prof. Phan Thi Hoan

The thesis has been defended to the council for evaluating PhD
thesis at the Hanoi Medical University

At hour date month 2019

The thesis can be found at:

- Vietnam National Library
- Library of Hanoi Medical University

INTRODUCTION

1. Imperativeness of the study:

Prader-Willi syndrome (Prader-Willi Syndrome - PWS) is a genetic disease syndrome caused by the inactivation of the function of genes on the long arm of the chromosome 15 at band q11-q13 origin from father. The incidence of PWS in an estimated population of 1/10,000 - 1/30,000, there are about 350,000 - 400,000 patients diagnosed with PWS in the world.

Common symptoms in this syndrome are: reduced fetal movement, hypotonia, obesity, mental retardation, short stature, small limbs, hypogonadism, facial dysmorphism and most are infertile.

The cause of PWS due to loss of function of genes on chromosome 15q11-q13 originated from father. These genes work according to genetic imprinting - monoallelic, a complex genetic mechanism. These genes activate on paternal chromosome 15 only, unactivate on maternal chromosome 15.

Diagnosis of PWS is based on clinical diagnostic criteria and is diagnosed by genetic testings.

In Vietnam, the National Children's Hospital (NCH) has been diagnosed and managed patients with PWS since 2007. The disease is caused by the unactivity genes of the chromosome 15q11-q13, the complex genetics mechanism of imprinting activity, patients with severe symptoms, diverse clinical manifestations in many specialties, most patients are diagnosed late. Therefore, a study of PWS's genetic and clinical characteristics has led the clinicians to designate genetic testings to confirm PWS early, to treat and manage patients, to improve severe symptoms, reduce complications, improve the quality of life for PWS patients.

2. Aim of study:

- Describe the clinical characteristics in the patients with Prader-Willi syndrome.

- Determination of cytogenetic and molecular genetic in the patients with Prader-Willi syndrome.

3. Thesis contributions for science and clinical practice

Clinical: PWS syndrome is a rare disease, the disease has a diverse, severe manifestation, symptoms in many organs, varying with each stage of the child's development. The disease follows the genetic marker mechanism, requiring specific diagnostic genetic tests.

Study on PWS clinical features provides the clinical diagnostic criteria for PWS, especially signs in the neonatal period for early diagnosis, treatment and management of patients on time.

In this study, we describe the clinical characteristics of PWS patients, commenting on the clinical characteristics of each stage of the child's development, which are indications for clinicians towards diagnosis determine PWS. The important goal is to diagnose the disease in the early stages especially before 6 months, to recommend treatment for growth hormone for patients on time.

Study on cytogenetic and molecular genetic in the patients with PWS have a role to select genetic tests to confirm the diagnosis. Reconciliation of genetic changes and clinical signs of disease prognosis, effectiveness of treatment. Identify cases of PWS patients' families who are at risk of having PWS in next births, genetic counseling and prescribe prenatal diagnosis for next births of those families.

Genetic testing: we use cytogenetic and molecular genetic testing techniques in the study: G banding chromosomal analysis, Fluorescence in situ hybridization (FISH), methylation specific chain reaction (MS-PCR) and methylation specific multiplex ligation dependent probe amplification (MS-MLPA). With these techniques, the diagnosis identifies more than 99% of PWS cases due to deletion paternal chromosome 15q11-q13, maternal Uniparental Disomy chromosome 15 (mUPD), imprinting defect (ID). The study classified a number of cases of deletion chromosome 15q11-q13 in type 1, type 2, rare atypical

deletion; Identify a case of a genetic PWS patient due to translocation chromosome 15 with another chromosome origin from the father.

Thus, the significance of describing clinical characteristics, identifying genetic changes through the successful application of cytogenetic genetic and molecular testing to diagnose PWS. The purpose of this study to diagnose PWS early, selection of genetic techniques suitable for diagnostic purposes or genetic counseling for next births in the fastest and most cost-effective way.

4. Structure of thesis:

Thesis has 126 pages (without references and appendix) including 7 parts:

- + Introduction: 2 pages
- + Chapter 1: overview 33 pages
- + Chapter 2: participants, materials and methods 24 pages
- + Chapter 3: results 34 pages
- + Chapter 4: discussion 29 pages
- + Conclusion: 2 pages
- + Recommendations and further studies in the future: 1 page

The thesis contains 32 tables, 34 figures and 2 graphs. References contain 168 papers in English and Vietnamese and several websites.

Appendix contains: the list of patients and questionnaire, sample of medical records, table of IQ and DQ assessment.

Chapter 1: OVERVIEW

1.1. Introduction

Prader-Willi syndrome (PWS) is a genetic disease syndrome that manifests itself on many organ systems, changes through stages, complex pathological manifestations, with major symptoms such as hypotonia and poor suck, developmental delay mental movement, obesity, low stature, hypogonadism, adult infertility.

The incidence of PWS in the population is estimated at 1/10,000 - 1/30,000. In Vietnam, there is no statistic of PWS incidence, at the

National Children's Hospital, PWS has been diagnosed since 2007, every year there are 10 -12 new patients.

Prader-Willi syndrome is an inherited disease syndrome based on genetic imprinting, meaning that the expression of an allele belonging to a chromosome-dependent locus that contains that locus originates from a parent, Diseases manifested when loss of chromosome function 15q11-q13 originating from father.

1.2. Clinical manifestations

Clinical characteristics change in each stage.

- History of pregnancy: reduction in fetal movement, increased incidence of caesarean section due to hypotonia.

- Hypotonia: is a severe and typical symptom of disease, occurring in most PWS patients. Hypotonia with difficulty feeding (0-9 months), needs assistance with feeding either through feeding tubes, prolonged and recurrent respiratory infections, which are the cause of death in newborn and young children. Children achieve physical developmental milestones slower than normal children, causing scoliosis in older children.

- Development delay: 90%-100% of PWS patients have developmental delay, mainly in mild and moderate levels.

- Incontinence and obesity: are severe symptoms of disease, increasing with age, causing many complications affecting the quality of life of patients and is the main cause of death of PWS patients children and adults

- Dysmorphic face: narrow nasal bridge, narrow forehead, almond-shaped eyes, small chin, thin upper lip, lower lip late.

- Sexual dysfunction manifests as a dysplasia of the external genitalia, testicular hiding, small penis in boys, dysplasia, large lips, baby lips, slow puberty, most infertility.

- Short stature.

- Sleep disorders at a young stage.

- Behavioral problems at the age of children.

- Curved scoliosis.
- Skin with reduced pigmentation, pale hair, small hands and feet.
- Mortality rate: average 3% per year.

1.3. Genetic of Prader-Willi Syndrome

On the 15q11-q13 contains 2.5 Mb of genetic material related to Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. Genes in this region act as a genetic imprinting mechanism, a monoallelic mechanism, meaning that the expression or non-expression of the allele of the gene locus depends on the chromosome containing locus is the source of a parent. The mechanism of genetic imprinting is DNA methylation at Cytosin bases. Non-methylated genes will be in active state, the methylated gene will be inactivated.

On the paternal chromosome 15q11-q13 contains a number of genes called the Prader-Willi genome (Prader-Willi Critical region - PWCR), losing the activity of these genes causing PWS.

There are 4 groups of causes of Prader-Willi syndrome:

- Deletion paternal chromosome 15q11-q13, rate 65% - 75%.
- Maternal uniparental disomy - mUPD, the rate of 20% - 30%.
- Imprinting Defect - ID, the rate of 1% - 5%.
- Translocation chromosome 15 and other chromosomes causing deletion of chromosome 15q11-q13, the rate is less than 1%.

1.4. Diagnostic genetic testing for Prader-Willi Syndrome

Cytogenetic technique: G banding chromosome analysis to detect abnormal chromosome including translocation chromosome 15 caused by deletions chromosome 15 containing PWCR on 15q11-q13.

FISH technique detects deletion 15q11.2 is the group that accounts for the highest proportion causing PWS, accounting for 70% - 75%.

Molecular genetic engineering:

+ aCHG diagnoses PWS due to deletion 15q11-q13, accounting for 70% -75%, the advantage over the FISH technique is that this technique determines the size of deletion.

+ Southern Blot, MS-PCR identifies abnormal methylation of diagnosis to determine > 99% PWS, but these two techniques cannot distinguish the cause of PWS due to deletion 15q11-q13 or mUPD, ID.

+ MS-MLPA detects methylation abnormalities and deletion 15q11-q13, diagnosis most cases of PWS. This technique distinguishes PWS due to deletion 15q11-q13 type 1, type 2, atypical deletion, deletion IC, but does not distinguish between mUPD and IC point mutations in ID group.

+ Analyzing microsatellite to identify mUPD cases.

+ Sequencing to identify IC point mutations.

Chapter 2: PARTICIPANTS AND METHODS

2.1. Participants

101 patients were clinically diagnosed with Prader-Willi syndrome at the National Children's Hospital during 2009-2018, prospective and retrospective studies.

Criteria for selection of patients: clinically suspected patients with PWS were assessed according to the transcripts of Holm et al. (1993), the results are as follows:

* Children \leq 3 years old: 5 points or more, of which there must be at least 4 severe symptoms.

* Children > 3 years: 8 points or more, of which there must be at least 5 severe symptoms.

Exclusion criteria: i / patients are not adequately evaluated for clinical symptoms and clinical samples; ii / patients quit the study.

Sample size: Prader-Willi syndrome is a rare disease with a low incidence of disease. Therefore, it is recommended to select samples by convenient method based on patients with enough selection criteria and exclusion criteria. To study case series.

2.2. Method

2.2.1. Clinical manifestations

- Ask about disease and history: determine the time of onset, clinical signs on admission, eating habits, personality traits, prehistoric history.

- Clinical examination:

- + Assessing physical development: measuring height, weight, assessing BMI according to WHO 2006 standards.
- + Assessing mental development and movement: children under 6 years of age are assessed by DQ index, children over 6 years old are assessed by IQ index.
- + Examining muscle tone, tendon reflex.
- + External genital examination and secondary sexual characteristics: male children detect hidden testes, measure penis length, assess dysplasia and pale color, measure testicular volume; Young women find a major obstetric, baby lips, clitoris.
- + Describe unusual facial features (dymorphism)
- + Examining the spine and specialized eye.

2.2.2. Genetic characteristics

Samples: 2ml peripheral blood with anti-coagulation heparin to perform chromosomal analysis and FISH; 2ml EDTA anticoagulant blood, DNA extraction performed molecular genetic tests: MS-PCR and MS-MLPA.

The analysis of chromosomes, FISH, MS-MLPA was conducted at the Department of Human Genetics - National Children's Hospital.

FISH technique in PWS diagnosis uses a kit with probes: the transducer marks *SNRPN*, *snoRNA* and *UBE3A* genes at position 15q11.2, red signal (red - R). The *PML* probe at chromosome 15q24, the blue hybrid signal (green - G). Centromere probe, the signal crosses aqua (aqua - A). Patients diagnosed with PWS due to loss of chromatogram 15q11-q13 have FISH results with 1 red signal.

MS-MLPA technique: Use MS-MLPA commercial ME028-C1 kit from MRC-Holland. This kit consists of 47 transducers in which 33 zone specific NST15q11-q13 transducers are used to investigate the number of copies. In these 33 transducers, there are 6 transducers containing limited enzymes that identify the methylation-sensitive point: HhaI enzyme, so after only the methylation chain is amplified

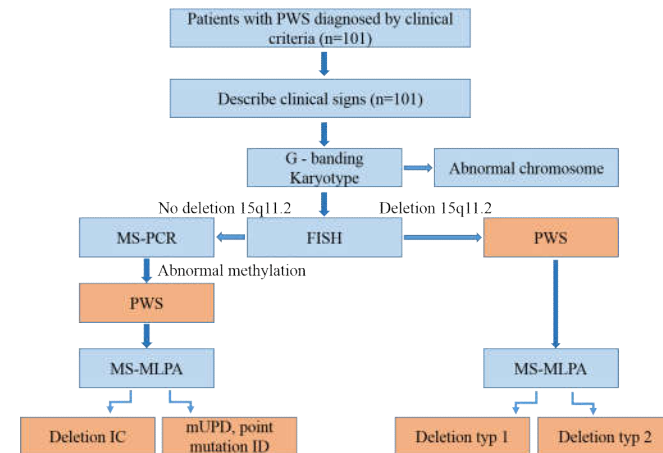
and signaled. Patients diagnosed with PWS by MS-MLPA with results show a loss of chromosome 15q11-q13 and methylation abnormalities or methylation abnormalities only.

MS-PCR assay conducted at the Medical Genetics Center - Seoul - Korea Aasn Medical Center: detects methylated mutated genes, using modified DNA with bisulfite salt. Patients diagnosed with PWS have MS-PCR result shows methylation abnormalities on 15q11-q13 region.

2.3. Ethical approval

Protocol was approved by Ethical committee of NCH. Informed consent was obtained from all participants.

2.4. Study diagram



Chapter 3: RESULTS

3.1. General characteristics

101 patients: 35 girls, 66 boys, the male / female ratio is 1.88. Average age of diagnosis: 30.18 ± 0.39 months, 66 patients were diagnosed before 2 years old (65.3%). 33 patients gave birth normally

(32.7%), 68 patients delivered caesarean section (67.3%). 19 patients had low birth weight (18.8%).

3.2. Clinical characteristics

Table 3.6. Summary table of severe Holm symptoms

Major signs	Number	%
Dysmorphic face	98/101	97,0
Hypogonadism	95/101	94,1
Hypotonia	93/101	92,1
Poor suck	93/101	92,1
Hypophagia	51/63	81,1
Developmental delay	36/46	78,3
Overweight and obesity	22/101	21,8

Table 3.7. Describe some severe symptoms by age group

Age group	Dysmorphic face	Hypogonadism	Hypotonia	Obesity	Total
< 2 y.o	66 (100%)	65 (98,5%)	66 (100%)	0	66
2 – 6 y.o	23 (100%)	20 (87%)	4 (17,4%)	12 (52,2%)	23
6 – 12 y.o	9 (75%)	10 (83,3%)	1 (8,3%)	10 (83,3%)	12

Comments: obesity and overweight symptoms change with each stage.

Table 3.8. Holm's summary list of mild symptoms

Minor signs	Number	%
Decreased fetal movement	101/101	100
Behavior problems	35/35	100
Small hand/ feet	93/101	92,1
Hypopigmentation	89/101	88,1
Articulation defects	28/35	80
Sleep disturbance	66/101	65,3
Short stature	25/101	24,8
Eye abnormalities	15/101	14,9

Table 3.9. Describe some mild symptoms by age group

Age group	Sleep disturbance	Short stature	Eye abnormalities	Total
< 2 y.o	66 (100%)	65 (98,5%)	66 (100%)	66
2 – 6 y.o	23 (100%)	20 (87%)	4 (17,4%)	23
6 – 12 y.o	9 (75%)	10 (83,3%)	1 (8,3%)	12

< 2 y.o	59 (89,4%)	7 (10,6%)	9 (13,6%)	66
2 – 6 y.o	6 (26,1%)	8 (34,7%)	4 (17,4%)	23
6 – 12 y.o	1 (8,3%)	10 (83,3%)	2 (16,6%)	12

3.2.1. Some clinical characteristics of the neonatal period

Symptoms in the neonatal period are mostly severe symptoms, requiring treatment in a medical facility. In this study, at the newborn stage 98/101 (97%) had a typical PWS face; 93/101 (92.1%) have hypotonia and need to support eating; 95/101 (94.1%) has a deficiency of external genitalia. Percentage of patients with respiratory infections requiring hospitalization after delivery: 62/101 (61.4%).

3.2.2. Body Mass Index (BMI)

Table 3.10. Body mass index at diagnosis

BMI	n	Tỷ lệ (%)
Thinness	60	58,8
Normal	19	18,6
Overweight	10	9,8
Obesity	12	11,8
Total	101	100

Comment: at the time of diagnosis, the number of underweight patients accounted for 58.8%; 11.8% of patients are obese.

Investigation of the association between overweight and obesity symptoms by age group: at the time of diagnosis, the obesity rate of patients ≥ 3 years is higher in patients < 3 years old. The difference is statistically significant ($p < 0.001$).

3.2.3. Developmental delay

34/89 patients under 6 years of age were assessed for the level of psychomotor development, the patients mainly belonged to the moderate and mild mental retardation group accounted for 58.9%.

12 patients over 6 years of age were assessed for mental development with IQ, resulting in moderate and mild mental retardation in patients with 83.3% (33.3% and 50%).

Comparing the average IQ and DQ index by sex, there was no difference in the level of motor mental development in male and female patients.

3.2.4. Hypogonadism

3.2.4.1. Cryptorchism

Table 3.15. The ratio of cryptorchism

Variables	n	%
Unilateral cryptorchism	11	16,7
Bilateral cryptorchism	51	77,3
None cryptorchism	4	6,1
Total	66	100

Comment: in 66 male patients, only 4 patients did not have testicular hiding, the rate of male 2-sided testicular male children accounted for 77.3%. 1 male patient showed early puberty.

3.2.4.2. Hypogonadism in female

In 35 female patients, there were 29/35 (82.9%) patients who suffered from clitoris, large lips, and small lips.

3.2.6. Mortality rate

In 9 years from 2009 to 2018, there were 10 deaths in the study, accounting for 9.9%.

3.3. Genetic features

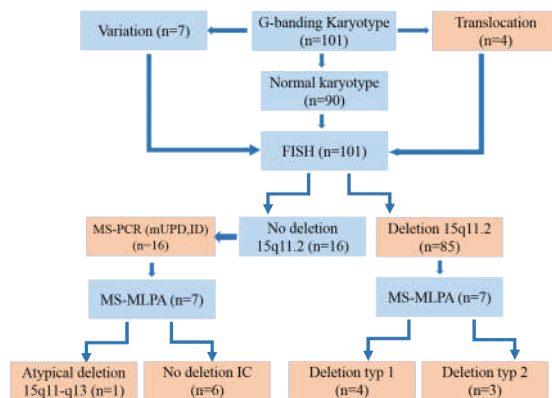


Figure 3.1. Summary of the process of performing genetic tests

3.3.1. Results of chromosomal analysis

Implementation of G-band chromosomal analysis technique on 101 patients, the results are as follows:

Table 3.17. Results of chromosome analysis (n = 101)

Karyotype	Number	%
Translocation	4	3,96
Variation	7	6,93
Normal	90	89,11
Total	101	100

Comment: 4 patients have translocation, accounting for 3.96%. 8 patients had variable chromosome, including 1 patient with t(15; 22) and variation of chromosomal 1. 4 patients carrying translocation chromosome 15 are indicated to analyse parental chromosomes, the results are as follows:

Table 3.18. Results of chromosomal analysis of 4 patients with 15 chromosome transitions and chromosomes of patient's parents

Code	Karyotype	Father's Karyotype	Mother's Karyotype
45PWS	45,XY,der(10)t(10;15)(q26;q12),-15	46,XY	46,XX
126PWS	45,XY,der(22)t(15;22)(q12;p13),1qh+,-15	46,XY,1qh+	46,XX,1qh+
117PWS	46,XX,der(20)t(15;20)(q12;q12)pat	46,XY,t(15;20)(q12;q12)	46,XX
146PWS	45,X,der(X)t(X;15)(q28;q12),-15	46,XY	46,XX

Comment: 1 patient code 117PWS received abnormal chromosome from father, 3 patients have *de novo* mutation.

These four patients all have the typical clinical characteristics of patients with PWS.

3.3.2. Result of Fluorescence in Situ Hybridization

Table 3.19. FISH results

FISH analysis	Number (n = 101)	%
1R2G2A	81	80,20

1R2G1A	4	3,96
2R2G2A	16	15,84
Total	101	100

1R2G2A (1 red signal, 2 green signals, 2 aqua signals): deletion 15q11-q13. 1R2G1A (1 red signal, 2 green signals, 1 aqua signal): deletion 15q11.2 and centromere. 2R2G2A (2 red signals, 2 green signals, 2 aqua signals): no deletion 15q11.2.

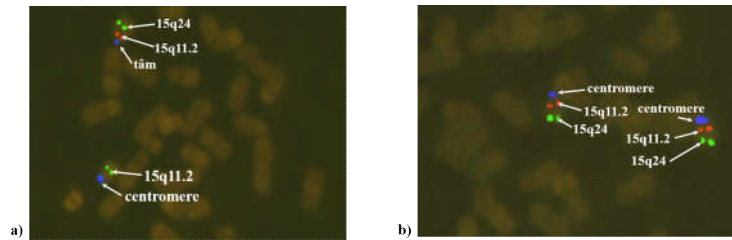


Figure 3.7. Patient code 103PWS deletion 15q11.2

Figure 3.8. Patient code 23PWS Nodeltion 15q11.2

Comment: a) 103PWS patient code, on the FISH result is 1R2G2A: conclusion of PWS due to deletion 15q11-q13. In the study, 81 patients had the FISH result image similar to 103PWS patients. b) Patient code 23PWS, on the FISH result is 2R2G2A: the conclusion does not lose paragraph 15q11.2. In the study, there were 16 patients with FISH-like images of patients with code 23PWS.

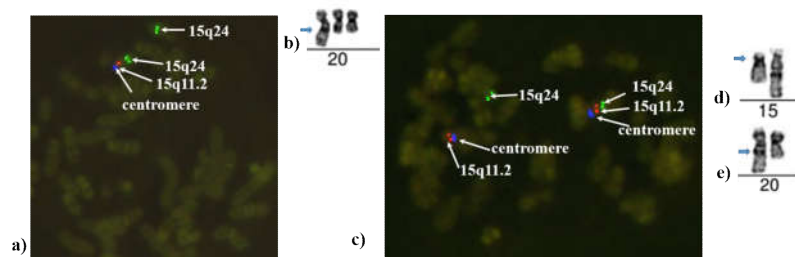


Figure 3.11. FISH results of patient code 117PWS and patient's father

Comment: a) FISH image of patient code 117PWS: bring chromosome 20 to convert $\text{der}(20) \text{t}(15; 20)(q12; q12)$, FISH result is 1R2G1A, conclude deletion 15q11.2 and region of mind. 3 patients with 15 chromosome translocation in the study: 45PWS, 126PWS, 146PWS have FISH results similar to this patient. b) The patient's chromosome image 117PWS. c), d), e) FISH and chromosome images of patient's father 117PWS: FISH result is 2R2G2A.

Thus, with FISH technique, 4 patients with 15 chromosomal deletions with other chromosomes have deletion 15q11.2, diagnosing patients with PWS.

3.3.3. Methylation Specific Polymerase Chain Reaction- MS-PCR

In the study, 16 patients did not have deletion 15q11.2 by FISH technique designated as MS-PCR, all images of electrophoresis products similar to those of patients 1, 2, 5 (Figure 3.12), diagnostic results determine PWS.

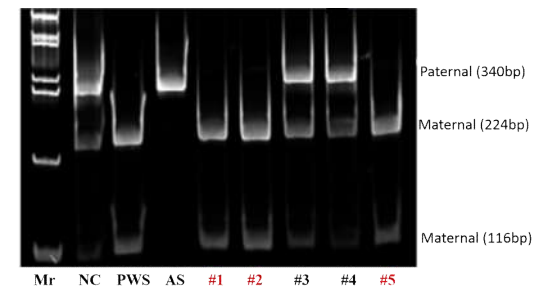


Figure 3.12. Product electrophoresis image of MS-PCR technique

1, 2, 5: digital patients with positive control electrophoresis (PWS), diagnosed as PWS patients.

With MS-PCR, PWS patients due to loss of chromosome 15q11-q13, due to two 15 chromosomes of the same mother origin (mUPD) or due to genetic defects (ID), result in imaging electrophoresis of PCR products. The same: only methylated product bands appear, so do not distinguish these patient groups from one another.

3.3.4. Methylation - Specific Multiplex Ligation - Dependent Probe Amplification - MS-MLPA

Apply MS-MLPA technique for 14 patients as follows:

7/85 patients were diagnosed with PWS due to deletion 15q11.2 with FISH technique including 3 patients with 15 chromosome translocations and 4 patients randomly selected. 7/16 patients were diagnosed with PWS by MS-PCR technique, randomly selected.

3.3.4.1. The result of determining deletion 15q11-q13 by MS-MLPA

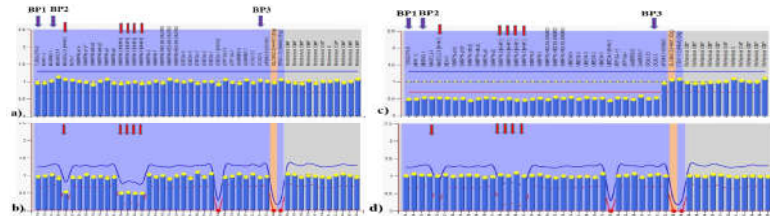


Figure 3.13. Results MS-MLPA patient code 86PWS lost paragraph Chromosome 15q11-q13 type 1

Comment: figure a and b are MS-MLPA images of ordinary people; image c, d is the MS-MLPA image of the patient. **a)** peak signal of chromosome genes 15q11-q13 at threshold 1; **b)** at the HhaI enzyme probe location (red arrow), signal peak at 0.5. **c)** is the loss of the chromatic segment 15q11-q13 type 1 (BP1-BP3), the peak of the signal at threshold 0.5; **d)** is an abnormally methylated image, at the red arrow positions where the signals are at threshold 1.

In 7 patients with deletion 15q11.2, there were 4 patients with MS-MLPA-like images of 86PWS patients, in which 3 patients had translocation, these patients were found deletion 15q11- q13 type 1.

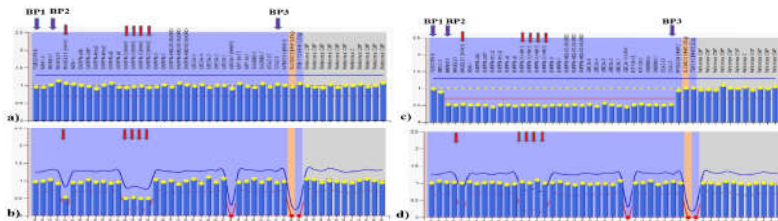


Figure 3.14. Results MS-MLPA patient 141PWS code lost paragraph NST 15q11-q13 type 2 (BP2-BP3)

3 patients with MS-MLPA image similar to 141PWS patient code, the patients were concluded to deletion 15q11-q13 type 2.

3.3.4.2. The result of abnormal determination of methylation by MS-MLPA technique

Among 16 patients who were positive for MS-PCR techniques, MS-MLPA was performed for 7 patients, with the aim to identify cases of deletion mutation IC requiring genetic counseling and prenatal diagnosis. Results: 1 patient had atypical deletion 15q11-q13 and 6 patients with mUPD or ID due to point mutation, did not detect any patients with deletion mutation IC.

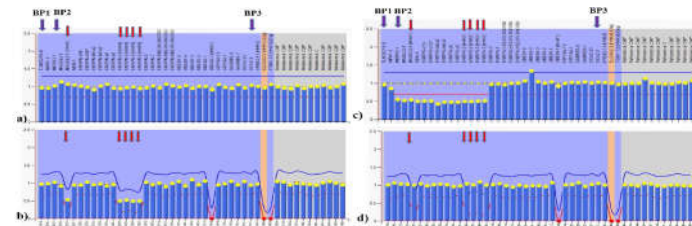


Figure 3.15. The MS-MLPA patient result code 133PWS carries an atypical deletion 15q11-q13

Comment: **c)** deletion 15q11-q13, the peak of signals at threshold 0.5 includes the genes: MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN in the upstream region (the center of IC genetic markers), intron 2, intron 5 and exon 3. The loss locations of the SNRPN gene are outside the marker area of the transducer used in the FISH technique, so there is no detectable loss in this case.

The remaining 6 patients had MS-MLPA images as follows, concluded PWS by mUPD or mutation of IC region, showing no deletion 15q11-q13 and abnormal methylation of this gene region.

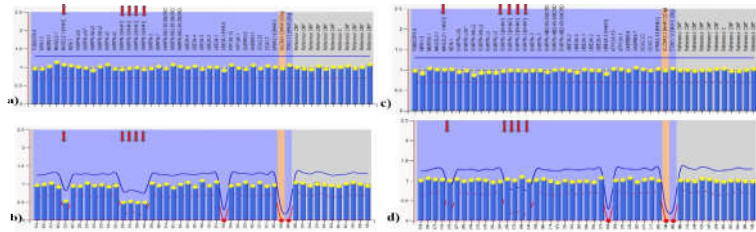


Figure 3.16. MS-MLPA results of patient code 33PWS

3.4. Correlation between clinical manifestations and genetic

Comparison of clinical manifestations according to genetic changes of deletion 15q11-q13 and mUPD, ID found differences as follows:

In the group deletion 15q11-q13, the proportion of patients with symptoms of overweight, obesity and hypopigmentation reduced, the color of hair was lighter in the group due to mUPD, ID.

The difference between IQ of patients with deletion 15q11-q13 and mUPD, ID is statistically significant ($p < 0.05$). There was no difference between the DQ index of the two genetic groups.

The mean age at diagnosis of the group of patients with deletion 15q11-q13 was lower than that of the group with mUPD, ID, the difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Mean maternal age in the mUPD group and ID was 3.64 years higher than the average age of the mother in the group due to the loss of paragraph 15q11-q13, this result has a statistical idea with $t_{100} = -3.51$; $p < 0.05$.

Chapter 4: DISCUSSION

4.1. General characteristics

The average diagnostic age of patients in the study was 30.18 ± 0.39 months. Compared to other studies this diagnostic age is much later.

Proportion of caesarean and preterm patients is similar to other studies in the world.

The percentage of low birth weight $< 2500g$ in the study was 18.8%, corresponding to the premature birth rate of 17.8%. According to WHO, the rate of premature babies in Asian countries is 15%, thus compared

to the average preterm birth rate in the population, the preterm birth rate in PWS patients in this study is higher.

4.2. Clinical characteristics

The clinical characteristics of PWS vary from period to phase, the study of these characteristics is significant in the PWS diagnostic clinical practice, specifically determining the early diagnosis right after birth, thereby giving the plan manage patients, limit severe symptoms, reduce complications and improve the quality of life for PWS patients.

With the results of our study, describe the clinical characteristics of 101 PWS patients in Vietnam, aiming to diagnose PWS in patients with clinical characteristics in each stage as follows:

Child stage < 2 years old:

Hypotonia, a history of reduction in fetal movement, increased caesarean birth rate, low birth weight. Children must support feeding right after giving birth because they cannot feed themselves. The rate of children hospitalized due to prolonged, recurrent respiratory infections. Sleep disorder, sleep apnea. Dysmorphic face with features of PWS such as thin upper lip, lower lower lip, almond-shaped eyes, may have reduced pigmentation, pale hair. Infertility of external genitalia, showing that boys have testicles on one side or two sides, girls have a minimum of clitoris, big lips and baby lips.

Child stage from 2 to 6 years:

History of hypotonia. Mild or moderate mental retardation. Beginning signs of appetite, overweight and obesity. Behavioral disorders with stubborn personality characteristics, difficult to say. Hands and feet are significantly smaller than children of the same age.

Child stage > 6 years:

History of hypotonia. Slow TV shows clearly, manifesting poor concentration, difficulty in communication, short-term and long-term memory loss, stubborn and difficult personality. Central obesity, low stature. Most children have late puberty.

4.3. Genetic features

4.3.1. Deletion 15q11-q13

86/101 PWS patients in the study due to deletion 15q11-q13, the rate of 85.1% of which 85 patients were identified deletion 15q11.2 by FISH technique, 1 patient had an atypical deletion 15q11-q13 with very small size, detected by MS-MLPA technique. Compared to the literature, the proportion of PWS patients with deletion 15q11-q13 averaged 70% - 75%, the rate of this group of patients in our study was higher.

In the case of patients with atypical deletion 1511-q13, the fragment loss is very small from the gene MKRN3 to exon 3 of SNRPN, the patient carries typical PWS clinical features as an unusually thick face. show PWS, hypotonia, testicular latency, but some other symptoms tend to be lighter like no overweight, no behavioral disorders, no reduction in skin pigmentation, hair is not pale, no sign of self-harm.

This study found 4 patients with translocation chromosomal 15, the rate of 3.96%, including 1 case of father origin, the family was counseled about the risk of having a PWS in the following births.

4.3.2. Maternal uniparental disomy- mUPD

The diagnosis of PWS patients due to mUPD has a prognostic significance for clinical manifestations and determines the risk of reproductive childbirth in later births.

Currently with many modern molecular biology techniques, more detailed mUPD status has been identified including: maternal heterodisomy, partial isodisomy (segmental isodisomy) and complete isodisomy (total isodisomy).

Comparison of the rates of PWS patients by mUPD, ID among studies found that the proportion of PWS patients due to mUPD in studies in Europe and the United States was significantly higher than those in Asia, including this research.

4.3.3. Imprinting defect- ID

The genetic imprint is the cause of 1-3% of PWS cases, of which 15% - 20% are caused by the sudden loss of the IC genetic imprint (imprinting center), 80% - 85% The remaining cases are due to point

mutations or epimutation. The cases of patients with deletion mutations IC are mostly of father origin, the risk of having a child with PWS in that family is 50%, which has important implications in genetic counseling and prenatal diagnosis.

CONCLUSIONS

Study on clinical characteristics and genetic changes of 101 patients diagnosed with PWS in National Pediatric Hospital from 2009 to 2018, we have the following conclusions:

1. Describe the clinical characteristics of PWS patients

There are 66 boys, 35 girls. The average age of diagnosis is 30.18 ± 0.39 months. All patients have hypotonia and a history of reduced fetal movement. 97% have an abnormal face, 94.1% have hypogenitalism. 61.4% were hospitalized immediately after birth mainly due to respiratory infections. Mortality rate of 9.9%.

Some clinical characteristics change in each period as follows:

- Group of patients <2 years old: 100% had hypotonia, 89.4% had sleep disorder, 10.6% of patients had low height compared to age, no patients had overweight and obesity.

- Group of patients aged 2 - 6 years: all patients had behavioral disorders, 17.4% had hypotonia, 52.2% were overweight and obesity, the rate of sleep disorder decreased (26, 1%), the proportion of patients with low stature increased by 34.7%. 17.4% had scoliosis.

- The group of patients aged 6-12 years: the rate of hypotonia, sleep disorder was low (8.3%), the rate of overweight, obesity, high low stature (83.3%), rate of scoliosis curvature increases (25%), all patients have behavioral disorders.

Comparing the characteristics of two groups of PWS patients due to deletion 15q11-q13 and mUPD, ID found some differences symptoms as follows:

- The proportion of patients with overweight and obesity, hypopigmentation, pale hair in the group deletion 15q11-q13 is higher than the mUPD group and ID.

- Average IQ of patients due to mUPD, ID higher than this of patients due to deletion 15q11-q13.

- Average maternal age of the mUPD, ID group higher than this of the group deletion 15q11-q13.

2. Determination of cytogenetic and molecular genetic of Prader-Willi syndrome.

By genetic testing techniques applied in this study include: G-banding chromosome analysis, FISH, MS-PCR, MS-MLPA in 101 patients were diagnosed with PWS with genetic changes as follows:

- 86/101 (85.1%) belongs to the group with deletion 15q11-q13, in which 4 patients have translocations, one patient has an atypical deletion 15q11-q13.

- 15/101 (14.9%) belonged to the mUPD group, ID, did not find any patients have deletion mutation IC.

RECOMMENDATIONS

Clinical: suggestion diagnosis of PWS for patients with specific clinical characteristics for each age group.

Genetic testing: we recommend two options for assigning genetic tests to diagnose PWS as follows:

Method 1: designate MS-MLPA technique, diagnose most (> 99%) PWS cases, identify cases of deletion 15q11-q13 type 1, type 2, atypical deletion, deletion mutation IC.

Method 2:

Step 1: Assign FISH technique, identify more than 80% of PWS patients due to deletion 15q11.2. Step 2: MS-MLPA identifies cases of PWS caused by mUPD, ID, or atypical deletion with small size.

Genetic counseling and prenatal diagnosis: for families who had the first child with PWS, they wish have their next child, need genetic counseling and prenatal diagnosis of cases: deletion 15q11-q13 due to translocations in chromosome 15 originating from the father; deletion mutation IC.

NEW CONTRIBUTIONS

Comprehensive and systematic study of Prader-Willi syndrome:

- **Clinical:** describe the clinical characteristics of the disease, identify the differences of clinical features by age, thereby orienting clinicians to appoint genetic diagnostic tests to determine PWS, especially early diagnosis before 6 months, to provide management and treatment plan for patients, limit severe symptoms, reduce complications and improve the quality of life for PWS patients.

- **Genetic testing:** successfully apply PWS diagnostic genetic testing techniques in which MS-MLPA technique is the most advanced advanced technique today, first applied in Vietnam, this technique can be diagnosed. Most cases of PWS (> 99%) distinguish the groups of genetic causes of deletion 15q11-q13, mUPD and ID.

- Detecting one case of PWS patients due to the atypical deletion 15q11-q13, enriching the understanding of the causes of PWS in Vietnam.

- **Genetic counseling and Prenatal diagnosis:** improving genetic testing techniques to identify cases of PWS patients who are at risk of having children with PWS in the following births are cases of carrying chromosomal delays of 15 origin sources and cases of deletion mutation IC.

LIST OF PUBLICATIONS RELATED WITH THESIS

1. An Thuy Lan, Bui Phuong Thao, Vu Chi Dung, Ngo Diem Ngoc, Dinh Thi Hong Nhung, Le Thi Lieu, Phan Thi Hoan (2015). Clinical characteristics and diagnosis of chromosomal deletion 15q11-q13 in Prader-Willi syndrome patients. *Journal of medical research*, 96 (4), 51-59.
2. An Thuy Lan, Bui Phuong Thao, Vu Chi Dung, Le Thi Lieu, Phan Thi Hoan (2015). Genetic changes in Prader-Willi syndrome patients at National Hospital of Pediatrics. *Pediatric Journal*, 8 (6), 63-66.