

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



CÁN THỊ BÍCH NGỌC

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN, LÂM SÀNG VÀ
ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG SƠ SINH**

Chuyên ngành : Nhi khoa

Mã số : 62720135

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2017

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

Người hướng dẫn khoa học:

PGS. TS. Nguyễn Thị Hoàn

Phản biện 1: PGS. TS. Nguyễn Phú Đạt

Phản biện 2: PGS. TS. Trần Văn Khoa

Phản biện 3: PGS. TS. Đỗ Trung Quân

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sĩ cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào hồi ngày tháng năm 2017

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam.
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội.

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Đái tháo đường (ĐTĐ) sơ sinh là tình trạng tăng glucose máu xuất hiện trong 6 tháng đầu sau đẻ. Đây là một rối loạn bẩm sinh hiếm gặp với tỷ lệ 1/215000 - 1/500000 trẻ sơ sinh đẻ sống. Bệnh có thể là tạm thời đôi khi tái phát hoặc vĩnh viễn suốt đời. Nguyên nhân của ĐTĐ sơ sinh là do di truyền, đột biến các gen dẫn đến giảm hoặc mất chức năng của tuyến tụy hay đảo tụy gây rối loạn chức năng tế bào β và giảm bài tiết insulin.

Triệu chứng của bệnh không điển hình, dễ chẩn đoán nhầm với các bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa, hô hấp trên, bỏ sót chẩn đoán hoặc chẩn đoán muộn. Bệnh thường được chẩn đoán khi đã có biến chứng nhiễm toan xê tôn. Nếu không được điều trị kịp thời sẽ để lại di chứng nặng nề thậm chí tử vong.

Việc điều trị kiểm soát glucose máu ở trẻ nhỏ vô cùng phức tạp do trẻ bú mẹ hoặc ăn liên tục, liều thuốc nhỏ khó lấy chính xác, trẻ nhạy cảm với insulin.

Nghiên cứu chẩn đoán phân tử bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh có ý nghĩa quan trọng trong thực hành lâm sàng. Kết quả phân tích sẽ giúp khẳng định chẩn đoán, quyết định phương pháp điều trị và có giá trị tiên lượng bệnh nhân cũng như các thành viên khác trong gia đình bệnh nhân. Những bệnh nhân có đột biến gen *ABCC8/KCNJ11* có thể được điều trị bằng thuốc uống thay thế cho tiêm insulin. Kết quả điều trị góp phần cải thiện chất lượng sống, tránh được đau đớn do tiêm insulin và giảm chi phí điều trị cho bệnh nhân và gia đình. ĐTĐ sơ sinh tạm thời cần phải theo dõi chặt chẽ để xác định thời điểm ngừng thuốc để phòng biến chứng hạ glucose máu cũng như xác định thời điểm bệnh tái phát.

Việt Nam, tại khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương (BVNTU), từ năm 2000 đến nay có 40 bệnh nhân được chẩn đoán ĐTĐ sơ sinh chiếm tỷ lệ 8,9% trong tổng số 447 bệnh nhân ĐTĐ chẩn đoán trước 15 tuổi. Tuy nhiên, cho đến nay, tại Việt Nam

chưa có nghiên cứu đầy đủ nào về nguyên nhân ở mức độ phân tử, kiểu gen, kiểu hình và kết quả điều trị đối với các bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh.

2. Mục tiêu của đề tài

- i/* Xác định đột biến gen trong bệnh đái tháo đường sơ sinh.
- ii/* Đối chiếu kiểu gen và kiểu hình của các thể ĐTĐ sơ sinh.
- iii/* Đánh giá kết quả điều trị bệnh đái tháo đường sơ sinh.

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

ĐTĐ sơ sinh là bệnh hiếm gặp. Những năm gần đây, các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại phát triển đã được ứng dụng trong chẩn đoán nguyên nhân phân tử của bệnh. Nhiều bằng chứng cho thấy chẩn đoán di truyền bệnh ĐTĐ sơ sinh đã cải thiện được kết quả điều trị và tiên lượng bệnh. Những bệnh nhân có đột biến gen *ABCC8/KCNJ11* có thể điều trị bằng uống sulfonylureas (SU) thay thế cho tiêm insulin. Việc điều trị bằng sulfonylureas đơn giản hơn, kinh tế hơn và kiểm soát glucose máu tốt hơn so với insulin. Tuy nhiên trên thế giới và Việt Nam, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào toàn diện về ĐTĐ sơ sinh được tiến hành trên số lượng bệnh nhân đủ lớn. Một nghiên cứu năm 2015 tiến hành trên số lượng bệnh nhân lớn nhất là 1020 bệnh nhân nhưng số bệnh nhân này lại được tập hợp từ 79 trung tâm.

Như vậy, chúng ta hoàn toàn không có dữ liệu về nguyên nhân ĐTĐ sơ sinh, cụ thể là dữ liệu đột biến các gen gây ĐTĐ sơ sinh, thực trạng chẩn đoán, điều trị với số lượng bệnh nhân đủ lớn tại một trung tâm. Nghiên cứu này tiến hành một cách khá toàn diện về bệnh ĐTĐ sơ sinh, cung cấp dữ liệu tương đối lớn về nguyên nhân ở mức độ di truyền phân tử, lâm sàng, hóa sinh và điều trị bệnh. Các dữ liệu bao gồm các dạng đột biến gen, kiểu gen, kiểu hình, góp phần bổ xung cho dữ liệu đột biến gen người ở Việt Nam và trên thế giới.

Hơn nữa, trong thực hành lâm sàng, phân tích đột biến gen giúp cho việc lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp. Nghiên cứu cung cấp dữ liệu về điều trị SU trên số lượng lớn bệnh nhân có ý nghĩa thực tiễn giúp cho việc xây dựng lại phác đồ cũng như tối ưu hóa điều trị ĐTĐ ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.

4. Cấu trúc luận án:

- Luận án được trình bày trong 121 trang (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án được chia làm 7 phần:

- + Đặt vấn đề: 2 trang
- + Chương 1: Tổng quan tài liệu 36 trang
- + Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 15 trang
- + Chương 3: Kết quả nghiên cứu 28 trang
- + Chương 4: Bàn luận 37 trang
- + Kết luận: 2 trang
- + Kiến nghị: 1 trang

Luận án gồm 20 bảng, 4 biểu đồ và 20 hình và 2 sơ đồ. Sử dụng 112 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt, tiếng Anh và một số trang Web. Phần phụ lục gồm: quy trình chiết tách ADN, bảng cho điểm test raven, quy trình làm test Denver, trình tự môi cho các gen *ABCC8*, *KCNJ11*, *INS*, *EIF2AK3*, danh sách bệnh nhân nghiên cứu và mẫu bệnh án nghiên cứu.

Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. Định nghĩa, thuật ngữ và cơ chế bệnh sinh

Đái tháo đường sơ sinh là tình trạng tăng glucose máu không kiểm soát được xuất hiện trước 6 tháng tuổi, gần đây được mở rộng ra trước 12 tháng tuổi.

Có hai thể: ĐTĐ sơ sinh tạm thời và ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn. ĐTĐ sơ sinh tạm thời chủ yếu do bất thường NST số 6 (6q24), bệnh nhân có giai đoạn hồi phục không phải dùng thuốc, sau đó có thể tái phát ở tuổi dậy thì; ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn phải điều trị thuốc suốt đời.

Cơ chế gây ĐTĐ sơ sinh tạm thời: đột biến gen là nguyên nhân của hơn 90% các bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời. Các nghiên cứu gần đây cho thấy rằng sự biến đổi biểu hiện của các gen di truyền đơn allele trên NST số 6 đã gây chậm trưởng thành tế bào β và đảo tụy dẫn đến rối loạn chức năng tế bào β và giảm bài tiết insulin. Kết quả là giảm insulin của bào thai mà insulin hoạt động như yếu tố tăng trưởng dẫn đến chậm phát triển trong tử cung. Nguyên nhân chính là do đột biến vùng di

truyền đơn allele trên NST số 6, thường kết hợp với sự biểu hiện quá mức của ít nhất là 2 gen hoạt động theo quy luật di truyền đơn allele: *PLAGL1* (Pleomorphic adenoma gene - like 1) và *HYMAI* (imprinted in hydatidiform mole). Cả hai gen *PLAGL1/HYMAI* có nguồn gốc từ bố sẽ hoạt động bình thường ở thai nhi, các gen có nguồn gốc từ mẹ bị methyl hóa nên bị bất hoạt

Cơ chế gây ĐTD sơ sinh vĩnh viễn: khi chức năng của tế bào β bình thường, glucose được vận chuyển vào trong tế bào nhờ GLUT-2, được chuyển hóa qua nhiều giai đoạn để tạo ra ATP làm tăng tỷ số ATP/ADP dẫn đến đóng kênh K_{ATP} gây khử cực màng tế bào. Màng tế bào bị khử cực sẽ mở kênh canxi, canxi tràn vào trong tế bào gây giải phóng insulin từ các hạt dự trữ. Bất thường GLUT-2 sẽ dẫn đến giảm glucose vào trong tế bào β . Thiếu hụt glucokinase sẽ dẫn đến giảm phosphoryl hóa glucose dẫn đến giảm ATP được tạo ra. Đột biến kích hoạt gen *ABCC8/KCNJ11* mã hóa cho hai tiểu đơn vị SUR1 và Kir6.2 của kênh K_{ATP} sẽ dẫn đến mở kênh K_{ATP} , kali ra ngoài tế bào nhiều dẫn đến tăng phân cực màng tế bào và ổn định điện thế màng làm insulin không được giải phóng gây ĐTD. Trong nhân, các gen *PDX1*, *PTF1A*, *GLIS3*, *PAX6*, *RFX6*, *NEUROD1*, *NEUROG3* mã hóa cho các yếu tố phiên mã có vai trò điều hòa quá trình tổng hợp insulin. Khi các gen này bị đột biến sẽ gây ĐTD. Đột biến gen *INS* gây bất thường quá trình tổng hợp proinsulin trong lưới nội bào gây độc cho tế bào β . Đột biến gen *INS* sẽ phá vỡ cấu trúc bình thường của cầu nối disulfua (p.Cys43Gly và p.Cys96Tyr) hoặc thêm vào một cystein không ghép cặp (p.Arg89Cys và p.Gly90Cys) ở chỗ phân cắt của chuỗi A và C-peptid. Đột biến p.Tyr108Cys có thể gây nên không ghép cặp của cystein ở vùng quyết định đóng cầu nối disulfua. Tất cả những đột biến này có thể là đột biến trội gây rối loạn sinh tổng hợp insulin dẫn đến stress trong lưới nội bào gây ĐTD.

1.2. Biểu hiện lâm sàng liên quan đến đột biến gen

Thể ĐTD sơ sinh tạm thời: chủ yếu do bất thường NST 6, một tỷ lệ nhỏ do đột biến gen *KCNJ11/ABCC8*. Chậm phát triển trong tử cung là

triệu chứng thường gặp. Tăng glucose máu, chậm phát triển và trong một số trường hợp có dấu hiệu mất nước xuất hiện ngay sau sinh. Các xét nghiệm kháng thể kháng tiểu đảo tụy và HLA haplotype cho đại tháo đường typ 1 đều âm tính [15]. Biểu hiện khác được chú ý là lưỡi to gặp ở 1/3 số bệnh nhân trong nghiên cứu của Temple và cs không liên quan đến cơ chế của gen. Biểu hiện thoát vị rốn cũng được mô tả. Chậm phát triển tâm thần gặp ở một số bệnh nhân. Nhu cầu insulin ngoại sinh giảm sau điều trị trung bình là 3 tháng. Cần điều trị insulin đến 18 tháng gặp ở một số hiếm các bệnh nhân. Trong giai đoạn này, ĐTĐ được hồi phục và bệnh nhân có glucose máu bình thường, mức tăng trưởng bình thường. Tuy nhiên, một số bệnh nhân có biểu hiện tăng glucose máu nhẹ tái phát trong những ngày bị ốm. ĐTĐ tái phát trong giai đoạn vị thành niên hoặc giai đoạn sớm ở người lớn gặp ở 50% các trường hợp ĐTĐ sơ sinh tạm thời typ 1.

ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn: bệnh nhân có đột biến *KCNJ11* thường gây ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn hơn ĐTĐ sơ sinh tạm thời (90% so với 10% tương ứng). Ngược lại đột biến *ABCC8* gây ĐTĐ sơ sinh tạm thời nhiều hơn ($\approx 66\%$). Không có sự khác biệt giữa hai nhóm về mức độ chậm phát triển trong tử cung và tuổi chẩn đoán ĐTĐ. Bệnh nhân có đột biến gen mã hóa cho các tiểu đơn vị của kênh K_{ATP} có mức độ chậm phát triển trong tử cung nhẹ hơn và thường được chẩn đoán muộn hơn so với những bệnh nhân có bất thường 6q24. Ở những bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời do đột biến gen *ABCC8/KCNJ11* thì bệnh thường hồi phục muộn hơn và tái phát sớm hơn so với những bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh do đột biến 6q24.

Biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân có đột biến kích hoạt gen mã hóa cho các tiểu đơn vị của kênh K_{ATP} gợi ý phụ thuộc insulin với mức C-peptide thấp hoặc không đo được và thường biểu hiện toan xê tôn.

Ngoài ĐTĐ, khoảng 20% bệnh nhân mang đột biến *KCNJ11* có biểu hiện triệu chứng thần kinh do kênh K_{ATP} không chỉ có mặt ở màng tế bào β của tụy mà còn có mặt ở nơ ron thần kinh và tế bào cơ. Biểu hiện nặng bao gồm chậm phát triển tâm thần, động kinh xuất hiện sớm và được gọi là hội chứng DEND (developmental delay, epilepsy, and

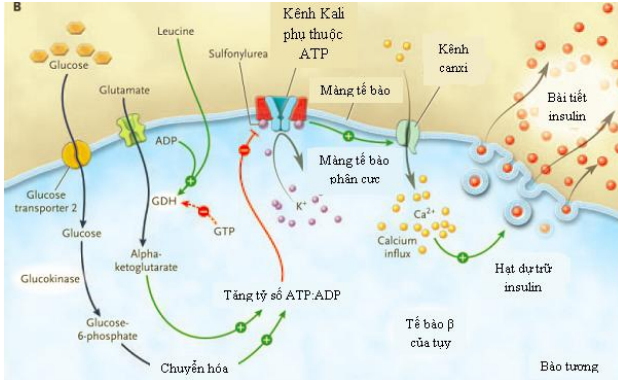
neonatal diabetes). Hội chứng DEND trung gian đặc trưng bởi ĐTĐ sơ sinh, chậm phát triển tâm thần nhẹ hơn và không có động kinh. Biểu hiện thần kinh ít gặp hơn và nhẹ hơn ở những bệnh nhân có đột biến *ABCC8*. Tuy nhiên những nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng các bất thường tâm thần kinh nhẹ bao gồm rối loạn phối hợp với phát triển tâm thần (đặc biệt là loạn phối hợp động tác không gian thị giác) hoặc giảm chú ý có thể gặp ở những bệnh nhân có đột biến K_{ATP} .

Đột biến dị hợp tử gen insulin (*INS*) là nguyên nhân phổ biến thứ hai gây ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn sau đột biến kênh K_{ATP} . Đột biến làm phân tử proinsulin không gấp cuộn bị giữ lại và ứ đọng trong lưới nội bào dẫn đến stress trong lưới nội bào và chết theo chương trình của tế bào β . Mức độ nặng của chậm phát triển trong tử cung ở bệnh nhân có đột biến dị hợp tử gen *INS* tương tự như ở bệnh nhân có đột biến gen mã hóa kênh K_{ATP} . Ngược lại ĐTĐ biểu hiện ở tuổi muộn hơn, nhẹ hơn và bệnh nhân thường không có biểu hiện thần kinh. Đột biến gen *INS* thường là dị hợp tử và là đột biến mới (*de novo*) đơn phát lẻ tẻ. Khoảng 20% có tiền sử gia đình của ĐTĐ di truyền trội NST thường. Đôi khi, đột biến gen *INS* gây ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn sau 6 tháng tuổi, vì vậy xét nghiệm phân tích gen cần được cân nhắc chỉ định trong trường hợp này đặc biệt khi bệnh nhân có kháng thể ĐTĐ typ 1 âm tính. Ngoài đột biến dị hợp tử của gen *INS*, đột biến đồng hợp tử hoặc đột biến dị hợp tử kép gây ĐTĐ sơ sinh cũng đã được mô tả. Đột biến hai allele không gây phá hủy tế bào β từ từ nhưng dẫn đến thiếu hụt sinh tổng hợp insulin trước và sau sinh. Điều này giải thích vì sao cân nặng lúc sinh thấp hơn và biểu hiện ĐTĐ sớm hơn ở những trẻ mang đột biến. Khi bệnh là di truyền lặn, có 25% nguy cơ xuất hiện bệnh ở anh chị em ruột nhưng ở những gia đình không kết hôn cận huyết thống thì nguy cơ rất thấp ở thế hệ sau của bệnh nhân.

1.3. Điều trị

Nguyên tắc là điều trị theo cơ chế bệnh sinh. Trong giai đoạn đầu khi mới được chẩn đoán hoặc khi nhiễm toan xê tôn, bệnh nhân sẽ được điều trị bằng insulin. Những bệnh nhân có đột biến gen *ABCC8/KCNJ11* sẽ

được điều trị chuyển đổi sang uống (SU) thay thế cho insulin tiêm. Những bệnh nhân có đột biến gen trên NST số 6 sẽ được theo dõi để xác định thời điểm ngừng thuốc và tái phát. Những bệnh nhân còn lại sẽ tiếp tục điều trị bằng insulin theo phương pháp truyền thống.



Hình 1.1. Sơ đồ điều hòa bài tiết insulin và cơ chế tác dụng của SU

Khi SU gắn kết với các SUR đặc hiệu trên màng tế bào β tụy, kênh K_{ATP} vận chuyển K^+ sẽ bị đóng lại. Kênh này cũng sẽ bị đóng lại dưới tác dụng của một số chất mà sự chuyển hóa cần đến vai trò của insulin như glucose và acid amin qua cơ chế làm tăng nồng độ ATP hay tăng tỉ lệ ATP/ADP nội bào. Kênh K^+ đóng sẽ khử cực màng tế bào do giảm tính thấm K^+ của tế bào β tụy. Để cân bằng điện tích hai bên màng tế bào β , kênh Ca^{++} sẽ được mở ra. Khi kênh Ca^{++} mở ra, một dòng thác Ca^{++} sẽ đi vào tế bào làm tăng nồng độ Ca^{++} nội bào. Một protein nội bào là calmodulin sẽ kết hợp với Ca^{++} qua phản ứng phosphoryl hóa. Phức hợp Ca^{++} -calmodulin sẽ đưa các hạt chế tiết insulin đến sát màng tế bào β tụy và kết quả là insulin sẽ được giải phóng.

1.4. Kết quả điều trị

Do bệnh hiếm gặp, số lượng bệnh nhân được theo dõi và điều trị tại cùng một trung tâm ít, hầu hết các nghiên cứu đều là các báo cáo ca bệnh hoặc chùm ca bệnh với cỡ mẫu nhỏ, vì vậy khó đánh giá được kết

quả điều trị lâu dài trên số lượng bệnh nhân đủ lớn có thể đại diện cho nhóm bệnh nhân ĐTD sơ sinh.

Nhiều nghiên cứu báo cáo chùn ca bệnh hoặc ca bệnh đã khẳng định hiệu quả của uống SU.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 40 bệnh nhân được chẩn đoán ĐTD trước 12 tháng tuổi, điều trị và theo dõi tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương (BVNTU) từ 1/2000 đến 1/2017. Chọn mẫu theo phương thức thuận tiện với các tiêu chuẩn: *i/* tăng glucose máu xuất hiện trước 12 tháng tuổi, glucose máu lúc đói ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) (đói được định nghĩa là không ăn ít nhất 4 giờ ở trẻ 0-1 tuổi) hoặc glucose máu bất kỳ > 200 mg/dl ($> 11,1$ mmol/l); *ii/* tình trạng tăng glucose máu lúc đói kéo dài trên 2 tuần phải điều trị bằng insulin; *iii/* bệnh nhân và gia đình chấp thuận tham gia nghiên cứu. Các tiêu chuẩn loại trừ bao gồm: tất cả những trường hợp tăng glucose máu do truyền dung dịch có glucose; do nhiễm trùng; bệnh nhân và gia đình không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu một loạt các ca bệnh bao gồm: phát hiện đột biến một số gen, kiểu hình (lâm sàng, xét nghiệm hóa sinh), can thiệp điều trị và đánh giá kết quả điều trị. Mỗi bệnh nhân có hồ sơ nghiên cứu riêng.

2.2.1 Phát hiện đột biến gen gây ĐTD sơ sinh và phân tích kiểu gen

Được tiến hành tại Phòng Xét nghiệm Di truyền phân tử, Đại học Y, Đại học Exeter, Vương Quốc Anh.

Bệnh phẩm: 2 ml máu tĩnh mạch bệnh nhân và bố, mẹ bệnh nhân được chống đông bằng EDTA. DNA được chiết tách bằng kit thương mại của hãng QIAGEN (QIAamp DNA blood mini kit) tại BVNTU. Exon đơn độc của *KCNJ11* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR và giải

trình tự gen theo quy trình của Ellard và Flanagan. Phản ứng được phân tích trên ABI 3100 capillary sequencing (Applied Biosystems) và được so sánh với các trình tự gen đã được công bố (NM_000525.3).

Những bệnh nhân không có đột biến trên gen *KCNJ11* sẽ được phân tích gen *ABCC8*. 39 exon và vùng gắn nối exon-intron được khuếch đại bằng các primer đặc hiệu, sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự bằng hệ thống ABI 3730 capillary sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK) và được so sánh với trình tự gen đã được công bố (NM_000525 và NM_000352.2).

Những bệnh nhân không có đột biến trên gen *KCNJ11* và *ABCC8*, các gen *INS*, *INSR*, *EIF2AK3*, *FOXP3*, *GATA4*, *GATA6*, *GCK*, *GLIS3*, *HNF1B*, *IER3IP1*, *PDX1*, *PTF1A*, *NEUROD1*, *NEUROG3*, *RFX6*, *SLC2A2*, *SLC19A2*, *WFS1* sẽ được phân tích các vùng gen mã hóa và vị trí gắn nối bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (Agilent custom capture v5/Illumina HiSeq; reference sequences at www.exeterlaboratory.com/genetics/tngs). Sau đó những đột biến gen được tìm thấy (*FOXP3* hoặc *EIF2AK3*) sẽ được khẳng định lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

Những bệnh nhân không có đột biến các gen đã liệt kê trên đây sẽ được phân tích để phát hiện các bất thường trên NST số 6 bằng phương pháp PCR-Methylation và khuếch đại đầu dò đa môi dựa vào phản ứng nối đặc hiệu methyl hóa (Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: MS-MLPA) sử dụng kit thương mại MRCHolland ME033. Kỹ thuật này cho phép phát hiện số lượng bản sao và dạng methyl hóa. Quá trình methyl hóa được tiến hành cho các locus đặc hiệu theo đích như: ĐTD sơ sinh typ 1, GRB10, PEG1/MEST, KCNQ1OT1, H19, DLK1 (14q32), SNRPN (15q12), PEG3/ZIM2, and NESPAS/GNAS-AS1 (20q13.2) DMRs sử dụng PCR methyl hóa đặc hiệu và pyrosequencing nếu cần đã được mô tả bởi Mackay và cs.

Những bệnh nhân có bất thường methyl hóa trên những locus đặc hiệu cho ĐTĐ sơ sinh tạm thời sẽ được phân tích tìm đột biến trên gen *ZFP57*. Sự thay đổi trình tự gen *ZFP57* được xác định bằng giải trình tự trực tiếp hai sản phẩm khuếch đại PCR bao gồm exon 1 (49bp) và các exon từ 2-6 (4,8kb) tương ứng. Vì exon 6 có chứa đoạn finger zinc có trình tự lặp lại nên sẽ có các vấn đề xảy ra khi khuếch đại. Vì vậy để khắc phục vấn đề này, các exon 2-6 sẽ được khuếch đại cùng nhau

Các đột biến phát hiện được ở các bệnh nhân nghiên cứu sẽ được so sánh với dữ liệu từ Human Gene Mutation database (HGMD). Đối với các đột biến chưa được báo cáo tại các cơ sở dữ liệu trên đây sẽ được kiểm tra đối chiếu với dữ liệu tại 1000 genomes database tại "MutationTaster". <http://www.mutationtaster.org>.

2.2.2. Nghiên cứu lâm sàng

Kiểu hình lâm sàng, hóa sinh, được tiến hành tại BVNTU: lập phả hệ, khai thác tiền sử, bệnh sử, khám lâm sàng toàn diện gồm chiều cao, cân nặng, phát hiện các triệu chứng của nhiễm toan xê tôn: thở nhanh, dấu hiệu mất nước, li bì, hôn mê, các triệu chứng khác: co giật, vàng da, bở bủ, lưỡi to, thoát vị rốn, phát triển tâm thần vận động.

Xét nghiệm hóa sinh: bệnh phẩm huyết thanh: định lượng glucose máu bằng phương pháp hexokinase trên máy hóa sinh tự động Beckman Coulter AU5800/AU680 và thuốc thử định lượng glucose ORS 6221 của hãng OLYMPUS. Máu tĩnh mạch được thu thập vào buổi sáng sớm khi bệnh nhân ngủ dậy hoặc thời điểm bệnh nhân đến khám; Định lượng HbA1c: Sử dụng máy hóa sinh tự động Beckman Coulter AU680 và thuốc thử định lượng HbA1c ORS6192 (hãng olympus). Xét nghiệm bao gồm 2 quy trình: định lượng HbA 1c bằng phương pháp miễn dịch ức chế cạnh tranh, định lượng Hb toàn phần bằng kỹ thuật so màu, từ đó tính ra tỷ lệ HbA1c/Hb toàn phần để có % HbA1C. Định lượng insulin theo phương pháp miễn dịch hóa phát quang trên máy sinh hóa tự động Hitachi 704 của Mỹ. Định lượng nồng độ C-peptid bằng phương pháp miễn dịch hóa phát quang theo nguyên lý IRMA (Radioimmunometric assay) và được thực hiện trên máy sinh hóa tự động Hitachi 704 của

Mỹ; đo khí máu động mạch bằng phương pháp đo quang học, thực hiện trên máy đo khí máu GEM primer 3000. Đo glucose máu mao mạch tại nhà bằng máy đo glucose máu One Touch Ultra: sử dụng phương pháp điện hóa. Theo dõi glucose máu liên tục 24 giờ trong nhiều ngày bằng máy đo glucose máu liên tục Ipro.

2.2.3. Điều trị

Những bệnh nhân có đột biến gen *ABCC8/KCNJ11* sẽ được nhập viện để điều trị chuyển đổi từ insulin tiêm sang uống SU theo phác đồ. Bắt đầu liều SU 0,1mg/kg/lần x 2lần/ngày, định lượng glucose máu mao mạch trước khi uống thuốc, nếu $> 7\text{mmol/l}$ → tăng dần liều SU, mỗi lần tăng 0,1mg/kg, giữ nguyên liều insulin, nếu glucose máu mao mạch trước uống thuốc $< 7\text{mmol/l}$, giảm liều insulin 1 nửa cho đến khi uống SU hoàn toàn và ngừng insulin.

Tất cả bệnh nhân được theo dõi glucose máu mao mạch 5 mẫu/ngày (trước các bữa ăn chính, 22 giờ và 2 giờ), HbA1C (3 tháng/lần). Kết quả glucose máu và HbA1C được đánh giá theo hướng dẫn của hiệp hội Đái tháo đường trẻ em và vị thành niên thế giới (ISPAD) năm 2014.

Đánh giá phát triển tâm thần vận động bằng test Raven với trẻ > 6 tuổi và Denver II với trẻ < 6 tuổi. Kết quả phát triển tâm thần vận động được đánh giá qua 4 mức độ: bình thường (IQ(DQ) $\geq 75\%$); chậm phát triển nhẹ (IQ(DQ): từ $> 66,7$ đến $< 75\%$); chậm phát triển mức độ vừa (IQ(DQ) từ > 50 đến $\leq 66,7\%$); chậm phát triển mức độ nặng trầm trọng (IQ(DQ) $\leq 50\%$).

2.2.4. Xử lý số liệu thống kê

Sử dụng phần mềm SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Các số liệu được diễn tả dưới dạng các phân bố về tần số hoặc các tham số thống kê mô tả và được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm, hoặc trị số trung bình \pm SD và trung vị.

2.2.5. 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, BVNTU, được sự đồng ý của đối tượng nghiên cứu.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phát hiện đột biến gen gây bệnh ĐTĐ sơ sinh

Trong số 40 bệnh nhân (22 nam, 18 nữ) thì 33 bệnh nhân có đột biến gen. Đề tài tập trung phân tích 33 bệnh nhân có đột biến gen. Các gen bị đột biến là: *ABCC8* (33,3%), *KCNJ11* (27,3%), *INS* (18,2%), *6q24* (15,2%), *EIF2AK3*(3%), *FOXP3* (3%). 9/33 bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời và 24/33 bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn.

Bảng 3.1. Đặc điểm lâm sàng và đột biến gen khi chẩn đoán

Đặc điểm lâm sàng	<i>ABCC8</i> (n=11)	<i>KCNJ11</i> (n=9)	<i>INS</i> (n=6)	<i>6q24</i> (n=5)	P (test Kruskal- Wallis)	Chung các nhóm
Tuổi thai (tuần)	39,8± 0,4	39,0 ±1,4	37,3± 3,0	38,5± 3,0	0,076	39±1,9
Cân nặng lúc sinh (kg)	2,9 ±0,36	2,65± 0,5	2,8 ±0,76	2,25± 0,33	0,226	2706 ±520
Cân nặng lúc sinh ≤10 th (n)	7	8	2	4		
Tuổi chẩn đoán (ngày)	54,5 ±24,8	64,3 ±43,9	14 – 357 Trung vị 101,5	23,8 ±11,4	0,076	7-357 Trung vị 45
Toan xê tôn (n)	6	8	5	1		
Triệu chứng thần kinh (n)	1	1	0	0		
pH	7,14± 0,2	7,06 ±0,16	7,04± 0,22	7,16± 0,25	0,618	7,11 ±0,9
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	8,0± 6,6	1-28,9 Trung vị 3,85	2-22,4 Trung vị 2,65	15,1 ±10,5	0,216	8,9±8,3
BE (mmol/l)	-17,8 ±8,4	-19,6± 11,9	-19,6 ±11,2	-4,55 ±0,49	0,296	17,4 ±10,5
Glucose (mmol/l)	30,8± 11,6	39,1± 9,9	34,2 ±12,7	37,8± 12,2	0,462	35,9 ±11,3
HbA1C (%)	7,9 ±2,4	8,64 ±3,03	9,8± 3,6	6,87 ±1,04	0,206	7,8±2,8
C-peptide (nmol/l)	0,01 -0,52 Trung vị 0,08	0,0002-0,27 Trung vị 0,085	0-0,16 Trung vị 0,97	0,03 -0,17 Trung vị 0,41	0,913	0-0,52 Trung vị 0,08
Xê tôn niệu (+) (n)	7	5	5	3		

Nhận xét: các biểu hiện lâm sàng và xét nghiệm hóa sinh không có sự khác biệt giữa các nhóm bệnh nhân do các đột biến gen khác nhau.

3.1.1. Đột biến gen *ABCC8*

Trong 11 bệnh nhân có đột biến gen *ABCC8*, xác định được 11 đột biến khác nhau. 8 bệnh nhân có đột biến sai nghĩa dị hợp tử: c.3547C>T (p. R1183W) (3 bệnh nhân); c.3458C>G (p.A1153G), c.1303T>C(p.C435R); c.3596C>T (p.P1199L); c.4139G>A (p.R1380H); c.1793G>A (p.R598Q) và c.2476C>T (p.R826W). Một bệnh nhân có đột biến vô nghĩa đồng hợp tử c.2239G>T(p.E747X). Một bệnh nhân có phối hợp một đột biến sai nghĩa và một đột biến vô nghĩa c.382G>A(p.E128K)/c.2239G>T(p.E747X). Một bệnh nhân có phối hợp một đột biến sai nghĩa và đột biến vùng cắt nối c.4519G>C(p.E1507Q)/c.3403-1G>A (p?). Trong đó có 4 đột biến mới được phát hiện: p.E747X, p.A1153G, p. E1507Q, p.R598Q.

3.1.2. Đột biến gen *KCNJ11*

Trong 9 bệnh nhân có đột biến gen *KCNJ11*, xác định được 7 đột biến sai nghĩa dị hợp tử khác nhau: c.602G>A (p.R201H) (2 bệnh nhân), c.601C>T (p.R201C) (3 bệnh nhân), c.149G>A (p.R50Q), c.875A>G (p.E292G), c.685G>A (p.E229K), c.553A>C (p.K185Q), c.157G>A (p.G53S). Các đột biến này đều không có nguồn gốc từ bố hoặc mẹ.

3.1.3. Đột biến gen *INS*

Trong 6 bệnh nhân có đột biến gen *INS*, xác định được 4 đột biến khác nhau. Bốn bệnh nhân có đột biến sai nghĩa dị hợp tử: c.157G>A (p.G53S); c.286T>C (p.C96R); c.265C>T (p.R89C) (2 bệnh nhân). Hai bệnh nhân có đột biến dị hợp tử vùng cắt nối c.188-31G>A (p?). Trong đó có một đột biến mới c.127T>A (p.C43S). Tất cả các đột biến phát hiện được đều là những đột biến không di truyền từ bố mẹ (*de novo mutation*).

3.1.4. Bất thường 6q24

Trong số 5 bệnh nhân có đột biến mất methyl hóa hoàn toàn ở vùng biệt hóa methyl trên NST số 6 thì 2/5 bệnh nhân có đột biến của gen *ZFP57* và kiểu gen là c.7450delT/c.7812C>T (1 bệnh nhân), bệnh nhân khác có 3 đột biến dị hợp tử trong đó đột biến mất một base trên exon 6 dẫn đến lệch khung dịch mã gây kết thúc phiên mã sớm di truyền từ mẹ c.398delT (p.L133HfsX49), hai đột biến dị hợp tử khác cũng trên vùng này được di truyền từ bố c.760C>T (p.L254F) và c.499C>T (p.R167C);

một bệnh nhân có đột biến gen *PLAGL1*; 1 bệnh nhân khác ngoài đột biến trên locus gây ĐTD sơ sinh tạm thời TND (6q24) còn đột biến trên các locus khác GF2R (6q27), SNRPN (5q11), GRB10 (7p12); 1 bệnh nhân có đột biến trên các locus GRB10 và PEG3.

3.1.5. Các đột biến gen trong các hội chứng hiếm gặp

1 bệnh nhân có đột biến sai nghĩa đồng hợp tử c.1894C>T trên exon 12 của gen *EIF2AK3*, đột biến này được di truyền từ bố mẹ. 1 bệnh nhân khác mang đột biến sai nghĩa dị hợp tử c.1133C>T trên nhiễm sắc thể X được di truyền từ mẹ.

3.2. Đối chiếu kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân ĐTD sơ sinh.

3.2.1. Đặc điểm lâm sàng và hóa sinh của các thể ĐTD sơ sinh

3.2.1.1. Đái tháo đường sơ sinh do đột biến gen *ABCC8*

Bảng 3.2. Lâm sàng và hóa sinh của bệnh nhân có đột biến *ABCC8*

BN	Kiểu gen	Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng khi chẩn đoán									
		Tuổi ngày	Cân nặng lúc sinh bách phân vị	Toan xê tôn	Triệu chứng thần kinh	Glucose mmol/l	pH	HCO ₃ - mmol/l	BE mmol/l	HbA1C %	Thời gian hồi phục tháng
3	p.R1183W	45	<3	-	-	28,2	7,34	15	-9,5	5,8	
4	p.E747X	36	<3	-	+	30,9	7,36	4	-18	8	
5	p.E128K/ p.E747X	44	50	Nặng	-	26,2	7,03	3,7	-25,1	10,3	
13	p.A1153G	15	<3	Nhẹ	-	22,4	7,3	13	-15,4	3,5	
14	c.3403-1G>A /p.E1507Q	96	<3	Nặng	-	47,7	6,99	4,3	-26	6,7	
23	p.C435R	71	>10	Nặng	-	25,6	7,1	6,3	-22	7,2	
24	p.R1183W	36	>10	Nặng	-	31,7	7,08	3,3	-26	7,6	6
25	p.P1199L	48	3	-	-	13,1	7,44	23	-0,8	8,2	
27	p.R1183W	82	10	Nặng	-	30	6,89	5,1	--	11,5	14
32	p.R1380H	72	>10	Nặng	-	53,1	6,90	3	--	8,7	
33	p.R598Q/ p.R826W	33	10	Nhẹ	-	50,1	7,29	18	-8,8	4	

Ghi chú: màu đỏ là các đột biến mới chưa được báo cáo trong y văn (novel mutations); "--": thấp không đo được; "-": không có "+": có

Nhận xét: Tỷ lệ cao bệnh nhân được chẩn đoán trước 90 ngày tuổi (10/11) và có biểu hiện toan xê tôn (8/11).

3.2.1.2. Đái tháo đường sơ sinh do đột biến gen *KCNJ11*

Bảng 3.3. Lâm sàng và hóa sinh của bệnh nhân có đột biến gen *KCNJ11*

BN	Kiểu gen	Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng khi chẩn đoán									Hồi phục sau chẩn đoán tháng
		Tuổi ngày	P lúc sinh bách phân vị	Toan xê tôn	Triệu chứng thần kinh	Glucose mmol/l	pH	HCO ₃ ⁻ mmol/l	BE mmol/l	HbA1C %	
1	p.R201H	44	<3	Nặng	-	49,5	7,12	-	-22,7	9,7	
2	p.R201C	37	<3	Nặng	+	31,2	6,9	1	--	8,4	
10	p.R50Q	160	70	Nặng	-	37,2	6,9	1,9	-28,2	13,7	6
12	p.R201C	7	<3	Nhẹ	-	26	7,2	21	-5,7	5,4	
15	p.E292G	45	10	-	-	39,3	7,35	28,9	3,2	6	
16	p.E229K	52	3	Nặng	-	43,1	6,9	4	-28,7	5,1	50
26	p.R201H	62	10	Nặng	-	41,6	7,06	3,7	-26,6	10,2	
28	p.K185Q	72	<3	Nặng	-	27,8	6,86	3,6	-28,5	9,3	
30	p.G53S	100	10	Trung bình	-	56	7,2	5,4	-19,9	11,0	

Ghi chú: “P”: cân nặng lúc sinh, “--”: không đo được “-”: không có “+”: có

Nhận xét: tỷ lệ cao bệnh nhân khởi phát bệnh dưới 2 tháng tuổi (5/9), có cân nặng lúc sinh < 10 bách phân vị (8/9) và có biểu hiện nhiễm toan xê tôn khi chẩn đoán (8/9).

3.2.1.3. Đái tháo đường sơ sinh do đột biến gen *INS***Bảng 3.4. Lâm sàng và hóa sinh của bệnh nhân có đột biến gen *INS***

BN	Kiểu gen	Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng khi chẩn đoán							
		Tuổi ngày	P lúc sinh (bách phân vị)	Toan xê tôn	Glucose (mmol/l)	pH	HCO ₃ ⁻ mmol/l	BE mmol/l	HbA1C (%)
7	c.127T>A (p.C43S)	18 0	50	Nặng	24	6,8	2,3	--	8,3
9	c.188-31G>A (p?)	13 3	40	Nặng	34,7	6,9	2	-28,9	12,8
18	c.188-31G>A (p?)	70	10	Nặng	54	7,14	3,6	-23,2	8,5
19	c.286T>C (p.C96R)	35 7	50	Trung bình	21	7,23	2	-23	11,4
21	c.265C>T (p.R89C)	21	10	-	44,4	7,35	21,4	-3,3	3,9
22	c.265C>T (p.R89C)	14	50	Nặng	27,8	6,8	3	--	13,6

Ghi chú: “BN”: bệnh nhân, “--”: thấp không đo được, “-”: không

Nhận xét: tất cả các bệnh nhân có cân nặng lúc sinh từ 10 bách phân vị trở lên, 5/6 nhập viện trong tình trạng toan xê tôn từ trung bình đến nặng.

3.2.1.4. Đái tháo đường sơ sinh do bất thường nhiễm sắc thể số 6
Bảng 3.5. Đặc điểm lâm sàng và hóa sinh của bệnh nhân có đột biến mất methyl hóa vùng imprinting

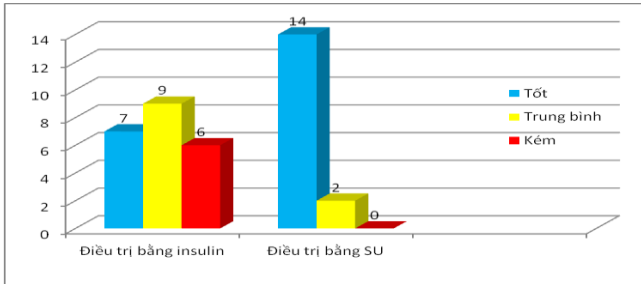
BN	Đột biến	Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh khi chẩn đoán									
		Tuổi ngày	P lúc sinh bách phân vị	Toan xê tôn	Glucose mmol/l	pH	HCO ₃ ⁻ mmol/l	BE mmol/l	HbA1C %	Lưỡi to, rón lồi	Hồi phục sau điều trị insulin tháng
6	c.7450delT/ c.7812C>T	23	20	-	30				6,8	+	18
8	TND (6q24), GF2R(6q27), SNRPN(5q11),GRB10 (7p12)	40	<3	-	31,1	7,32	21,2	-4,2	8,3	+	5,5
11	c.398delT (p.L133HfsX49) c.499C>T(p.R167C) c.760C>T (p.L254F)	15	<3	-	56	7,3	20,7	-4,9	5,8	+	5
20	GRB10 và PEG3	11	<3	Nặng	31	6,8	3	--	6,6	+	5,5
31	PLAGL1	13	<3	-	44				3,6	+	3

Ghi chú: “BN”: bệnh nhân, “P”: cân nặng lúc sinh, “+”: có “-”: không, “--”: không đo được

Nhận xét: 4/5 bệnh nhân có cân nặng lúc sinh thấp < 3 bách phân vị. 2/3 bệnh nhân có đột biến ở các locus trên gen *ZFP57* không có biểu hiện toan xê tôn khi chẩn đoán; bệnh nhân có đột biến ở locus *GRB10* và *PEG3* nhập viện trong tình trạng nhiễm toan xê tôn rất nặng và cân nặng lúc sinh thấp.

3.3. Kết quả điều trị

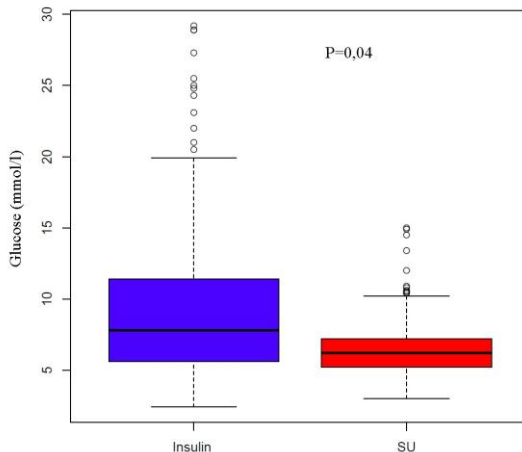
3.3.1. Kết quả kiểm soát glucose



Biểu đồ 3.1. Kết quả kiểm soát glucose máu ở bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn

Nhận xét: tỷ lệ kiểm soát glucose máu tốt khi điều trị bằng insulin là 30,4% và tỷ lệ kiểm soát kém còn cao 26,1% nhưng khi chuyển sang điều trị bằng SU thì tỷ lệ kiểm soát tốt là 87,5% và không còn bệnh nhân kiểm soát kém.

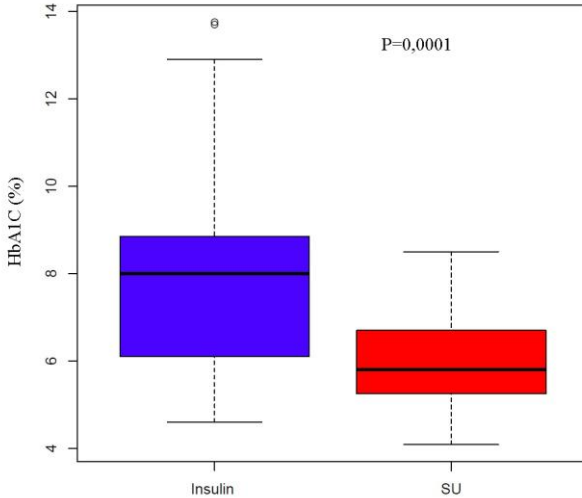
3.3.2. Kết quả theo dõi glucose máu ở bệnh nhân điều trị bằng insulin và sulfonylurea



Biểu đồ 3.2. Kết quả theo dõi glucose khi điều trị bằng insulin và SU

Nhận xét: khi điều trị bằng sulfonylurea, glucose máu hầu hết trong giới hạn bình thường đồng thời khoảng giao động nhỏ hơn so với điều trị bằng insulin.

3.3.3. Kết quả HbA1C khi điều trị bằng insulin và SU



Biểu đồ 3.3. Kết quả HbA1C khi điều trị bằng insulin và SU

Nhận xét: HbA1C của bệnh nhân khi điều trị bằng insulin cao hơn có ý nghĩa so với HbA1C của bệnh nhân khi điều trị bằng SU ($p=0,0001$).

3.3.4. Kết quả phát triển tâm thần vận động

Bảng 3.6. Kết quả phát triển tâm thần vận động của bệnh nhân

Đột biến gen	Phát triển tâm thần, vận động bình thường		Chậm phát triển tâm thần, vận động vừa và nặng	
	n	%	n	%
<i>ABCC8</i>	10	90,9	1	9,1
<i>KCNJ11</i>	8	88,9	1	11,1
<i>INS</i>	6	100	0	0
<i>6q24</i>	4	80	1	20
<i>EIF2AK3</i>	1	100	0	0
Tổng	29	90,6	3	9,4

Nhận xét: tỷ lệ bệnh nhân chậm phát triển tâm thần vận động là 9,4%. Tất cả bệnh nhân có đột biến gen *INS* phát triển tâm thần vận động bình thường.

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Xác định đột biến gen ở bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh

Trong số 40 bệnh nhân được phân tích các gen gây ĐTD sơ sinh thì 33 bệnh nhân có đột biến (82,5%). Các gen phát hiện được đột biến là *ABCC8* (33,3%), *KCNJ11* (27,2%), *INS* (18%), *6q24* (15%), *EIF2AK3*(3%), *FOXP3*(3%). Tỷ lệ bệnh nhân được chẩn đoán trước 6 tháng tuổi là 96,97% (32/33) với độ tuổi trung bình là 54,78±42,32 ngày, một bệnh nhân được chẩn đoán trong vòng 6-12 tháng với 357 ngày tuổi chiếm tỷ lệ 3,03%. Tỷ lệ phát hiện được đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự như trong nghiên cứu ở Ukraina và Trung Quốc nhưng cao hơn trong nghiên cứu tại Slovakia. Trong đó đột biến kênh K_{ATP} trong các nghiên cứu đều là nguyên nhân phổ biến gây ĐTD sơ sinh và *KCNJ11* chiếm tỷ lệ cao nhất thì trong nghiên cứu của chúng tôi gen có tỷ lệ đột biến cao nhất lại là *ABCC8*. Sự khác biệt này có thể do yếu tố chủng tộc hoặc do cỡ mẫu nghiên cứu chưa đủ lớn, chưa cân bằng giữa các nghiên cứu và chưa đại diện được cho quần thể.

4.2. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân ĐTD sơ sinh

Về cân nặng lúc sinh, kết quả từ bảng 3.1 cho thấy cân nặng lúc sinh trung bình của các nhóm bệnh nhân có đột biến *KCNJ11*, *ABCC8* và bất thường NST số 6 khoảng 10 bách phân vị so với tuổi thai còn của nhóm có đột biến *INS* gần như trong giới hạn bình thường. Trong 4 nhóm này, cân nặng lúc sinh của nhóm có đột biến NST số 6 là thấp nhất. Tuy nhiên không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh cân nặng lúc sinh của các nhóm với nhau.

Về tuổi chẩn đoán, kết quả trong bảng 3.1 cho thấy tuổi chẩn đoán của nhóm bệnh nhân có đột biến NST số 6 là thấp nhất phù hợp với kết quả trong nghiên cứu của Flanagan và cs (2007). Tuy nhiên, bệnh nhân của chúng tôi được chẩn đoán muộn hơn. Điều này có thể do triệu chứng của bệnh thường không rõ ràng, bệnh thường biểu hiện với triệu

chúng của nhiễm khuẩn đường hô hấp trên, nhiễm khuẩn tiêu hóa hoặc thậm chí là bệnh nhân chỉ có biểu hiện quấy khóc ngủ ít và không tăng cân hoặc giảm cân. Do vậy, bệnh nhân có thể được chẩn đoán nhầm là bệnh nhiễm trùng trước khi được chẩn đoán là ĐTĐ.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm bệnh nhân được chẩn đoán sớm nhất là nhóm có đột biến NST số 6 ở độ tuổi 17-40 ngày, bệnh nhân *ABCC8* chẩn đoán ở độ tuổi 15-96 ngày, bệnh nhân *KCNJ11* được chẩn đoán từ 7-160 ngày, còn nhóm bệnh nhân có đột biến *INS* thì tuổi chẩn đoán từ 14-357 ngày. Như vậy tuổi chẩn đoán cũng rất khác nhau giữa các bệnh nhân, giữa các nhóm, tuy nhiên sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể do số lượng bệnh nhân còn hạn chế.

Về triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng khi chẩn đoán, bảng 3.1 cho thấy, bệnh nhân có đột biến *KCNJ11* có tỷ lệ nhập viện vì toan xê tôn cao nhất (8/9 bệnh nhân), trong khi chỉ có 1/5 bệnh nhân bất thường nhiễm sắc thể số 6 có biểu hiện toan xê tôn. Điều này phù hợp với tuổi chẩn đoán của bệnh nhân có đột biến *KCNJ11* muộn nhất. Do chẩn đoán muộn nên dễ có biến chứng toan xê tôn. Tình trạng toan xê tôn nặng với pH; HCO₃⁻ và BE rất thấp.

4.3. Kết quả điều trị

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 100% bệnh nhân có đột biến gen *ABCC8* và *KCNJ11* được điều trị thành công bằng thuốc uống SU thay thế cho insulin tiêm. Trong đó có 4 bệnh nhân là ĐTĐ sơ sinh tạm thời hiện không phải dùng thuốc. Khi chuyển sang điều trị bằng glibenclamide, kết quả kiểm soát glucose máu và HbA_{1C} cải thiện rõ rệt và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (kết quả từ biểu đồ 3.2). Khi điều trị bằng glibenclamide, glucose máu ổn định hơn, dao động ít hơn và HbA_{1C} gần với giá trị bình thường hơn (kết quả từ biểu đồ 3.2 và 3.3). Trong nghiên cứu của Pearson và cs, 49 bệnh nhân được điều trị với SU, 44 bệnh nhân có thể ngừng tiêm insulin. Kiểm soát glucose máu cải thiện ở 38 bệnh nhân. HbA_{1C} trung bình trước điều trị SU là 8,1% (7,7-8,6%) giảm xuống 6,4% (6,2-6,6) sau khi điều trị 12 tuần bằng SU.

Kết quả từ biểu đồ 3.1 cho thấy, khi điều trị bằng insulin, tỷ lệ bệnh nhân kiểm soát kém chiếm 26,1%. Điều này chứng tỏ việc kiểm soát glucose máu và HbA1C ở trẻ nhỏ là vô cùng khó khăn và phức tạp. Trẻ nhỏ bú mẹ hoặc ăn liên tục, khó kiểm soát glucose máu sau ăn. Hơn nữa trẻ lại nhạy cảm với insulin nên rất dễ hạ glucose máu sau tiêm insulin tác dụng nhanh. Khi chuyển sang điều trị bằng SU, kết quả kiểm soát glucose máu và HbA1C cải thiện rõ rệt và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Khi điều trị bằng SU, glucose máu ổn định hơn, dao động ít hơn và HbA1C gần với giá trị bình thường hơn.

Kết quả từ bảng 3.6 cho thấy tỷ lệ trẻ bị chậm phát triển tâm thần vận động chiếm 9,4% (3/32). Trong những bệnh nhân này có hai bệnh nhân có đột biến gen *KCNJ11/ABCC8* biểu hiện triệu chứng thần kinh trong hội chứng DEND và một bệnh nhân có đột biến mất methyl hóa trên các locus TND (6q24), GF2R (6q27), SNRPN (5q11), GRB10 (7p12) có mắc viêm não trong quá trình điều trị. Chậm phát triển tâm thần ở bệnh nhân này có thể do bản thân đột biến gây nên, cũng có thể do ở thời điểm chẩn đoán bệnh nhân có mắc viêm não phối hợp.

Glyon và cs nghiên cứu 10 bệnh nhân có đột biến gen *KCNJ11*, trong đó có 3 trẻ có biểu hiện tổn thương thần kinh trong hội chứng DEND. Tuy nhiên trong 3 bệnh nhân này, 2 bệnh nhân khi được chẩn đoán có biểu hiện nhiễm toan xê tôn rất nặng với pH 6,9; một bệnh nhân chậm phát triển tâm thần vận động có kèm theo kiểm soát glucose máu kém với HbA1C rất cao 13%. Vì vậy nguyên nhân gây rối loạn thần kinh có thể do: *i*) tác dụng trực tiếp của đột biến kênh K_{ATP} gây ảnh hưởng đến chức năng của kênh ở cơ, sợi trục và vỏ sợi trục, *ii*) hậu quả cấp tính của ĐTD như hạ glucose máu nặng (trong toan xê tôn) hoặc tăng glucose máu rất nặng, *iii*) ảnh hưởng lâu dài của bệnh ĐTD như các biến chứng, hạ glucose máu nặng tái phát hoặc *iv*) biểu hiện thần kinh không liên quan đến đột biến kênh K_{ATP} hoặc ĐTD.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đột biến gen, kiểu hình lâm sàng và hóa sinh, đánh giá kết quả điều trị chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Xác định các đột biến gen gây đái tháo đường sơ sinh

Tỷ lệ phát hiện đột biến gen trong ĐTĐ sơ sinh là 82,5%. Các gen xác định được gây ĐTĐ sơ sinh là: *ABCC8* (33,3%), *KCNJ11* (27,3%), *INS* (18,2%), bất thường NST số 6 (15,2%), *EIF2AK3* (3,0%), *FOXP3* (3,0%).

Xác định được 11 đột biến của gen *ABCC8*; 7 đột biến của gen *KCNJ11*; 4 đột biến của gen *INS*; 1 đột biến của gen *EIF2AK3* và 1 đột biến của gen *FOXP3*. Trong đó xác định được 4 đột biến mới của gen *ABCC8*: đột biến vô nghĩa p.E747X; các đột biến sai nghĩa p.A1153G; p.E1507Q; p.R598Q, và 1 đột biến mới của gen *INS* là p.C43S.

2. Đối chiếu kiểu gen và kiểu hình ĐTĐ sơ sinh

Tỷ lệ trẻ có cân nặng lúc sinh thấp là 69,7%. Tỷ lệ trẻ có biểu hiện toan xê tôn khi chẩn đoán là 60,6%.

Đặc điểm hóa sinh tại thời điểm chẩn đoán: HbA1C $7,8 \pm 2,8$ (%); C-peptide thấp (0-0,52 nmol/l; trung vị 0,08); glucose máu $35,9 \pm 11,3$ mmol/l.

Đột biến gen mã hóa kênh K_{ATP} có thể gây nên biểu hiện thần kinh: *KCNJ11* (1 bệnh nhân), *ABCC8* (1 bệnh nhân).

Mối liên quan giữa đột biến gen và biểu hiện lâm sàng: chưa tìm thấy mối liên quan giữa biểu hiện lâm sàng và đột biến gen. Có mối liên quan khá chặt chẽ giữa đột biến gen và phương pháp điều trị: những bệnh nhân có đột biến gen mã hóa kênh K_{ATP} đều điều trị thành công bằng SU thay thế cho insulin tiêm.

3. Kết quả điều trị

Tỷ lệ bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời là 24%. Trong đó tỷ lệ bệnh nhân do bất thường NST số 6 là 15%, do đột biến gen *KCNJ11* là 6% và do đột biến gen *ABCC8* là 3%.

Sau thời gian theo dõi dài nhất là 9 năm, chưa có bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời nào tái phát

Tất cả bệnh nhân có đột biến gen mã hóa kênh K_{ATP} đều điều trị thành công bằng thuốc uống sulfonylurea thay thế cho insulin tiêm.

Bệnh nhân điều trị bằng SU kiểm soát glucose máu và HbA1c tốt hơn khi điều trị bằng tiêm insulin: HbA1c cải thiện tốt hơn (thường trong giới hạn bình thường), glucose máu dao động ít hơn, tỷ lệ hạ glucose máu thấp hơn.

90,9% trẻ phát triển tâm thần vận động bình thường.

KIẾN NGHỊ

Cần xét nghiệm glucose máu cho tất cả những trẻ sơ sinh có cân nặng lúc sinh thấp <10 bách phân vị.

Xét nghiệm phân tích gen *ABCC8/KCNJ11* cho tất cả những trẻ có biểu hiện ĐTĐ sơ sinh trong năm đầu sau sinh.

Xét nghiệm phân tích gen *ABCC8/KCNJ11* cho bố và mẹ của những trẻ ĐTĐ trong năm đầu sau sinh có đột biến gen để có kế hoạch tư vấn di truyền và theo dõi phù hợp.

Cần theo dõi sát và lâu dài những trường hợp ĐTĐ sơ sinh tạm thời để xác định thời điểm tái phát và có phương pháp điều trị thích hợp.

ĐÓNG GÓP MỚI

Nghiên cứu toàn diện về nguyên nhân ở mức độ phân tử, kiểu gen, kiểu hình và kết quả điều trị đối với các bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh. Kết quả phân tích gen được ứng dụng trong thực hành lâm sàng để lựa chọn phương pháp điều trị thích hợp, cải thiện kết quả điều trị và góp phần tư vấn di truyền. Dữ liệu đột biến gen góp phần bổ xung cho dữ liệu ngân hàng gen ở trong nước và trên thế giới. Với những kiểu hình lâm sàng hiếm (ĐTĐ sơ sinh tạm thời), dữ liệu của nghiên cứu sẽ bổ xung cho dữ liệu của thế giới về tiến triển của bệnh.

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

1. Ngoc Thi Bich Can; Dung Chi Vu;...Hoan Thi Nguyen et al. Molecular genetics in children with neonatal diabetes at Vietnam National Hospital of Pediatrics. *Horm Res Paediatr* 2013;80(suppl 1). P2-d2-893. P278
2. CTB Ngoc, VC Dung, BP Thao et al. Transient neonatal diabetes: a report of three cases. *Pediatric Diabetes* (2013) 14 (Suppl. 18). P223. Page 137.
Travel award
3. Can Thi Bich Ngoc, Vu Chi Dung, Nguyen Ngoc Khanh et al. Molecular genetics and management of Vietnamese patients with neonatal diabetes mellitus: a case series report of 16 cases. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. Vol 29.2013. ISSN 0912-0122.
ETO prize
4. Ngoc Can Thi Bich, Dung Vu Chi, Thao Bui Phuong et al. The Result of Sulphonylureas Treatment in Patients with Neonatal Diabetes Mellitus due to *KCNJ11/ABCC8* gene mutations in Vietnam. *Horm Res Paediatr* 2014;82(suppl 1). P3-D3-728. P367.
5. Bich Ngoc Can Thi, Dung Vu Chi, Thao Bui Phuong et al. Neonatal Diabetes Mellitus: Clinical Feature and Outcome. *Horm Res Paediatr* 2015;84(suppl 1). P3-690. P357
6. Ngoc Can Thi Bich, Dung Vu Chi, Thao Bui Phuong et al. Transient Neonatal Diabetes Mellitus in Hanoi, Vietnam: Clinical Feature and Outcome. *Horm Res Paediatr* 2016;86(suppl 1). P1-P255. P225
7. Can Thi Bich Ngoc, Vu Chi Dung, Bui Phuong Thao et al. Phenotype, genotype of neonatal diabetes mellitus due to insulin gene mutation. *International Journal of Pediatric Endocrinology* 2015, 2015(Suppl 1):P12
8. Ngoc Thi Bich Can, Dung Chi Vu, Thao Phuong Bui et al. Neonatal diabetes mellitus: genotype, phenotype and outcome. *Ann Transl Med* 2015;3(S2)- **Chen award**
9. Cấn Thị Bích Ngọc và cs. Đột biến gen *ABCC8*, *KCNJ11*, *INS* và *ZFP57* ở các bệnh nhân tiểu đường sơ sinh. *Tạp chí Nhi khoa*, tập 3, số 3 &4, 2010, tr286-291.
10. Cấn Thị Bích Ngọc và cs. Nhân một trường hợp đái đường do đột biến gen Kir6.2 điều trị thành công với glibenclamide thay thế cho insulin. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 397, số đặc biệt, 2012, tr 405 – 411.
11. Cấn Thị Bích Ngọc và cs. Kết quả điều trị bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh do đột biến gen *KCNJ11* và *ABCC8* bằng sulfonylureas. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, tập 89, số 4, 2014, tr 23-31
12. Cấn Thị Bích Ngọc và cs. Đái tháo đường sơ sinh tạm thời: biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng, kết quả điều trị. *Tạp chí Nhi khoa*, tập 9, số 1, 2016, tr59-65.

**MINISTRY OF EDUCATION & TRAINING MINISTRY OF HEALTH
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**



CAN THI BICH NGOC

**STUDY OF GENE MUTATIONS, CLINICAL
AND MANAGEMENT OF NEONATAL
DIABETES MELLITUS**

Speciality : Pediatrics

Code : 62720135

SUMMARY OF MEDICAL PhD THESIS

HANOI - 2017

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

Scientific Supervisors:

A/Prof. Nguyen Thi Hoan. M.D, PhD

Reviewer 1: A/Prof. Nguyen Phu Dat

Reviewer 2: A/Prof. Tran Van Khoa

Reviewer 3: A/Prof. Do Trung Quan

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

At hour date month 2017

The thesis can be found at:

- Vietnam National Library
- Library of Hanoi Medical University

INTRODUCTION

1. Imperativeness of the study:

Neonatal Diabetes Mellitus (NDM) is defined as uncontrolled hyperglycemia that requires treatment with insulin and has an onset in the first 6 months of life. This is a rare disorder with frequency of 1/500,000 to 1/215,000 live births. NDM may take one of two forms, depending on the permanence of hyperglycemia: transient neonatal diabetes mellitus (TNDM) or permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM). The etiology of NDM is genetically heterogeneous, producing abnormal development or absence of the pancreas or islets, decreased β -cell mass secondary to increased β -cell apoptosis or destruction, and β -cell dysfunction that limits insulin secretion

NDM usually manifest nonspecific symptoms for a variety of illnesses such as gastrointestinal infections or respiratory infections and is often misdiagnosed or delay. The disease is often detected accidentally through blood tests or when there are complications of diabetes ketoacidosis. It will leave severe sequelae even death if not be treated promptly.

Management of diabetes in the infant is a challenge because infants cannot communicate effectively their symptoms of hypoglycemia or hyperglycemia and must rely on an astute caretaker to meet and recognize their needs. Moreover, when treatment for small infants requiring little insulin per day translate into very small doses that can be difficult to measure in a standard insulin syringe and small infant are sensitive to insulin.

Molecular diagnosis of patients with NDM is important in clinical practice. The results of the analysis will determine the treatment of NDM by insulin or oral sulfonylurea and prognostic value of the patient as well as other members of the patient's families. Treatment for patients with *ABCC8/KCNJ11* genes mutation can be transferred from subcutaneous insulin to oral sulfonylurea, so that it will improve quality of life, and reduce treatment costs for patients and families. TNDM

needs to be closely monitored to determine the remission period to avoid hypoglycemic complications due to overtreatment as well as to determine relapse.

In Vietnam, 40 patients were diagnosed with NDM from 2000 to 2017 and managed at National Children's Hospital (NCH) accounted 8.9% of diabetes mellitus before 15 years.

However, up to now, there has been no full-scale study of causes at molecular, genetic, phenotypic, and treatment outcomes in patients with NDM.

2. Aim of study:

- 1. To identify gene mutations of patients with NDM.*
- 2. To study correlation between genotype and phenotype of NDM*
- 3. To evaluate the outcome of NDM*

3. Thesis contributions for science and clinical practice

NDM is a rare disease. In recent years, modern molecular biology techniques have been developed that have been used in the diagnosis of NDM. More evidence suggests that genetic diagnosis improves treatment outcomes and prognosis of NDM. The patients with *ABCC8/KCNJ11* gene mutation can be treated with sulfonylurea. Treatment with sulfonylureas is simpler, more economical and it has a better glycemic control than insulin. However, in the world including Vietnam, up to now, no comprehensive study on NDM has been conducted on the large number of NDM patients. A study published in 2015 was conducted on the largest number of patients. A number of patients was 1020, but patients were gathered from 79 centers.

Therefore, we has not had a data on diagnosis and treatment for a bid number of patients in one center. This study was comprehensively conducted on NDM, providing relatively large data on etiology, clinical presentation and treatment of patients in one center. The data includes the types of mutations, genotypes, phenotypes that contribute to human genetic mutation data in Vietnam and in the world. Furthermore, in clinical practice, genetic mutation analysis helps clinical doctors to select the appropriate treatment. The study provides data on the

treatment of sulfonylureas in a large numbers of patients. The study also provides practical significance for rebuilding the regimen as well as optimizing the treatment of diabetes mellitus in infants and young children.

4. Structure of thesis:

Thesis has 121 pages (without references and appendix) including 7 parts:

- + Introduction: 2 pages
- + Chapter 1: overview 36 pages
- + Chapter 2: participants, materials and methods 15 pages
- + Chapter 3: results 28 pages
- + Chapter 4: discussion 37 pages
- + Conclusion: 2 pages
- + Recommendations and further studies in the future: 1 page

The thesis contains 20 tables, 4 graphs and 22 figures. References contain 112 papers in English and Vietnamese and several websites. Appendix contains: DNA Extraction protocol, Raven mark, Denver test protocol, Primer sequencing of *ABCC8*, *KCNJ11*, *INS EIF2AK3* genes; the list of patients and questionnaire

Chapter 1: OVERVIEW

1.1. Definition, term and pathophysiology

Neonatal Diabetes Mellitus (NDM) is defined as uncontrolled hyperglycemia that requires treatment with insulin and has an onset in the first 6 months of life, expanded to before 12 months of age recently.

Two type of NDM: TNDM and PNDM. Most of TNDM caused by imprinting defects on chromosome 6q24, has a remarkable clinical course, involving presentation in infancy, remission, and subsequent relapse. PNDM requires medical treatment for whole life.

TNDM pathophysiology: Genetic mutation is cause of TNDM in 90% of cases. Recent works suggests that the altered expression imprinted genes on chromosome 6 result in delay maturation of

pancreatic islets, β -cells and reduced insulin secretion. It caused a reduce intrauterine insulin secretion, which as growth factor. That is why the patient with NDM were born with intra uterous growth retardation. The main cause is a mutation in the single allele region on chromosome 6, mainly associated with overexpression of at least two imprinted genes, PLAGL1 (Pleomorphic adenoma gene-like 1) and HYMAI (imprinted in hydatidiform mole). For PLAGL1/HYMAI only the paternal copies of both genes are normally expressed in fetal tissues, the maternal copies are silent as a result of differential methylation of the promoter. Any genetic or epigenetic mechanism that results in overexpressing of these genes causes TND.

PNDM pathophysiology: normally, glucose is transported into the β cell by GLUT-2. Glucokinase phosphorylates glucose to glucose-6-phosphate as the rate-limiting enzyme in glucose metabolism. Glycolysis increases the ATP/ADP ratio, sensed by the K_{ATP} channels. Increase of the ATP/ADP ratio leads to K_{ATP} channel closure, followed by membrane depolarization resulting in opening of VDCC (voltage-dependent calcium channels). Influx of calcium triggers exocytosis of insulin. Within the nucleus, different transcription factors regulating insulin synthesis are shown. Defective GLUT-2 results in decreased glucose influx into the β cell. Glucokinase deficiency leads to impaired glucose phosphorylation, which reduces the generation of ATP. Activating mutations of the genes encoding the two subunits SUR1 and Kir6.2 of the pancreatic K_{ATP} channel result in channel opening. Increased potassium outflow leads to hyperpolarization and stabilization of the membrane potential, thus blocking insulin exocytosis. Mutations in the *INS* gene cause abnormal proinsulin processing within the endoplasmic reticulum, leading to β -cell toxicity. Mutations in genes encoding transcription factors *PDX1*, *PTF1A*, *RFX6*, *GLIS3*, *PAX6*, *NEUROD1* and *NEUROG3* cause abnormal development of pancreas or endocrine cells,.

1.2. Clinical and gene mutations

TNDM: Intrauterine growth retardation (IUGR) is usually present. The high rate of IUGR is in keeping with the crucial role of insulin in fetal growth, especially during the last trimester of pregnancy. Hyperglycemia, failure to thrive and, in some cases, dehydration occur after birth. Insulin production is inadequate, requiring exogenous insulin therapy. Tests are negative for anti-islet antibodies and for HLA class II haplotypes conferring susceptibility to type 1 diabetes. Most patients recover within a year but a few have persistent glucose intolerance and/or recurrence of diabetes in late childhood or adulthood. Another feature noted in the neonatal period by many authors is macroglossia. This was found in 1/3 of cases in the series of Temple *et al* and was not related to any specific genetic mechanism. An umbilical hernia is also occasionally described. Growth-retarded infants present within the first few days of life with hyperglycemia, dehydration, and minimal ketosis. Endogenous insulin levels are low or undetectable, and exogenous insulin is usually required for a mean duration of 3 months. The condition resolves by 18 months of age, but type 2 diabetes may recur in early adulthood. Insulin levels were low or undetectable at presentation but ketonuria was usually absent. There was no association with HLA antigens common in type 1 diabetes and there was no evidence that TND was the result of autoimmunity. Islet cell antibodies were negative

PNDM: The majority of patients with mutations in *KCNJ11* have PNDM rather than TNDM (90 vs. 10%). Mutations in *ABCC8* cause TNDM more frequently (66%). There are no significant differences between the two subtypes of neonatal diabetes regarding the severity of intrauterine growth retardation or the age at diagnosis of diabetes. Patients with K_{ATP} channel mutations typically show milder intrauterine growth retardation and are diagnosed slightly later than patients with 6q24 abnormalities, indicating a less severe insulin deficiency during the last months of intrauterine development and at the time birth. In K_{ATP} -TNDM patients, diabetes usually remits later and relapses earlier

than in 6q24-TNDM. Presenting clinical features in patients with K_{ATP} channel activating mutations suggest insulin dependency, with low or undetectable C-peptide levels and frequent presentation with diabetic ketoacidosis (54). In addition to diabetes, about 20% of patients with mutations in *KCNJ11* were initially found to present with associated neurological features (7, 54, 55) in keeping with the expression of K_{ATP} channels in neurons and muscle cells. The most severe defect included marked developmental delay and early-onset epilepsy and became known as DEND (developmental delay, epilepsy, and neonatal diabetes) syndrome. An intermediate DEND syndrome characterized by neonatal diabetes and less severe developmental delay without epilepsy is more common. Neurological features were considered less frequent and usually milder in patients with mutations in *ABCC8*. However, a recent study suggested that mild neurodevelopmental abnormalities, including developmental coordination disorder (particularly visual-spatial dyspraxia) or attention deficits, might be found on detailed testing in all patients with K_{ATP} channel encoding gene mutations. Heterozygous coding mutations in the *INS* gene are the second most common cause of PNDM after K_{ATP} channel encoding gene mutations. The mutation usually results in a misfolded proinsulin molecule that is trapped and accumulated in the endoplasmic reticulum, leading to endoplasmic reticulum stress and β -cell apoptosis. The severity of intrauterine growth retardation in patients with heterozygous *INS* mutations is similar to that of patients with K_{ATP} channel mutations. In contrast, diabetes presents at a slightly later age although the ranges overlap greatly and patients do not present with neurological features as a direct consequence of the mutation. The majority of heterozygous *INS* mutations are sporadic *de novo* mutations. Only about 20% of probands have a positive family history of autosomal dominant neonatal diabetes. Occasionally, *INS* mutations cause permanent diabetes after 6 months of age and therefore genetic testing should be considered in certain situations, especially in patients with antibody-negative type 1 diabetes. In addition to heterozygous *INS* mutations, homozygous or compound

heterozygous mutations causing neonatal diabetes have also been described. Biallelic mutations do not cause slowly progressive β -cell destruction but result in a lack of insulin biosynthesis before and after birth, which explains much lower birth weights and earlier presentation of diabetes in affected children. As the disease is recessively inherited, there is a 25% recurrence risk in siblings but, in the absence of consanguinity, a very low risk for the offspring of a patient.

1.3. Treatment

Treatment based on pathogenesis. In the early stages after diagnosis or ketoacidosis, patients were treated with insulin. The patients with *ABCC8/KCNJ11* gene mutation were transferred to oral sulfonylurea (SU) from subcutaneous insulin injection. The patients with abnormal of chromosom 6 were closely monitored to determine the remission period and relapse. Other patients were treated with insulin.

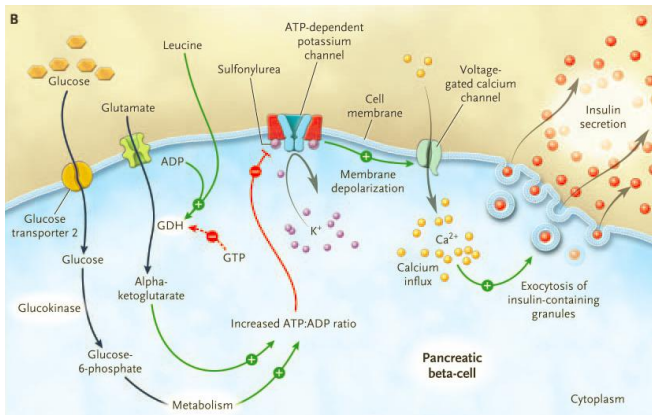


Figure 1.1. Regulation of Insulin Secretion and mechanism of SU action

SU bind to the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel, closing mutant K_{ATP} channels, which results in membrane depolarization. This process triggers the opening of voltage-gated calcium channels, causing calcium influx and a small increase in insulin release.

1.4. Outcome of treatment

Due to the rare disease, the number of patients monitored and treated in one center were low. Most of the studies were case reports or series cases with small sample size. Therefore, it is very difficult to evaluate the long-term outcome on a large number of patients which can be represented for NDM.

Many studies have confirmed the efficacy of SU

Chapter 2: PARTICIPANTS AND METHODS

2.1. Participants

From January 2000 to January 2017, 40 patients diagnosed and treated at the Department of Endocrinology, Metabolism and Genetics-NCH were recruited in the study. Included criteria were hyperglycemia onset before 12 months of age, fasting blood glucose ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) (Fasting is defined as no caloric intake for at least 4h with children 0-1 year old) or casual plasma glucose concentration ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dl). Hyperglycemia lasting at least 2 weeks required insulin for treatment. Patients and families agree to participate in the study. Excluded criteria were hyperglycemia due to glucose infusion, infection, patients and their families did not agree to participate in the study.

2.2. Method

This is cases series study investigating identification of gene mutations, phenotype (clinical and biochemistry), intervene treatment and outcome.

2.2.1. Identification of gene mutations and genotype analysis

Mutation analysis was performed at molecular genetic laboratory, Medical school, University of Exeter, UK.

Blood samples were taken when informed consent was obtained from the patients and their parents. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using phenol/chloroform methods at NCH.

The single exon of *KCNJ11* was amplified in three overlapping fragments, as previously described. The 39 exons of *ABCC8* were

analyzed in all patients in whom no *KCNJ11* mutation was identified. The *ABCC8* gene was amplified in 38 fragments using previously described primers (7). PCR products were sequenced using standard methods on an ABI 3100 or ABI 3730 (Applied Biosystems, Warrington, U.K.). Sequences were compared with the published sequences ([*KCNJ11* _NM_000525.3] [*ABCC8* _NM_000352.2]) using Staden analysis or Mutation Surveyor version 2.61.

If sequence analysis of the *KCNJ11*, *ABCC8* genes did not identify a pathogenic mutation, analysis of the coding regions and conserved splice sites of the *INS*, *INSR*, *EIF2AK3*, *FOXP3*, *GATA4*, *GATA6*, *GCK*, *GLIS3*, *HNF1B*, *IER3IP1*, *PDX1*, *PTF1A*, *NEUROD1*, *NEUROG3*, *RFX6*, *SLC2A2*, *SLC19A2*, *WFS1* and *ZFP57* genes by targeted next generation sequencing (Agilent custom capture v5/Illumina HiSeq; reference sequences at www.exeterlaboratory.com/genetics/tngs). This assay can also detect partial/whole gene deletions and duplications (Ellard *et al* 2013 *Diabetologia* 56: 1958-1963). Mutation confirmation by Sanger sequencing.

If any mutation was identified, PCR-methylation will be used to identify mutation on chromosome 6 for specific locus: TND, GRB10, PEG1/MEST, KCNQ1OT1, H19, DLK1 (14q32), SNRPN (15q12), PEG3/ZIM2, and NESPAS/GNAS-AS1 (20q13.2).

Identified mutations were compared with Human Gene Mutation database (HGMD)(<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Unreported identified variants were compared with 1000 genomes database at "Mutation Taster". <http://www.mutationtaster.org>.

2.2.2. Clinical study

Clinical phenotype, biochemistry tests were performed at NCH. Data included pedigree, natural history, examination including weight, height, symptoms of DKA (tachypnea, dehydration, lethargy, coma) and other symptom such as convulsion, jaundice, macroglossia, umbilical hernia, psychomotor development delay, ...

Biochemistry testing: Blood glucose and HbA1C were measured by automated Beckman Coulter AU2700/ AU 680 system. The specimen

was taken early in the morning when the patient waked up or when the patient visits. Hexokinase technology with ORS 6221 reagent of OLYMPUS and ORS6192 reagent were used for blood glucose test and HbA1c test, respectively. Insulin and C-peptide were measured using immunoassay chemiluminiscent technology by automated biochemistry Hitachi 704; Arterial blood gas was measured by spectrometry method, using GEM primer 300. Capillary glucose level were measured at home by One Touch Ultra using electrochemistry method. Continuous 24-hour glucose measurement in seven days was monitored by using Ipro.

2.2.3. Treatment

The patients with *ABCC8/KCNJ11* gene mutation were transferred from subcutaneous insulin injection to oral sulfonylurea. The initial dose of SU is 0.1 mg/kg/dose x2 dose/day, test capillary blood glucose before breakfast and dinner, if the result $> 7\text{mmol/l}$ \rightarrow increasing SU dose 0,1mg/kg and keep the insulin dose intact, if the result $< 7\text{mmol/l}$, decreasing insulin dose by half. This process continues until insulin is completely stopped.

Capillary glucose level were determined in all patients 5 time/day (before breakfast, lunch, dinner, 22h and 2h), HbA1C was checked in 3 months interval. Raven test was applicated for patients aged more than 6 years old and Denver II test was used for patients age under 6 years old.

Blood glucose level and HbA1C level were by using the guiderline of international society of Pediatrics and Aldolescent Diabetes (ISPAD) in 2014.

+ Evaluate the psychomotor development: normal (IQ/DQ) $\geq 75\%$, mild development delay (IQ/DQ): from $> 66,7$ to $< 75\%$, moderate development delay (IQ/DQ) from > 50 to $\leq 66,7\%$, and severe (IQ/DQ) $\leq 50\%$)

2.2.4. Statistical analysis

These analyses were performed using SPSS version 12.0 (SPSS Inc.,

Chicago, Illinois). Data were expressed as rates, median and range. Continuous variables were analyzed using ANOVA or Kruskal-Wallis tests. Rates were compared using Fisher's exact tests. With $P < 0.05$ or the corresponding Bonferroni-adjusted P value when multiple comparisons are made, deemed significant.

2.2.5. Ethical approval: protocol was approved by Ethical committee of NCH. Informed consent was obtained from all participants.

Chapter 3: RESULTS

3.1. Identification of gene mutations

40 patients (22 males, 18 females): 33 patients had gene mutation (82.5%). The study focused on the analysis of 33 patients with genetic mutations. The mutation genes include of *ABCC8* (33.3%), *KCNJ11* (27.3%), *INS* (18.2%), 6q24 (15.2%), *EIF2AK3*(3%), *FOXP3* (3%). In 33 patients, 9 patients (27.2%) had TNDM and 24 patients (72.7%) had PNDM.

Bảng 3.1. Clinical characteristics at diagnosis

Clinical	<i>ABCC8</i> (n=11)	<i>KCNJ11</i> (n=9)	<i>INS</i> (n=6)	6q24 (n=5)	P (test Kruskal- Wallis)
GA (week)	39.8± 0.4	39.0 ±1.4	37.3± 3.0	38.5± 3.0	0.076
BW(kg)	2.9 ±0.36	2.65± 0.5	2.8 ±0.76	2.25± 0.33	0.226
BW ≤10 th (n)	7	8	2	4	
Diagnosis age (day)	54.5 ±24.8	64.3 ±43.9	14 – 357 Trung vị 101.5	23.8 ±11.4	0.076
DKA (n)	6	8	5	1	
Neurological symptoms (n)	1	1	0	0	
pH	7.14± 0.2	7.06 ±0.16	7.04± 0.22	7.16± 0.25	0.618
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	8.0± 6.6	1-28.9 median 3.85	2-22.4 Median 2.65	15.1 ±10.5	0.216
BE (mmol/l)	-17.8 ±8.4	-19.6± 11.9	-19.6 ±11.2	-4.55 ±0.49	0.296
Glucose (mmol/l)	30.8± 11.6	39.1± 9.9	34.2 ±12.7	37.8± 12.2	0.462
HbA1C (%)	7.9 ±2.4	8.64 ±3.03	9.8± 3.6	6.87 ±1.04	0.206
C-peptide (nmol/l)	0.01 -0,52 Median 0.08	0.0002-0.3 Median 0.085	0.088 ±0.082	0.03 -0.17 Median 0.41	0.913
Ketonurine (+) (n)	7	5	5	3	

Comment: there was no significant difference among groups in term of clinical characteristics.

3.1.1. *ABCC8* gene mutation

In 11 patients with *ABCC8* gene mutation, 11 mutations were identified: c.3547C>T (p. R1183W), c.3458C>G (p.A1153G), c.1303T>C(p.C435R), c.3596C>T (p.P1199L), c.4139G>A (p.R1380H), c.1793G>A (p.R598Q), c.2476C>T (p.R826W), c.2239G>T(p.E747X), c.382G>A(p.E128K)/c.2239G>T(p.E747X),

c.4519G>C(p.E1507Q)/c.3403-1G>A (p?). Among them, there were 4 novel mutations: p.E747X, p.A1153G, p. E1507Q, p.R598Q.

3.1.2. *KCNJ11* gen mutation

In 9 patients with *KCNJ11* gene mutation, 7 mutations were identified: c.602G>A (p. R201H), c.601C>T (p.R201C), c.149G>A (p.R50Q), c.875A>G (p.E292G), c.685G>A (p.E229K), c.553A>C (p.K185Q), c.157G>A (p.G53S).

3.1.3. *INS* gene mutation

4 different genotypes identified in 6 patients with *INS* gen mutation were de novo mutation: c.157G>A (p.G53S), c.286T>C (p.C96R), c.265C>T(p.R89C), c.188-31G>A (p?). In these mutation, one novel mutation was c.127T>A p.C43S.

3.1.4. 6q24 anomalies

Five patients had complete loss of maternal methylation at the TND differentially methylated region on chromosome 6q24. Five difference bi-parental inheritance mutations in *ZFP57* gene were identified in two patients: c.7450delT/c.7812C>T, c.398delT (p.L133HfsX49)/c.760C>T(p.L254F)/c.499C>T (p.R167C); one patient had *PLAGL1* gene mutation; one patient had maternal hypomethylation at the *GRB10* and *PEG3* loci, other patient had maternal hypomethylation at the TND (6q24) *GF2R* (6q27), *SNRPN* (5q11), *GRB10* (7p12);

3.1.5. Gene mutation in rare syndromes

Patient No7 was homozygous for a *EIF2AK3* missense mutation, p.R632W inherited from parents in Wolcot – Rallison syndrome. Patient No29 had X-link missense mutation which was c.1133C>T inherited from his mother.

3.2. Correlation between genotype – phenotype of patients with NDM

3.2.1. Neonatal diabetes mellitus due to *ABCC8* gene mutation

Table 3.2. Clinical, laboratories of patients with *ABCC8* gene mutation

Pt	Genotype	Clinical feature and laboratories at diagnosis									
		Age days	BW Percentile	DKA	Neuro symptom	Glucose mmol/l	pH	HCO ₃ - mmol/l	BE mmol/l	HbA1C %	Remission months
3	p.R1183W	45	<3	-	-	28,2	7,34	15	-9,5	5,8	
4	p.E747X	36	<3	-	+	30,9	7,36	4	-18	8	
5	p.E128K/ p.E747X	44	50	severe	-	26,2	7,03	3,7	-25,1	10,3	
13	p.A1153G	15	<3	mild	-	22,4	7,3	13	-15,4	3,5	
14	c.3403-1G>A /p.E1507Q	96	<3	severe	-	47,7	6,99	4,3	-26	6,7	
23	p.C435R	71	>10	severe	-	25,6	7,1	6,3	-22	7,2	
24	p.R1183W	36	>10	severe	-	31,7	7,08	3,3	-26	7,6	6
25	p.P1199L	48	3	-	-	13,1	7,44	23	-0,8	8,2	
27	p.R1183W	82	10	severe	-	30	6,89	5,1	--	11,5	14
32	p.R1380H	72	>10	severe	-	53,1	6,90	3	--	8,7	
33	p.R598Q/ p.R826W	33	10	Mild	-	50,1	7,29	18	-8,8	4	

Note: red colour is novel mutation “--” : very low, , “-” not available, “+” yes, “DKA”: diabetes ketoacidosis, “Neuro”: Neurological

Comment: Most patients were diagnosed before 90 days of age (10/11) and presented with ketoacidosis (8/11).

3.2.2. Neonatal diabetes mellitus due to *KCNJ11* gene mutation

Bảng 3.3. Clinical, laboratories of patients with *KCNJ11* gene mutation

Pt	Genotype	Clinical feature and laboratories at diagnosis									
		Age day	BW percentile	DKA	Neuro feature	Glucose mmol/l	pH	HCO ₃ ⁻ mmol/l	BE mmol/l	HbA1C (%)	Remission months
1	p. R201H	44	<3	severe	-	49.5	7.12	-	-22.7	9.7	
2	p.R201C	37	<3	severe	+	31.2	6.9	1	--	8.4	
10	p.R50Q	160	70	severe	-	37.2	6.9	1.9	-28.2	13.7	6
12	p.R201C	7	<3	Mild	-	26	7.2	21	-5.7	5.4	
15	p.E292G	45	10	-	-	39.3	7.35	28.9	3.2	6	
16	p.E229K	52	3	severe	-	43.1	6.9	4	-28.7	5.1	50
26	p.R201H	62	10	severe	-	41.6	7.06	3.7	-26.6	10.2	
28	p.K185Q	72	<3	severe	-	27.8	6.86	3.6	-28.5	9.3	
30	p.G53S	100	10	moderate	-	56	7.2	5.4	-19.9	11.0	

Note: "--": very low, "-": not available, "+" yes, "Pt" patient "BW": Birth weight, "DKA": Diabetes Ketoacidosis "Neuro": Neurological

Comment: More than a half of patients were diagnosed before 2 months of age (5/9), low birth weight < 10 percentild (8/9) and presented with ketoacidosis (8/9).

3.2.3. Neonatal diabetes mellitus due to *INS* gene mutation

Table 3.4. Clinical feature and laboratories of patients with *INS* gene mutation

Pt	Genotype	Clinical feature and laboratories at diagnosis							
		Age (day)	Birth weight percentile	DKA	Glucose (mmol/l)	pH	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	BE (mmol/l)	HbA1C (%)
7	p.C43S	180	50	severe	24	6.8	2.3	--	8.3
9	c.188-31G>A (p?)	133	40	severe	34.7	6.9	2	-28.9	12.8
18	c.188-31G>A (p?)	70	10	severe	54	7.14	3.6	-23.2	8.5
19	p.C96R	357	50	Moderate	21	7.23	2	-23	11.4
21	p.R89C	21	10	-	44.4	7.35	21.4	-3.3	3.9
22	p.R89C	14	50	Severe	27.8	6.8	3	--	13.6

Note: "pt": patient, "--": very low, "-": no, "DKA": Diabetic ketoacidosis

Comment: Most of patients did not have low birth weight. 5/6 patients presented with ketoacidosis at diagnosis.

3.2.4. Neonatal diabetes due to disorder of chromosom 6

Table 3.5. Clinical, laboratories of patients with chromosom 6 alteration

Patient	Genotype	Clinical feature, laboratories at diagnosis									
		Age (day)	Birth weight (percentile)	Ketoacidosis	Glucose (mmol/l)	pH	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	BE (mmol/l)	HbA1C(%)	Macroglosia, exumblication	Remission (month)
6	c.7450delT c.7812C>CT	23	20	-	30				6.8	+	18
8	TND (6q24), GF2R(6q27), SNRPN(5q11)GRB 10 (7p12)	40	<3	-	31.1	7.32	21.2	-4.2	8.3	+	5,5
11	c.398delT c.499C>CT c.760C>CT	15	<3	-	56	7.3	20.7	-4.9	5.8	+	5
20	GRB10 & PEG3	11	<3	Severe	31	6.8	3	--	6.6	+	5.5
31	PLAGL1	13	<3	-	44				3.6	+	3

Comment: 4/5 patient had low birth weight < 3 percentile. 4/5 patients presented ketoacidosis at diagnosis.

3.3. Management outcome

3.3.1. Blood glucose control

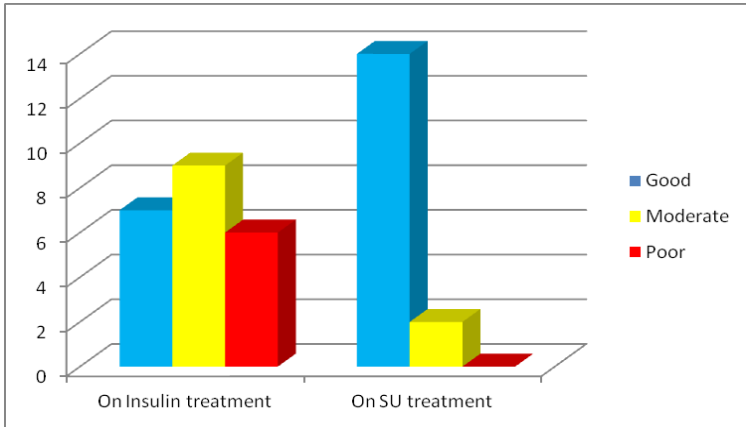


Figure 3.1. Blood glucose control in PNDM

Comment: On insulin treatment, 18.7% patients had poor glyceimic control. Meanwhile no patient had poor glyceimic control when using SU treatment.

3.3.2. Glycemic control

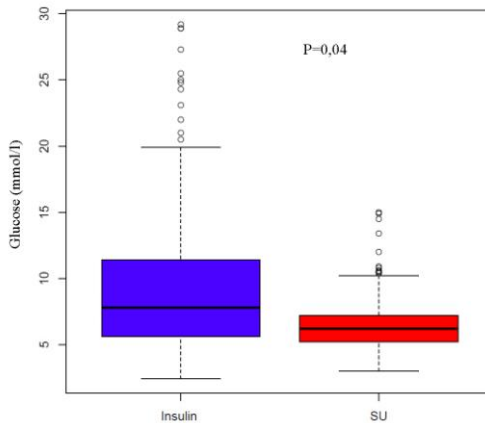


Figure 3.2. The glycemic control on insulin and SU treatment

Comment: glycemin control on SU treatment was better than that on insulin treatment.

3.3.3. HbA1C level on insulin treatment and SU treatment

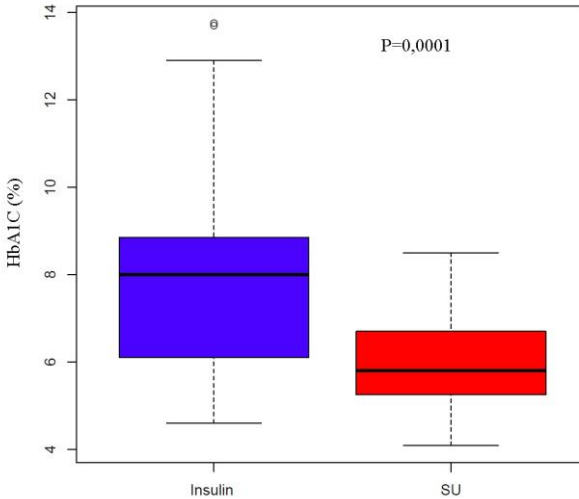


Figure 3.3. Reduction in HbA1C levels associated with switching from Insulin to sulfonylurea therapy

Comment: HbA1C levels of patients with insulin treatment were significantly higher than that in patients with SU treatment ($p=0.0001$).

3.3.4. Psychomotor development

Table 3.18. Psychomotor development results of patients

Mutation	Normal psychomotor development		Moderate/Severe psychomotor development delay	
	N	%	N	%
<i>ABCC8</i>	10	90.9	1	9.1
<i>KCNJ11</i>	8	88.9	1	11.1
<i>INS</i>	6	100	0	0
<i>6q24</i>	4	80	1	20
<i>EIF2AK3</i>	1	100	0	0
Tổng	29	90.6	3	9.4

Comment: Frequency of patients with severe psychomotor development delay was high of 9.4%. 100% patients with *INS* mutation were normal psychomotor development.

Chapter 4: DISCUSSION

4.1. Identified gene mutation in neonatal diabetes patients

In our comprehensive mutation analysis of a large cohort of 40 patients with NDM enrolled at NCH, we identified gene mutations in 33 patients (82.5%). Mutation genes identified in our cohort included: *ABCC8* (33.3%), *KCNJ11* (27.2%), *INS* (18%), *6q24* (15%), *EIF2AK3*(3%), *FOXP3*(3%). Frequency of patients who was diagnosed before 6 months of age were 96.9% (32/33) with the mean age of 54.7 ± 42.3 days, one case was diagnosed within 6-12 months in the age of 357 days, accounting 3.0%. The identified mutation rate in our study was similar to that in Ukrainian and Chinese studies, but higher than that in Slovakia study. In 33 patients identified genetic mutations, genes encoding a subunit of K_{ATP} channel was common cause of NDM. Among gene mutations encoded K_{ATP} , *KCNJ11* gene mutation was the highest. This difference may be due to ethnicity, race, or size of study sample. The size of study sample was not enough large, unbalanced between studies and not representative for the population.

4.2. Correlation between gene mutation and clinical characteristics

About birth weight (BW), the results from Table 3.1 show that the mean BW of patients with *KCNJ11*, *ABCC8* mutations, and abnormal of chromosome 6 was about 10 percentile compared to gestational age and gender. While BW of patients with *INS* gene mutation was normal. In these groups, the BW of patients with chromosome 6 abnormal was the lowest. However, difference was not statistically significant with $P < 0.05$.

About age of diagnosis, the results from table 3.1 showed that the age at diagnosis of patients with chromosome 6 abnormal was the lowest. It was consistent with the results of Flanagan et al 2007.

However, our patients was diagnosed later due to unclear symptoms. Patients may be mistaken for infection before being diagnosed with diabetes.

In our study, the age of patients with chromosome 6 abnormal was the earliest with 17-40 days old. The diagnosis age of patient with *ABCC8*, *KCNJ11* and *INS* gene mutation were 15-96, 7-160 and 14-357 days of age, respectively. Thus, the age of diagnosis varied widely among mutation groups, but this difference is not statistically significant and may be due to small sample size.

About clinical feature and laboratories, the results from table 3.7 showed that high frequency (8/9) of patients with *KCNJ11* gene mutation presented with DKA at diagnosis while only one-fifth of patients with chromosome 6 abnormal presented with DKA. This was consistent with the fact that diagnosis age of patients with *KCNJ11* mutation were the latest. Due to delay of diagnosis, the patients were usually diagnosed with NDM when they had severe DKA.

4.3. Treatment outcome

In our study, 100 patients with *ABCC8/KCNJ11* were successfully transferred from insulin injection to oral SU. Among them, there were 4 patients with TNM. After transferring to SU, glycemic and HbA1C control were clearly improved and the difference was statistically significant with $P < 0.05$ (figure 3.2). On SU treatment blood glucose was more stable, less fluctuating, and HbA1C was quite normal (figure 3.2 and figure 3.3). Pearson et al assessed glycemic control in 49 consecutive patients with Kir6.2 mutations who received appropriate doses of sulfonylureas. 44 patients (90 percent) successfully discontinued insulin after receiving sulfonylureas. HbA1C levels were improved in all patients who were switched to sulfonylurea therapy (from 8.1 percent before treatment to 6.4 percent after 12 weeks of treatment, $P < 0.001$).

The results from figure 3.1 showed that 26.1% patients had poor glycemic control on insulin treatment. This proved that control of blood glucose and HbA1C in young children was extremely difficult and

complicated. Because young children breast feeding or eating continuously, it was very difficult to control blood glucose after meal. Moreover, young children are usually sensitive to insulin so that they are prone to have hypoglycemia after using rapid-acting insulin. In our study, after transferring to SU treatment, the results of glycemic and HbA1C control clearly were improved and this difference was statistically significant with $P < 0.05$.

The results from table 3.6 showed that the rate of patients with psychomotor development delay was 9.4%. Among them, there were two patients with *KCNJ11/ABCC8* gene mutation presented with clinical presentation of DEND syndromes and one patient with loss of methylation on TND loci (6q24), *GF2R* (6q27), *SNRPN* (5q11), *GRB10* (7p12) presented encephalitis during diabetic treatment. Retarded psychomotor development in two patients with DEND syndrome could be caused by the mutation itself or combined disease.

Glyon et al studied on 10 proband with *KCNJ11* mutation. Among them, there were 3 patients having neurological feature in DEND syndrome. However, 2/3 these patients presented with severe DKA with pH of 6.9, 1/3 case presented with mental retardation with poor glycemic control with high level HbA1C of 13%. Therefore, the cause of neurological disorders can be due to: 1) a direct effect of the mutated channel altering channel function in muscle, axon and cortex; 2) an acute consequence of the neonatal diabetes such as severe hypoglycaemia (ketoacidosis) and very severe hyperglycemia; 3) the long-term impact of diabetes either diabetes-specific complications or repeated severe hypoglycaemia or 4) neurological features unrelated to either the Kir6.2 channel subunit or diabetes.

CONCLUSIONS

1. Identified gene mutation of neonatal diabetes mellitus

- The rate of gene mutation in NDM was 82.5%.
- The mutation genes causing NDM included of *ABCC8* (33.3%), *KCNJ11*(27.3%), *INS* (18.2%), chromosom 6 (15.2%), *EIF2AK3*(3.0%), *FOXP3*(3.0%).

- Identified 11 mutations on *ABCC8* gene, 7 mutations on *KCNJ11* gene, 4 mutations on *INS* gene, 1 mutation on *EIF2AK3* and 1 mutation on *FOXP3* gene. Among them there were 4 novel mutation on *ABCC8*: nonsense p.E747X, misense p.A1153G, p.E1507Q, p.R598Q and one novel mutation on *INS* gene: p.C43S

2. Phenotype and correlation phenotype-genotype

The rate of patients with IURG was 69.7%
96.9% patients were diagnosed before 6 months of age. Most of them was diagnosed in the first 3 months of age.

The rate of patients presented with DKA was 60.6%

At diagnosis: HbA1C 7.8 ± 2.8 , blood glucose 35.9 ± 11.3 and C-peptide 0-0.52 nmol/l (median 0.08)

There was not yet correlation between gene mutations and clinical characteristics.

There was a strong correlation between genetic mutations and ability to transfer to SU. Patients with *ABCC8/KCNJ11* can be transferred to SU treatment from insulin.

3. Management outcome

- The rate of TND was 24%. The cause of TND was chromosome 6 abnormal of 15%, *KCNJ11* gene mutation of 6% and *ABCC8* gene mutation of 6%. After the longest follow-up of 9 years, there was no relapse in TND patient.

- 100% patients with *ABCC8/KCNJ11* were successfully switched to oral SU from insulin..

- The glycemc and HbA1C control on SU treatment was better than that on insulin treatment.

- 90.9% patients had normal psychomotor development,

RECOMMENDATIONS

- Blood glucose testing and follow up are needed for all infants with low birth weight <10 percentile
- It is necessary to performed genetic testing for *ABCC8/KCNJ11* in any patient diagnosed with diabetes before 12 months of age
- *ABCC8/KCNJ11* gene mutation analysis for parents of patients with NDM is needed to have a suitable genetic counseling and follow-up plan

NEW CONTRIBUTIONS

This study was comprehensive conducted on molecular genetic cause, phenotype, genotype and management outcome of NDM. Genetic analysis results were used in clinical practice to select appropriate treatments, improve treatment outcomes, and contribute to genetic counseling.

LIST OF PUBLICATIONS RELATED WITH THESIS

1. Ngoc Thi Bich Can; Dung Chi Vu; Thao Phuong Bui; Khanh Ngoc Nguyen; Dat Phu Nguyen; Hoan Thi Nguyen; Maria Craig; Sian Ellard. Molecular genetics in children with neonatal diabetes at Vietnam National Hospital of Pediatrics. *Horm Res Paediatr* 2013;80(suppl 1). P2-d2-893. P278
2. CTB Ngoc, VC Dung, BP Thao, NN Khanh, NT Hoan, DJ Mackay, IK Temple & M Craig. Transient neonatal diabetes: a report of three cases. *Pediatric Diabetes* (2013) 14 (Suppl. 18). P223. Page 137. **Travel award**
3. Can Thi Bich Ngoc, Vu Chi Dung, Nguyen Ngoc Khanh, Bui Phuong Thao, Nguyen Phu Dat, Nguyen Thi Hoan, Sarah Flanagan, Sian Ellard, Deborah Mackay, Maria Craig. Molecular genetics and management of Vietnamese patients with neonatal diabetes mellitus: a case series report of 16 cases. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. Vol 29.2013. ISSN 0912-0122. **ETO prize**
4. Ngoc Can Thi Bich, Dung Vu Chi, Thao Bui Phuong, Khanh Nguyen Ngoc, Dat Nguyen Phu, Sian Ellard, Maria Craig, Hoan Nguyen Thi. The Result of Sulphonylureas Treatment in Patients with Neonatal Diabetes Mellitus due to *KCNJ11/ABCC8* gene mutations in Vietnam. *Horm Res Paediatr* 2014;82(suppl 1). P3-D3-728. P367.
5. Bich Ngoc Can Thi, Dung Vu Chi, Thao Bui Phuong, Khanh Nguyen Ngoc, Maria Craig, Sian Ellard, Hoan Nguyen Thi. Neonatal Diabetes Mellitus: Clinical Feature and Outcome. *Horm Res Paediatr* 2015;84(suppl 1). P3-690. P357
6. Ngoc Can Thi Bich, Dung Vu Chi, Thao Bui Phuong, Khanh Nguyen Ngoc, Louise Docherty, Sian Edwards, Deborah Mackay, Karen Temple, Sian Ellard. Transient Neonatal Diabetes Mellitus in Hanoi, Vietnam: Clinical Feature and Outcome. *Horm Res Paediatr* 2016;86(suppl 1). P1-P255. P225
7. Can Thi Bich Ngoc, Vu Chi Dung, Bui Phuong Thao, Nguyen Ngoc Khanh, Nguyen Phu Dat, Maria Craig, Sian Ellard, Nguyen Thi Hoan. Phenotype, genotype of neonatal diabetes mellitus due to insulin gene mutation. *International Journal of Pediatric Endocrinology* 2015, 2015(Suppl 1):P12
8. Ngoc Thi Bich Can, Dung Chi Vu, Thao Phuong Bui, Khanh Ngoc Nguyen, Sarah Flanagan, Sian Ellard, Maria Craig, Dat Phu Nguyen, Hoan Thi Nguyen. Neonatal diabetes mellitus: genotype, phenotype and outcome. *Ann Transl Med* 2015;3(S2)- **Chen award**
9. *Journal of Pediatrics*, volume 3, number 3 &4, 2010, tr286-291, title: “*ABCC8, KCNJ11, INS and ZFP57 gene mutations in neonatal diabetic mellitus patients*”
10. *Journal of Vietnam Medicine*, volume 397, special number, 2012, page 405 – 411, title: “Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with neonatal diabetes mellitus due to Kir6.2 mutation: a case report”
11. *Journal of Medical Research*, volume 89, number 4, 2014, p 23-31, Title: “*Treatment results of patients with neonatal diabetes mellitus due to KCNJ11/ABCC8 gene mutations by sulfonylureas*”.
12. *Journal of Practical medicine*, volume 945, 2014, page 203-207, title: “Neonatal diabetes mellitus: gene mutations and treatment outcome”.
13. *Journal of Pediatrics*, volume 9, number 1, 2016, page 59-65, title: “*Transient neonatal diabetes: clinical characteristic, laboratories and treatment outcome*”