

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐINH THÚY LINH

CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH
BỆNH LOẠN DƯỠNG CƠ DUCHENNE
BẰNG KỸ THUẬT MICROSATELLITE

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐINH THUYẾT LINH

**CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH
BỆNH LOẠN DƯỠNG CƠ DUCHENNE
BẰNG KỸ THUẬT MICROSATELLITE**

Chuyên ngành: Sản phụ khoa

Mã số: 62720131

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Nguyễn Đức Hình

HÀ NỘI - 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đinh Thuý Linh, nghiên cứu sinh khóa 33, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Sản phụ khoa, xin cam đoan:

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

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

Hà Nội, ngày tháng năm 2019

Người viết cam đoan

Đinh Thuý Linh

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

BMD	Becker Muscular Dystrophy (Bệnh loạn dưỡng cơ Becker)
CK	Creatine Kinase
CĐTS	Chẩn đoán trước sinh
DMD	Duchenne Muscular Dystrophy (Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne)
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
GTTG	Giải trình tự gen
kb	Kilo base
MLPA	Multiplex Ligation Probe Amplification
NST	Nhiễm sắc thể
NST X	Nhiễm sắc thể X
NST Y	Nhiễm sắc thể Y
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGD	Preimplantation Genetic Diagnosis
rfu	Relative fluorescent unit
RNA	Ribo Nucleic Acid
RPA	Relative Peak Area
RT – RCR	Reverse transcription PCR (PCR sao mã ngược)
STR	Short tandem repeat (Trình tự lặp lại ngắn)

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne	3
1.2. Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, điều trị bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne..	4
1.2.1. Triệu chứng lâm sàng.....	4
1.2.2. Xét nghiệm cận lâm sàng	8
1.2.3. Điều trị và dự phòng	11
1.3. Cơ chế di truyền bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne	15
1.3.1. Cơ chế di truyền.....	15
1.3.2. Cấu trúc gen dystrophin	17
1.3.3. Cấu trúc, chức năng Protein dystrophin	18
1.3.4. Các dạng đột biến gen dystrophin	20
1.4. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne.....	21
1.4.1. Các kỹ thuật lấy bệnh phẩm trong chẩn đoán trước sinh	21
1.4.2. Các kỹ thuật di truyền ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne	24
1.4.3. Chẩn đoán tiền lâm tổ bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne.....	35
1.5. Tình hình nghiên cứu bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne ở Việt Nam và trên thế giới	35
1.5.1. Trên thế giới	35
1.5.2. Tại Việt Nam	36
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	38
2.2. Phương tiện nghiên cứu.....	38
2.2.1. Dụng cụ	38

2.2.2. Hóa chất.....	39
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	41
2.3.1. Nội dung nghiên cứu.....	41
2.3.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu.....	43
2.3.3. Quy trình kỹ thuật.....	43
2.3.4. Sơ đồ nghiên cứu.....	50
2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	51
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	52
3.1. Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen.....	52
3.1.1. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA....	55
3.1.2. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen.....	66
3.2. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	71
3.2.1. Kết quả xác định marker STR dị hợp tử gen dystrophin bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	72
3.2.2. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	77
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	104
4.1. Phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen.....	105
4.1.1. Xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA.....	110
4.1.2. Xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen	114
4.2. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	116
4.2.1. Xác định marker STR dị hợp tử gen dystrophin bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	116

4.2.2. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA	118
KẾT LUẬN	135
KHUYẾN NGHỊ	136
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1.	Các marker STR ứng dụng trong nghiên cứu	41
Bảng 3.1.	Tỷ lệ người lành mang gen bệnh ở các bà mẹ và thành viên nữ.	52
Bảng 3.2.	Tỷ lệ người lành mang gen bệnh theo tiền sử gia đình	53
Bảng 3.3.	Số lượng thành viên nữ được xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen.....	54
Bảng 3.4.	Tỷ lệ phát hiện người lành mang gen bệnh.....	55
Bảng 3.5.	Kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA.....	55
Bảng 3.6.	Các dạng đột biến được phát hiện trên người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA	56
Bảng 3.7.	Kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen.....	67
Bảng 3.8.	Các dạng đột biến điểm được phát hiện trên người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen.....	67
Bảng 3.9.	Tần suất phân bố alen của các marker STR	74
Bảng 3.10.	Kết quả nuôi cấy tế bào ối làm NST đồ	79
Bảng 3.11.	Tỷ lệ sảy thai sau thủ thuật chọc hút nước ối.....	79
Bảng 3.12.	Kết quả thai kỳ trên nhóm thai nam được chẩn đoán bị DMD...	80
Bảng 3.13.	Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi của những thai phụ không phát hiện đột biến từ mẫu máu.....	103

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Dấu hiệu Gower	6
Hình 1.2.	Cấu trúc phân tử mRNA dystrophin trưởng thành và các mô hình micro và mini dystrophin	14
Hình 1.3.	Cơ chế di truyền bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne	16
Hình 1.4.	Vị trí của gen DMD trên NST X	17
Hình 1.5.	Cấu trúc gen dystrophin	18
Hình 1.6.	Minh họa kỹ thuật chọc ối	22
Hình 1.7.	Minh họa kỹ thuật sinh thiết gai rau	23
Hình 1.8.	Hình ảnh giải trình tự gen dystrophin của người bệnh DMD	24
Hình 1.9.	Kỹ thuật Southern blotting	25
Hình 1.10.	Kỹ thuật Southern blotting xác định đột biến gen dystrophin ...	26
Hình 1.11.	Quy trình kỹ thuật FISH	28
Hình 1.12.	Hình ảnh xác định đột biến gen dystrophin bằng kỹ thuật FISH	29
Hình 1.13.	Sơ đồ các bước tiến hành kỹ thuật MLPA	31
Hình 1.14.	Hình ảnh MLPA của mẫu người bình thường (A), mẫu người bệnh DMD (B) và mẫu mẹ người bệnh	31
Hình 1.15.	Ứng dụng kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán bất thường số lượng nhiễm sắc thể	34
Hình 1.16.	Kỹ thuật Microsatellite DNA chẩn đoán trước sinh DMD	34
Hình 2.1.	Phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng	42
Hình 2.2.	Phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng	42
Hình 2.3.	Marker xác định giới tính thai nhi	47
Hình 2.4.	Xác định marker STR dị hợp tử	48
Hình 2.5.	Kỹ thuật Microsatellite DNA trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne	49
Hình 3.1.	Tỷ lệ người lành mang gen bệnh	52
Hình 3.2.	Tỷ lệ các dạng đột biến ở các thành viên nữ	54

Hình 3.3.	Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.10.....	57
Hình 3.4.	Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA bằng phần mềm coffalyser của thành viên nữ II ₁ (A-B) và IV ₁ (C-D).....	58
Hình 3.5.	Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.43.....	59
Hình 3.6.	Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA của thành viên nữ III ₃ (A-B) và III ₂ (C-D).....	60
Hình 3.7.	Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.17.....	61
Hình 3.8.	Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA bằng phần mềm coffalyser của thành viên nữ II ₁ (A-B) và III ₁ (C-D).....	62
Hình 3.9.	Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.50.....	63
Hình 3.10.	Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA của thành viên nữ II ₁ (A - B) và người bình thường (mẫu chứng) (C-D).....	64
Hình 3.11.	Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.35.....	65
Hình 3.12.	Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA bằng phần mềm coffalyser của các thành viên nữ II ₁	66
Hình 3.13.	Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.81.....	69
Hình 3.14.	Hình ảnh giải trình tự gen gia đình người bệnh D.81.....	69
Hình 3.15.	Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.78.....	70
Hình 3.16.	Hình ảnh giải trình tự gen gia đình người bệnh D.78.....	71
Hình 3.17.	Tỷ lệ đồng hợp tử và dị hợp tử của các marker STR.....	73
Hình 3.18.	Tần suất phân bố các alen của 6 marker STR.....	75
Hình 3.19.	Sơ đồ kết quả chẩn đoán trước sinh DMD.....	77
Hình 3.20.	Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD.....	78
Hình 3.21.	Tỷ lệ các loại đột biến phát hiện ở thai nam bị bệnh.....	78
Hình 3.22.	Sơ đồ chẩn đoán trước sinh các trường hợp thai phụ có nguy cơ cao sinh con mắc DMD.....	81
Hình 3.23.	Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD trong nhóm thai phụ có phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng.....	83
Hình 3.24.	Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh DMD.07.....	84

Hình 3.25.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.07 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	85
Hình 3.26.	Kết quả chẩn đoán trước sinh của thai phụ DMD.07 bằng kỹ thuật MLPA	86
Hình 3.27.	Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.16	87
Hình 3.28.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.16 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	88
Hình 3.29.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.16 bằng kỹ thuật MLPA.....	89
Hình 3.30.	Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.27	90
Hình 3.31.	Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD của thai phụ D.27 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA	91
Hình 3.32.	Kết quả giải trình tự gen trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ DMD.27.....	92
Hình 3.33.	Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.28	93
Hình 3.34.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.28 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	94
Hình 3.35.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.28 bằng kỹ thuật MLPA.....	95
Hình 3.36.	Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.31	96
Hình 3.37.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ DMD.31 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	97
Hình 3.38.	Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.32	99
Hình 3.39.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.32 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.....	100
Hình 3.40.	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng kỹ thuật giải trình tự gen của thai phụ DMD.32.....	101

ĐẶT VẤN ĐỀ

Loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là bệnh lý di truyền thần kinh cơ hay gặp nhất với tần suất 1/3600 trẻ trai [1]. Bệnh gây nên do đột biến gen dystrophin, một trong những gen người lớn nhất được phát hiện cho đến nay. Gen dystrophin nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc (NST) thể giới tính X, vùng Xp21 có chiều dài khoảng 2400kb với 79 exon [2],[3]. Đột biến gen dystrophin sẽ làm giảm hoặc mất khả năng tổng hợp protein dystrophin, một protein đóng vai trò quan trọng để bảo vệ tế bào cơ khỏi bị tổn thương trong quá trình co cơ gây nên bệnh DMD. Cho đến nay, nhiều dạng đột biến gen dystrophin đã được phát hiện bao gồm đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm. Đột biến xóa đoạn chiếm tỉ lệ cao nhất khoảng 60%, tiếp theo là đột biến điểm chiếm tỉ lệ khoảng 30-35%, đột biến lặp đoạn chiếm tỉ lệ thấp nhất khoảng 5-10%. DMD là bệnh di truyền lặn, liên kết với NST giới tính X, trong trường hợp mẹ là người lành mang gen bệnh sẽ có khả năng truyền bệnh cho 50% số con trai của họ và truyền gen bệnh cho 50% số con gái của họ [4],[5].

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne đặc trưng bởi sự yếu cơ có tính chất tiến triển, biểu hiện bằng khó đi lại, khó đứng lên ngồi xuống và khó khăn khi leo cầu thang, sau đó mất dần khả năng đi lại ở lứa tuổi 11-12 và thường tử vong ở lứa tuổi ngoài 20 do tổn thương cơ tim và rối loạn cơ hô hấp [3],[6],[7]. Hiện nay bệnh DMD vẫn chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu, liệu pháp điều trị gen vẫn đang trong giai đoạn điều trị thử nghiệm, vì vậy việc phát hiện người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh DMD đóng một vai trò quan trọng giúp đưa ra những tư vấn di truyền thích hợp nhằm ngăn ngừa và làm giảm tỷ lệ sinh con mắc bệnh, đồng thời giảm bớt gánh nặng về tinh thần và vật chất cho gia đình người bệnh và cả xã hội [8],[9]. Hiện nay có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử đã được ứng dụng để xác định đột biến gen dystrophin. Kỹ thuật PCR và Multiplex PCR là kỹ thuật truyền thống để xác

định đột biến xóa đoạn gen, tuy nhiên các kỹ thuật này chỉ khảo sát được đột biến trên 25 exon ở hai vùng đột biến trọng điểm trong tổng số 79 exon của gen dystrophin. Gần đây, kỹ thuật MLPA đã bộc lộ những ưu điểm vượt trội so với các kỹ thuật truyền thống với độ chính xác cao, dễ thực hiện, thời gian thực hiện kỹ thuật ngắn, xác định được không chỉ các đột biến xóa đoạn mà cả các đột biến lặp đoạn trên toàn bộ 79 exon [10],[11]. Tuy nhiên, còn khoảng 30-35% đột biến điểm gen dystrophin không xác định được bằng các kỹ thuật trên mà cần phải sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để giải trình tự toàn bộ 79 exon.

Thông thường, việc chẩn đoán trước sinh thường được thực hiện bằng kỹ thuật phát hiện đột biến trực tiếp trên gen dystrophin dựa vào đột biến chỉ điểm trên người bệnh. Tuy nhiên, trong một số trường hợp người bệnh không phát hiện thấy đột biến, hoặc việc phát hiện đột biến gặp khó khăn do cấu trúc gen quá lớn thì kỹ thuật phân tích gián tiếp (Microsatellite DNA) có thể được áp dụng. Microsatellite DNA được phát triển dựa trên kỹ thuật PCR truyền thống với việc sử dụng các trình tự mỗi có gắn huỳnh quang để khuếch đại các đoạn trình tự lặp lại ngắn và phân tích kích thước của chúng thông qua điện di mao quản trên máy giải trình tự gen để xác định sự có mặt của các alen khác nhau, dựa vào phân tích liên kết có thể xác định được các alen đột biến trong bệnh lý di truyền. Việc áp dụng kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD có thể áp dụng cho tất cả thai phụ kể cả những trường hợp chưa rõ vị trí đột biến với thời gian trả kết quả nhanh trong 48 -72 giờ và chi phí xét nghiệm thấp [12],[13]. Vì vậy đề tài: “**Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite**” được thực hiện với hai mục tiêu:

1. ***Phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen.***
2. ***Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne cho thai nhi của những bà mẹ là người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.***

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) lần đầu tiên được mô tả vào năm 1852 bởi Edward Meryon, một bác sĩ người Anh. Ông mô tả chi tiết về một gia đình có 4 người con trai đều có biểu hiện yếu cơ nhưng không hề có bất thường về hệ thần kinh trung ương. Edward Meryon đã chỉ ra sự tổn thương tế bào cơ sau khi quan sát dưới kính hiển vi, đồng thời phát hiện bệnh lý này chỉ xuất hiện ở con trai và được di truyền từ người mẹ [14].

Một thập kỷ sau vào năm 1861, Guillaume Duchenne - một nhà thần kinh học người Pháp - đã ứng dụng dòng điện để kích thích cơ và thần kinh trong điều trị cho những người bệnh mắc loạn dưỡng cơ đầu tiên của ông. Năm 1868, ông đã mô tả sự yếu cơ tiến triển ở 13 người bệnh gọi là “liệt cơ giả phi đại”. Vì những cống hiến của ông, sau này người ta đã lấy tên ông đặt tên cho bệnh là bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [14].

Khoảng năm 1959, lần đầu tiên creatine kinase huyết thanh được định lượng để chẩn đoán bệnh và phát hiện người lành mang gen bệnh [15],[16].

Năm 1879, Gowers thống kê 220 người bệnh và mô tả bệnh DMD với những hình ảnh lâm sàng điển hình và rất chi tiết. Trong một thời gian dài hơn 100 năm bệnh DMD chỉ được đánh giá chủ yếu ở mức độ lâm sàng và điều trị chỉ dừng ở mức độ chăm sóc, hỗ trợ người bệnh [16].

Từ năm 1975 – 1980, các khiếm khuyết cơ trong bệnh lý DMD được xác định bằng kỹ thuật hiển vi điện tử và hóa sinh [14].

Trước và sau năm 1980, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào chẩn đoán và đặc biệt là chẩn đoán sớm bệnh DMD khi chưa có biểu hiện lâm sàng

đồng thời phát hiện người mang gen bệnh DMD bằng đo hoạt độ enzym Creatin Kinase (CK) để phục vụ cho điều trị và tư vấn di truyền [17].

Năm 1981, Zatz và cộng sự đã phát hiện gen dystrophin ở vị trí Xp21. Đến giai đoạn 1984 – 1987, Hoffman và các cộng sự đã phát hiện gen dystrophin và sản phẩm protein tương ứng của gen. Từ năm 1983 – 1985, RLFs lần đầu được sử dụng để phát hiện người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne lần đầu được thực hiện vào năm 1985 [6],[14]. Sau năm 1987, các phương pháp di truyền phân tử được phát triển mạnh ở một số nước tiên tiến nhằm phát hiện đột biến gen dystrophin, chẩn đoán trước sinh, phát hiện người lành mang gen bệnh và từ đó tư vấn di truyền cũng như chẩn đoán những trường hợp thai nhi mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [14],[18].

Năm 1993, thành phần và cấu trúc gen dystrophin đã được mô tả đầy đủ gồm 79 exon với kích thước 3200kb [14].

Năm 1989, glucocorticoid lần đầu được đưa vào điều trị bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [19]. Đến năm 1990, liệu pháp gen điều trị bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne lần đầu tiên được tiến hành trên chuột mdx. Năm 1999, liệu pháp tế bào gốc được nghiên cứu hứa hẹn khả năng điều trị khỏi bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne. Năm 2003, các nhà khoa học nghiên cứu liệu pháp gen sử dụng các chuỗi nucleotide ngắn không mã hóa trong điều trị loạn dưỡng cơ Duchenne và đến năm 2008, lần đầu tiên liệu pháp sử dụng các chuỗi nucleotide ngắn không mã hóa được áp dụng điều trị trên người bệnh DMD [20],[21],[22].

1.2. Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, điều trị bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

1.2.1. Triệu chứng lâm sàng

1.2.1.1. Triệu chứng về vận động

Bệnh DMD đặc trưng bởi sự yếu cơ tiến triển có xu hướng từ gần đến

xa. Trong giai đoạn đầu sau sinh trẻ thường không có triệu chứng lâm sàng, chỉ một số trường hợp có giảm trương lực cơ nhẹ. Triệu chứng yếu cơ bắt đầu xuất hiện rõ khi trẻ ở giai đoạn tập đi. Trẻ xuất hiện hay té ngã, khó khăn khi chạy hoặc leo cầu thang và mất khả năng đi lại, phụ thuộc xe lăn ở lứa tuổi 12. Cuối cùng người bệnh tử vong ở độ tuổi 20 do tình trạng yếu cơ toàn thân gây suy hô hấp và các bệnh lý tim mạch [2],[14].

Bệnh DMD được biểu hiện qua 3 giai đoạn chính:

Giai đoạn 1: Những năm đầu sau sinh, người bệnh hiếm khi biểu hiện triệu chứng, chỉ một số ít trường hợp có biểu hiện giảm trương lực cơ kín đáo. Các kỹ năng vận động thô sơ như lật, ngồi và đứng thường phù hợp với lứa tuổi, một số trường hợp có thể hơi chậm. Dấu hiệu sớm nhất của yếu cơ là trẻ giữ cổ kém hơn những trẻ cùng lứa tuổi. Những triệu chứng lâm sàng rõ ràng thường bắt đầu khi trẻ 3-5 tuổi với các biểu hiện như chậm đi hoặc đi lại hay vấp ngã, điển hình là dáng đi lạch bạch do yếu các cơ hông lớn và hông nhỏ, hai chân mở rộng, đi bằng ngón chân do bàn chân bị duỗi thẳng, vẹo vào trong và quá uốn cột sống. Trong giai đoạn này trẻ chưa có biểu hiện teo cơ [5],[11],[23].

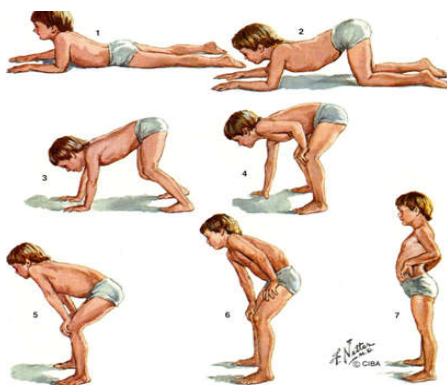
Giai đoạn 2: Đây là giai đoạn toàn phát của bệnh, xuất hiện đầy đủ các triệu chứng. Tình trạng giảm vận động xuất hiện rõ. Trẻ không chạy nhảy được như trẻ bình thường, gặp khó khăn khi leo cầu thang, dễ vấp ngã. Yếu cơ tiến triển từ gần đến xa, xuất hiện ở gốc chi nhiều hơn ngọn chi và thường gặp ở vùng thắt lưng chậ hơn là vùng vai [24]. Yếu cơ thường gặp là yếu cơ chi dưới, biểu hiện bằng dấu Gowers: khi trẻ đang ngồi xổm muốn đứng thẳng lên hoặc đang nằm muốn ngồi dậy, trẻ phải quay người sang một bên, gập đầu gối vào hông, hai tay chống và đỡ người như tư thế như quỳ bần, sau đó tỳ hai tay lần lượt lên cẳng chân, đầu gối và đùi và đẩy cho thân thẳng dậy [1],[16]. Dấu hiệu Gower thường xuất hiện khi trẻ 3 tuổi và biểu hiện đầy đủ khi trẻ 5 - 6 tuổi. Mặc dù dấu hiệu Gower là triệu chứng lâm sàng kinh điển của loạn dưỡng cơ Duchenne nhưng đây là triệu chứng không đặc hiệu, các

bệnh loạn dưỡng cơ khác hay các rối loạn yếu cơ đầu gần cũng biểu hiện triệu chứng này [6],[23].

Tình trạng yếu các cơ ở hông làm trẻ có dáng đi lắc người, lạch bạch. Khi đứng trẻ phải dặng chân, lưng uốn và bụng phình ra phía trước. Dáng đi Trendelenberg hay hông lắc lư cũng xuất hiện vào thời điểm này. Chức năng của các cơ phía đầu xa thường được bảo tồn nên trẻ vẫn có thể sử dụng thìa, đũa, dùng bút hay đánh máy. Co cứng các tổ chức phân mềm và biến dạng cột sống có thể xuất hiện do tiến triển tăng dần của yếu cơ và sự mất cân bằng giữa các cơ. Sự co cứng thường gặp ở mắt cá, đầu gối, hông và khuỷu tay [14].

Triệu chứng teo cơ nhiều nơi trên cơ thể có tính chất đối xứng cũng xuất hiện trong giai đoạn này. Cơ lưng rộng và cơ ngực lớn bị tổn thương sớm. Tiếp theo là tổn thương teo các cơ delta, cơ tam đầu, cơ nhị đầu, cơ hông và cơ đùi trước [24].

Giả phì đại cơ bắp chân là dấu hiệu kinh điển ở giai đoạn toàn phát của bệnh. Sự tăng kích thước bắp chân do thâm nhiễm mỡ vào cơ và tăng sinh collagen. Tình trạng giả phì đại có thể gặp ở cơ cẳng tay, cơ tam đầu, cơ delta, cơ trên gai, dưới gai, cơ nhai và lưỡi [16].



Hình 1.1. Dấu hiệu Gower
(nguồn: Labeled-Jones Green Book II)

Giai đoạn 3: xảy ra ở giai đoạn người bệnh 12-15 tuổi, các triệu chứng yếu cơ ngày càng nặng. Người bệnh mất khả năng vận động, hầu hết phụ thuộc xe lăn và dẫn tới cong vẹo cột sống tiến triển nhanh [14]. Thời gian duy trì khả năng đi lại thay đổi ở các người bệnh khác nhau. Một số người bệnh phải sử dụng xe lăn lúc 7 tuổi, trong khi đó một khác có thể đi lại mặc dù khó khăn đến năm 10 tuổi mà không cần có bất kỳ một can thiệp chỉnh hình nào. Nếu sử dụng các khung nâng đỡ, vật lý trị liệu và can thiệp phẫu thuật nhỏ (kéo dài gân Achilles) thì hầu hết người bệnh DMD có thể đi lại đến năm 12 tuổi [6],[14],[23]. Việc kéo dài khả năng đi lại của người bệnh có tác dụng phòng ngừa vẹo cột sống. Giai đoạn cuối, người bệnh đại tiểu tiện không tự chủ do tổn thương cơ vòng hậu môn và cơ vòng niệu đạo. Tổn thương cơ hô hấp dẫn đến nhiễm khuẩn hô hấp, giảm dung tích phổi. Yếu cơ vùng hầu họng dễ dẫn đến hít nhầm thức ăn vào đường hô hấp, trào ngược dịch qua mũi. Biến dạng lồng ngực làm nặng thêm tình trạng suy giảm dung tích phổi và gây chèn ép tim [14],[25]. Người bệnh thường tử vong ở độ tuổi 20-25 do suy hô hấp, suy tim xung huyết, viêm phổi hoặc do sặc và tắc nghẽn đường thở.

1.2.2.2. Triệu chứng tại các cơ quan khác

Chậm phát triển trí tuệ gặp ở hầu hết các trường hợp tuy nhiên ở mức độ nhẹ, chỉ khoảng 20-30% có chỉ số IQ < 70. Phần lớn người bệnh vẫn có thể đi học bình thường [6].

Bệnh lý tim mạch bao gồm nhịp tim nhanh, suy tim quan sát thấy ở 50% - 80% các trường hợp [24]. Bệnh cơ tim thường xuất hiện trong bệnh lý DMD, tuy nhiên mức độ của bệnh có thể không tương đồng với mức độ yếu cơ. Một số trường hợp người bệnh tử vong sớm do bệnh lý cơ tim trầm trọng

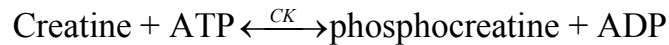
trong khi vẫn còn có khả năng đi lại. Ngược lại, một số trường hợp ở giai đoạn muộn của bệnh, chức năng tim vẫn tốt [14].

Người bệnh có thể xuất hiện thoái hóa, xơ hóa cơ nhưng không có tình trạng đau cơ và chuột rút và hiếm khi có vô hóa cơ [14].

1.2.2. Xét nghiệm cận lâm sàng

1.2.2.1. Nồng độ Creatine Kinase (CK)

Creatine Kinase (CK) là enzym xúc tác cho phản ứng tạo năng lượng cho quá trình co, duỗi cơ và quá trình chuyển hóa chất trong tế bào cơ.



Phosphocreatine là dạng dự trữ năng lượng cho hoạt động cơ. Ba isoenzym của CK là CK-MM, CK-MB và CK-BB. CK-MM chiếm 95% CK toàn phần, tập trung chủ yếu ở mô cơ vân. CK-MB chiếm 5% và tập trung chủ yếu ở mô cơ tim. CK-BB chiếm tỷ lệ không đáng kể và chủ yếu tập trung ở tổ chức não. CK-BB không qua được hàng rào máu não, do đó không xuất hiện trong huyết thanh [17],[24].

Chẩn đoán bệnh DMD thường dựa vào nồng độ CK trong máu [26]. Ở người bệnh DMD, gen dystrophin bị đột biến làm thay đổi cấu trúc protein dystrophin trên màng tế bào, dẫn đến tổn thương màng tế bào cơ và giải phóng một lượng lớn CK vào máu. Trong bệnh DMD, nồng độ CK tăng cao ít nhất 40 lần so với bình thường. Nồng độ CK trong huyết thanh tăng cao ngay sau sinh, trước khi có triệu chứng lâm sàng (15000-35000UI/l so với trị số bình thường <160UI/l) [27]. Tuy nhiên các trường hợp nồng độ CK huyết thanh bình thường cũng không thể loại trừ bệnh lý loạn dưỡng cơ Duchenne. Ở giai đoạn cuối của bệnh, nồng độ CK còn có thể thấp hơn so với giá trị trước đó vài năm do số lượng cơ còn lại ít và tình trạng bất động kéo dài [23],[26].

1.2.2.2. Sinh thiết cơ

Sinh thiết cơ là một phương pháp chẩn đoán chính xác. Vị trí sinh thiết ở cơ cẳng chân hoặc cơ thẳng đùi. Sinh thiết cơ thấy hình ảnh các tế bào cơ thoái hóa, teo nhỏ, tổ chức liên kết quanh sợi cơ tăng sinh [14].

Phản ứng miễn dịch huỳnh quang khi nhuộm tiêu bản sinh thiết cơ cho thấy sự vắng mặt hoàn toàn của protein dystrophin trên bề mặt tế bào cơ. Phương pháp hóa mô miễn dịch sử dụng chất huỳnh quang gắn vào kháng nguyên hoặc kháng thể có thể phát hiện phức hợp kháng nguyên-kháng thể ở mức vi thể. Khi nhuộm tiêu bản sinh thiết của những tế bào cơ bình thường, protein dystrophin định khu ở màng sợi cơ nên có phản ứng kết hợp kháng nguyên-kháng thể với hình ảnh đường viền các sợi cơ với sự phát sáng huỳnh quang liên tục không ngắt quãng [24],[28]. Ở người bệnh DMD, nhuộm tiêu bản sinh thiết tế bào cơ không thấy có sự bắt màu và không thấy rõ ranh giới màng tế bào cơ do sự vắng mặt của protein dystrophin trên màng tế bào cơ. Các sợi cơ với đường kính không đều, có dấu hiệu thoái hóa hoại tử, thâm nhiễm mô mỡ, mô liên kết và tế bào đơn nhân. Ngay cả các sợi cơ có chức năng bình thường cũng biểu hiện những thay đổi nhẹ về cấu trúc. Ngoài ra tổ chức sinh thiết còn có rất nhiều sợi đậm đặc, hậu quả của hoại tử ở một vị trí khác trên chiều dài sợi cơ [1],[26]. Quá trình hoại tử này tạo điều kiện cho canxi đi vào nội bào qua chỗ tổn thương của màng sợi cơ vỡ, khởi động quá trình co rút của toàn bộ sợi cơ. Phương pháp này cho phép phát hiện 30% các trường hợp nghi ngờ bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne trên lâm sàng nhưng có kết quả PCR phát hiện đột biến gen dystrophin âm tính [28].

Một thể bệnh nhẹ của bệnh là loạn dưỡng cơ Becker (BMD), có triệu chứng lâm sàng muộn hơn DMD, biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn và thời gian tiến triển chậm hơn. Trên tiêu bản sinh thiết cơ vẫn có hình ảnh protein dystrophin nhưng giảm đáng kể trên màng tế bào sợi cơ [17].

Trường hợp gia đình có người đã được chẩn đoán xác định mắc bệnh DMD, đặc biệt là anh, em trai của người bệnh, nếu người bệnh có những triệu

chúng lâm sàng đặc trưng của bệnh cũng như enzym CK huyết thanh tăng cao thì không cần thiết phải sinh thiết cơ để chẩn đoán. Nếu người bệnh là người đầu tiên trong gia đình có biểu hiện lâm sàng và cận lâm sàng nghi ngờ mắc DMD thì sinh thiết cơ giúp chẩn đoán phân biệt với một số bệnh lý cơ khác có biểu hiện lâm sàng giống với DMD [14].

1.2.2.3. Thăm dò điện sinh lý cơ

Ghi điện cơ là phương pháp nghiên cứu hoạt động điện cơ bằng cách ghi lại điện thế hoạt động của các sợi cơ ở trạng thái khác nhau. Phương pháp ghi điện cơ phát hiện những tổn thương có nguồn gốc từ tế bào cơ, tuy nhiên không đặc hiệu cho bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [14],[23]. Người bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne khi làm điện cơ đồ cho thấy những biến đổi đặc trưng chung của bệnh lý cơ, tuy nhiên không có biến đổi đặc trưng riêng cho bệnh DMD và không có hình ảnh suy giảm phân bố thần kinh trong cơ. Tốc độ dẫn truyền thần kinh cảm giác và vận động bình thường [28].

1.2.2.4. Xét nghiệm di truyền phát hiện đột biến gen dystrophin

Những năm trở lại đây đã đánh dấu những tiến bộ vượt bậc trong lĩnh vực di truyền phân tử nhằm phát hiện đột biến gen dystrophin. Trước đây với kỹ thuật PCR chỉ tập trung phát hiện những đột biến hay gặp tại hai vùng “hot spot”, xác định được 65% các trường hợp đột biến trong bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne thì hiện nay với sự ra đời của những kỹ thuật di truyền phân tử như MLPA với khả năng khảo sát cả 79 exon của gen dystrophin đã phát hiện được cả đột biến xóa đoạn và lặp đoạn, chiếm khoảng 70-75% các đột biến gen dystrophin trong thời gian 3-7 ngày [2],[11],[29]. Tuy nhiên còn khoảng 25-30% các đột biến là đột biến điểm, cần phải áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen để xác định [29]. Kỹ thuật giải trình tự gen có thời gian tiến hành kỹ thuật thường dài và giá thành xét nghiệm hiện còn cao.

1.2.2.5. Các xét nghiệm khác

Các xét nghiệm thăm dò về tim mạch như siêu âm tim, điện tâm đồ, chụp X-quang tim phổi là những xét nghiệm cần được thực hiện thường xuyên nhằm đánh giá tình trạng chung của người bệnh.

1.2.3. Điều trị và dự phòng

Hiện nay chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu bệnh DMD. Các phương pháp điều trị chủ yếu vẫn tập trung vào điều trị các biến chứng của bệnh và cải thiện chất lượng cuộc sống các người bệnh [25].

1.2.3.1. Điều trị nội khoa

** Corticosteroids*

Glucocorticoid giúp giảm tình trạng hoại tử cơ, cải thiện sức mạnh và chức năng cơ từ 6 tháng đến 2 năm và kéo dài thời gian đi lại của người bệnh [7],[19]. Điều trị bằng glucocorticoid liều 0.75mg/kg/ngày trong 10 ngày đầu tiên của mỗi tháng giúp hạn chế các biến chứng mạn tính do corticoid gây ra. Thời gian điều trị bắt đầu ở giai đoạn sớm của bệnh khi trẻ 4-6 tuổi [30],[31],[32].

** Kiểm soát các biến chứng tim mạch và hô hấp*

Bệnh lý cơ tim giãn xảy ra ở 90% các trường hợp loạn dưỡng cơ Duchenne trên 18 tuổi. 20% người bệnh tử vong do các biến chứng tim mạch, vì vậy điều trị các biến chứng tim mạch đóng vai trò lớn trong việc kéo dài thời gian sống của người bệnh [19],[25].

Các nhiễm trùng phổi cần điều trị tích cực. Người bệnh cần tránh tiếp xúc với những người bị nhiễm trùng hô hấp hoặc đang mắc các bệnh truyền nhiễm, đồng thời cần được tiêm phòng cúm và các loại vắc xin khác theo chương trình tiêm chủng [25],[33].

1.2.3.2. Vật lý trị liệu và phục hồi chức năng

Các phương pháp vật lý trị liệu giúp giảm nhẹ tình trạng co cứng cơ, tăng cường sức mạnh cơ [34],[35]. Tuy nhiên các bài tập quá sức có thể đẩy

nhanh quá trình thoái hóa cơ. Phục hồi chức năng sử dụng dụng cụ chỉnh hình khớp gối – gót chân có thể kéo dài thời gian đi lại của người bệnh từ 6 tháng đến 2 năm [7],[36]. Trong trường hợp co cứng khuỷu tay thì có thể cố định khuỷu tay gấp 90 độ giúp trẻ có thể viết và tự ăn [7].

1.2.3.3. Chế độ dinh dưỡng

Đảm bảo chế độ dinh dưỡng tốt và kiểm soát cân nặng của trẻ nhằm tránh tình trạng béo phì do trẻ mắc bệnh có xu hướng ăn nhiều, tăng cân vì ít vận động và điều trị bằng corticoid hàng ngày. Bổ sung calci giúp giảm quá trình hủy xương ở người bệnh phụ thuộc xe lăn [37],[38].

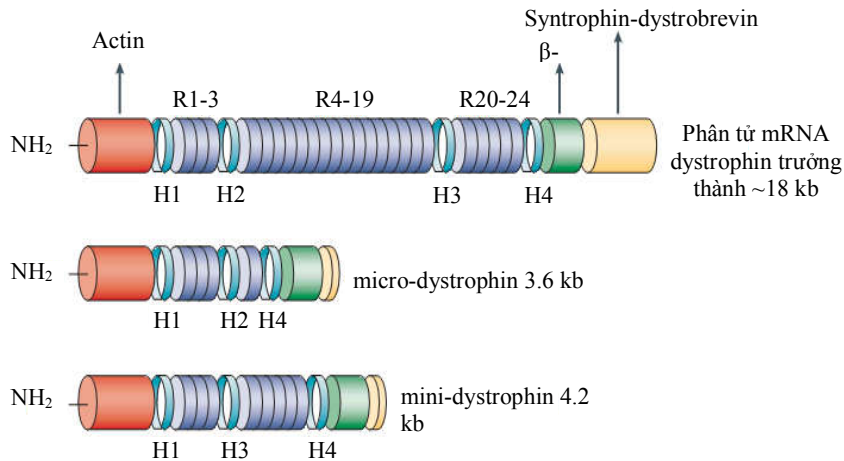
1.2.3.4. Liệu pháp gen

Những tiến bộ trong lĩnh vực sinh học phân tử đã phát triển phương pháp điều trị bằng liệu pháp gen, hứa hẹn điều trị khỏi hoàn toàn bệnh lý loạn dưỡng cơ Duchenne [35]. Nguyên tắc của liệu pháp gen là sử dụng các vector đưa vào trong cơ các đoạn nucleotid ngắn không mã hóa (antisense oligonucleotides) nhằm bỏ qua một số exon trong quá trình dịch mã mRNA, khôi phục lại khung đọc mở trong gen dystrophin bị đột biến [34],[39]. Tuy nhiên hiện nay phương pháp này vẫn đang trong quá trình nghiên cứu và thử nghiệm với ba hướng chính:

Thiết kế vector mang gen mini hoặc micro-dystrophin

Nghiên cứu sử dụng vector mang gen dystrophin có chức năng như một liệu pháp điều trị tổng thể cho mọi dạng đột biến. Tuy nhiên phương pháp này gặp nhiều khó khăn do gen dystrophin có kích thước lớn. Một số nghiên cứu đã thành công trong việc thiết kế vector mang gen dystrophin có bản chất là virus HSV-1 hoặc plasmid [34]. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu khác đã cho thấy một số vùng trên gen dystrophin có thể loại bỏ mà không làm ảnh hưởng đến chức năng protein dystrophin [20],[34],[35].

Sử dụng mô hình chuột chuyển gen bị loạn dưỡng cơ Duchenne (chuột *mdx*) mang nhiều đột biến xóa đoạn khác nhau, các nhà khoa học đã xác định được những vùng chức năng thiết yếu của protein dystrophin. Nhóm nghiên cứu của Harper và cộng sự đã thành công trong việc xây dựng một mini-dystrophin dài 6.2 kb (xóa vùng H2-R19) mang 8 vùng trình tự lặp lại và các vùng nối 1,3,4 nhằm mô phỏng lại đột biến xóa exon 17-48 của một bệnh nhân Becker đã được phát hiện trước đó. Chuột *mdx* chuyển gen mang mini-dystrophin có khả năng vận động bình thường, không xuất hiện các dấu hiệu loạn dưỡng cơ đặc trưng cho thấy mini-dystrophin đã mã hóa cho protein dystrophin có chức năng [20],[40]. Một số nghiên cứu khác cũng đã thành công trong xây dựng những micro-dystrophin khi cắt ngắn thêm những vùng trình tự lặp lại khác. Hiện nay, mô hình tối giản nhất của gen dystrophin đã được xây dựng là một micro-dystrophin (xóa vùng R4-R23) có kích thước 3.6 kb (phân tử mRNA trưởng thành của gen dystrophin nguyên gốc dài 18 kb) [20]. Việc thử nghiệm thành công mô hình mini và micro-dystrophin đã tạo ra bước tiến đột phá trong hướng nghiên cứu áp dụng các vector mang gen chức năng để điều trị DMD.



Vùng rod trung tâm gồm 24 đoạn trình tự lặp lại (R1-R24) và 4 vùng nối (H1-H4).
 Mô hình tối giản gen dystrophin được xây dựng thông qua việc xóa một số vùng trình tự lặp lại và vùng nối.

Hình 1.2. Cấu trúc phân tử mRNA dystrophin trưởng thành và các mô hình micro và mini dystrophin [40]

Thử nghiệm các loại thuốc có hoạt tính readthrough

Hướng nghiên cứu tập trung vào thử nghiệm các loại thuốc có khả năng can thiệp trực tiếp vào quá trình dịch mã protein dystrophin. Theo nghiên cứu của Palmer, kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside (gentamicin, tobramicin, amikacin, hygromycin) có thể tác động đến bộ máy dịch mã của tế bào, giúp tổng hợp protein hoàn chỉnh từ mRNA mang mã đột biến kết thúc [20],[41]. Những nghiên cứu in vitro cho thấy gentamicin giúp ribosome sử dụng glutamin là acid amin tương ứng của các mã kết thúc UAG, UAA và tryophan cho mã kết thúc UGA-hoạt tính readthrough. Gentamicin cũng tác động tới các yếu tố giải phóng RF1 và RF2 giúp ổn định quá trình tổng hợp protein của ribosome [41].

Sử dụng antisense gây xóa đoạn exon

Nguyên tắc của phương pháp là sử dụng antisense gây xóa exon trên gen dystrophin nhằm khôi phục lại khung dịch mã ở các bệnh nhân DMD,

giúp chuyển từ thể bệnh nặng sang thể bệnh nhẹ [42]. Việc xoá đoạn được thực hiện thông qua tác động trực tiếp vào các yếu tố điều khiển quá trình cắt nối exon-intron [35],[43],[44].

1.2.3.5. Liệu pháp tế bào

Liệu pháp tế bào dựa trên chuyển ghép nguyên bào cơ, thực hiện thông qua nuôi cấy các nguyên bào cơ lấy từ cơ trưởng thành của một người thân không mắc bệnh DMD (thường là người cha) trong phòng thí nghiệm (in vitro). Các nguyên bào cơ được nuôi cấy sẽ được tiêm vào cơ loạn dưỡng của người bệnh, thay thế các tế bào cơ bệnh lý và chức năng cơ được tái lập [36],[45]. Trước khi thực hiện liệu pháp tế bào, người bệnh cần được điều trị thuốc ức chế miễn dịch để ngăn chặn phản ứng thải ghép [45].

Hiện nay phương pháp này mang lại nhiều hứa hẹn trong tương lai. Một số nghiên cứu cho thấy khi lấy tế bào gốc tủy xương từ người bình thường cấy ghép vào cơ của người bệnh sẽ tạo ra protein dystrophin và một lượng nhỏ sợi cơ ở người bệnh [45].

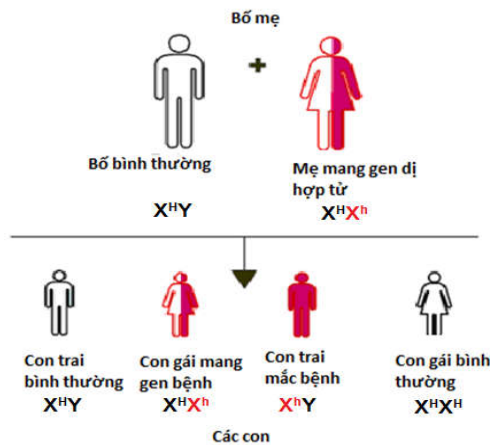
1.2.3.6. Dự phòng

Hiện nay, phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne và tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh hiện nay vẫn là phương pháp phòng bệnh chính. Những người phụ nữ trong gia đình có người mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne sẽ được xét nghiệm phát hiện gen đột biến nếu có và sẽ được chẩn đoán trước sinh khi mang thai nếu được chẩn đoán là người lành mang gen bệnh [9],[46]. Với sự phát triển của các kỹ thuật thụ tinh nhân tạo, chẩn đoán tiền làm tổ cũng đã mở ra một hướng mới trong dự phòng bệnh DMD. Thông qua chẩn đoán tiền làm tổ sẽ phát hiện các phôi bị bệnh và chỉ chuyển vào tử cung người mẹ những phôi không bị DMD [47],[48].

1.3. Cơ chế di truyền bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

1.3.1. Cơ chế di truyền

DMD là bệnh di truyền gen lặn liên kết NST giới tính X, không có alen tương ứng trên NST Y. Người mẹ là người lành mang gen bệnh có khả năng truyền gen bệnh cho con và gây biểu hiện bệnh ở con trai với tỷ lệ 50% [29],[49].



Hình 1.3. Cơ chế di truyền bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

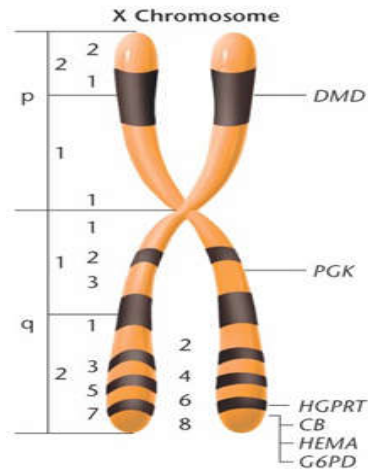
Trong một vài trường hợp, người nữ mang gen có biểu hiện bệnh khi NST X không mang gen bệnh bị bất hoạt dẫn đến NST X mang gen bệnh gây biểu hiện bệnh [2]. Trong trường hợp người nữ có chuyển đoạn gen dystrophin với một vùng trên NST thường dẫn đến tình trạng protein Dystrophin có chức năng không được sản xuất đầy đủ, gây biểu hiện bệnh DMD [7]. Bệnh cảnh lâm sàng DMD đầy đủ ở trẻ gái cũng xuất hiện ở các trường hợp trẻ gái mắc hội chứng Turner do người bệnh mang NST X duy nhất có đột biến gen dystrophin [2],[50].

DMD là bệnh di truyền gen lặn liên kết NST giới tính, tuy nhiên có khoảng 30% người bệnh mắc bệnh là do các đột biến mới [14],[51].

Phụ nữ là người lành mang gen bệnh thường không có triệu chứng lâm sàng của bệnh, chỉ một số ít trường hợp có biểu hiện yếu cơ nhẹ [26],[52]. Khoảng 80% người lành mang gen bệnh có tăng nồng độ CK huyết thanh. Mức độ tăng từ vài trăm đến vài nghìn đơn vị quốc tế, không tăng cao như ở

người bệnh. 20% người lành mang gen bệnh có nồng độ CK bình thường [13],[15].

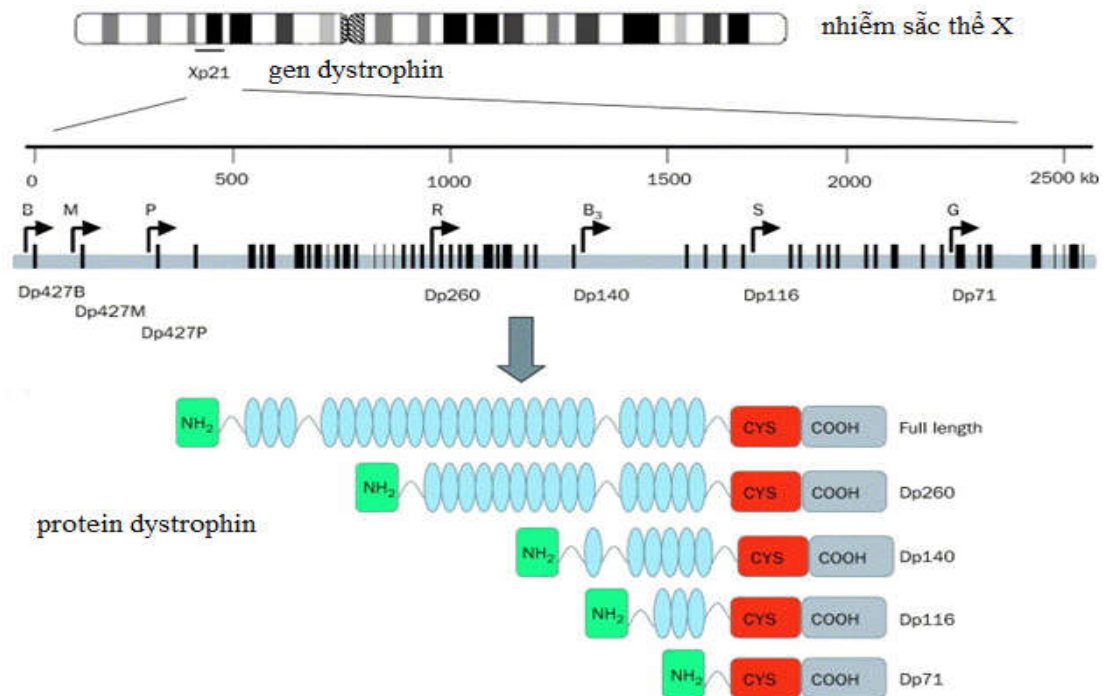
1.3.2. Cấu trúc gen dystrophin



Hình 1.4. Vị trí của gen DMD trên NST X

(Nguồn: *Concepts of genetic*, 2008)

Gen dystrophin nằm trên NST X, thuộc nhánh ngắn, vùng 2, băng 1, băng phụ 2 và là một trong những gen lớn nhất được xác định cho đến nay với chiều dài hơn 2000kb gồm 79 exon, mã hóa tổng hợp protein dystrophin [24],[29].



Hình 1.5. Cấu trúc gen dystrophin (nguồn Lancet)

Cấu trúc gen dystrophin là một phức hợp gồm [14],[17]:

Promoter: là trình tự nhận biết và gắn của enzym RNA polymerase trong quá trình dịch mã, cho phép gen hoạt động đóng - mở, tổng hợp protein đặc hiệu tương ứng. Gen DMD có 7 promoter: promoter não, cơ, purkinje, promoter Dp260, Dp 140, Dp 116 và Dp 71.

Exon: là vùng gen mã hóa thông tin di truyền tổng hợp protein tương ứng. Gen DMD có 79 exon.

Intron: là vùng gen nằm xen kẽ giữa các exon không mã hóa nhưng đóng vai trò quan trọng trong quá trình hoàn thiện mRNA.

1.3.3. Cấu trúc, chức năng Protein dystrophin

1.3.3.1. Cấu trúc Protein dystrophin

Protein dystrophin có 3685 acid amin, là một protein hình que có cấu trúc gồm bốn phần [14],[17]:

- Vùng giàu cystein gồm 280 acid amin

- Vùng C-tận (chức năng liên kết màng tế bào) gồm 420 acid amin (Hai vùng này có chức năng rất quan trọng, khi bị đột biến sẽ gây biểu hiện triệu chứng lâm sàng nặng)
- Vùng N-tận (gắn với actin) gồm 240 acid amin, khi đột biến sẽ biểu hiện triệu chứng lâm sàng ở thể trung gian giữa DMD và BMD.
- Vùng trung tâm rod (giống spectrin) gồm 2700 acid amin, ít chức năng nhất, khi bị đột biến sẽ biểu hiện triệu chứng lâm sàng ở thể nhẹ.

Protein dystrophin liên kết chặt chẽ với các phức hợp glycoprotein nhờ vùng giàu cystein và đầu tận cùng carboxyl. Protein dystrophin nằm ở màng bào tương của tế bào cơ, được tìm thấy trong cơ xương, cơ trơn, cơ tim và não [14].

Protein dystrophin hoạt động thông qua sự tương tác với nhóm protein màng gọi là phức hợp dystrophin-glycoprotein (DGC), trong đó protein chính là dystroglycan α và β . β -dystroglycan gắn với vùng C-tận của dystrophin và α -dystrophin gắn với lớp lưới ngoại bào. Phức hợp DGC giữ vai trò quan trọng trong ổn định màng bào tương và là cầu nối giữa sợi actin và khung xương ngoài tế bào [17].

Ở người bệnh DMD, gen DMD bị đột biến làm cho protein dystrophin không được sản xuất hoặc giảm sản xuất. Nhiều nghiên cứu cho thấy nhiều glyco-protein tương tác với dystrophin cũng không hiện diện trong bệnh DMD. Những protein kết hợp với dystrophin có thể liên quan trực tiếp với dòng canxi vào sợi dystrophin, do đó, thiếu hụt dystrophin có thể chỉ là bước đầu tiên của quá trình dẫn đến loạn dưỡng cơ [14].

1.3.3.2. Chức năng protein dystrophin

Protein dystrophin chỉ chiếm 0,002% tổng lượng protein cơ nhưng chiếm đến 5% tổng lượng protein của màng tế bào cơ [53]. Dystrophin được tìm thấy ở các cơ bám xương, cơ trơn, cơ tim và não. Protein dystrophin có chức năng quan trọng trong bảo vệ tính ổn định của màng tế bào cơ do liên

kết với các protein khác của màng tế bào tạo thành phức hợp (DAPC) gồm dystroglycan, sarcoglycan, dystrobrevin, syntrophin và NOS. Khi thiếu hụt dystrophin, màng tế bào cơ sẽ bị tổn thương gây thoát các thành phần bên trong tế bào ra ngoài, đồng thời ion Ca^{++} sẽ đi vào trong tế bào, hoạt hóa enzym protease phân giải protein sợi cơ dẫn đến hoại tử tế bào cơ [6],[53].

1.3.4. Các dạng đột biến gen dystrophin

Các dạng đột biến gen dystrophin bao gồm đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm trong đó các đột biến xóa đoạn chiếm đa số với tỷ lệ khoảng 60%-65%. Không có mối liên hệ rõ ràng giữa kích thước và vị trí đột biến với mức độ trầm trọng và diễn biến của bệnh [54],[55].

1.3.4.1. Đột biến xóa đoạn

Đột biến xóa đoạn chiếm tỉ lệ 60-65% trong số các dạng đột biến gen dystrophin [56],[57]. Sự phân bố các đột biến tập trung chủ yếu ở hai vùng “hot spot” là vùng trung tâm (khoảng 80%) và gần phía đầu tận cùng 5’ của gen (khoảng 20%). Vùng 200-kb bao gồm intron 44, exon 45, intron 45 là điểm bắt đầu đột biến xóa đoạn chính của gen [58],[59].

Những đột biến xóa đoạn gây lệch khung dịch mã sẽ tạo ra những protein dystrophin mất chức năng, gây bệnh cảnh lâm sàng nặng [54]. Trong trường hợp đột biến không làm lệch khung dịch mã tạo ra những protein với chức năng không hoàn chỉnh, gây ra bệnh cảnh lâm sàng nhẹ hơn [60].

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra không có mối liên quan giữa kích thước hoặc vị trí của đoạn gen bị mất với mức độ nặng của bệnh hoặc diễn biến lâm sàng. Một số người bệnh DMD có biểu hiện nặng nề trong khi chỉ mất một vài exon, còn người bệnh BMD có biểu hiện nhẹ hơn nhưng có thể mang đột biến xóa đoạn dài vài chục exon [3],[54]. Nguyên nhân là do mặc dù các đột biến xóa đoạn nhỏ nhưng lại tạo ra mã kết thúc (stop codon) sớm hoặc gây lệch khung dịch mã (out of frame) của mRNA dẫn đến sản xuất ra protein

dystrophin không chức năng, gây nên bệnh cảnh lâm sàng của bệnh DMD. Còn trong trường hợp đột biến xóa đoạn dài nhưng vẫn duy trì được bộ ba mã hóa và không gây lệch khung dịch mã (in frame) thì vẫn có thể tạo ra protein dystrophin còn một phần chức năng và gây ra bệnh cảnh lâm sàng của BMD [14],[54],[61].

1.3.4.2. Đột biến lặp đoạn

Đột biến lặp đoạn chiếm khoảng 5 -10% các trường hợp đột biến tập trung chủ yếu ở đầu 5' (80%). Chỉ có 20% đột biến xuất hiện ở cùng trung tâm gen [3],[62].

1.3.4.3. Đột biến điểm

Đột biến điểm có thể xuất hiện rải rác ở tất cả các vị trí của gen dystrophin với tỷ lệ 25%-30% [56],[63].

1.4. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

1.4.1. Các kỹ thuật lấy bệnh phẩm trong chẩn đoán trước sinh

1.4.1.1. Chọc hút nước ối

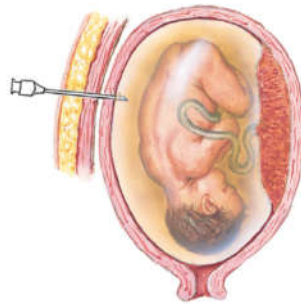
Chọc hút nước ối là một thủ thuật can thiệp y học nhằm lấy nước ối từ buồng tử cung để xét nghiệm. Chọc hút dịch ối lần đầu tiên được Schatz thực hiện vào năm 1882 với mục đích hút bớt nước ối ở thai phụ đa ối. Đến năm 1966, lần đầu tiên một trường hợp hội chứng Down được chẩn đoán trước sinh qua phân tích NST từ tế bào dịch ối [64].

Hiện nay, chọc hút nước ối là kỹ thuật được sử dụng nhiều nhất trong chẩn đoán trước sinh phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể, các bệnh lý di truyền đơn gen, chẩn đoán các bệnh lý nhiễm trùng thai hay đánh giá sự trưởng thành của phổi thai nhi. Chọc ối được tiến hành qua thành bụng của thai phụ dưới hướng dẫn của siêu âm [65],[66]. Tuổi thai khi tiến hành thủ thuật chọc ối được khuyến cáo từ 15 tuần [65],[67]. Chọc ối sớm khi thủ thuật được thực hiện ở tuổi thai trước 14 tuần, tuy nhiên một số nghiên cứu đã chỉ ra chọc ối sớm có tỷ lệ tai biến cao hơn [67],[68].

Bảng 1.1. Kết quả nghiên cứu của Farrell về thời gian chọc ối [69]

	Farrell SA và cs (1999)	
	Chọc ối sớm	Chọc ối 3 tháng giữa
Số mẫu (thai phụ)	2172	2162
Tuổi thai (tuần)	11– 12 tuần 6 ngày	15-16 tuần 6 ngày
Bất thường NST	1.8%	2.25
Tỷ lệ sảy thai	7.8%	5.9%
Tỷ lệ rỉ ối	3,5%	1,7%
Tỷ lệ thai bị bàn chân vẹo	1,3%	0,1%

Sự nhiễm máu mẹ trong dịch ối có thể xảy ra trong quá trình lấy mẫu với tỷ lệ 0,35%. Để hạn chế hiện tượng này, nhiều tác giả khuyến cáo hút bỏ 2ml dịch ối đầu tiên [67], [68].

**Hình 1.6. Minh họa kỹ thuật chọc ối**

(nguồn: *Williams obstetric, 23rd*)

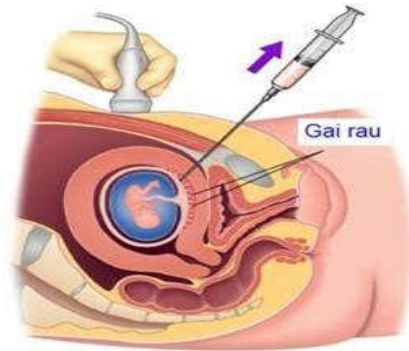
Tỷ lệ sảy thai sau chọc ối vào khoảng 0,1-1% khi thủ thuật được tiến hành ở quý 2 của thai kỳ. Tai biến rỉ ối gặp từ 1-2%. Ngoài ra có thể có một số tai biến hiếm gặp như nhiễm trùng buồng ối (dưới 0,1%), chấn thương thai do kim, tụ máu thành bụng [68],[70],[71].

1.4.1.2. Sinh thiết gai rau

Sinh thiết gai rau thường được thực hiện ở tuần thứ 10 đến 13. Tùy theo vị trí bánh rau mà có thể tiến hành sinh thiết xuyên qua cổ tử cung hoặc

xuyên qua thành bụng [72]. Ưu điểm của phương pháp là cho kết quả chẩn đoán ở tuổi thai nhỏ hơn và cho phép chấm dứt thai kì sớm hơn và an toàn hơn khi kết quả xét nghiệm thai nhi bất thường [68],[72].

Tai biến của kỹ thuật bao gồm rỉ ối và nhiễm trùng với tỷ lệ >1%, bàn chân vẹo [66],[70],[73]. Dị tật thiếu sản chi có liên quan đến sinh thiết gai rau sớm trong thời kì mang thai.



Hình 1.7. Minh họa kỹ thuật sinh thiết gai rau

(nguồn: *Williams obstetric, 23rd*)

1.4.1.3. Lấy máu cuống rốn

Lấy máu cuống rốn lần đầu được mô tả bởi Daffos và cộng sự vào năm 1983. Kỹ thuật được thực hiện để đánh giá tình trạng phù thai không do miễn dịch; phân tích di truyền trong trường hợp kết quả sinh thiết gai rau hoặc chọc hút nước ối còn nghi ngờ; cấy vi khuẩn; chẩn đoán các bệnh lý di truyền đơn gen bằng các kỹ thuật di truyền phân tử [65].

Kỹ thuật lấy máu cuống rốn được tiến hành dưới hướng dẫn siêu âm. Vị trí chọc kim ở tĩnh mạch rốn gần hoặc tại vị trí xuất phát từ bánh rau hoặc ở đoạn dây rốn tự do. Cần tránh lấy máu động mạch rốn vì gây co mạch và tim thai chậm. Tai biến có thể gặp bao gồm chảy máu dây rốn (50%), tụ máu (17%), chảy máu giữa mẹ - thai nhi trước bánh rau (66%) và sau bánh rau (17%), tim thai chậm (3 – 12%) [65],[68]. Đa số các tai biến chỉ thoáng qua, tuy nhiên có thể gây thai lưu với tỷ lệ 1,4% [74].

1.4.1.4. Sinh thiết mô thai

Sinh thiết mô thai dưới hướng dẫn siêu âm để chẩn đoán các bệnh có tính chất gia đình: sinh thiết cơ chẩn đoán bệnh loạn dưỡng cơ như DMD, sinh thiết da chẩn đoán bệnh lý lý thượng bì có bọt nước [65].

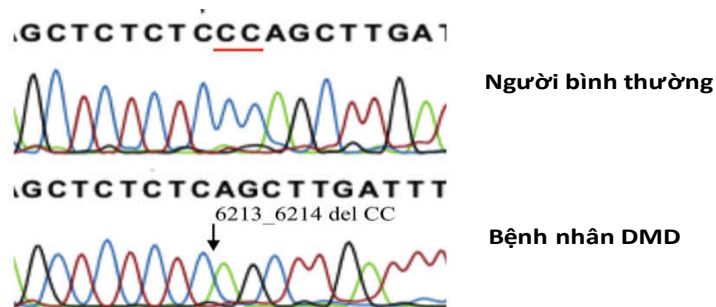
1.4.2. Các kỹ thuật di truyền ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

1.4.2.1. Các kỹ thuật phát hiện đột biến trực tiếp

* Kỹ thuật giải trình tự gen bằng máy tự động

Máy giải trình tự gen tự động sử dụng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP và hệ thống điện di mao quản. Mỗi khi có một vạch điện di đi qua, phân tử ddNTP cuối cùng ở đầu 3' của đoạn DNA sẽ phát ra màu huỳnh quang tương ứng và máy sẽ ghi nhận màu sắc, chuyển về máy tính phân tích. Dựa vào màu huỳnh quang, máy sẽ nhận diện được các nucleotid, từ đó biết được trình tự của DNA đích và xác định chính xác các đột biến như đột biến điểm, đột biến lặp đoạn,... [75],[76].

Kỹ thuật giải trình tự gen có ưu điểm là một kỹ thuật có độ chính xác cao, có thể phát hiện được tất cả các dạng đột biến của gen dystrophin. Tuy nhiên kỹ thuật này có chi phí xét nghiệm cao, thực hiện phức tạp và thời gian trả kết quả kéo dài. Vì vậy hiện nay kỹ thuật giải trình tự gen thường chỉ được ứng dụng trong xác định các đột biến điểm.



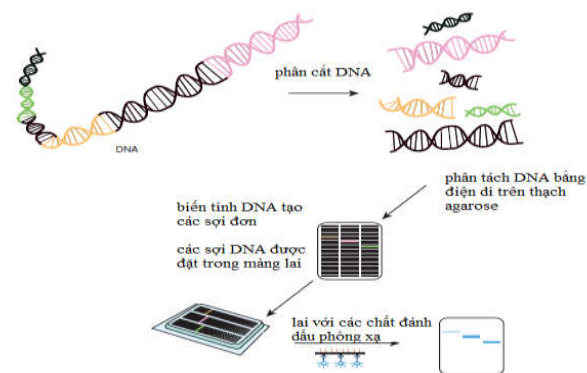
Hình 1.8. Hình ảnh giải trình tự gen dystrophin của người bệnh DMD
(nguồn: Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, trường Đại học Y Hà Nội)

* Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS)

Các công nghệ giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS) sử dụng phương pháp tách chuỗi DNA, RNA hoặc methyl hóa, giải trình tự bộ gen và phiên mã quy mô lớn với chi phí thấp hơn so với phương pháp giải trình tự thế hệ đầu tiên của Sanger. Trong vài năm gần đây, các phương pháp NGS đã bắt đầu được nghiên cứu và ứng dụng xác định các gen đột biến trong một số bệnh lý di truyền đơn gen.

* Kỹ thuật Southern Blotting

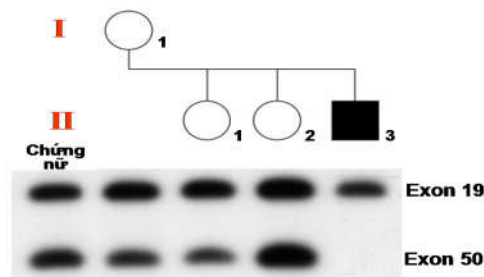
Phân tử DNA sau khi được cắt thành các đoạn nhỏ sẽ điện di trên thạch agarose rồi chuyển sang màng lai để lai với các oligonucleotid đặc hiệu có gắn chất đánh dấu phóng xạ hay huỳnh quang. Kết quả được thể hiện là các băng lai, qua đó xác định được các đột biến xóa đoạn hay lặp đoạn gen, đồng thời phát hiện được các trường hợp người lành mang gen bệnh [65]. Với đột biến xóa đoạn, băng lai của các exon bị đột biến và đoạn dò đặc hiệu không xuất hiện trên phim. Đối với đột biến lặp đoạn, có hiện tượng tăng cường độ phát sáng của băng lai với exon bị lặp đoạn khi so sánh với mẫu đối chứng. Phương pháp này cho phép xác định được những đoạn DNA có kích thước lớn chỉ với một nồng độ nhỏ trong hỗn hợp, vốn khó có thể xác định được bằng các phương pháp khác như nhuộm ethedium bromide [76].



Hình 1.9. Kỹ thuật Southern blotting (nguồn: Williams Obstetric, 23rd)

Ngoài phát hiện được đột biến xóa đoạn, Southern blotting còn cho

phép xác định các đột biến lặp đoạn gen dystrophin. Ở người bệnh có đột biến xóa đoạn, băng lai của các exon bị đột biến và đoạn dò đặc hiệu không xuất hiện trên phim. Đối với các người bệnh có đột biến lặp đoạn, có hiện tượng tăng cường độ phát sáng của băng lai với exon bị lặp đoạn khi so sánh với mẫu đối chứng. Kỹ thuật Southern blotting cũng được ứng dụng trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh [4],[49].



Hình 1.10. Kỹ thuật Southern blotting xác định đột biến gen dystrophin

(Nguồn: Prior, 2005)

*Kỹ thuật PCR

PCR cho phép tổng hợp một số lượng lớn các gen trong thời gian ngắn. Phản ứng PCR bao gồm ba bước được lặp đi lặp lại nhiều lần: giai đoạn biến tính phân tử DNA thành 2 sợi đơn ở 94°C – 96°C trong 1 – 2 phút, giai đoạn tiếp theo nhiệt độ được hạ xuống 45°C – 60°C trong 1 – 2 phút để phản ứng bắt cặp giữa các cặp mồi và DNA khuôn xảy ra; giai đoạn tổng hợp dưới tác dụng của DNA polymerase ở nhiệt độ 72°C [29],[75]. Sau mỗi chu kỳ các chuỗi đôi DNA mới tạo thành tiếp tục được dùng làm DNA khuôn để tổng hợp các DNA mới trong chu kỳ tiếp theo. Quá trình này được lặp đi lặp lại, khuếch đại các đoạn DNA theo cấp số nhân [59].

Hiện nay có nhiều kỹ thuật PCR được sử dụng trong chẩn đoán bệnh DMD: PCR sử dụng một cặp mồi (monoplex PCR); PCR sử dụng nhiều cặp mồi (multiplex PCR); PCR lồng (nested PCR); PCR sao chép ngược (RT-PCR) và PCR định lượng (Realtime PCR) [76],[77]. Trong các kỹ thuật PCR, kỹ thuật multiplex PCR được phát triển bởi Chamberlain (1998) sử dụng

nhiều cặp mồi đang được ứng dụng rộng rãi trong phát hiện các đột biến xóa đoạn gen dystrophin, thể hiện bằng sự vắng mặt của các band tương ứng trên gel agarose. Tuy nhiên, kỹ thuật này chỉ khảo sát được 25 exon tập trung tại hai vùng “hot spot” hay xảy ra đột biến của gen dystrophin [78]. Các kỹ thuật PCR có ưu điểm dễ thực hiện, giá thành rẻ. Tuy nhiên kỹ thuật PCR chỉ có thể phát hiện các đột biến xóa đoạn trên gen dystrophin, các đột biến lặp đoạn và đột biến điểm hiện này nằm ngoài khả năng phát hiện của kỹ thuật này.

Các kỹ thuật PCR áp dụng trong phát hiện đột biến gen dystrophin

PCR đơn mồi (monoplex PCR):

Mỗi phản ứng PCR sử dụng duy nhất một cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại một đoạn gen từ phân tử DNA. Trong chẩn đoán đột biến xóa đoạn gen dystrophin, kỹ thuật PCR đơn mồi sử dụng từng cặp mồi để khuếch đại từng exon, sau đó điện di sản phẩm trên thạch agarose. Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu đối chứng và mẫu bệnh phẩm rồi so sánh: nếu mẫu đối chứng xuất hiện vạch DNA tương ứng với kích thước của exon được khuếch đại trong khi mẫu người bệnh DMD không xuất hiện vạch thì người bệnh bị đột biến xóa đoạn exon đó [77],[79].

PCR đa mồi (multiplex PCR):

Kỹ thuật sử dụng đồng thời nhiều cặp mồi đặc hiệu khác nhau để khuếch đại các đoạn DNA đặc trưng khác nhau trên một phân tử DNA, hoặc trên các phân tử DNA khác nhau. Trong chẩn đoán bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, kỹ thuật PCR đa mồi được ưu tiên sử dụng nhằm tiết kiệm thời gian, công sức và hóa chất do gen dystrophin là một gen có kích thước lớn với 79 exon [59],[80].

Kỹ thuật PCR lồng (nested PCR):

Nguyên lý của kỹ thuật nested PCR là sử dụng 2 cặp mồi trong đó cặp mồi thứ 2 có trình tự các nucleotid nằm bên trong cặp mồi thứ nhất. Sản phẩm

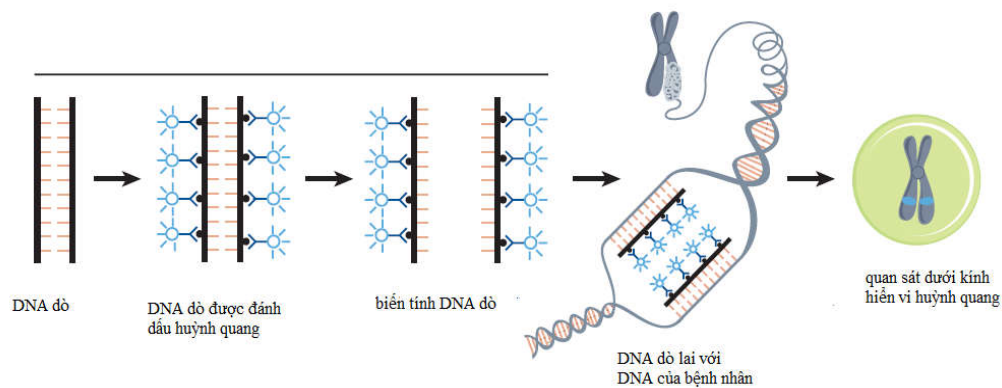
PCR được tổng hợp bởi cặp môi thứ nhất được dùng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR thứ 2 để tăng chất lượng và độ đặc hiệu cho phản ứng [29].

Kỹ thuật PCR sao chép ngược (RT-PCR):

Trong phản ứng RT - PCR, mRNA được chuyển thành cDNA nhờ enzyme phiên mã ngược, sau đó môi hoặc oligonucleotid T (oligo dT) bắt cặp với đuôi polyA của các mRNA hoặc các hexanucleotid để bắt cặp ngẫu nhiên với một trình tự ngắn trên RNA. Cuối cùng cDNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR nhờ enzym *Taq* polymerase [75]. Trong phát hiện đột biến gen dystrophin của bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, phân tử mRNA được chuyển thành cDNA. Trên phân tử cDNA, 79 exon nằm liên tục với nhau mà không có sự xen kẽ của các intron nên chỉ cần thiết kế 15 cặp môi và sử dụng kỹ thuật nested PCR để khuếch đại toàn bộ chiều dài gen [49].

*** Kỹ thuật FISH**

Kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH) được ứng dụng rộng rãi để phát hiện những bất thường NST từ những năm 80. Kỹ thuật sử dụng DNA dò được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hoặc bằng phương pháp hóa học để dò tìm DNA đích trên NST của tế bào ở gian kỳ hoặc kỳ giữa, qua đó phát hiện được sự có mặt hoặc vắng mặt của một đoạn gen nào đó bằng kính hiển vi huỳnh quang [49],[65].

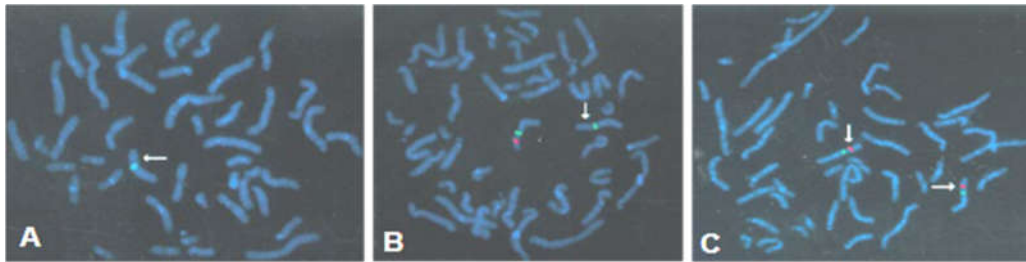


Hình 1.11. Quy trình kỹ thuật FISH (nguồn: Williams obstetric, 23rd)

FISH là một kỹ thuật giúp chẩn đoán hiệu quả các bệnh lý di truyền nói chung và bệnh DMD nói riêng. Để chẩn đoán đột biến gen dystrophin, Ligon (2000) đã sử dụng 2 loại probe [64],[81].

- Probe xác định đột biến xóa đoạn các exon của gen dystrophin gọi là cosmid probe có gắn chất huỳnh quang digoxigenin. Khi hiện tượng lai đặc hiệu xảy ra, digoxigenin gắn trên probe sẽ phát ra màu đỏ.

- Probe định vị các NST X, có gắn biotin. Khi lai với NST X, tâm động của NST X phát ra màu xanh.



Hình 1.12. Hình ảnh xác định đột biến gen dystrophin bằng kỹ thuật FISH (Nguồn: Ligon, 2000)

- (A). Người bệnh DMD, sử dụng cosmid probe đặc hiệu cho exon 3-6. Kết quả cho thấy người bệnh có 1 NST X (tâm động có màu xanh đặc hiệu). Trên NST X không xuất hiện tín hiệu màu đỏ, không có hiện tượng lai giữa probe và đoạn gen đặc hiệu, kết luận người bệnh bị đột biến xóa đoạn exon 3-6.
- (B). FISH sử dụng probe cosmid đặc hiệu cho exon 12, kết quả của con gái người bệnh bị BMD cho thấy chỉ có 1 NST X phát tín hiệu màu đỏ và 1 NST X không xuất hiện màu đỏ. Như vậy người con gái này ở dạng dị hợp tử, mang 1 gen đột biến xóa đoạn exon 12.
- (C). FISH sử dụng probe cosmid đặc hiệu cho exon 44, xác định trên người chị. Kết quả cho thấy hiện tượng lai xảy ra ở cả 2 NST X, như vậy người chị này không mang gen đột biến exon 44.

Kỹ thuật FISH có ưu điểm với độ chính xác cao và thời gian trả kết quả nhanh sau 48h. Tuy nhiên giá thành xét nghiệm còn cao, tín hiệu huỳnh quang trong một số trường hợp không rõ ràng có thể gây ảnh hưởng đến kết quả.

* Kỹ thuật MLPA

Kỹ thuật MLPA (khuếch đại đa đoạn dò) được mô tả lần đầu vào năm 2002 bởi Schouten J.P. và cộng sự. Hiện nay kỹ thuật MLPA được ứng dụng trong nhiều nghiên cứu về bệnh lý di truyền đơn gen, di truyền tế bào và ung thư. Những năm gần đây, MLPA là phương pháp được ưu tiên chọn lựa trong chẩn đoán đột biến xóa đoạn, lặp đoạn cũng như phát hiện người lành mang gen bệnh với độ chính xác cao và thời gian thực hiện xét nghiệm ngắn [82],[83],[84].

Các probe trong phản ứng MLPA chứa hai phân tử oligonucleotid có kích thước khác nhau [11],[85]:

- Phân tử oligonucleotid ngắn gồm 2 đoạn:

+ Đoạn 1 nằm ở đầu 5' gồm 19 nucleotid có trình tự giống nhau ở tất cả các probe. Đây là vị trí gắn với môi Y để khuếch đại probe.

+ Đoạn 2 nằm ở đầu 3' gồm 21-30 nucleotid có trình tự nucleotid bổ sung với đoạn DNA.

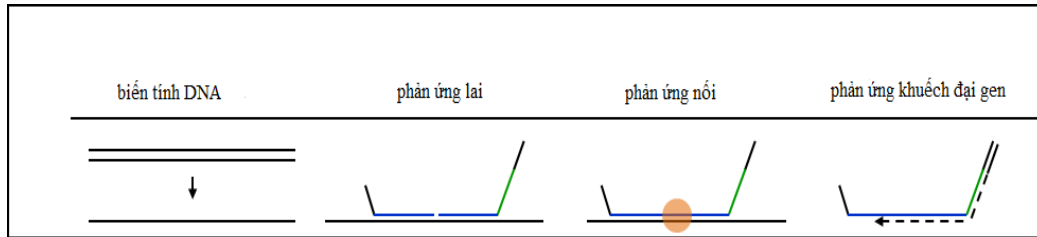
- Phân tử oligonucleotid dài gồm 3 đoạn:

+ Đoạn 1' ở đầu 3' gồm 36 nucleotid có trình tự giống nhau ở tất cả các probe. Đây là vị trí gắn với môi X đặc hiệu để khuếch đại probe.

+ Đoạn 2' ở đầu 5' gồm 25-43 nucleotid, gắn đặc hiệu với DNA đích,

+ Đoạn 3' (đoạn nucleotid đệm) nằm giữa hai đoạn 1' và 2', gồm 19 - 370 nucleotid tùy từng probe. Các sản phẩm khuếch đại của các probe sẽ được phân tách bằng điện di.

Các bước tiến hành kỹ thuật MLPA: biến tính DNA, phản ứng lai, phản ứng nối, phản ứng khuếch đại gen PCR [10],[86].



Hình 1.13. Sơ đồ các bước tiến hành kỹ thuật MLPA

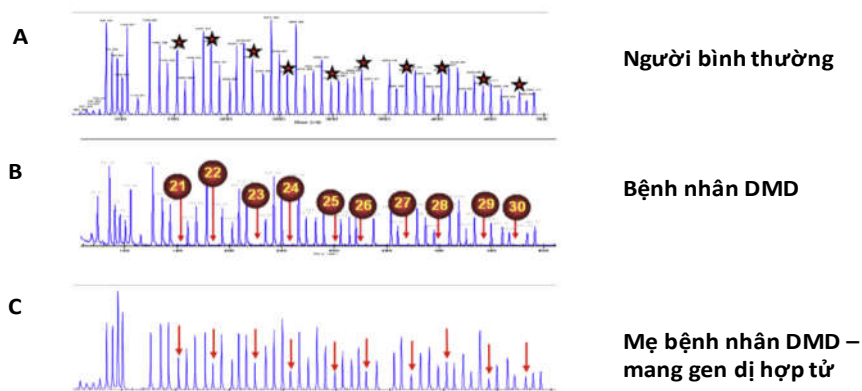
(nguồn: Williams Obstetric, 23rd)

Kết quả MLPA được phân tích dựa trên hình ảnh, dữ liệu thô tương ứng với từng probe. Các công cụ tiến hành phân tích MLPA bao gồm:

- Đánh giá trực tiếp qua hình ảnh và dựa vào tính toán chiều cao của các đỉnh (peak area) tương ứng với mỗi exon.

- Sử dụng các phần mềm: Gene Marker, Coffalyser hoặc phân tích tương quan cường độ tín hiệu từng exon của người bệnh so với nhóm chứng [87],[88],[89].

Nếu exon bị đột biến xóa đoạn thì không có hiện tượng lai và probe không được khuếch đại, do đó khi điện di mao quản sẽ không thấy hình ảnh exon bị đột biến. Trong trường hợp đột biến lặp đoạn gen, trên hình ảnh điện di thấy đỉnh tín hiệu của probe tương ứng với exon bị đột biến tăng cao so với người bình thường [83],[87].



Hình 1.14. Hình ảnh MLPA của mẫu người bình thường (A), mẫu người bệnh DMD (B) và mẫu mẹ người bệnh

(nguồn: Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, trường Đại học Y Hà Nội)

Hình ảnh phân tích MLPA tại probe tương ứng với các exon 21-30 của mẫu người bệnh (B) cho thấy không xuất hiện tín hiệu của các đỉnh so với các đỉnh ở người bình thường (A). Như vậy cho thấy người bệnh có đột biến xóa đoạn các exon từ 21- 30. Mẹ người bệnh (C) có tín hiệu các đỉnh bằng 50% so với mẫu người bình thường (A), kết luận mẹ người bệnh mang gen đột biến dị hợp tử.

Kỹ thuật MLPA có thể xác định số lượng bản sao lên tới 50 DNA chỉ trong một phản ứng PCR với một cặp mồi duy nhất. Trong chẩn đoán bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, kỹ thuật MLPA có thể tiến hành khảo sát toàn bộ 79 exon thay vì 25 exon như trong kỹ thuật multiplex PCR trong thời gian ngắn [10],[87],[89]. Cho đến nay, kỹ thuật MLPA vẫn được ưu tiên lựa chọn trong chẩn đoán đột biến gen dystrophin và phát hiện người lành mang gen bệnh. Nghiên cứu của Janssen B. (2005), Li H. (2009) cho thấy kỹ thuật MLPA có thể phát hiện đột biến xóa đoạn với độ chính xác cao và nhanh hơn so với multiplex PCR và FISH, ngoài ra MLPA còn chẩn đoán được lặp đoạn gen và giúp phát hiện người lành mang gen bệnh [11],[85]. Tuy nhiên kỹ thuật MLPA có hạn chế là không phát hiện được những đột biến điểm.

1.4.2.2. Kỹ thuật phát hiện đột biến gián tiếp: Kỹ thuật Microsatellite DNA

** Nguyên tắc*

Microsatellite DNA được phát triển dựa trên kỹ thuật PCR tiêu chuẩn, sử dụng mồi có gắn huỳnh quang và máy giải trình tự gen (automated DNA sequencer) để xác định các sản phẩm PCR. Với các đầu dò huỳnh quang đặc hiệu cùng với kỹ thuật tăng cường hình ảnh thông qua máy vi tính nên các đoạn DNA khuếch đại gắn huỳnh quang có thể được phát hiện ở nồng độ thấp hơn nhiều so với việc xác định DNA trên gel điện di agarose hay acrylamide

[90]. Kỹ thuật Microsatellite có độ chính xác và độ tin cậy cao kể cả khi thực hiện phản ứng để xác định các gen mang đột biến dị hợp tử [91].

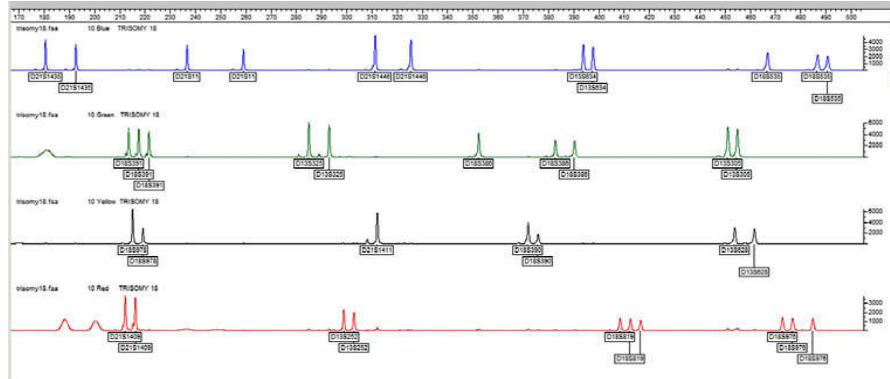
Trong những năm gần đây, kỹ thuật này được phát triển dựa trên việc sử dụng các marker đa hình (polymorphic marker) trên các nhiễm sắc thể để xác định sự có mặt của các alen khác nhau. Kỹ thuật này dựa trên các thông tin đa hình của các đoạn trình tự lặp ngắn (short tandem repeat: STRs). Kỹ thuật Microsatellite sử dụng môi gắn huỳnh quang của các marker STR và phân tích kích thước của các marker thông qua điện di mao quản trên máy giải trình tự gen (automated DNA sequencer) để xác định các bất thường về số lượng nhiễm sắc thể như: hội chứng Down, hội chứng Edwards, hội chứng Patau, các bất thường về số lượng nhiễm sắc thể giới tính và các đột biến gen gây một số bệnh di truyền đơn gen [92],[93]. Trong phát hiện bất thường số lượng nhiễm sắc thể, các cặp môi gắn huỳnh quang khuếch đại một số đoạn DNA đặc hiệu trên các NST khác nhau. Sản phẩm của phản ứng sau đó được phân tích qua điện di mao quản để xác định nồng độ sản phẩm PCR (tương ứng chiều cao của các đỉnh) và kích thước sản phẩm PCR (tương ứng với số lượng các đỉnh) được khuếch đại trên đoạn gen được phân tích [93],[94]. Kỹ thuật Microsatellite có độ nhạy cảm rất cao, gấp khoảng 1000 lần so với phân tích gel thông thường, cho phép phát hiện những tín hiệu rất yếu hoặc thấp hơn nhiều các alen khác (<1%) [93].

Với ưu điểm thời gian trả lời kết quả nhanh, kỹ thuật đơn giản, kỹ thuật này đang được ứng dụng nhiều trong chẩn đoán trước sinh các bệnh lý di truyền [90],[93].

** Ứng dụng trong chẩn đoán các bất thường số lượng NST*

Phân tích các marker có tín hiệu từ 50 rfu (relative fluorescent unit) đến 6000 rfu. Các marker dị hợp tử có 2 alen được phân tích bằng cách tính tỉ số diện tích tín hiệu (peak area) (tín hiệu 1 của alen ngắn/ tín hiệu 2 của

alen dài). Kết luận về số lượng nhiễm sắc thể phụ thuộc vào tỉ số và sự chênh lệch về độ dài giữa các alen trong từng marker.

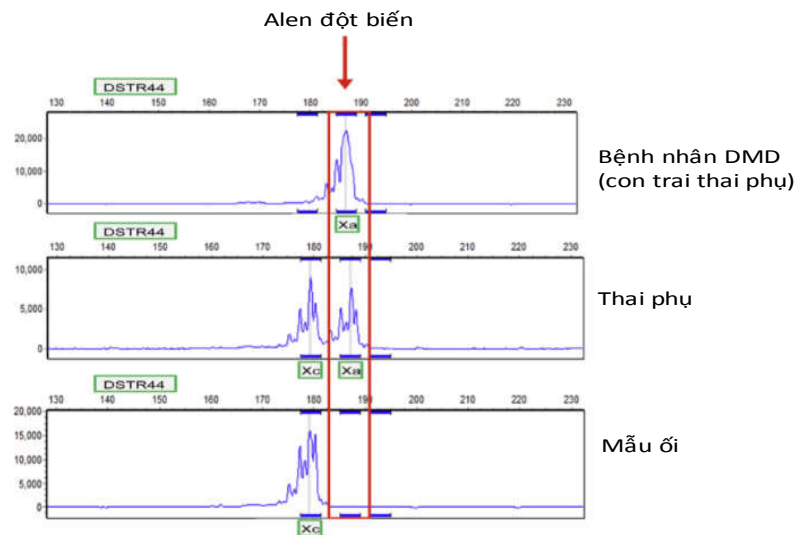


Hình 1.15. Ứng dụng kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán bất thường số lượng nhiễm sắc thể

(Nguồn: Mann et al. Prenat Diagn. 2012, 32, 309-314).

* Ứng dụng kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

Ứng dụng kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne sử dụng các trình tự lặp ngắn trong gen dystrophin được gắn huỳnh quang [14],[77],[95].



Hình 1.16. Kỹ thuật Microsatellite DNA chẩn đoán trước sinh DMD [42]

Với marker DSTR 44, thai phụ xuất hiện 2 đỉnh có kích thước 181bp và 185bp, tương ứng với 2 alen nằm trên 2 nhiễm sắc thể X ($X^B X^b$). Ở con trai của thai phụ (người bệnh DMD) chỉ có 1 đỉnh kích thước 181bp tương ứng với 1 alen trên nhiễm sắc thể X ($X^b Y$), trùng với kích thước 1 đỉnh ở mẫu mẹ thai phụ và thai phụ, cho thấy đỉnh kích thước 181bp là đỉnh alen bệnh. Kết quả mẫu ối là thai nam bị bệnh DMD: Marker DSTR44 chỉ xuất hiện 1 đỉnh 181bp là alen bệnh.

1.4.3. Chẩn đoán tiền làm tổ bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

Chẩn đoán tiền làm tổ (PGD) đối với các trường hợp thụ tinh trong ống nghiệm giúp phát hiện những phôi mang mang đột biến và phôi bình thường. Những phôi không mang đột biến sẽ được cấy vào buồng tử cung. Hiện nay PGD được thực hiện để chẩn đoán gần 200 rối loạn di truyền đơn gen như bệnh hồng cầu hình liềm, thalassemia, loạn dưỡng cơ Duchenne...; xác định giới tính trong các bệnh lý di truyền liên kết nhiễm sắc thể giới tính [96], [97].

Sinh thiết phôi trước đây thường được tiến hành ở phôi ngày 3, trong giai đoạn có khoảng 6 đến 10 tế bào. Hiện nay sinh thiết phôi thường được thực hiện vào ngày thứ 5 sau khi thụ tinh. Một tế bào được lấy ra để chẩn đoán không ảnh hưởng đến phôi thai đang phát triển [97].

1.5. Tình hình nghiên cứu bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne ở Việt Nam và trên thế giới

1.5.1. Trên thế giới

Bệnh DMD đã được nghiên cứu từ nhiều năm nay trên thế giới. Hiện nay, các nghiên cứu tập trung vào phát triển các hướng điều trị bệnh mới và các kỹ thuật di truyền phân tử ứng dụng trong chẩn đoán đột biến gen dystrophin, chẩn đoán trước sinh và đặc biệt gần đây là chẩn đoán tiền làm tổ. Các nghiên cứu đã cho thấy những ưu điểm cũng như hạn chế của các phương pháp xác

định đột biến hiện nay cũng như sự phối hợp giữa các phương pháp để đưa đến hiệu quả chẩn đoán cao nhất.

Tác giả Thomas W. Prio năm 2005 và cộng sự đã xây dựng bản đồ đột biến gen dựa trên 361 người bệnh DMD có đột biến xóa đoạn (306 người bệnh DMD và 55 người bệnh BMD), 29 người bệnh có đột biến lặp đoạn và 56 người bệnh mang đột biến điểm [76].

Nghiên cứu của Janssen B. và cộng sự năm 2005 cho thấy kỹ thuật MLPA có thể chẩn đoán đột biến xóa đoạn và lặp đoạn với kết quả chính xác và thời gian trả kết quả nhanh hơn kỹ thuật multiplex PCR và FISH, có thể ứng dụng trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh [11].

Năm 2006, tác giả Lai K.K. và cộng sự đã ứng dụng kỹ thuật MLPA phát hiện đột biến gen dystrophin trên 43 người bệnh DMD/BMD và 20 người nữ mang gen bệnh trong khi kỹ thuật Multiplex PCR bỏ sót 4 trường hợp [83].

Năm 2009, tác giả Li và cộng sự đã kết hợp kỹ thuật MLPA và Multiplex PCR chẩn đoán trước sinh cho 8 thai phụ mang các đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen dystrophin gây bệnh DMD [98].

Năm 2011, tác giả Giliberto đã chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 24 thai phụ mang gen đột biến dị hợp tử bằng việc kết hợp kỹ thuật Multiplex PCR và phân tích STR (Microsatellite- DNA) [13].

Năm 2013, tác giả Li và cộng sự đã ứng dụng kỹ thuật MLPA trong chẩn đoán trước sinh DMD cho 155 thai phụ là người mang gen đột biến xóa đoạn và lặp đoạn [85].

1.5.2. Tại Việt Nam

Những nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về bệnh DMD được công bố từ những năm 1990. Các nghiên cứu đa phần tập trung vào xác định các đột biến gen dystrophin trên người bệnh DMD. Gần đây đã các nghiên cứu ứng dụng

các kỹ thuật di truyền phân tử trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh, tuy nhiên các nghiên cứu về chẩn đoán trước sinh bệnh DMD hiện còn ít.

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne lần đầu được thống kê tại Việt Nam vào năm 1991. Tác giả Nguyễn Thu Nhạn và cộng sự đã thống kê 131 người bệnh trong tổng số 107 gia đình mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne trong vòng 10 năm (1981-1990) tại Bệnh viện Nhi Trung Ương [60].

Năm 2004, tác giả Trần Văn Khánh và cộng sự đã xác định đột biến gen dystrophin ở 85 người bệnh mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne và loạn dưỡng cơ Becker ở Việt Nam bằng phương pháp PCR trong đó phát hiện 38% các trường hợp là đột biến xoá đoạn gen dystrophin [78].

Năm 2006, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thị Trang đã phát hiện tỷ lệ xoá đoạn exon 46, 51 và cả hai exon của gen Dystrophy ở 58 người bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne là 39,7% [79].

Năm 2009, Nguyễn Khắc Hân Hoan và cộng sự đã sử dụng kỹ thuật MLPA phát hiện đột biến gen dystrophin ở 11 người bệnh mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne. Kết quả đã phát hiện được các exon bị xoá đoạn nằm ngoài 2 vùng “hot spot” mà kỹ thuật PCR không phát hiện được [88].

Năm 2013, nhóm nghiên cứu của Tạ Minh Hiếu đã tiến hành chẩn đoán trước sinh cho 8 thai phụ thuộc 6 gia đình có khả năng sinh con mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA. Kết quả 7 mẫu dịch ối của 7 thai phụ không xác định có đột biến gen dystrophin, 1 mẫu được xác định có xoá đoạn nhỏ ở exon 43 [77].

Năm 2016, Trần Văn Khánh và cộng sự đã tiến hành ứng dụng kỹ thuật Microsatellite DNA trong chẩn đoán tiền lâm tổ bệnh DMD cho 3 gia đình người bệnh DMD với 18 phôi. Kết quả xác định được 10/18 phôi bình thường và 8/18 phôi bệnh lý [99].

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. *Cỡ mẫu*: lấy mẫu chủ đích

- Mục tiêu 1: 85 thành viên nữ thuộc 35 gia đình người bệnh DMD.
- Mục tiêu 2: 51 thai nhi của 45 thai phụ có nguy cơ cao sinh con mắc bệnh DMD (6 thai phụ mang thai 2 lần).

2.1.2. *Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu*

- Mục tiêu 1:
 - Các thành viên nữ trong phả hệ gia đình có người bệnh DMD
 - Các thành viên nữ bao gồm: bà ngoại, mẹ, bác gái, dì, chị/em gái ruột, chị/em gái họ (con của bác gái, dì), cháu gái (con của chị/em gái) của người bệnh DMD.
 - Mục tiêu 2:
 - Thai phụ mang thai ở tuổi thai: 17 – 25 tuần
 - Thai phụ đã được xác định là người lành mang gen bệnh hoặc có tiền sử sinh con mắc DMD và có nguyện vọng được chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi.
- Mỗi đối tượng nghiên cứu sẽ có một hồ sơ nghiên cứu bao gồm các thông tin về phả hệ gia đình, các thành viên trong gia đình, các dạng đột biến gen dystrophin, các thông tin về kết quả chẩn đoán người lành mang gen, kết quả chẩn đoán trước sinh,...

2.2. Phương tiện nghiên cứu

2.2.1. *Dụng cụ*

- Bộ dụng cụ thực hiện thủ thuật chọc ối
 - Máy siêu âm có đầu dò thành bụng

- Thuốc sát trùng, sàng vô trùng, túi vô trùng bảo vệ đầu dò, gel siêu âm, bơm tiêm 5 ml sử dụng một lần, ống đựng mẫu dịch ối.
- Kim chọc ối là kim chọc dò tuỷ sống 27 Gauge
- Hệ thống giải trình tự gen Beckman CEQ-8000 (USA).
- Tủ lạnh sâu: -30°C; -80°C (SANYO), máy điện di: Mupid (Nhật Bản).
- Máy quang phổ kế Thermo Electron Corporation của hãng Biomet.
- Máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm để bàn Eppendorf (Đức).
- Lò vi sóng, tủ ẩm, pipet, đầu côn các loại.
- Eppendorf 1,5 ml, ống Falcol, công đo sạch.

2.2.2. Hóa chất

2.2.2.1. Hoá chất tách chiết DNA:

- Dung dịch lysis buffer, dung dịch K, dung dịch SDS 10%.
- Proteinase K (10 mg/l).
- Dung dịch phenol: chloroform: isoamyl với tỷ lệ 25:24:1.
- Dung dịch chloroform: isoamyl với tỷ lệ 24:1.
- Ethanol 100%, ethanol 70%, sodium acetate 3M, pH = 5,2.

2.2.2.2. Hoá chất chạy phản ứng MLPA

- SALSA MLPA Kit P034-A2 / P035-A2 DMD/Becker, hãng MRC – Holland, Amsterdam, Hà Lan.

- Bộ hóa chất chứa 80 đoạn dò (probe) cho 79 exon đích và exon DP427c, chia đều vào hai hỗn hợp probe P034 và P035.

- Thành phần hóa chất:

- *SALSA MLPA Buffer*: KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, pH 8,5
- *SALSA Ligase-65*: Glycerol, BRIJ 0,05%, EDTA, KCl, Tris-HCl, Beta-Mercaptoethanol 0.1%, pH 7,5, Ligase-65 enzyme (nguồn gốc vi khuẩn).
- *Ligase buffer A*: NAD (nguồn gốc vi khuẩn), pH 3,5

- *Ligase buffer B*: Tris-HCl, non-ionic detergents, MgCl₂, pH 8,5
- *SALSA PCR Primer Mix*: oligonucleotides tổng hợp gắn huỳnh quang Cy5, dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ 0.04%, pH 8,0.
- *SALSA Polymerase*: Glycerol, BRIJ 0,5%, EDTA, DTT 0,1%, KCl, Tris-HCl, Polymerase enzym (nguồn gốc vi khuẩn), pH 7,5
- *Probemix*: chứa oligonucleotides tổng hợp, oligonucleotides tinh chế từ vi khuẩn, Tris-HCl, EDTA, pH 8,0.

- Bảo quản: hóa chất được bảo quản ở nhiệt độ -25°C đến -15°C, bảo quản trong hộp và tránh ánh sáng.

- Thành phần hỗn hợp probe (probemix):

- Probemix P034-A2 chứa 45 probe khác nhau với sản phẩm khuếch đại có độ dài từ 129 đến 490nt và có 10 đoạn chúng tạo ra những sản phẩm khuếch đại có kích thước nhỏ hơn 120nt (có 2 probe đặc hiệu cho NST Y: 105-118 nucleotid).
- Probemix P035-A2 chứa 45 probe khác nhau với sản phẩm khuếch đại có độ dài từ 129nt đến 490nt và có 9 đoạn chúng tạo ra những sản phẩm khuếch đại có kích thước nhỏ hơn 120nt (có 1 probe đặc hiệu cho NST Y gồm 105 nucleotid).

2.2.2.3. Hoá chất chạy phản ứng giải trình tự gen

BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) gồm BigDye Terminator v3.0 (dATP, dCTP, dGTP và dUTP), BigDye buffer, cặp mồi đặc hiệu, dung dịch formamide.

2.2.2.4. Hoá chất chạy phản ứng Microsatellite DNA

- Sample Loading Solution (SLS) (Beckman Coulter)
- Size Standard 600 (Beckman Coulter)
- Mineral Oil (Beckman Coulter)
- Buffer Plate, Sample Plate 96 wells

Bảng 2.1. Các marker STR ứng dụng trong nghiên cứu

STR	Vị trí	Mũi xuôi	Mũi ngược
DXS8090	Intron 1	GGGTGAAATCCATCAAAA	ACAAATGCAGATGTACAAAAAATA
DXS9907	Intron 45	CTGTGGTGTAAGGTTTCGCTT	TAGACTTGACCTCATGGGCT
STR49	Intron 49	CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC	CATATGATACGATTTCGTGTTTTGC
DXS1067	Intron 50	TATGTCCTCAGACTATTCAGATGCC	CCTCCAGTAACAGATTTGGGTG
STR50	Intron 50	AAGGTTCTCCAGTAACAGATTTGG	TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC
DXS1036	Intron 51	TGCAGTTTATTATGTTTCCACG	GCCATTGATAAGTGCCAGAT

2.3. Phương pháp nghiên cứu

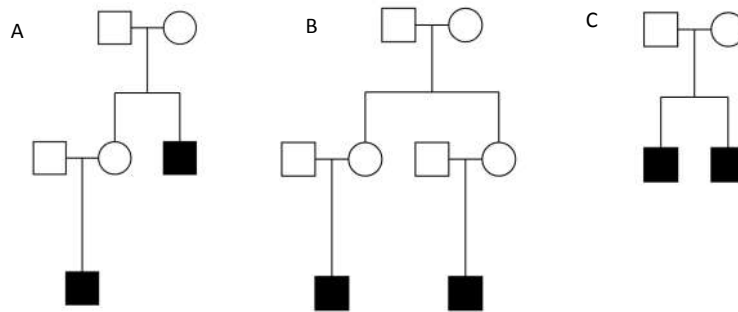
Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.3.1. Nội dung nghiên cứu

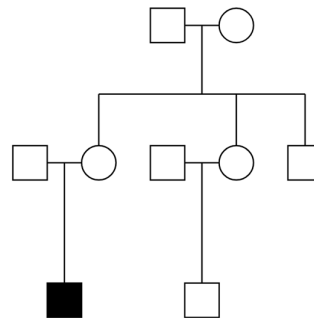
2.3.1.1. Phát hiện người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong gia đình người bệnh DMD

- Phân tích phả hệ gia đình người bệnh DMD:

- Phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng khi có ít nhất 2 thành viên nam mắc DMD. Người mẹ được xác định là mang gen dị hợp tử bắt buộc khi có một trong các điều kiện sau:
 - Có ít nhất hai con trai bị bệnh (hình 2.1c).
 - Có một con bị bệnh và một người anh hoặc em trai của người mẹ bị bệnh (hình 2.1a).
 - Có một con bị bệnh và con của chị hoặc em gái mình cũng bị bệnh (hình 2.1b).
- Phả hệ gia đình có tiền sử bệnh không rõ ràng khi trong phả hệ chỉ có duy nhất một thành viên nam bị bệnh. Mẹ của người bệnh có thể mang gen đột biến hoặc không (hình 2.2).



Hình 2.1. Phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng



Hình 2.2. Phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng

- Tách chiết DNA từ mẫu máu của các thành viên nữ trong gia đình người bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne.

- Xác định người lành mang gen đột biến dị hợp tử bằng kỹ thuật MLPA, giải trình tự gen.

- Tư vấn di truyền cho các thành viên nữ trong gia đình người bệnh DMD.

2.3.1.2. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

** Xác định các marker STR dị hợp tử*

Xác định các marker STR có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất từ 6 marker sử dụng trong nghiên cứu ở bảng 2.1.

** Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.*

Các thai phụ được chọc hút nước ối để chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng kỹ thuật Microsatellite DNA và được đối chiếu kết quả bằng kỹ thuật di truyền phân tử khác tùy theo dạng đột biến gen dystrophin.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào ối cũng được đồng thời thực hiện trên mẫu ối để chẩn đoán các trường hợp thai có bất thường NST kèm theo.

2.3.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu:

- Các kỹ thuật di truyền phân tử sẽ tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu Gen và Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Kỹ thuật chọc hút nước ối được tiến hành tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội và Bệnh viện Phụ sản Trung Ương.

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 1/2015 – 12/2018

2.3.3. Quy trình kỹ thuật

2.3.3.1. Quy trình kỹ thuật phát hiện người lành mang đột biến gen dystrophin bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen

a. Quy trình lấy mẫu

Mỗi người trong nhóm nghiên cứu được lấy 5 ml máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA (1,5 mg/mL).

b. Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi: phụ lục 1

Máu chống đông bằng EDTA cần được tách trong vòng 24 giờ, tiến hành ly tâm, thu cặn, tủa DNA và kiểm tra độ tinh sạch DNA bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm.

c. Phương pháp đo quang phổ

* Nguyên lý của đo mật độ quang:

- Acid nucleic có phổ hấp thụ cực đại ở ánh sáng tử ngoại 260 nm do có base purin và pyrimidin. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm (A_{260nm}) của các mẫu cho phép xác định nồng độ acid nucleic trong mẫu.

- Protein hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 280 nm do sự hấp thụ của các acid amin thơm và dị vòng: tyrosin, tryptophan, phenylalanin.

- Nếu $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8-2,0$ thì DNA được coi là tinh sạch.

* Tiến hành đo mật độ quang DNA:

Sử dụng máy quang phổ kế Thermo Electron Corporation của hãng Biomate: pha 2 μl DNA đã tách với 98 μl nước cất, đọc đối chiếu với ống trắng.

d. Quy trình kỹ thuật MLPA: phụ lục 2

- Biến tính DNA
- Phản ứng lai
- Phản ứng nối
- Phản ứng khuếch đại gen PCR
- Phân tích trên máy CEQ8000- Beckman Coulter:

Các mẫu được chạy trên máy CEQ8000 theo chương trình phân tích đoạn (fragment analysis), sau đó phân tích các đỉnh với độ lớn tương ứng. Các mẫu được so sánh với mẫu đối chứng bình thường. Kết quả được tính toán dựa vào tỷ lệ RPA (Relative Peak Area) tương ứng với từng exon so với mẫu chứng. RPA của mỗi exon được tính bằng cường độ tín hiệu tương ứng ($A_s - \text{Peak area}$) chia cho tổng cường độ tín hiệu của 45 đỉnh trong probemix (ΣA_s)

- **Người không mang gen đột biến:** Nếu tại vị trí tương ứng với kích thước của đoạn gen đó có xuất hiện các đỉnh tương ứng có tỷ lệ RPA bằng 1.
- **Người mang đột biến dị hợp tử (người lành mang gen bệnh):**
 - Nếu tại vị trí tương ứng với kích thước của gen, đỉnh tương ứng có tỷ lệ RPA từ 0,3-0,5 thì kết luận là người lành mang đột biến xoá đoạn.
 - Nếu tại vị trí tương ứng với kích thước của gen, đỉnh tương ứng có tỷ lệ RPA từ 1,5 trở lên thì kết luận là người mang đột biến lặp đoạn.

e. Quy trình kỹ thuật giải trình tự gen: phụ lục 3

Sản phẩm PCR sau khi được khuếch đại bằng những cặp mồi đặc hiệu sẽ được làm nguyên liệu cho kỹ thuật giải trình tự gen.

+ Điện di sản phẩm PCR giải trình tự gen dystrophin bằng hệ thống giải trình tự ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

+ Phân tích kết quả:

So sánh kết quả giải trình tự các exon của gen dystrophin với trình tự gen chuẩn tương ứng của ngân hàng gen (GeneBank). Tại Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein sử dụng phần mềm CLC Main Workbench để phân tích kết quả giải trình tự gen.

2.3.3.2. Quy trình chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Các đối tượng được xác định có nguy cơ cao sinh con mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne sẽ được khám, quản lý thai và tư vấn chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne.

a. Quy trình chọc ối

Thủ thuật chọc hút nước ối được tiến hành ở tuổi thai 17 tuần – 25 tuần, qua thành bụng dưới sự hướng dẫn của siêu âm, tiến hành tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

Các thủ tục cần thiết

- Bệnh án sản khoa gồm cả phiếu cam kết thực hiện thủ thuật
- Xét nghiệm cơ bản: công thức máu, nhóm máu, đông máu cơ bản, các xét nghiệm sinh hoá máu
- Phiếu siêu âm trước ngày làm thủ thuật.
- Thai phụ và người nhà được giải thích và thông tin đầy đủ về quy trình thủ thuật, các xét nghiệm di truyền cũng như các nguy cơ của thủ thuật chọc ối, ký các giấy tờ cam kết cần thiết.

Bác sỹ làm thủ thuật

Rửa tay thủ thuật, mặc áo và đi găng vô khuẩn

Tiến hành thủ thuật

- Thai phụ nằm ngửa trên bàn thủ thuật, siêu âm đo các chỉ số trước khi thực hiện thủ thuật: đường kính lưỡng đỉnh, chu vi bụng, chiều dài xương đùi, xác định vị trí của rau bám, lượng nước ối.

- Sát trùng, trải sạch vô khuẩn lên thành bụng thai phụ

- Tiến hành chọc kim theo sự hướng dẫn của siêu âm, qua thành bụng của thai phụ.

- Lượng ối lấy ra ở mỗi thai phụ là 15 ml

- 5 ml dịch ối để chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng các kỹ thuật di truyền phân tử.

- 10 ml dịch ối để nuôi cấy tế bào ối, xác định bộ NST của thai nhi.

- Siêu âm lại sau thủ thuật, kiểm tra lại tình trạng của thai

- Người bệnh nghỉ ngơi tại viện 60 - 120 phút, về nhà sau khi ổn định

b. Quy trình kỹ thuật Microsatellite DNA

Mỗi thai phụ và thành viên nam mắc DMD trong gia đình được lấy 2 ml – 5 ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA (1,5 mg/mL).

Kỹ thuật Microsatellite DNA được tiến hành trên mẫu DNA của thai nhi, thai phụ và người bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne trong từng gia đình.

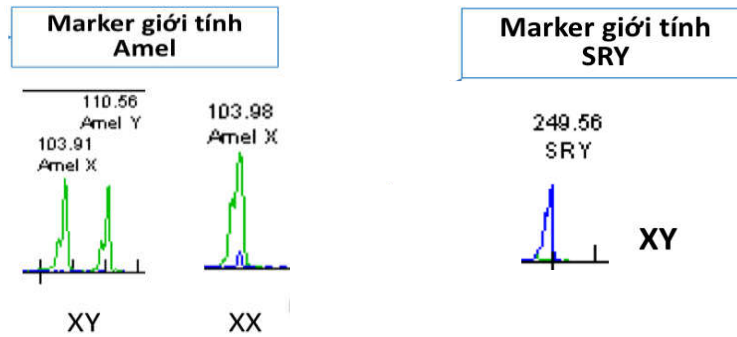
*** Tách chiết DNA của tế bào ối, tế bào máu thai phụ và người bệnh DMD:** sử dụng phương pháp phenol - chloroform.

***Xác định giới tính**

Ngoài các marker để xác định alen bệnh cho bệnh DMD, chúng tôi còn sử dụng 2 marker xác định giới tính là marker Amel và marker SRY. Do DMD là bệnh biểu hiện ở trẻ nam, vì vậy việc xác định giới tính của thai nhi trước khi tiến hành chẩn đoán bằng kỹ thuật Microsatellite là hết sức cần thiết. Các trường hợp được xác định là thai nam sẽ được tiến hành chẩn đoán DMD bằng kỹ thuật Microsatellite DNA, các trường hợp là thai nữ sẽ được tiến hành chẩn đoán người mang gen bằng kỹ thuật MLPA.

Marker Amel được thiết kế nằm trên cả hai NST giới tính X và Y. Trong trường hợp thai nam sẽ có 2 đỉnh tương ứng với đỉnh của NST X (104bp) và đỉnh của NST Y (110bp). Trong trường hợp là thai nữ thì sẽ chỉ cho 1 đỉnh tương ứng với đỉnh của NST X (104bp) (hình 2.3).

Marker SRY được thiết kế trên nhiễm sắc thể Y nên trong trường hợp là thai nam sẽ xuất hiện 1 đỉnh của NST Y (250bp), trong trường hợp thai nữ sẽ không xuất hiện đỉnh tín hiệu (hình 2.3).



Hình 2.3. Marker xác định giới tính thai nhi

*** Xác định marker STR dị hợp tử**

DNA tổng số sau khi tách chiết từ mẫu máu được sử dụng làm khuôn cho phản ứng single-PCR với cặp mồi đặc hiệu khuếch đại các marker STR.

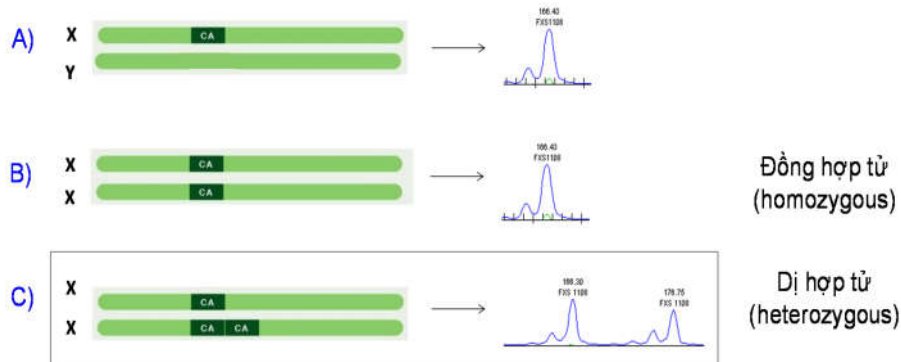
Thành phần và điều kiện của phản ứng single-PCR khuếch đại các marker STR đặc hiệu trên gen dystrophin.

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất	11,9
Buffer 10X	2,0
dNTP (2,5 mM)	2,0
Môi xuôi	0,5
Môi ngược	0,5
Taq polymerase (5 u/μl)	0,1
DNA	3,0
Tổng	20,0

Chu trình nhiệt phản ứng PCR:

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 10 phút		
2 – 34	95°C - 50 giây	57°C - 50 giây	72°C - 2 phút
35			72°C - 10 phút
Bảo quản ở 10°C			

Phân tích kết quả:



Hình 2.4. Xác định marker STR dị hợp tử

- Nếu là thai nam, sản phẩm điện di mao quản sẽ chỉ cho 1 đỉnh (A)
- Nếu là thai nữ, sản phẩm điện di mao quản cho 1 đỉnh nếu là vùng STR đồng hợp tử (B) và cho 2 đỉnh nếu là vùng STR dị hợp tử (C)

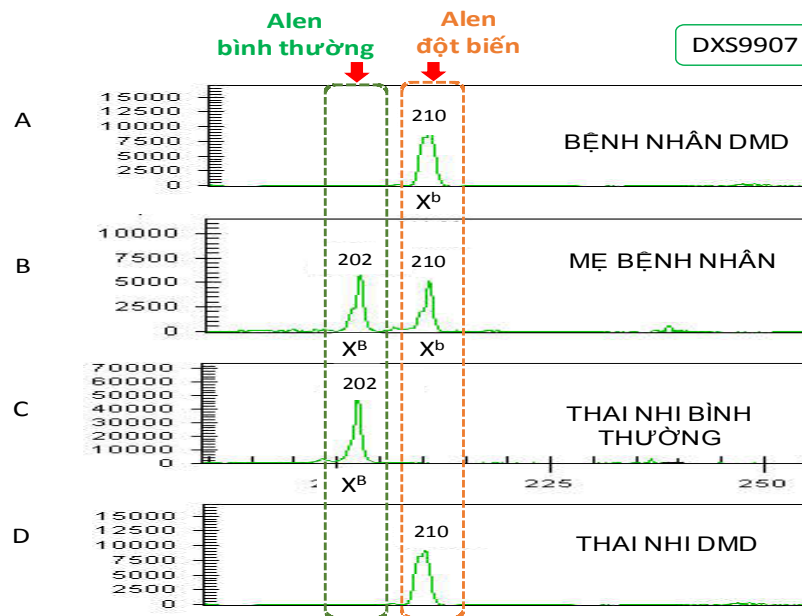
Những marker STR dị hợp tử sẽ được lựa chọn để thực hiện chẩn đoán trước sinh.

*** Xác định alen bệnh lý**

Tiến hành xác định alen bệnh lý qua phân tích DNA của người mẹ và con trai bị bệnh. Trong phản ứng này, các cặp mồi gắn huỳnh quang khuếch đại một số đoạn trình tự lặp lại đặc hiệu nằm trên cùng một vùng gen dystrophin. Sản phẩm của phản ứng PCR sau đó được phân tích bằng điện di mao quản để xác định kích thước các đoạn DNA được khuếch đại.

DMD là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể giới tính X, không có alen tương ứng trên NST Y nên các cặp mồi được thiết kế trên nhiễm sắc thể X. Ở mỗi vùng STR, người mẹ (XX) sẽ có 2 đỉnh tương ứng với 2 alen, người con trai (XY) sẽ có 1 đỉnh tương ứng với 1 alen. So sánh kết quả của từng marker giữa người mẹ và người con trai bị bệnh sẽ xác định được alen bệnh lý khi alen đó xuất hiện ở cả người mẹ và người con trai bị bệnh.

Cách phân tích kết quả được trình bày ở hình 2.5.



Hình 2.5. Kỹ thuật Microsatellite DNA trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

(Nguồn: Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội)

Hình A: Người bệnh DMD xuất hiện 1 đỉnh alen kích thước 210bp.

Hình B: Mẹ người bệnh xuất hiện 2 đỉnh alen kích thước 202bp và 210 bp.

Qua hình A và B, nhận thấy đỉnh alen 210bp xuất hiện ở cả người bệnh và mẹ người bệnh, xác định alen kích thước 210bp là alen bệnh, alen 202bp là alen bình thường.

Hình C: Thai nhi mang alen 202bp, là alen bình thường. Kết luận thai nhi không mắc bệnh.

Hình D: Thai nhi mang alen 210bp là alen bệnh. Kết luận thai nhi mắc DMD.

c. Quy trình kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen

**Kỹ thuật MLPA: Phụ lục 2*

Cách đọc kết quả: Sản phẩm khuếch đại probe sẽ được điện di mao quản huỳnh quang trên máy giải trình tự để phân tích kết quả.

- Nếu có đột biến xóa đoạn, probe không gắn được vào gen đích sẽ không xuất hiện đỉnh tương ứng tại exon đột biến.

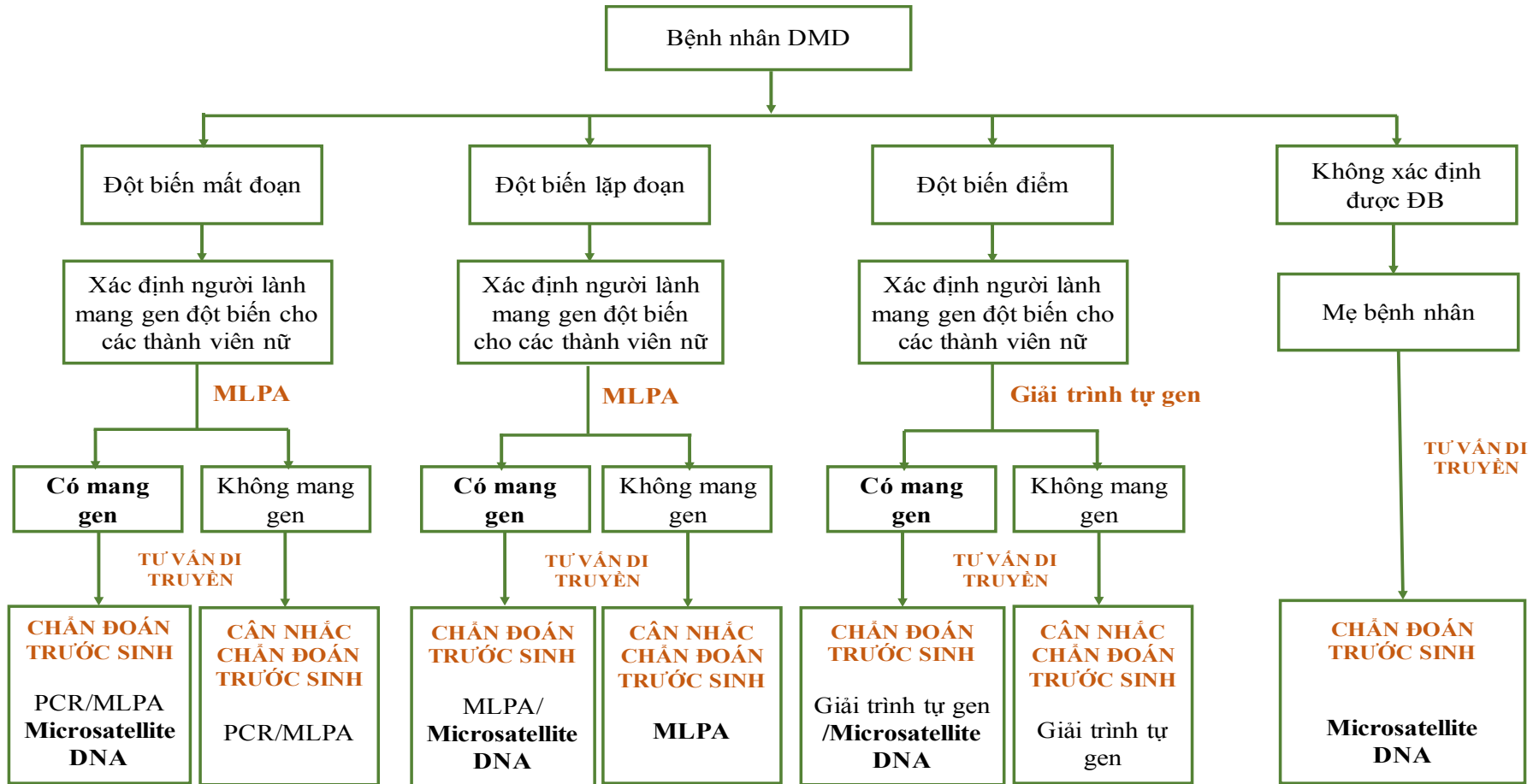
- Với đột biến lặp đoạn, kết quả được tính toán dựa vào tỷ lệ RPA (Relative Peak Area) tương ứng với từng exon so với mẫu chứng. Tỷ lệ RPA của mỗi exon được tính bằng cường độ tín hiệu tương ứng (A_s – Peak area) chia cho tổng cường độ tín hiệu của 45 đỉnh trong probemix (ΣA_s). Exon lặp đoạn khi tỷ lệ RPA lớn hơn 1,5

** Kỹ thuật giải trình tự gen: Phụ lục 3*

2.3.3.3. Quy trình nuôi cấy tế bào ối làm nhiễm sắc thể ở thai nhi

Nuôi cấy theo phương pháp hở, tủ ấm 37°C với 5% CO₂ và 95% không khí cùng nguồn ẩm. Thời gian nuôi cấy trung bình từ 7-15 ngày. Các tế bào ối thu được sau khi nuôi cấy sẽ được tách DNA theo phương pháp phenol-chloroform và phân tích gen, đồng thời cũng được sử dụng để nhuộm băng G và phân tích karyotype của thai.

2.3.4. Sơ đồ nghiên cứu



2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

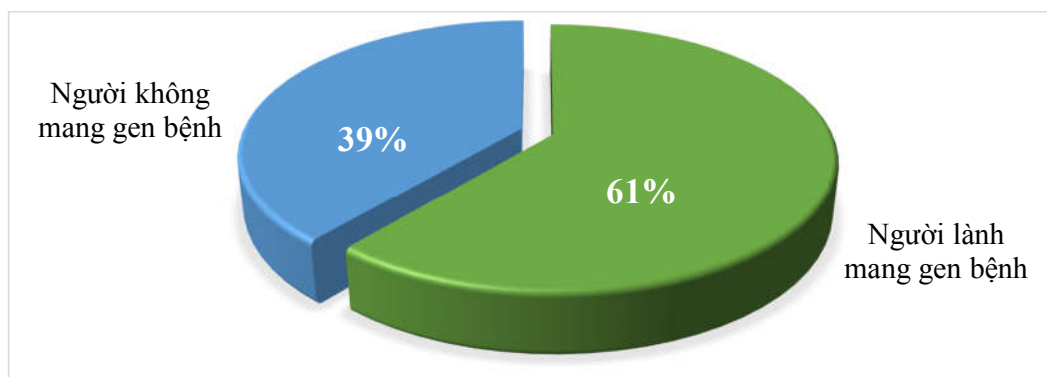
Những gia đình có thành viên nam được chẩn đoán mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne sẽ được đưa vào nghiên cứu khi đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu. Người bệnh và các thành viên trong gia đình sẽ được tư vấn và giải thích cụ thể về ý nghĩa, mục đích, qui trình nghiên cứu, quyền lợi và nghĩa vụ của người tham gia nghiên cứu, quyền được tự do rút khỏi nghiên cứu, được đảm bảo bí mật cá nhân trong quá trình nghiên cứu và kết quả nghiên cứu. Các thông tin về người bệnh, các thành viên trong gia đình và kết quả chẩn đoán hoàn toàn được giữ bí mật.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen

Trong nghiên cứu này 85 thành viên nữ trong 35 gia đình của 35 người bệnh DMD được tiến hành xác định người lành mang gen bệnh.



Hình 3.1. Tỷ lệ người lành mang gen bệnh

Nhận xét:

Kết quả 52/85 thành viên được chẩn đoán là người lành mang gen bệnh, chiếm 61%; 33/85 thành viên được xác định không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 39%.

Bảng 3.1. Tỷ lệ người lành mang gen bệnh ở các bà mẹ và thành viên nữ

	Mẹ người bệnh DMD		Thành viên nữ khác		Tổng
	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	
Mang gen	41	91,1	11	27,5	52
Không mang gen	4	8,9	29	72,5	33
Tổng	45	100	40	100	85

Nhận xét:

Trong 85 thành viên nữ có 45 bà mẹ có tiền sử sinh con mắc DMD và 40 người không sinh con mắc DMD hoặc chưa sinh con.

Trong 45 bà mẹ có con DMD, xác định được 41 người mang gen bệnh chiếm tỷ lệ 91,2% trong đó có 1 bà mẹ mang gen bệnh ở trạng thái khảm; 4 người không mang gen bệnh chiếm tỷ lệ 8,9%.

Trong 40 thành viên nữ không có tiền sử sinh con DMD có 11 người được chẩn đoán là người lành mang bệnh, chiếm tỷ lệ 27,5% và 29 người được chẩn đoán không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 72,5%.

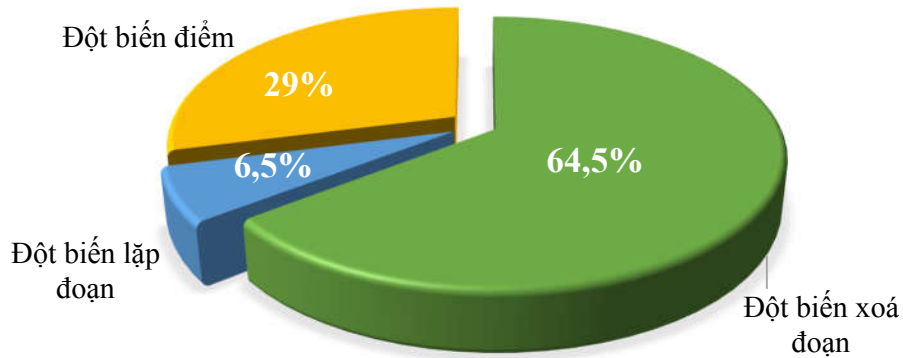
Bảng 3.2. Tỷ lệ người lành mang gen bệnh theo tiền sử gia đình

	Gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng		Gia đình không có tiền sử bệnh rõ ràng	
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %
Mang gen bệnh	17	100	24	85,7
Không mang gen bệnh	0	0	4	14,3
Tổng	17	100	28	100

Nhận xét:

Trong 45 bà mẹ có tiền sử sinh con DMD, có 17 người có thuộc các phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng (phả hệ có ít nhất 2 người mắc DMD), 28 người thuộc các phả hệ gia đình có tiền sử bệnh không rõ ràng.

Trong các gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng, 17/17 bà mẹ (100%) là người mang gen bệnh. Ở các gia đình có tiền sử bệnh không rõ ràng, xác định 24 người lành mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 85,7%; 4 người không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 14,3%.



Hình 3.2. Tỷ lệ các dạng đột biến ở các thành viên nữ

Nhận xét:

Trong 31 dạng đột biến xác định được ở các thành viên nữ, có 20 dạng đột biến xoá đoạn, chiếm tỷ lệ 64,5%; 9 dạng đột biến điểm, chiếm tỷ lệ 29% và 2 dạng đột biến lặp đoạn, chiếm tỷ lệ 6,5%.

Bảng 3.3. Số lượng thành viên nữ được xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen

Kỹ thuật	Người bệnh	Thành viên nữ
MLPA	25	66
Giải trình tự gen	10	19
Tổng	35	85

Nhận xét:

Trong 85 thành viên nữ, 66/85 thành viên nữ thuộc gia đình của 25 người bệnh DMD có đột biến xoá đoạn và lặp đoạn. Các thành viên nữ này được tiến hành phân tích tình trạng mang gen đột biến bằng kỹ thuật MLPA; 19/65 thành viên nữ thuộc gia đình của 10 người bệnh DMD có đột biến điểm sẽ được phân tích tình trạng mang gen đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

Bảng 3.4. Tỷ lệ phát hiện người lành mang gen bệnh

	Mang gen bệnh		Không mang gen bệnh		Tổng
	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	
MLPA	40	76,9	26	78,8	66
Giải trình tự gen	12	23,1	7	21,2	19
Tổng	52	100	33	100	85

Nhận xét:

Trong 52 thành viên nữ mang gen bệnh, 40 người được xác định là người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA, chiếm tỷ lệ 76,9%; 12 người được xác định là người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen, chiếm tỷ lệ 23,1%.

Trong 33 thành viên nữ không mang gen bệnh, 26 người được xác định là không mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA, chiếm tỷ lệ 78,8%; 7 người được xác định là không mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen, chiếm tỷ lệ 21,2%.

3.1.1. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA

Kỹ thuật MLPA được áp dụng để xác định người lành mang gen đột biến dị hợp tử trên 66 thành viên nữ của 25 gia đình người bệnh DMD có đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen. Tỷ lệ xác định người lành mang gen được mô tả ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA

	n	Tỷ lệ (%)
Mang gen	40	60,6
Không mang gen	26	39,4
Tổng	66	100

Nhận xét:

Kết quả trên cho thấy đã xác định được 40 (60,6%) người có mang gen đột biến dị hợp tử (người lành mang gen bệnh) và 26 (39,4%) người không mang gen đột biến.

Bảng 3.6. Các dạng đột biến được phát hiện trên người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA

STT	Dạng đột biến ở BN	Exon	Vị trí đột biến	Số thành viên nữ mang gen	Số thành viên nữ không mang gen
1	Xoá đoạn	3-7	Vùng 5' tận	1	0
2	Xoá đoạn	3-13	Vùng 5' tận	3	1
3	Xoá đoạn	4-6	Vùng 5' tận	1	0
4	Xoá đoạn	8-12	Vùng 5' tận	1	0
5	Xoá đoạn	8-13	Vùng 5' tận	1	3
6	Xoá đoạn	12-13	Vùng 5' tận	10	3
7	Xoá đoạn	12-29	Vùng 5' tận	1	0
8	Xoá đoạn	7-43	Vùng 5' tận đến vùng trung tâm	1	0
9	Xoá đoạn	11-39	Vùng 5' tận đến vùng trung tâm	5	6
10	Xoá đoạn	19-52	Vùng 5' tận đến vùng trung tâm	1	0
11	Xoá đoạn	35-43	Vùng trung tâm	1	0
12	Xoá đoạn	44	Vùng trung tâm	1	0
13	Xoá đoạn	44	Vùng trung tâm	4	8
14	Xoá đoạn	44	Vùng trung tâm	1	0
15	Xoá đoạn	45-47	Vùng trung tâm	1	0
16	Xoá đoạn	48-50	Vùng trung tâm	1	0
17	Xoá đoạn	48-50	Vùng trung tâm	1	0
18	Xoá đoạn	48-50	Vùng trung tâm	1	0
19	Xoá đoạn	49-52	Vùng trung tâm	1	0
20	Xoá đoạn	51	Vùng trung tâm	1	0
21	Xoá đoạn	51-53	Vùng trung tâm	0	1
22	Xoá đoạn	45-51	Vùng trung tâm	0	3
23	Xoá đoạn	47-50	Vùng trung tâm	0	1
24	Lặp đoạn	14-43	Vùng 5' tận đến vùng trung tâm	1	0
25	Lặp đoạn	44	Vùng trung tâm	1	0
Tổng				40	26

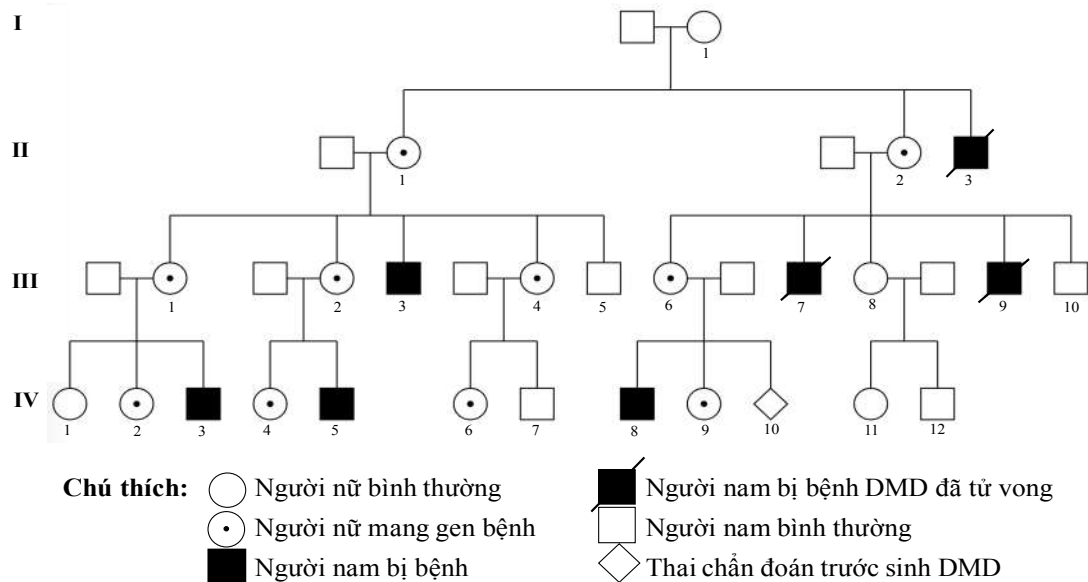
Nhận xét:

Có 22 dạng đột biến xoá đoạn và lặp đoạn xác định được ở 40 thành viên nữ là người lành mang gen bệnh. 20/22 dạng đột biến là xoá đoạn chiếm tỷ lệ 90,9%; 2/22 dạng đột biến là lặp đoạn chiếm tỷ lệ 9,1%. Các đột biến có thể là xoá đoạn hoặc lặp đoạn một hay nhiều exon trên gen dystrophin tập trung ở vùng 5' tận và vùng trung tâm. Có một số đột biến xoá đoạn và lặp đoạn lớn kéo dài từ vùng 5' tận đến vùng trung tâm gen dystrophin.

3.1.1.1. Phân tích phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng

* **Kết quả xác định người lành mang gen bệnh ở gia đình người bệnh DMD có đột biến xoá đoạn ở vùng 5' tận**

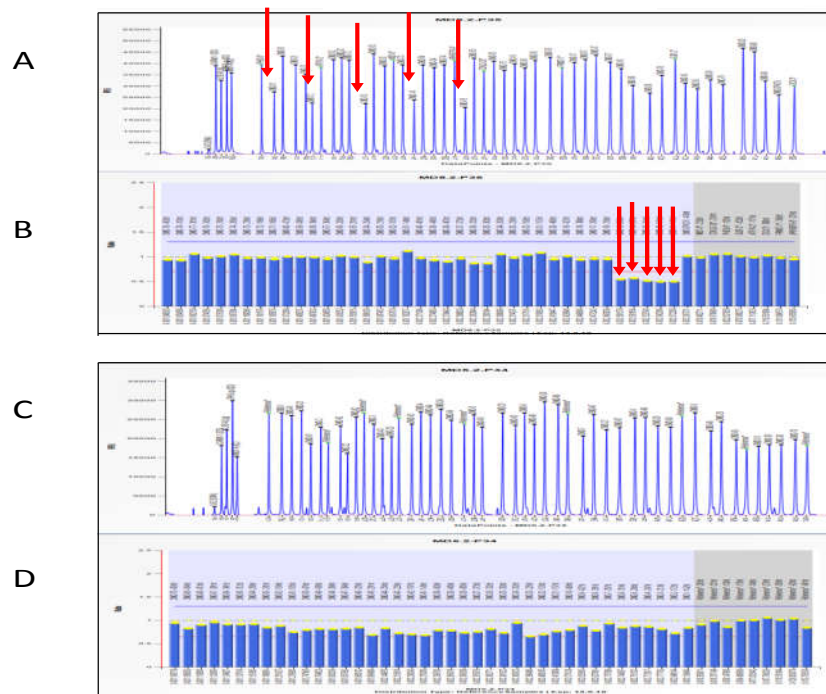
Gia đình người bệnh D.10 có 7 thành viên nam được chẩn đoán mắc bệnh DMD. Kết quả MLPA phát hiện thấy người bệnh có đột biến xoá đoạn exon 11-15 ở vùng 5' tận của gen dystrophin. Tiến hành lập phả hệ gia đình và xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong gia đình (14 thành viên).



Hình 3.3. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.10

Nhận xét:

Theo sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.10, có 7 thành viên nam bị bệnh DMD ($II_3, III_3, III_7, III_9, IV_3, IV_5, IV_8$). Phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng, vì vậy 6 bà mẹ của các người bệnh DMD là những người mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc ($I_1, II_1, II_2, III_1, III_2, III_6$). 8 thành viên nữ còn lại có thể là người lành mang gen bệnh. Tất cả các thành viên nữ trong phả hệ được lấy máu xét nghiệm để xác định người mang gen bằng kỹ thuật MLPA.



Hình 3.4. Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA bằng phần mềm *coffalyser* của thành viên nữ II_1 (A-B) và IV_1 (C-D)

Nhận xét

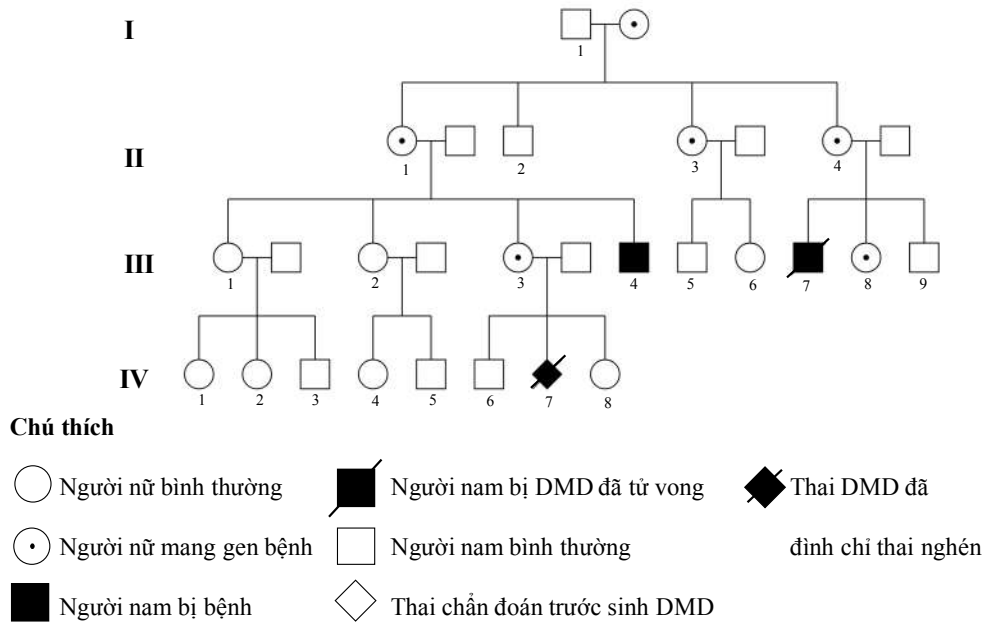
Thành viên nữ II_1 (Hình A-B): Hình ảnh phân tích MLPA các exon 11-15 (hình A) cho thấy chiều cao đỉnh thấp hơn mẫu người bình thường. Tỷ lệ RPA tại các exon 11-15 (Hình B) so với chứng nhỏ hơn 0,5 trong khi các exon khác dao động quanh 1. Như vậy xác định thành viên nữ II_1 là người mang gen đột biến dị hợp tử xoá đoạn exon 11-15.

Thành viên nữ IV₁ (Hình C-D): Hình ảnh phân tích MLPA các exon 11-15 (hình C) cho thấy chiều cao đỉnh bằng mẫu người bình thường. Tỷ lệ RPA tại các exon 11-15 (Hình D) dao động quanh 1 như các exon khác. Như vậy xác định thành viên nữ IV₁ là người không mang gen đột biến.

Phân tích tương tự với các thành viên nữ còn lại xác định các thành viên I₁, I₂, II₂, II₄, II₆, IV₂, IV₄, IV₆, IV₉ là người mang gen đột biến dị hợp tử xoá đoạn exon 11-15. Các thành viên III₈, IV₁, IV₁₁ không mang gen đột biến. Như vậy cả hệ có 4 thành viên nữ mang gen đột biến dị hợp tử và 10 thành viên nữ không mang gen đột biến.

*** Kết quả xác định người lành mang gen bệnh ở gia đình người bệnh DMD có đột biến xoá đoạn nhiều exon từ vùng 5' tận đến vùng trung tâm:**

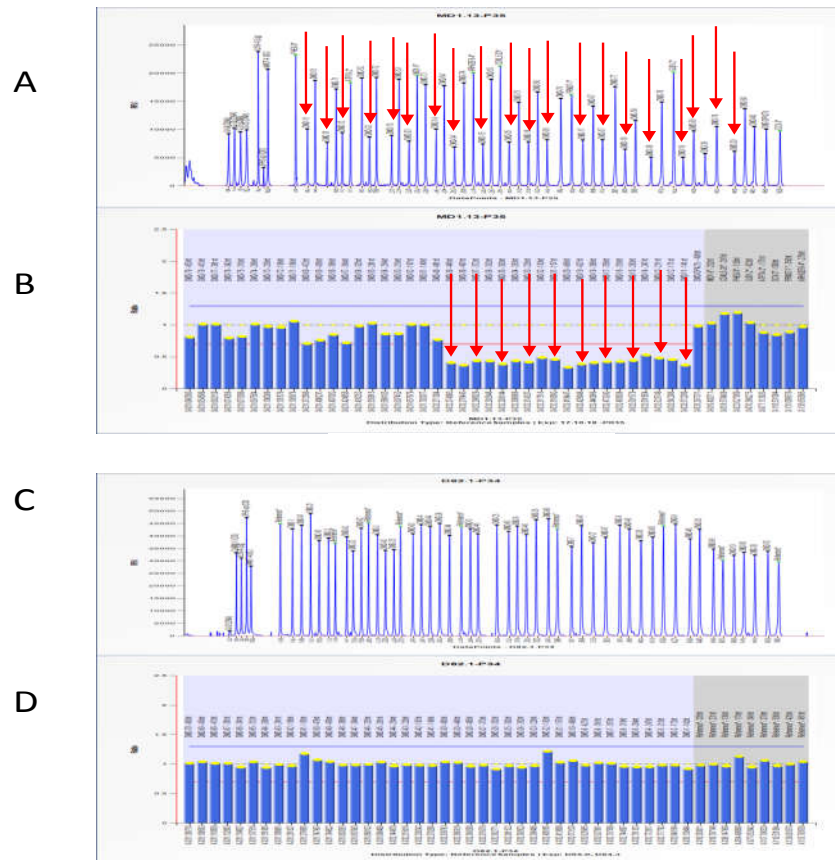
Gia đình người bệnh D.43 có 2 thành viên nam được chẩn đoán mắc bệnh DMD. Kết quả MLPA phát hiện thấy người bệnh có đột biến xoá đoạn exon 11 - 39 kéo dài từ vùng 5' tận đến vùng trung tâm của gen dystrophin. Tiến hành lập phả hệ gia đình người bệnh và xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong gia đình (13 thành viên).



Hình 3.5. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.43

Nhận xét:

Phả hệ gia đình người bệnh D.43 có 2 thành viên nam bị DMD. Phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng, vì vậy các bà mẹ có con bị DMD được xác định là người lành mang gen bệnh (thành viên nữ III₃, II₁, II₄). 10 thành viên nữ còn lại có nguy cơ mang gen đột biến dị hợp tử.



Hình 3.6. Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA của thành viên nữ III₃ (A-B) và III₂ (C-D)

Nhận xét

Thành viên nữ III₃ (Hình A - B): Hình ảnh phân tích MLPA các exon 11-39 (hình A) cho thấy chiều cao đỉnh thấp hơn mẫu người bình thường. Tỷ lệ RPA tại các exon 11-39 (Hình B) so với chứng nhỏ hơn 0,5 trong khi các exon khác dao động quanh 1. Kết luận thành viên nữ III₃ mang gen đột biến dị hợp tử xoá đoạn exon 11-39.

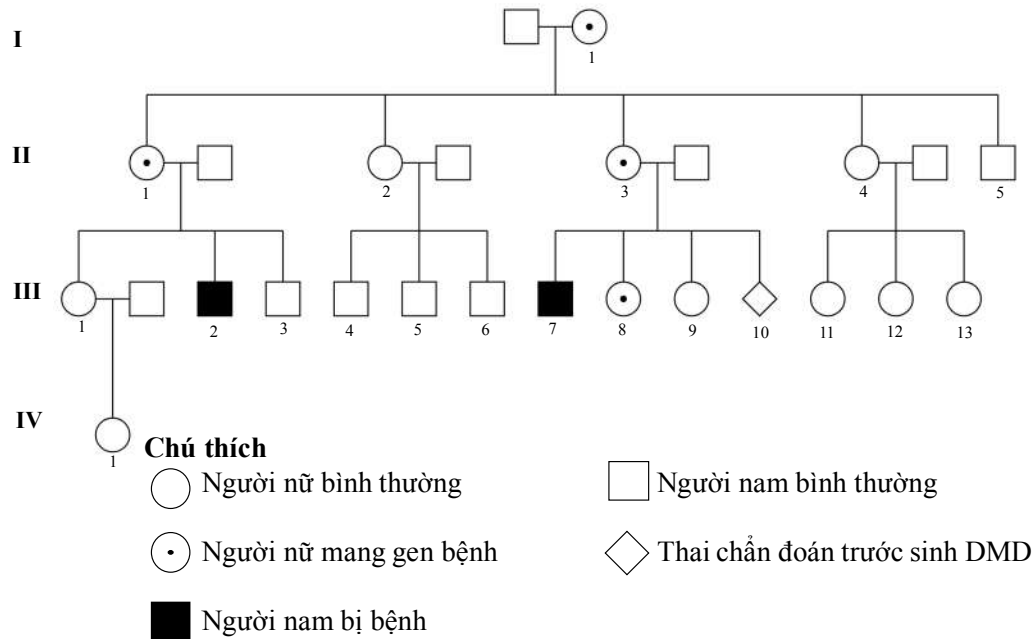
Thành viên nữ III₂ (Hình C-D): Hình ảnh phân tích MLPA các exon 11-39 (hình C) cho thấy chiều cao đỉnh bằng mẫu người bình thường. Tỷ lệ RPA tại các exon 11-39 (Hình D) dao động quanh 1 như các exon khác. Kết luận thành viên nữ III₂ không mang gen đột biến.

Phân tích tương tự với các thành viên nữ còn lại xác định thành viên nữ I₁, II₁, II₃, II₄, III₈ là người lành mang gen bệnh. Các thành viên nữ III₁, III₆, IV₁, IV₂, IV₄, IV₈ không mang gen đột biến.

Như vậy phả hệ có 6 thành viên nữ mang gen đột biến dị hợp tử và 7 thành viên nữ không mang gen đột biến.

*** Kết quả xác định người lành mang gen bệnh ở gia đình người bệnh DMD có đột biến xoá đoạn 1 exon vùng trung tâm**

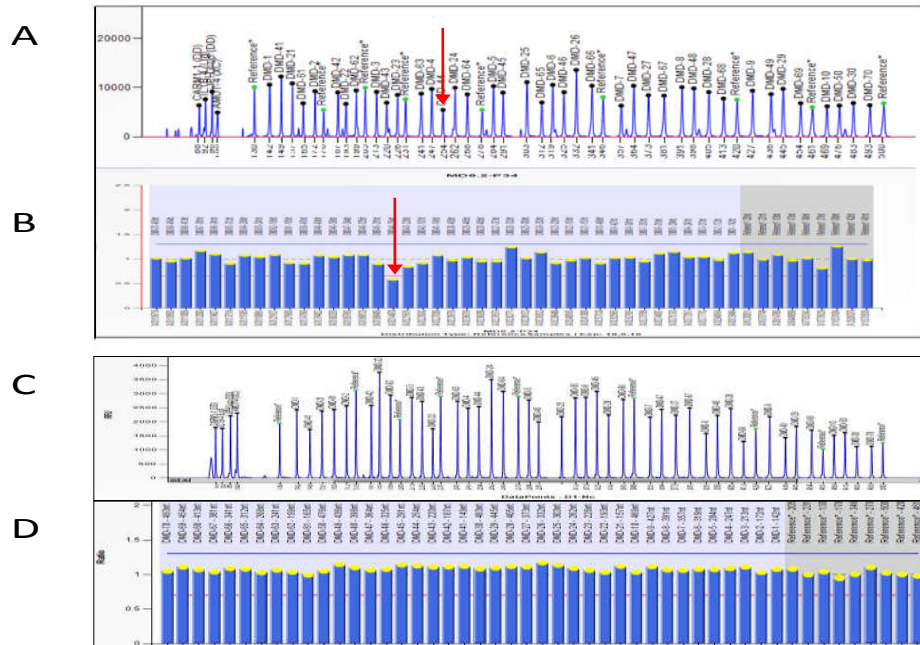
Gia đình D.17 có 2 thành viên nam được chẩn đoán bị DMD. Kết quả MLPA phát hiện người bệnh có đột biến xoá đoạn exon 44 ở vùng trung tâm gen dystrophin. Tiến hành lập phả hệ gia đình người bệnh và xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong gia đình (12 thành viên).



Hình 3.7. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.17

Nhận xét:

Do trong phả hệ có 2 người bệnh DMD nên đây là phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng. Mẹ của 2 người bệnh DMD (thành viên nữ II₁ và II₃) được xác định là người mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc. Các thành viên nữ còn lại có nguy cơ mang gen đột biến dị hợp tử. Thực hiện kỹ thuật MLPA xác định đột biến cho các thành viên nữ trong phả hệ.



Hình 3.8. Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA bằng phần mềm *coffalyser* của thành viên nữ II₁ (A-B) và III₁ (C-D)

Nhận xét

Thành viên nữ II₁ (hình A-B): Hình ảnh phân tích MLPA của exon 44 (hình A) cho thấy chiều cao đỉnh thấp hơn mẫu người bình thường. Tỷ lệ RPA tại exon 44 (hình B) so với chứng nhỏ hơn 0,5 trong khi các exon khác dao động quanh 1. Như vậy thành viên nữ II₁ mang gen đột biến dị hợp tử.

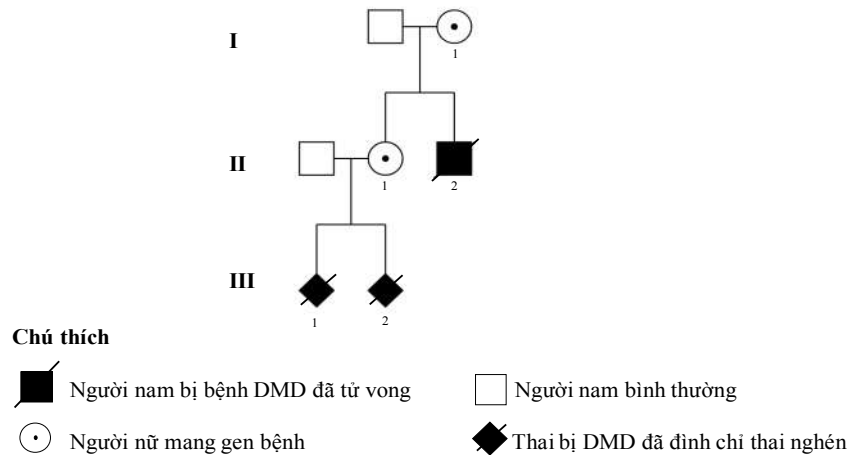
Thành viên nữ III₁ (hình C-D): Hình ảnh phân tích MLPA của exon 44 (hình C) cho thấy chiều cao đỉnh bằng mẫu người bình thường. Tỷ lệ RPA tại exon này (hình D) dao động quanh 1 như các exon khác. Như vậy xác định thành viên nữ III₁ không mang gen đột biến.

Phân tích tương tự với các thành viên nữ trong phả hệ xác định các thành viên nữ I₁, II₃ và III₈ là người lành mang đột biến xoá đoạn exon 44. Các thành viên nữ II₂, II₄, III₉, III₁₁, III₁₂, III₁₃, IV₁ không mang gen đột biến.

Như vậy phả hệ có 4 thành viên nữ mang gen đột biến dị hợp tử và 8 thành viên nữ không mang gen đột biến.

*** Kết quả xác định người lành mang gen bệnh ở gia đình người bệnh DMD có đột biến lặp đoạn kéo dài từ vùng 5' – vùng trung tâm:**

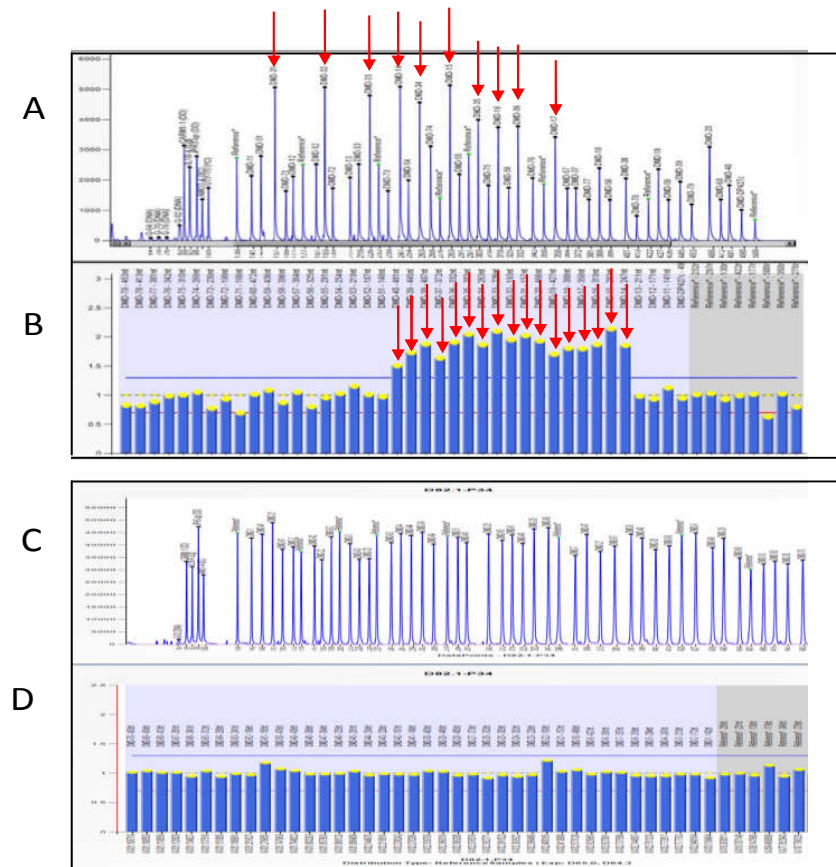
Gia đình người bệnh D.50 có 1 thành viên nam được chẩn đoán mắc bệnh DMD đồng thời chị gái người bệnh có 2 lần mang thai chẩn đoán trước sinh con mắc DMD. Kết quả MLPA phát hiện thấy người bệnh có đột biến lặp đoạn exon 14-43 kéo dài từ vùng 5' tận đến vùng trung tâm của gen dystrophin. Tiến hành lập phả hệ gia đình người bệnh và xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong gia đình (2 thành viên).



Hình 3.9. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.50

Nhận xét:

Phả hệ gia đình người bệnh D.50 có một người bệnh DMD đã tử vong. Chị của người bệnh có 2 lần mang thai đều được chẩn đoán trước sinh thai mắc DMD. Đây là phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng, vì vậy mẹ và chị gái người bệnh đều được xác định là người lành mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc. Thực hiện kỹ thuật MLPA chẩn đoán người mang gen cho 2 thành viên nữ.



Hình 3.10. Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA của thành viên nữ II₁ (A - B) và người bình thường (mẫu chứng) (C-D)

Nhận xét:

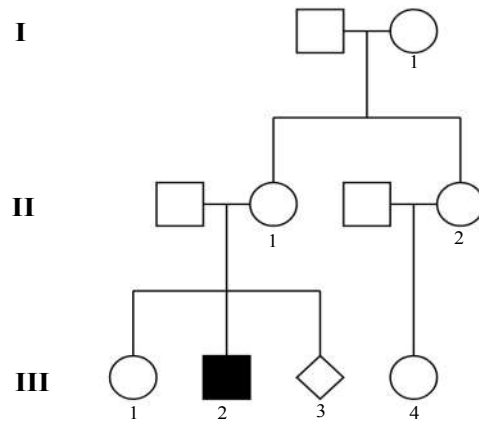
Hình ảnh phân tích MLPA của thành viên nữ II₁ (hình A) tại các exon 14-43 cho thấy cường độ tín hiệu của đỉnh cao hơn so với mẫu người bình thường (hình C). Sau khi phân tích dựa trên RPA ta có tỷ lệ RPA tại các exon từ 14 đến 43 của thành viên nữ II₁ (hình B) so với chứng (hình D) lớn hơn 1,5 trong khi của các exon khác giao động xung quanh 1. Kết luận thành viên nữ II₁ là người lành mang gen bệnh.

Phân tích tương tự, xác định thành viên nữ I₁ mang gen đột biến dị hợp tử. Như vậy 2 thành viên nữ trong gia đình đều là người lành mang gen bệnh.

3.1.1.2. Phân tích phả hệ gia đình có tiền sử bệnh không rõ ràng

*** Kết quả xác định người lành mang gen bệnh ở gia đình người bệnh DMD có đột biến xoá đoạn ở vùng trung tâm:**

Gia đình người bệnh D.35 chỉ có 1 thành viên nam được chẩn đoán mắc bệnh DMD. Kết quả MLPA phát hiện thấy người bệnh có đột biến xoá đoạn exon 45 - 52 ở vùng trung tâm của gen dystrophin. Tiến hành lập phả hệ gia đình người bệnh và xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong gia đình (5 thành viên).



Chú thích

○ Người nữ bình thường

□ Người nam bình thường

◉ Người nữ mang gen bệnh

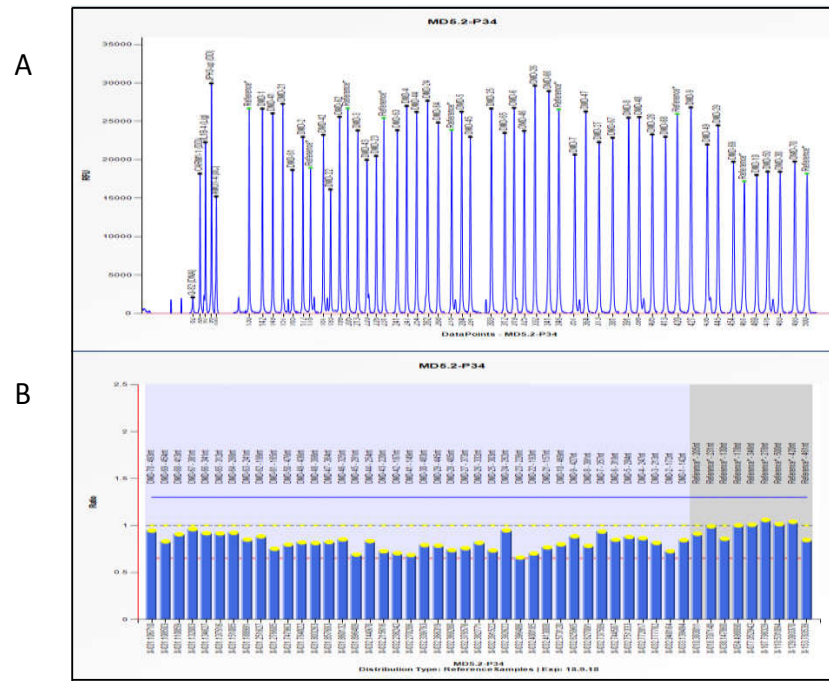
◇ Thai chửa đoán trước sinh DMD

■ Người nam bị bệnh

Hình 3.11. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.35

Nhận xét:

Qua phân tích cho thấy đây là phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng do chỉ có 1 thành viên nam mắc DMD. Vì vậy các thành viên nữ trong phả hệ (I₁, II₁, II₂, III₁, III₄) có thể là người lành mang gen bệnh.



Hình 3.12. Hình ảnh MLPA và kết quả tính toán RPA bằng phần mềm *coffalyser* của các thành viên nữ II₁

Nhận xét:

Hình ảnh phân tích MLPA các exon 45-52 cho thấy chiều cao đỉnh bằng mẫu người bình thường. Tỷ lệ RPA tại các exon này dao động quanh 1 như các exon khác. Như vậy xác định thành viên nữ II₁ không mang gen đột biến. Phân tích tương tự với 4 thành viên nữ còn lại (I₁, II₂, III₁, III₄) đều cho kết quả không mang gen đột biến. Như vậy cả 5 thành viên nữ trong phả hệ đều không mang gen đột biến. Đột biến ở người bệnh DMD trong phả hệ là đột biến mới phát sinh.

3.1.2. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen

Thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen xác định người lành mang gen bệnh cho 19 thành viên nữ trong 10 gia đình người bệnh DMD có đột biến điểm.

Bảng 3.7. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen

	n	Tỷ lệ (%)
Mang gen bệnh	12	63,2
Không mang gen bệnh	7	36,8
Tổng	19	100

Nhận xét:

Trong 19 thành viên nữ được phân tích gen, xác định 12 thành viên nữ là người lành mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 63,2%; 7 thành viên nữ không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 36,8%.

Bảng 3.8. Các dạng đột biến điểm được phát hiện trên người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen

STT	Đột biến	Exon/ intron	Biến đổi protein	Số thành viên nữ mang gen	Số thành viên nữ không mang gen
1	c2032_203 3delCA	exon 17	p.Gln678AspfsX41 (p.Q678RfsX41)	2	0
2	c2797C>T	exon 21	p.Glu933Ter (pE933X)	1	0
3	c.3021A>T	exon 23	Lys1007Ter (L1007X)	1	0
4	c.3713delA	exon 27	Lys1238ArgfsX6 (K1238RfsX6)	1	1
5	c.5273C>A	exon 37	p.Ser1758Ter (p.S1758X)	0	1
6	c.6282C>T	exon 43	p.Arg2094Ter (p.R2094X)	1	1

7	c.6237-6238delCC	exon 43	p.Ser2079SerfsX2 (p.S2079SfsX2)	1	0
8	c.6640C>A	exon 46	p.Ser2214Ter (p.S2214X)	1	0
9	c6282C>T	exon 47	p.Gln2297Ter (p.Q2297X)	2	4
10	c.10223+1	intron 70	Splicing	2	0
Tổng				12	7

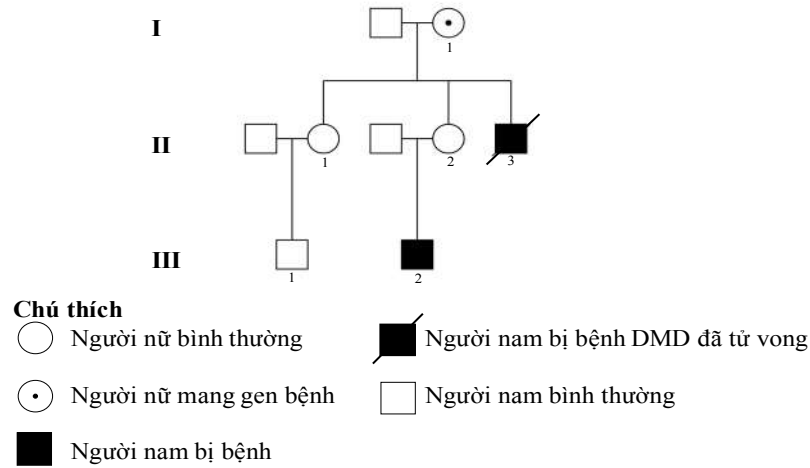
Nhận xét:

Có 9 dạng đột biến điểm được xác định ở 12 thành viên nữ. Phần lớn các đột biến đều tập trung ở exon, chỉ 1 trường hợp đột biến tại intron gây ảnh hưởng đến quá trình cắt nối intron và exon của gen dystrophin. Các đột biến điểm xảy ra rải rác trên gen dystrophin, hầu hết là đột biến tạo mã kết thúc sớm (stop codon) chiếm 6/9 dạng đột biến; 3/9 dạng đột biến có đột biến mất nucleotid gây lệch khung dịch mã.

3.2.2.1. Phân tích phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng

*** Kết quả xác định người lành mang gen bệnh ở gia đình người bệnh DMD có đột biến điểm mất 2 nucleotid**

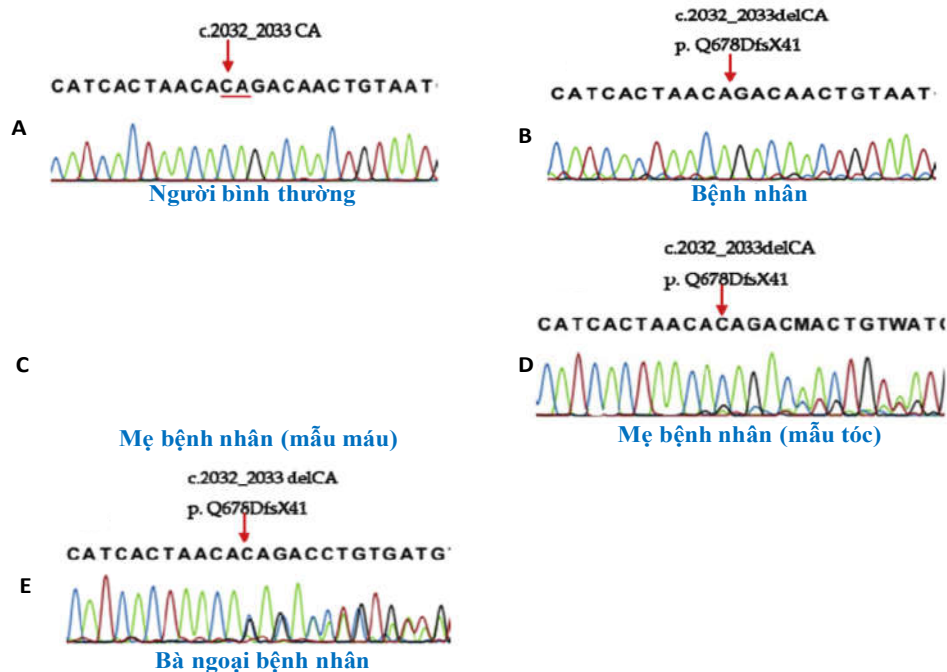
Gia đình người bệnh D.81 có 2 thành viên nam được chẩn đoán mắc bệnh DMD. Kết quả giải trình tự gen xác định người bệnh mang đột biến điểm mất 2 nucleotide CA ở vị trí 2032_2033 trên exon 17 gen dystrophin. Đột biến làm thay đổi bộ ba CAG mã hoá cho acid amin Glutamine thành bộ ba GAC mã hoá cho acid amin Aspartate, gây lệch khung dịch mã và hình thành mã kết thúc sớm tạo nên protein dystrophin không hoàn chỉnh. Tiến hành lập phả hệ gia đình người bệnh và xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong gia đình (3 thành viên).



Hình 3.13. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.81

Nhận xét:

Phả hệ có hai thành viên nam mắc DMD, trong đó một người đã tử vong. Đây là phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng, vì vậy thành viên nữ II₂ là người mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc do có con trai và em trai bị DMD. Tiến hành giải trình tự gen cho thành viên nữ I₁ và II₂.



Hình 3.14. Hình ảnh giải trình tự gen gia đình người bệnh D.81

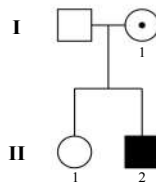
Nhận xét:

Người bệnh DMD (hình B) mang đột biến điểm c2032_2033delCA (p.Q678DfsX41). Thành viên nữ II₂ được xác định là người lành mang gen bệnh qua phân tích phả hệ (người mang đột biến dị hợp tử bắt buộc), tuy nhiên kết quả giải trình tự gen từ DNA mẫu máu của thành viên nữ này không phát hiện đột biến (hình C). Khi giải trình tự gen từ DNA mẫu tóc của thành viên nữ này thấy xuất hiện các đỉnh chồng lên nhau từ điểm đột biến c.2032_2033 trên gen dystrophin, khẳng định có đột biến dị hợp tử từ DNA mẫu tóc (hình D). Do không phát hiện được đột biến từ DNA mẫu máu nhưng lại tìm thấy đột biến từ DNA mẫu tóc của thành viên nữ II₂ nên khẳng định đây là người mang gen đột biến dị hợp tử nhưng ở trạng thái khảm. Bà ngoại người bệnh DMD (I₁) được xác định là người lành mang bệnh do kết quả giải trình tự xuất hiện các đỉnh chồng lên nhau từ điểm đột biến c.2032_2033 (hình E). Thành viên nữ II₁ không thực hiện xét nghiệm chẩn đoán gen.

3.2.2.2. *Phân tích phả hệ gia đình có tiền sử gia đình không rõ ràng*

*** Kết quả xác định người lành mang gen bệnh ở gia đình người bệnh DMD mang đột biến điểm mất 1 nucleotid**

Gia đình người bệnh D.78 chỉ có 1 thành viên nam được chẩn đoán mắc bệnh DMD. Kết quả giải trình tự gen phát hiện thấy người bệnh có đột biến điểm. Tiến hành lập phả hệ gia đình người bệnh.



Chú thích

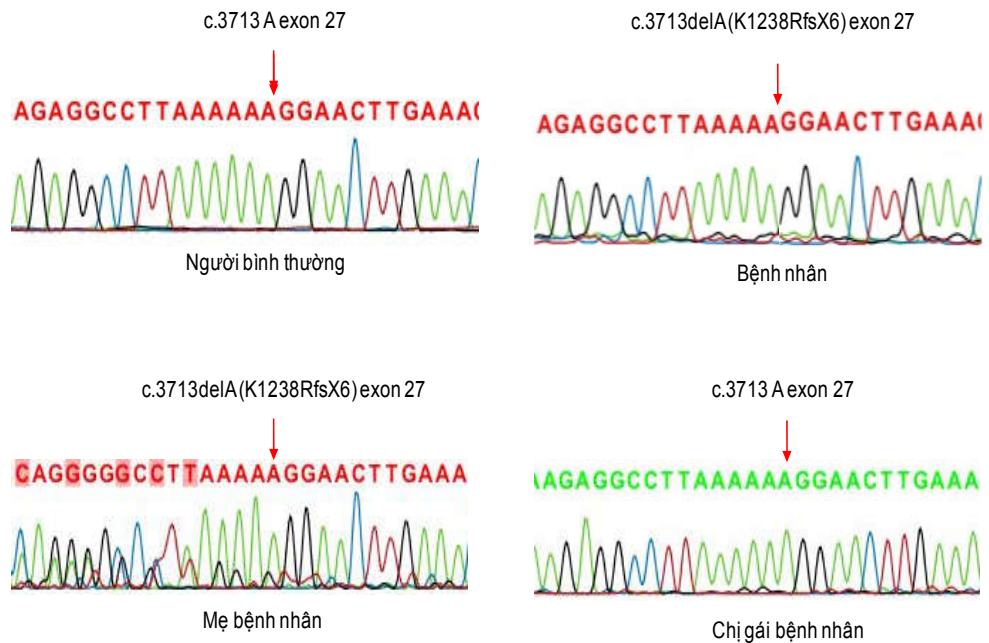
○ Người nữ bình thường □ Người nam bình thường

○ Người nữ mang gen bệnh ■ Người nam bị DMD

Hình 3.15. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.78

Nhận xét:

Do gia đình có tiền sử bệnh không rõ ràng nên mẹ và chị gái người bệnh có thể là người lành mang gen đột biến dị hợp tử và được tiến hành giải trình tự gen xác định người lành mang gen bệnh.



Hình 3.16. Hình ảnh giải trình tự gen gia đình người bệnh D.78

Nhận xét

Hình ảnh giải trình tự gen dystrophin cho các đỉnh rõ ràng, không bị nhiễu. Ở người bệnh DMD so với người bình thường có hiện tượng mất 1 nucleotid A tại vị trí 3713 trên exon 27 của gen dystrophin. Đột biến này làm thay đổi bộ 3 AAG mã hoá acid amin Lysine thành bộ ba AGG mã hoá acid amin Arginine, gây lệch khung dịch mã dẫn tới xuất hiện mã kết thúc sớm tại acid amin thứ 6 tính từ vị trí đột biến. Mẹ người bệnh xuất hiện các đỉnh chồng lên nhau từ điểm đột biến 3713, xác định đây là người lành mang gen bệnh. Chị gái người bệnh không xuất hiện các đỉnh chồng lên nhau, được xác định không mang gen bệnh.

3.2. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Trong nghiên cứu này, 45 thai phụ có nguy cơ sinh con bị bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne được tiến hành chẩn đoán trước sinh cho thai nhi từ dịch ối ở tuổi thai từ 17 tuần, trong đó có 6 thai phụ mang thai 2 lần.

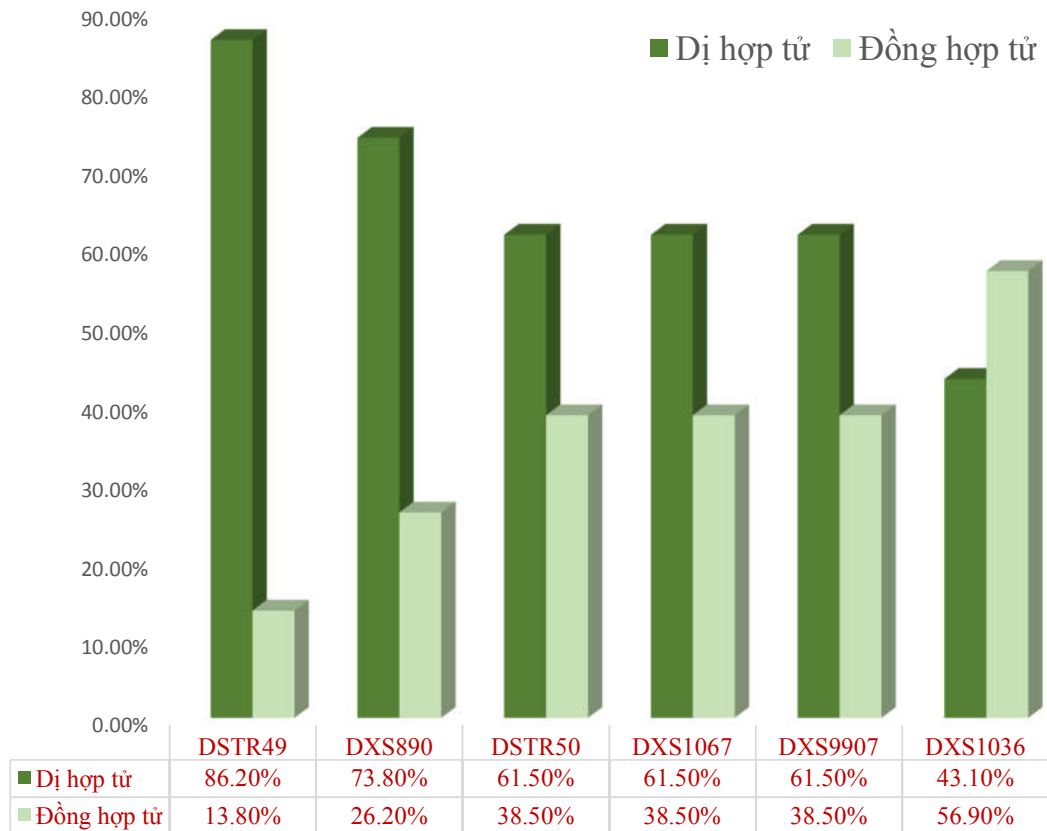
3.2.1. Kết quả xác định marker STR dị hợp tử gen dystrophin bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Trong nghiên cứu, 6 marker STR (DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907, DXS1036) của gen dystrophin được tiến hành phân tích xác định tình trạng dị hợp tử, từ đó tìm ra tình trạng dị hợp tử, từ đó tìm ra các marker STR có tỷ lệ dị hợp tử cao để ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.

3.2.1.1. Xác định marker STR dị hợp tử và đồng hợp tử

Các marker STR có tỷ lệ dị hợp tử càng cao thì xác suất xuất hiện ở các gia đình khi tiến hành chẩn đoán trước sinh càng lớn. STR marker được xác định là đồng hợp tử khi sản phẩm điện di mao quản chỉ cho 1 đỉnh. STR marker được xác định là dị hợp tử khi sản phẩm điện di mao quản cho 2 đỉnh kích thước khác nhau.

Trong nghiên cứu, 65 thành viên nữ thuộc 65 gia đình khác nhau được tiến hành xác định tình trạng dị hợp tử của 6 marker STR.

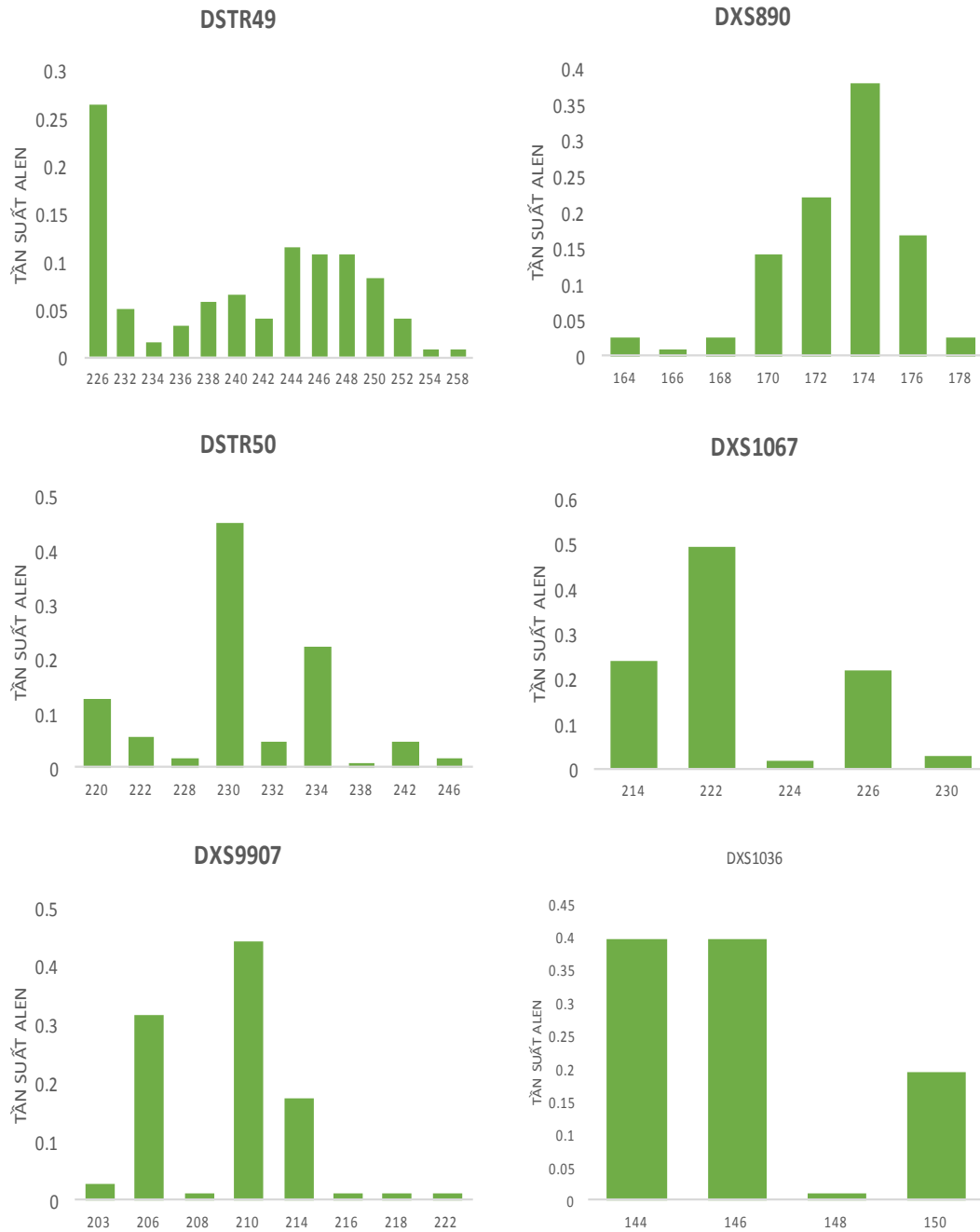


Hình 3.17. Tỷ lệ đồng hợp tử và dị hợp tử của các marker STR

Nhận xét

Kết quả ở hình 3.17 cho thấy các marker STR có tỷ lệ dị hợp tử từ cao xuống thấp lần lượt là DSTR49, DXS890, DSTR50, DXS1067, DXS9907, DXS1036. Marker DSTR49 có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất với 86,2%, marker DXS1036 có tỷ lệ dị hợp tử thấp nhất với 43,1%. Các marker DSTR50, DXS1067 và DXS9907 có tỷ lệ dị hợp tử như nhau là 61,5%.

Phân tích 6 marker STR, có 38 alen được xác định với kích thước dao động trong khoảng từ 144bp đến 258bp. Tần suất dao động của các alen từ 0,00823 đến 0,49524.



Hình 3.18. Tần suất phân bố các alen của 6 marker STR

Nhận xét

Trong 6 marker STR, marker DSTR49 là marker có số alen nhiều nhất với 14 alen. Marker DXS1036 có 4 alen, là marker có số alen thấp nhất.

Marker DSTR50 có số alen nhiều nhất (14 alen). Kích thước các alen phân bố từ 220bp đến 246bp với tần suất dao động từ 0,00961 đến 0,45192. Alen có tần suất xuất hiện cao nhất là alen có kích thước 230bp và alen có tần suất xuất hiện thấp nhất là alen có kích thước 228bp.

Marker DSTR49 có 9 alen với kích thước từ 226bp đến 258bp, tần suất dao động từ 0,00823 đến 0,26446. Alen kích thước 226bp có tần suất xuất hiện cao nhất, 2 alen kích thước 254bp và 258bp xuất hiện với tần suất ngang nhau và thấp nhất.

Marker DXS890 có 8 alen kích thước từ 164bp đến 178bp. Tần suất dao động của các alen từ 0,00885 đến 0,38053. Alen kích thước 166bp là alen có tần suất xuất hiện thấp nhất. Alen kích thước 174bp xuất hiện với tần suất cao nhất.

Marker DXS1067 có 5 vị trí alen với kích thước nằm trong khoảng từ 214bp đến 230bp. Các alen có tần suất dao động từ 0,01905 đến 0,49524. Alen kích thước 222bp có tần suất xuất hiện cao nhất và alen kích thước 224bp xuất hiện với tần suất thấp nhất.

Marker DXS9907 có 5 vị trí alen với kích thước từ 203bp đến 222bp. Các alen xuất hiện với tần suất dao động từ 0,00962 đến 0,44231. Các alen kích thước 216bp, 218bp, 222bp có tần suất xuất hiện như nhau và thấp nhất. Alen kích thước 210bp là alen xuất hiện với tần suất cao nhất.

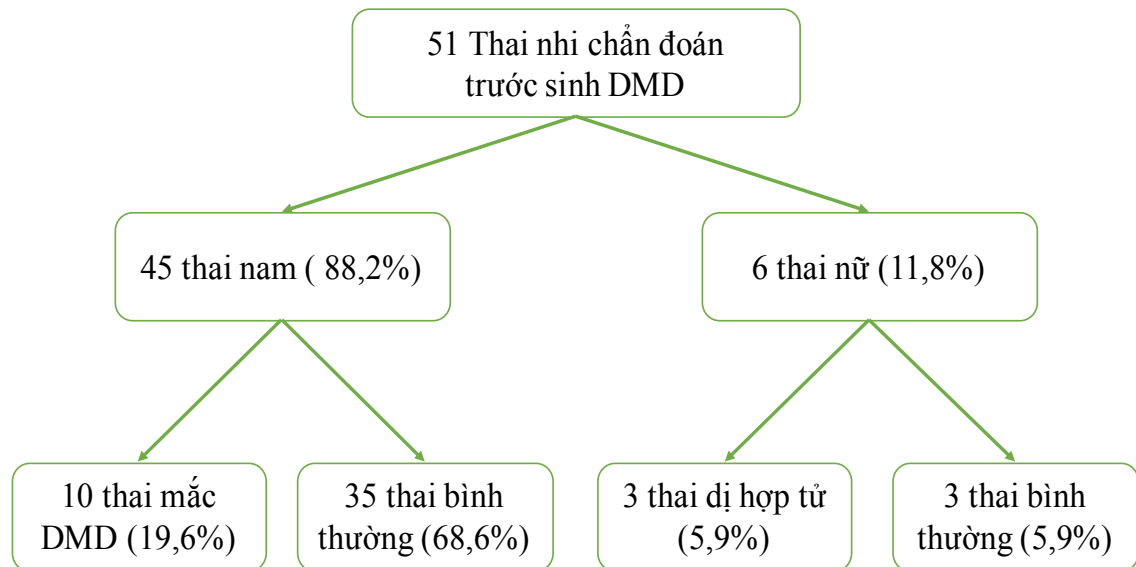
Marker DXS1036 có 4 vị trí alen với kích thước nằm trong khoảng từ 144 bp đến 150 bp. Đây là marker có số alen ít nhất với tần suất dao động các alen từ 0,01075 đến 0,39785. Hai alen kích thước 144bp và 146 bp có tần suất xuất hiện ngang nhau và cao nhất. Alen kích thước 148bp là alen xuất hiện với tần suất thấp nhất.

Trong 6 marker STR dị hợp tử, 5 marker có số alen nhiều nhất cũng là 5 marker có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất (DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907). Khi khuếch đại 5 marker STR này ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh, tỷ lệ xuất hiện ít nhất 2/5 marker dị hợp tử là 97,76%.

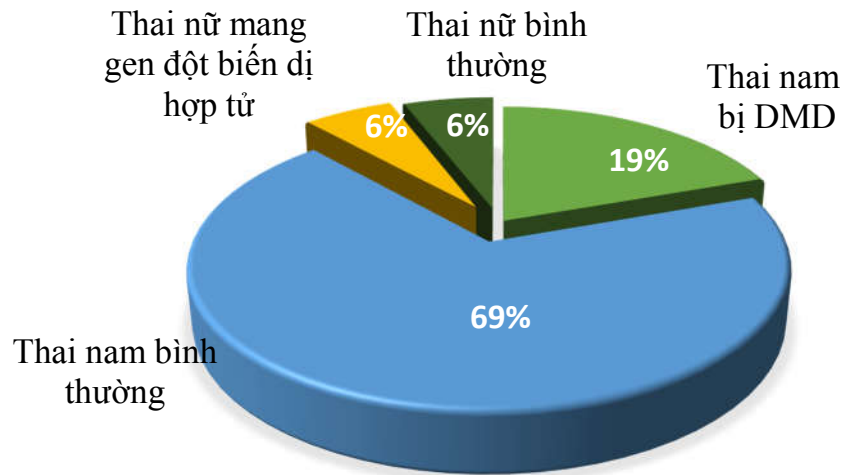
Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng 5 marker STR có tỷ lệ dị hợp cao nhất được tìm thấy ở trên để ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.

3.2.2. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Nghiên cứu tiến hành chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 51 thai nhi có nguy cơ cao mắc DMD của 45 thai phụ (6 thai phụ mang thai 2 lần). Các thai phụ được thực hiện thủ thuật chọc ối ở tuổi thai từ 17 tuần. Với mỗi trường hợp, 15ml dịch ối được thu thập trong đó 5ml được tách chiết DNA để phân tích gen dystrophin, 10ml dịch ối được nuôi cấy tế bào ối xác định các bất thường NST của thai nhi.



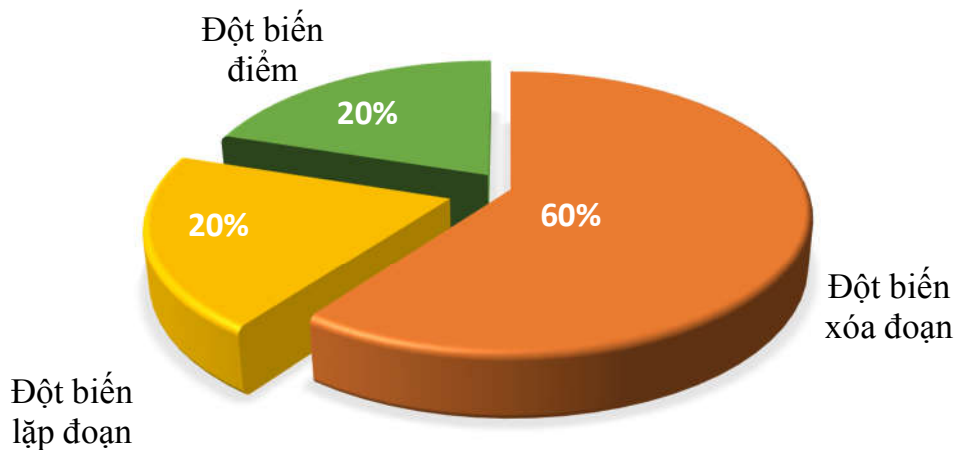
Hình 3.19. Sơ đồ kết quả chẩn đoán trước sinh DMD



Hình 3.20. Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD

Nhận xét:

Trong 51 thai nhi chẩn đoán trước sinh DMD có 45 thai nam (chiếm tỷ lệ 88,2%) và 6 thai nữ (chiếm 11,8%). Kết quả chẩn đoán xác định 10 trường hợp thai nam mắc DMD chiếm tỷ lệ 19,6%; 35 trường hợp thai nam bình thường chiếm tỷ lệ 68,6%, 2 trường hợp thai nữ mang gen đột biến dị hợp tử chiếm tỷ lệ 5,9% và 2 trường hợp thai nữ bình thường chiếm tỷ lệ 5,9%.



Hình 3.21. Tỷ lệ các loại đột biến phát hiện ở thai nam bị bệnh

Nhận xét:

10 trường hợp thai nam được chẩn đoán xác định mang đột biến gen dystrophin trong đó phát hiện 6 trường hợp đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ 60%, 2 trường hợp đột biến lặp đoạn chiếm tỷ lệ 20% và 2 trường hợp đột biến điểm chiếm tỷ lệ 20%.

Thai nhi được chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cũng đồng thời được lấy dịch ối thực hiện xét nghiệm nuôi cấy tế bào ối làm NST đồ để phát hiện các bất thường về số lượng và cấu trúc NST.

Bảng 3.10. Kết quả nuôi cấy tế bào ối làm NST đồ

	n	Tỷ lệ (%)
Bất thường NST	0	0
Bình thường	51	100
Tổng	51	100

Nhận xét:

Trong 51 thai nhi được làm NST đồ, không phát hiện thấy trường hợp nào có các bất thường NST kèm theo.

Bảng 3.11. Tỷ lệ sảy thai sau thủ thuật chọc hút nước ối

	n	Tỷ lệ (%)
Sảy thai	0	0
Không sảy thai	51	100
Tổng	51	100

Nhận xét:

Không ghi nhận tai biến sảy thai nào trong 51 trường hợp chọc hút nước ối để chẩn đoán trước sinh. Tỷ lệ thành công của thủ thuật là 100%.

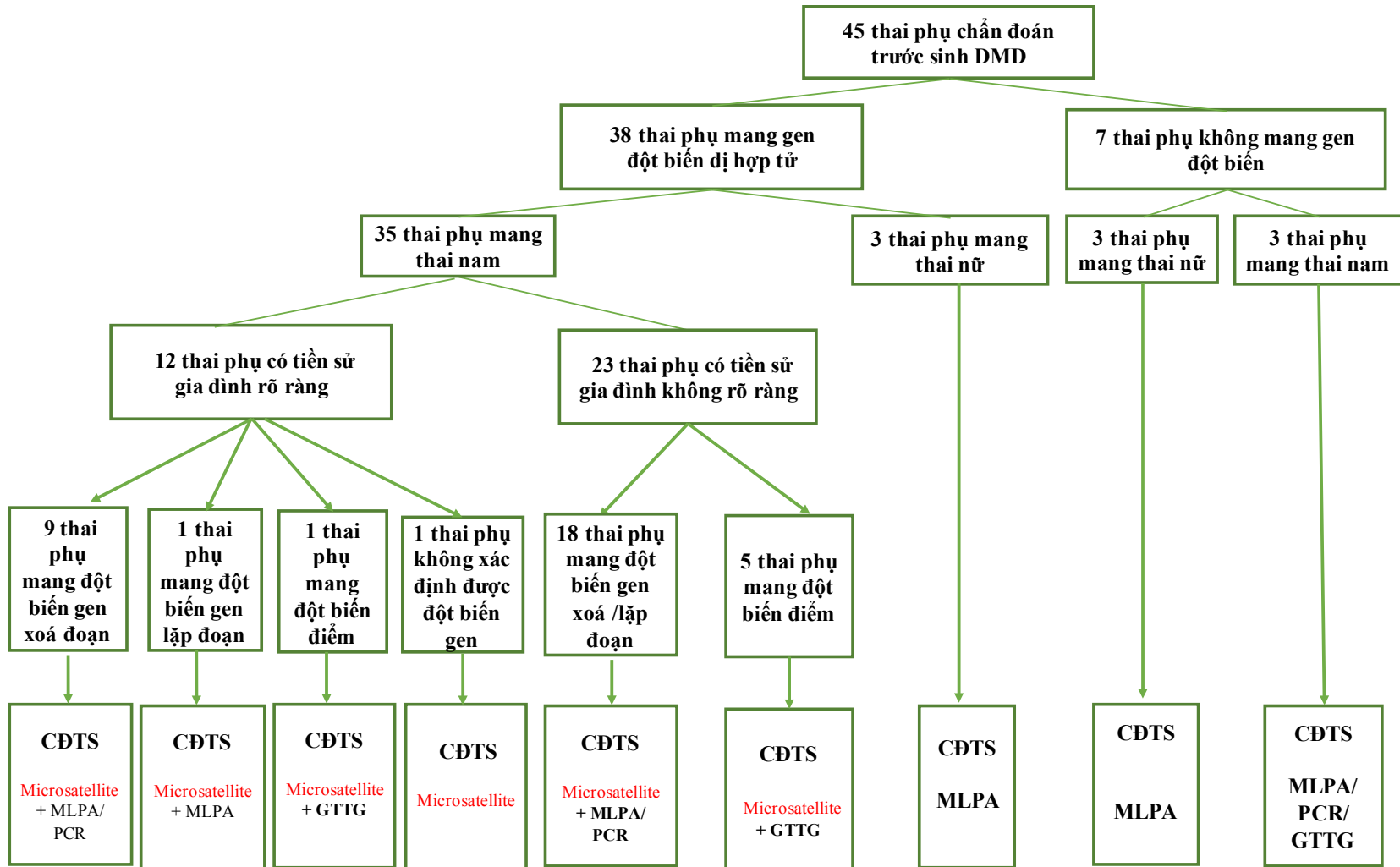
Bảng 3.12. Kết quả thai kỳ trên nhóm thai nam được chẩn đoán bị DMD

	n	Tỷ lệ (%)
Đình chỉ thai nghén	9	90
Giữ thai	1	10
Tổng	10	100

Nhận xét:

Qua chẩn đoán trước sinh 51 trường hợp, xác định được 10 trường hợp thai nam mắc DMD. Thai phụ đã được tư vấn di truyền và tư vấn về tình trạng bệnh lý của thai nhi. 9/10 thai phụ quyết định đình chỉ thai nghén chiếm tỷ lệ 90%, 1 trường hợp quyết định giữ thai chiếm tỷ lệ 10%.

Trong 45 thai phụ có nguy cơ cao sinh con mắc DMD, có 7 trường hợp không phát hiện được đột biến từ mẫu máu của thai phụ và 38 trường hợp được xác định là người lành mang gen bệnh. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 2 nhóm thai phụ này được trình bày dưới đây (mục 3.2.2.1 và 3.2.2.2)



Hình 3.22. Sơ đồ chẩn đoán trước sinh các trường hợp thai phụ có nguy cơ cao sinh con mắc DMD

3.2.2.1. Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD cho các thai phụ là người lành mang gen bệnh

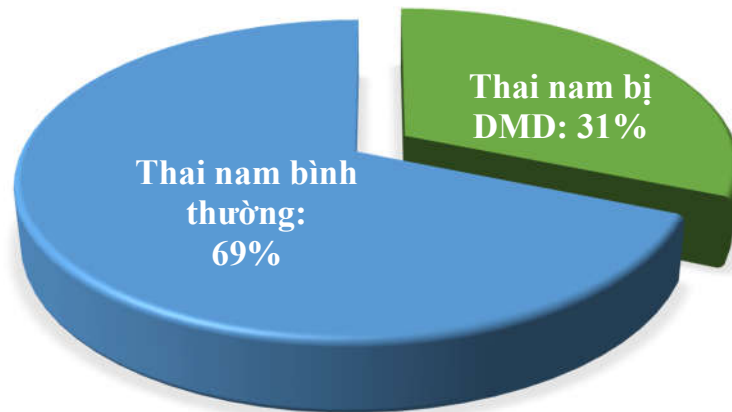
Nghiên cứu tiến hành chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 44 thai nhi của 38 bà mẹ là người lành mang gen bệnh (6 thai phụ mang thai 2 lần). Các thai nhi được xác định giới tính từ DNA dịch ối, xác định 3 thai nữ và 41 thai nam. Các trường hợp thai nữ được tư vấn xác định người lành mang gen bệnh. Các trường hợp thai nam được tư vấn chẩn đoán bệnh DMD.

Tiến hành chẩn đoán trước sinh cho 3 thai nữ bằng kỹ thuật MLPA, phát hiện 1 thai nữ mang gen đột biến dị hợp tử và 2 thai nữ bình thường. Tiến hành chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 41 thai nam từ 35 thai phụ trong đó có 12 thai phụ thuộc phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng và 23 thai phụ thuộc phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng. Kết quả chẩn đoán trước sinh được mô tả dưới đây.

**** Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD cho các thai phụ trong phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng: 12 thai phụ***

Trong nghiên cứu, 16 thai nam của 12 thai phụ (4 thai phụ mang thai 2 lần) được chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite DNA, đồng thời được đối chiếu kết quả bằng các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp như MLPA, PCR, giải trình tự gen.

Sử dụng 5 marker STR được xác định có tỷ lệ dị hợp cao được mô tả trong mục 3.2.1 để ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh cho 12 thai phụ. 11/12 thai phụ không cần khuếch đại thêm marker STR khác. Chỉ 1 trường hợp thai phụ cần tìm thêm marker STR dị hợp tử.



Hình 3.23. Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD trong nhóm thai phụ có phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng

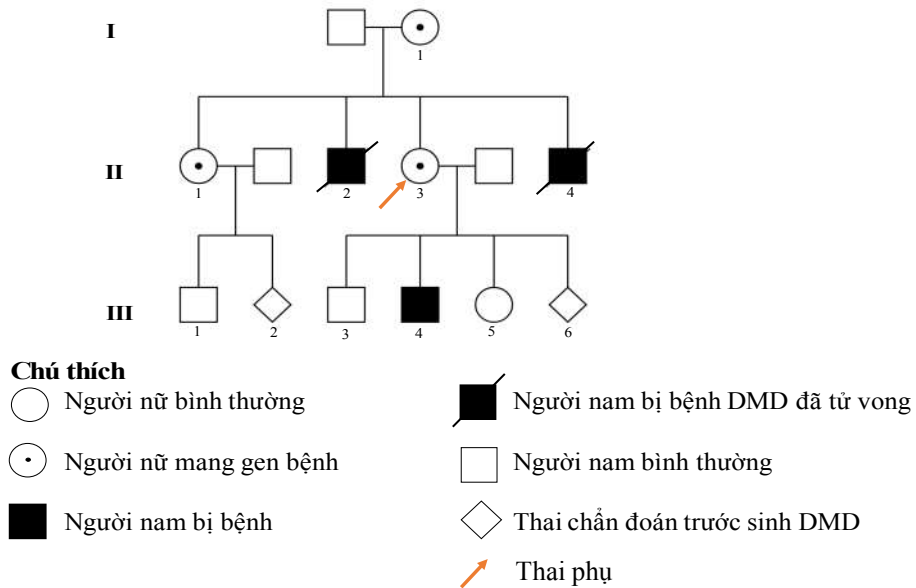
Nhận xét:

Trong 16 thai nam được chẩn đoán trước sinh bệnh DMD phát hiện 5 trường hợp thai bị bệnh chiếm tỷ lệ 31% và 11 trường hợp thai bình thường chiếm tỷ lệ 69%. 5 trường hợp thai nam bị DMD có 2 trường hợp mang đột biến lặp đoạn và 3 trường hợp mang đột biến xoá đoạn.

16 thai nhi được thực hiện chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite DNA đều được đối chiếu kết quả bằng kỹ thuật PCR, MLPA hoặc giải trình tự gen và cho kết quả tương đồng nhau.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne của thai phụ mang đột biến xoá đoạn vùng 5' tận

Phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng với 3 thành viên nam bị DMD trong đó 2 người đã tử vong. Người bệnh DMD được xác định mang đột biến xoá đoạn exon 3 đến 13 vùng 5' tận trên gen dystrophin. Thai phụ có tiền sử sinh con trai mắc DMD đã được xác định là người lành mang gen bệnh. Thai phụ mang thai lần 4 và được tư vấn chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.

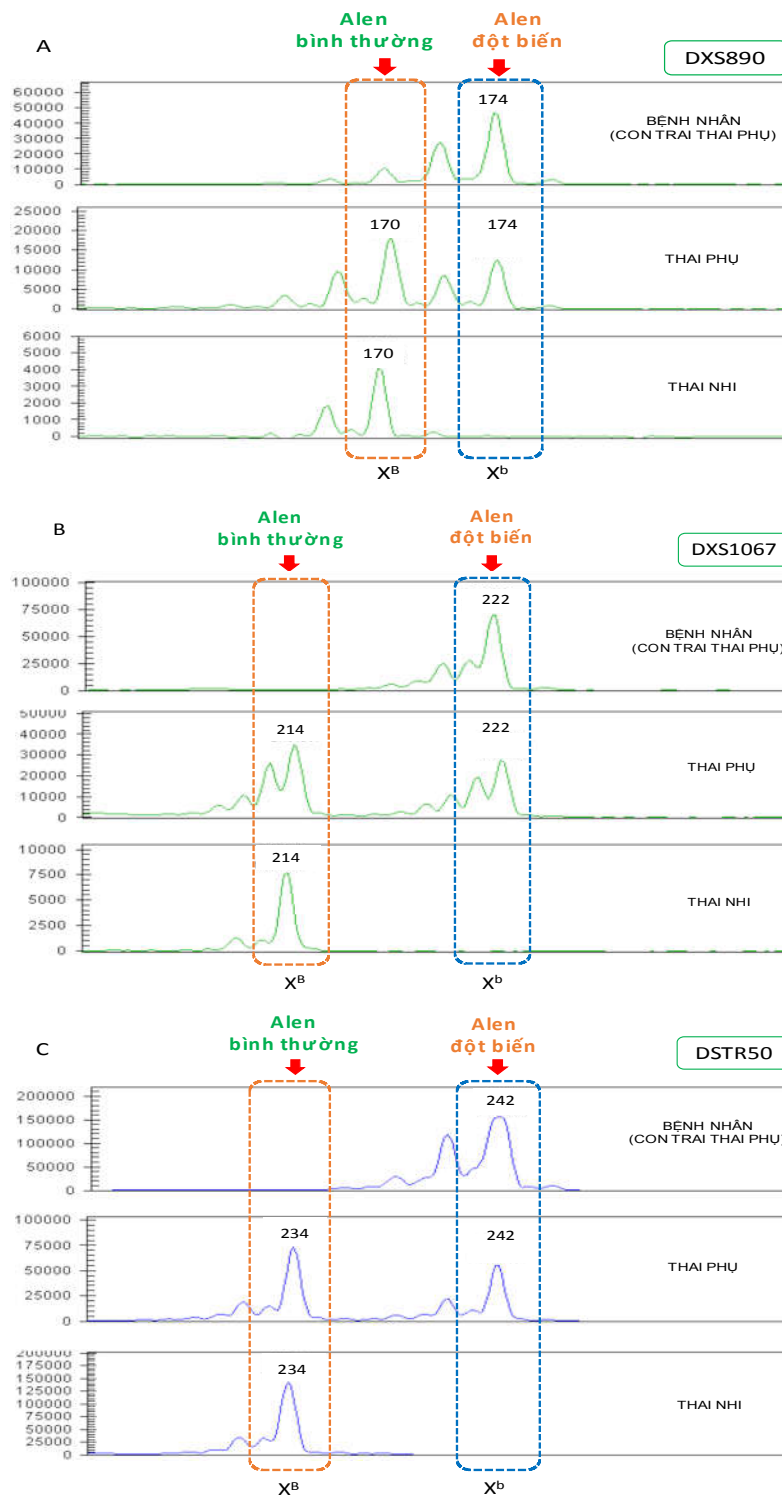


Hình 3.24. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh DMD.07

Kỹ thuật Microsatellite DNA được thực hiện đồng thời với kỹ thuật MLPA để chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite DNA:

Khuếch đại 5 marker STR có tỷ lệ dị hợp cao nhất tìm được qua nghiên cứu, xác định được 3 marker dị hợp tử ở thai phụ gồm marker DXS890, DXS1067 và DSTR50.



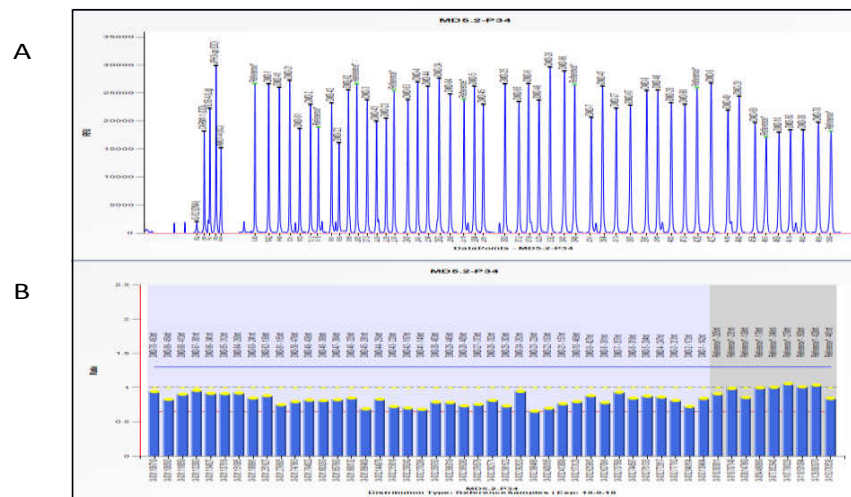
Hình 3.25. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.07 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Phân tích hình ảnh STR của marker DXS890 (hình A) cho thấy người bệnh DMD chỉ xuất hiện 1 đỉnh alen kích thước 174bp tương ứng với 1 alen trên NST X (X^{bY}). Ở thai phụ xuất hiện 2 đỉnh kích thước 170bp và 174bp tương ứng với 2 alen trên 2 NST X (X^BX^b). Đỉnh alen kích thước 174bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD. Do đó alen kích thước 174bp là alen bệnh, alen kích thước 170bp là alen bình thường.

Phân tích tương tự với marker DXS1067 (hình B) nhận thấy đỉnh alen kích thước 222bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD, do đó đỉnh kích thước 222bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 214bp là đỉnh alen bình thường. Phân tích marker DSTR50 xác định đỉnh kích thước 242bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 234bp là đỉnh alen bình thường.

Kết quả phân tích mẫu ối của thai nhi cho thấy thai nhi nhận các alen bình thường từ người mẹ ở cả 3 marker: marker DXS890 nhận alen 170bp, marker DXS1067 nhận alen 214bp, marker DSTR50 nhận alen 234bp. Kết quả chẩn đoán thai nhi không mắc DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật MLPA



Hình 3.26. Kết quả chẩn đoán trước sinh của thai phụ DMD.07 bằng kỹ thuật MLPA

Nhận xét:

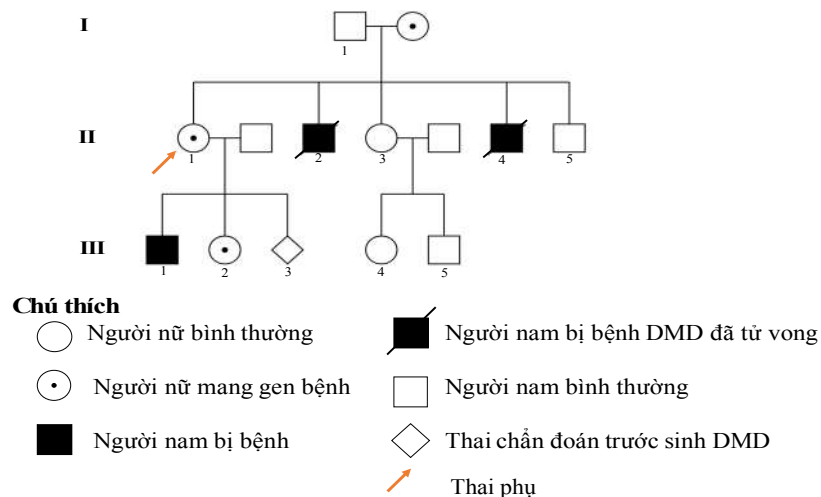
Hình ảnh phân tích MLPA của mẫu ối cho thấy tại probe tương ứng với các exon 3-13. Cường độ tín hiệu của đỉnh giống các exon khác (Hình A). Phân tích tỷ lệ RPA tại các exon từ 3 đến 13 của mẫu ối so với mẫu chứng dao động quanh mức 1 giống tỷ lệ RPA của các exon khác (Hình B). Như vậy thai nhi không bị đột biến gen dystrophin giống như anh trai thai nhi. Kết quả chẩn đoán thai nhi không mắc DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi của thai phụ DMD.07 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA và MLPA là tương đồng nhau.

Kết quả nuôi cấy tế bào ối không phát hiện bất thường về số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể ở thai nhi.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne của thai phụ là người lành mang đột biến xóa đoạn vùng 5' tận

Phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng với 3 thành viên nam bị DMD trong đó 2 người đã tử vong. Người bệnh DMD được xác định mang đột biến xóa đoạn exon 12-13 vùng 5' tận trên gen dystrophin. Thai phụ có tiền sử sinh con trai mắc DMD, được xác định là người lành mang gen bệnh. Thai phụ mang thai lần 3 và được tư vấn chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.

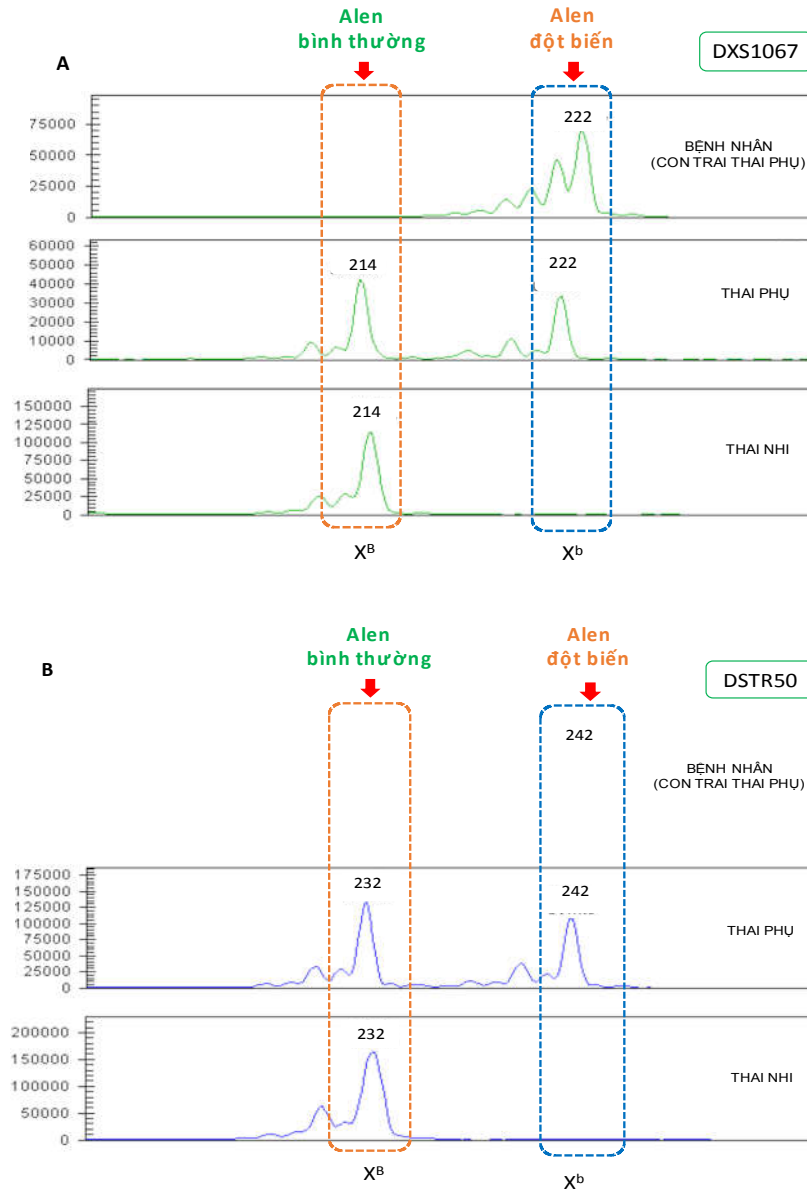


Hình 3.27. Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.16

Kỹ thuật Microsatellite DNA được thực hiện đồng thời với kỹ thuật MLPA để chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Khuếch đại 5 marker STR từ mẫu máu thai phụ, xác định được 2 marker dị hợp tử là DXS2067 và DSTR50.



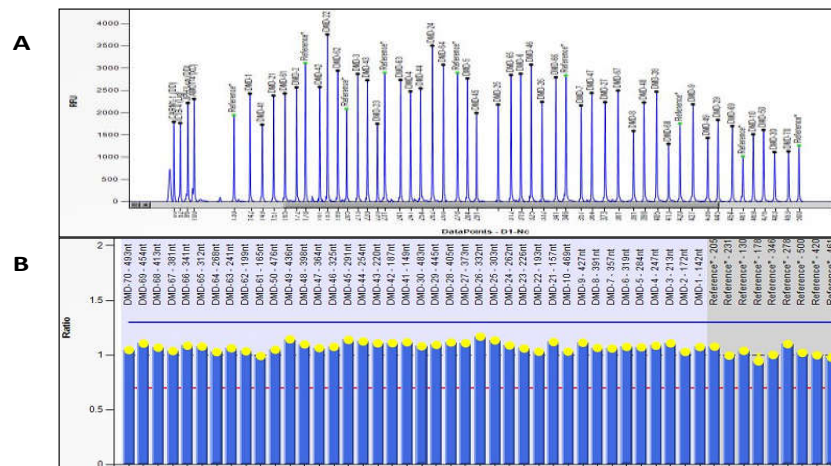
Hình 3.28. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.16 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Phân tích hình ảnh STR, với marker DXS1067 (hình A) người bệnh DMD chỉ xuất hiện 1 đỉnh kích thước 222bp tương ứng với 1 alen trên NST X (X^bY). Ở thai phụ thấy xuất hiện 2 đỉnh kích thước 214bp và 222bp tương ứng với 2 alen trên 2 NST X (X^BX^b). Nhận thấy đỉnh alen kích thước 222bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD. Do đó alen kích thước 222bp là alen bệnh, alen kích thước 214bp là alen bình thường.

Phân tích tương tự với marker DSTR50 (hình B) nhận thấy đỉnh alen kích thước 242bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD, do đó đỉnh kích thước 242bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 232bp là đỉnh alen bình thường.

Kết quả phân tích mẫu ối cho thấy thai nhi nhận các alen bình thường từ người mẹ ở cả 2 marker: marker DXS1067 nhận alen 214bp, marker DSTR50 nhận alen 232bp. Kết quả chẩn đoán thai nhi không mắc DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật MLPA



Hình 3.29. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.16 bằng kỹ thuật MLPA

Nhận xét:

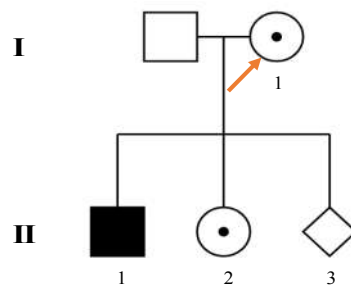
Hình ảnh phân tích MLPA của mẫu ối tại probe tương ứng với các exon 12-13 cho thấy cường độ tín hiệu của đỉnh giống các exon khác. Phân tích tỷ lệ RPA tại các exon 12 và 13 của mẫu ối so với mẫu chứng dao động quanh mức 1 giống tỷ lệ RPA của các exon khác. Kết quả chẩn đoán thai nhi không mắc DMD.

Hai kỹ thuật Microsatellite DNA và MLPA cho kết quả chẩn đoán trước sinh DMD tương đồng nhau.

Kết quả nuôi cấy tế bào ối không phát hiện bất thường về số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể ở thai nhi.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne của thai phụ mang đột biến điểm mất 1 nucleotid

Theo phả hệ gia đình, thai phụ DMD.27 có một người con trai bị DMD và một người con gái là người lành mang gen bệnh. Kết quả giải trình tự gen của người bệnh DMD phát hiện đột biến thay thế nucleotide G thành A tại vị trí c.10223 trên intron 70 của gen dystrophin. Thai phụ được xác định là người lành mang gen bệnh. Thai phụ mang thai lần 3, được tư vấn và chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.



Chú thích

○ Người nữ bình thường

□ Người nam bình thường

● Người nữ mang gen bệnh

◇ Thai chẩn đoán trước sinh DMD

■ Người nam bị bệnh

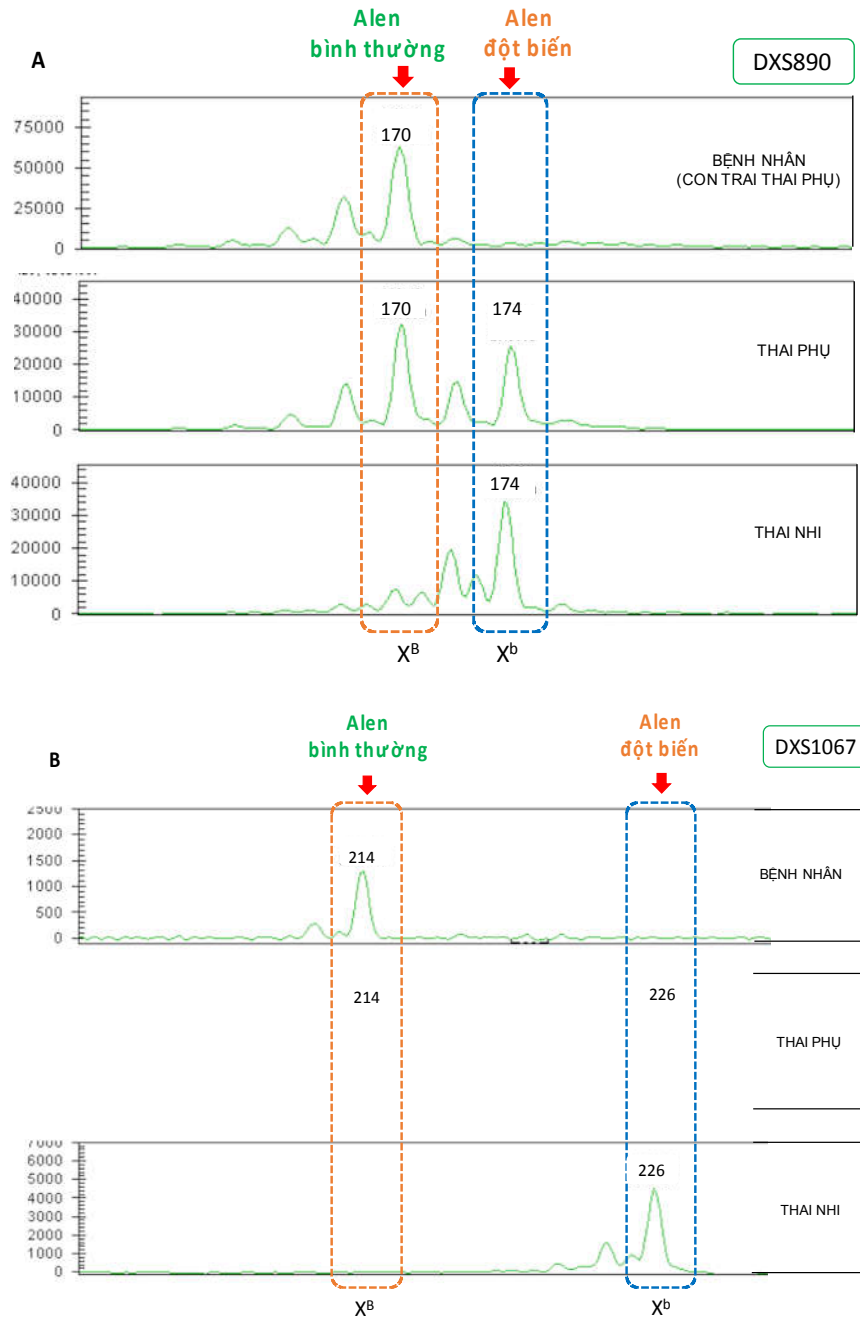
↗ Thai phụ

Hình 3.30. Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.27

Kỹ thuật Microsatellite DNA được thực hiện đồng thời cùng với kỹ thuật giải trình tự gen để chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Khuếch đại 5 marker STR, xác định được 2 marker dị hợp tử từ mẫu máu của thai phụ là DXS890 và DXS1067.



Hình 3.31. Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD của thai phụ D.27 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

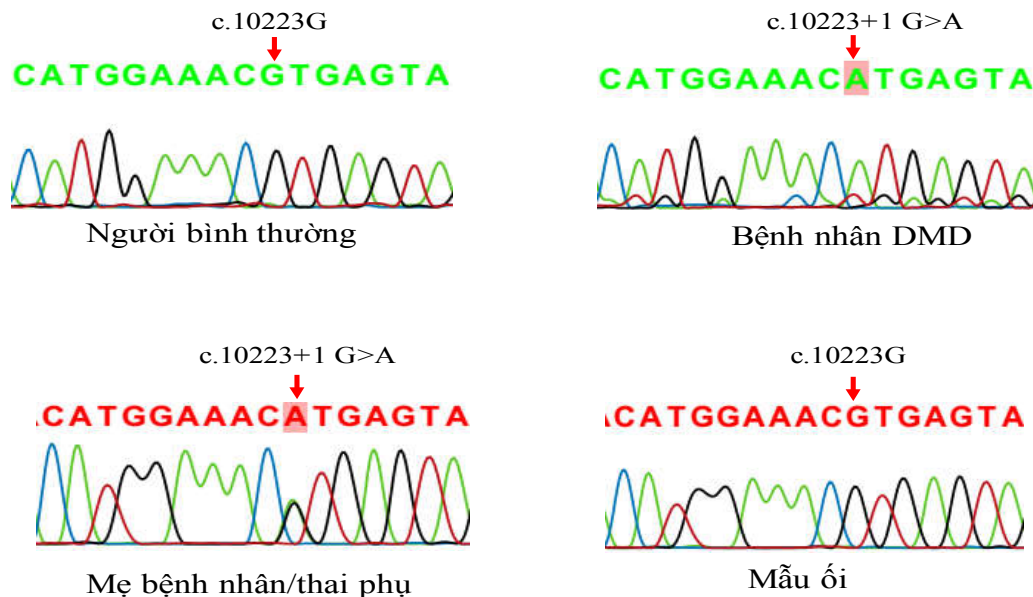
Phân tích hình ảnh STR của marker DXS890 (hình A) cho thấy người bệnh DMD chỉ xuất hiện 1 đỉnh kích thước 170bp tương ứng với 1 alen trên NST (X^bY). Ở thai phụ thấy xuất hiện 2 đỉnh kích thước 170bp và 174bp tương ứng với 2 alen trên 2 NST X (X^BX^b). Nhận thấy đỉnh alen kích thước 170bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD. Do đó alen kích thước 170bp là alen bệnh, alen kích thước 174bp là alen bình thường.

Phân tích tương tự với marker DSTR1067 (hình B) nhận thấy đỉnh alen kích thước 214bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD, do đó đỉnh kích thước 214bp là đỉnh alen bệnh là đỉnh kích thước 226bp là đỉnh alen bình thường.

Kết quả phân tích mẫu ối của thai nhi cho thấy thai nhi nhận các alen bình thường từ mẹ ở cả 2 marker: marker DXS890 nhận alen 174bp, marker DSTR1067 nhận alen 226bp. Kết quả chẩn đoán thai nhi không mắc DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật giải trình tự gen

Tiến hành giải trình tự cho DNA thai nhi từ dịch ối.



Hình 3.32. Kết quả giải trình tự gen trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ DMD.27

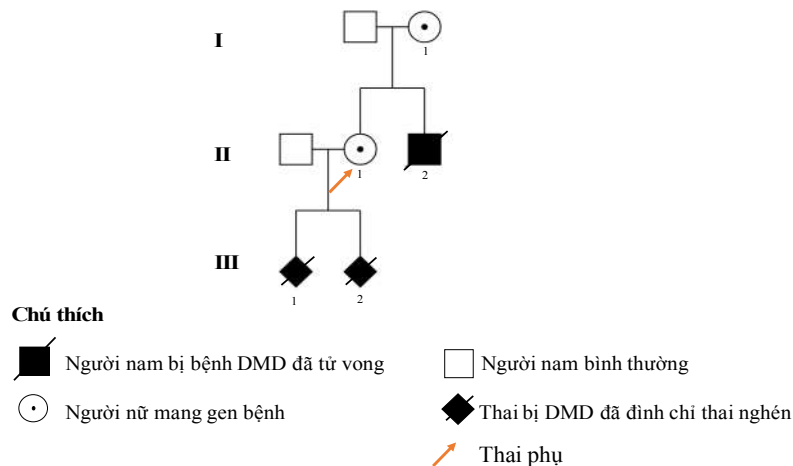
Kết quả giải trình tự gen của người bệnh DMD phát hiện đột biến thay thế nucleotide G thành A tại vị trí c.10223 trên intron 70 của gen dystrophin. Kết quả giải trình tự gen của thai phụ DMD.27 (mẹ người bệnh) cho thấy tại vị trí giống người con bị DMD thấy xuất hiện 2 đỉnh chồng lên nhau, từ đó xác định mẹ người bệnh là người lành mang gen bệnh. Kết quả giải trình tự gen ở thai nhi không xuất hiện đột biến tại vị trí c.10223 giống người bệnh DMD. Kết quả chẩn đoán thai nhi không mắc DMD.

Kỹ thuật Microsatellite DNA và MLPA cho kết quả tương đồng nhau trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi của thai phụ DMD.27.

Kết quả nuôi cấy tế bào ối không phát hiện bất thường về số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể ở thai nhi.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne của thai phụ mang đột biến lặp đoạn

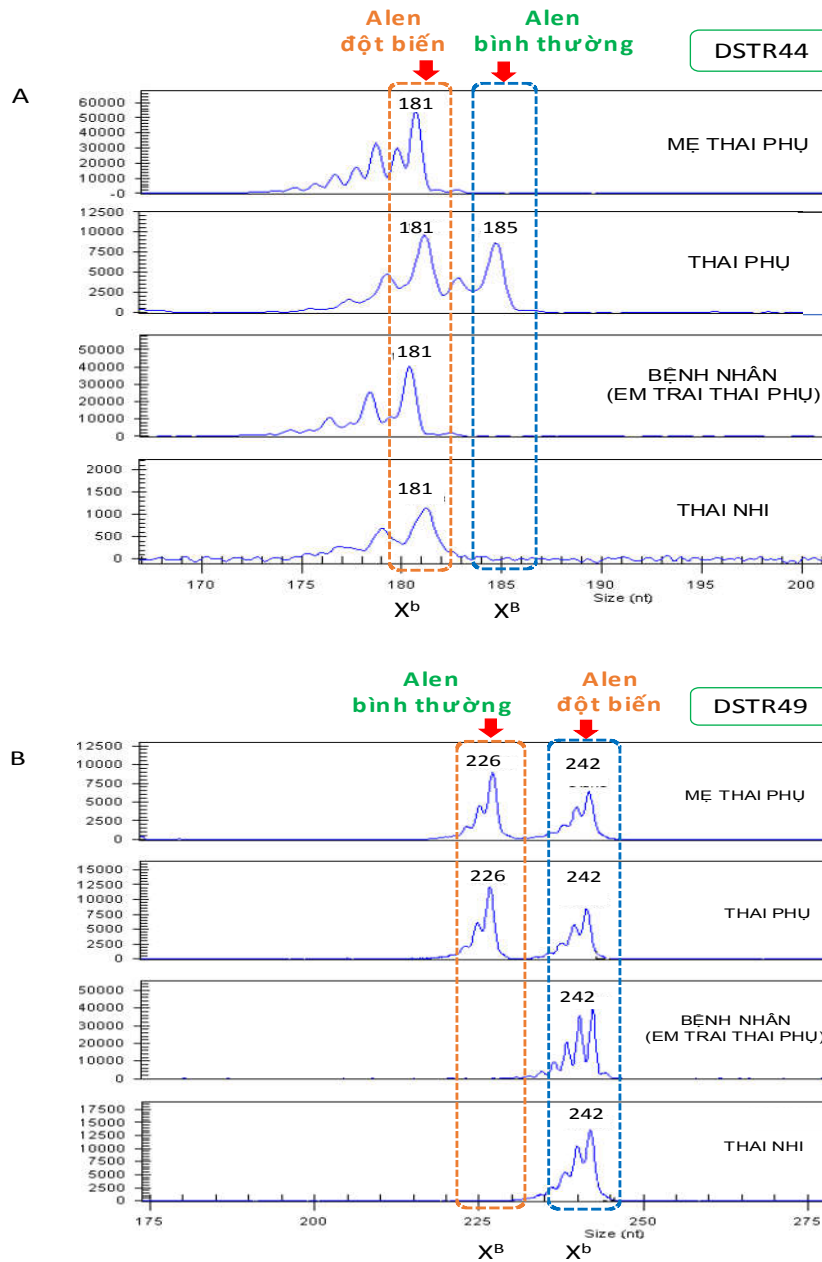
Theo phả hệ gia đình thai phụ DMD.28, thai phụ có em trai bị DMD mang đột biến lặp đoạn exon 14 – 43 gen dystrophin. Thai phụ được xác định là người lành mang gen đột biến bằng kỹ thuật MLPA. Thai phụ mang thai 2 lần, được chọc hút nước ối chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi bằng kỹ thuật Microsatellite DNA và MLPA.



Hình 3.33. Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.28

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Kỹ thuật Microsatellite DNA xác định được 2 marker dị hợp tử từ mẫu máu của thai phụ là DSTR 44 và DSTR49. Ứng dụng kỹ thuật Microsatellite DNA chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi từ dịch ối.



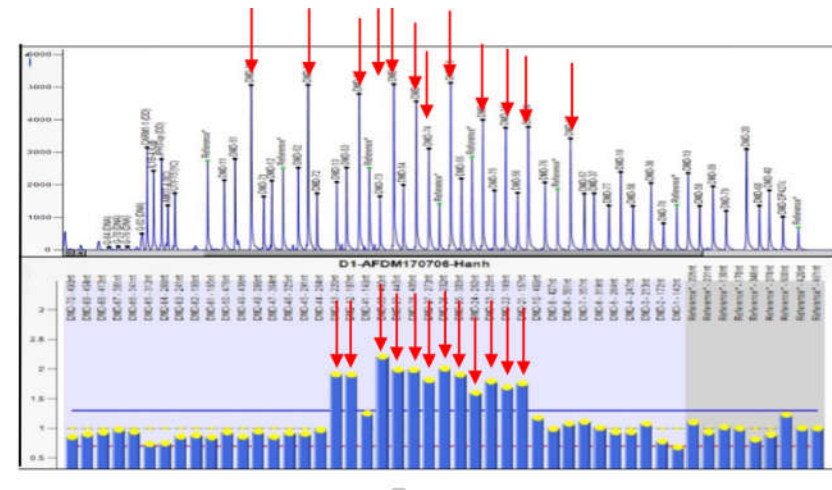
Hình 3.34. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.28 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Phân tích hình ảnh STR của marker DSTR44 (hình A) cho thấy người bệnh DMD (em trai thai phụ) chỉ xuất hiện 1 đỉnh kích thước 181bp tương ứng với 1 alen trên nhiễm sắc thể X (X^{bY}). Ở mẹ người bệnh DMD chỉ xuất hiện 1 đỉnh có kích thước 181 bp cho thấy đây là alen đồng hợp tử. Ở thai phụ xuất hiện 2 đỉnh có kích thước 181bp và 185bp (hình A), tương ứng với 2 alen nằm trên 2 nhiễm sắc thể X ($X^B X^b$). Nhận thấy đỉnh alen kích thước 181bp của người bệnh DMD trùng khớp với 1 đỉnh ở mẫu người mẹ và chị gái mình (thai phụ). Do đó alen kích thước 181bp là alen bệnh, alen kích thước 185bp là alen bình thường

Phân tích tương tự với marker DSTR49 (hình B) nhận thấy đỉnh alen kích thước 242bp của thai phụ (chị người bệnh) và mẹ người bệnh trùng khớp với đỉnh alen của người bệnh DMD, do đó đỉnh kích thước 242bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 226bp là đỉnh alen bình thường.

Kết quả phân tích mẫu ôi của thai nhi cho thấy thai nhi nhận các alen bệnh từ thai phụ ở cả 2 marker: marker DSTR44 nhận alen 181bp, marker DSTR49 nhận alen 242bp. Kết quả chẩn đoán thai nhi bị bệnh DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật MLPA



Hình 3.35. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.28 bằng kỹ thuật MLPA

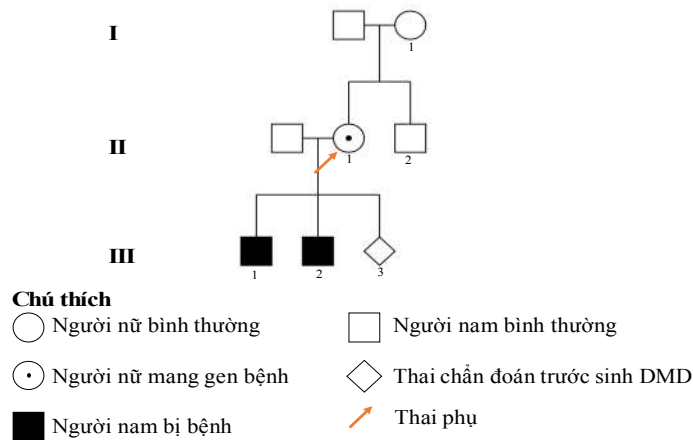
Hình ảnh phân tích MLPA của mẫu ối cho thấy tại probe tương ứng với các exon 14-43 cho thấy cường độ tín hiệu của đỉnh cao hơn mẫu người bình thường. Phân tích tỷ lệ RPA tại các exon từ 14 đến 43 của thai nhi so với chứng lớn hơn 1,5 trong khi của các exon khác giao động quanh mức 1. Như vậy xác định thai nhi mang đột biến lặp đoạn các exon từ 14 đến 43. Kết quả chẩn đoán thai nhi mắc DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi của thai phụ DMD.28 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA và MLPA là tương đồng nhau.

Kết quả nuôi cấy tế bào ối không phát hiện bất thường về số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể ở thai nhi.

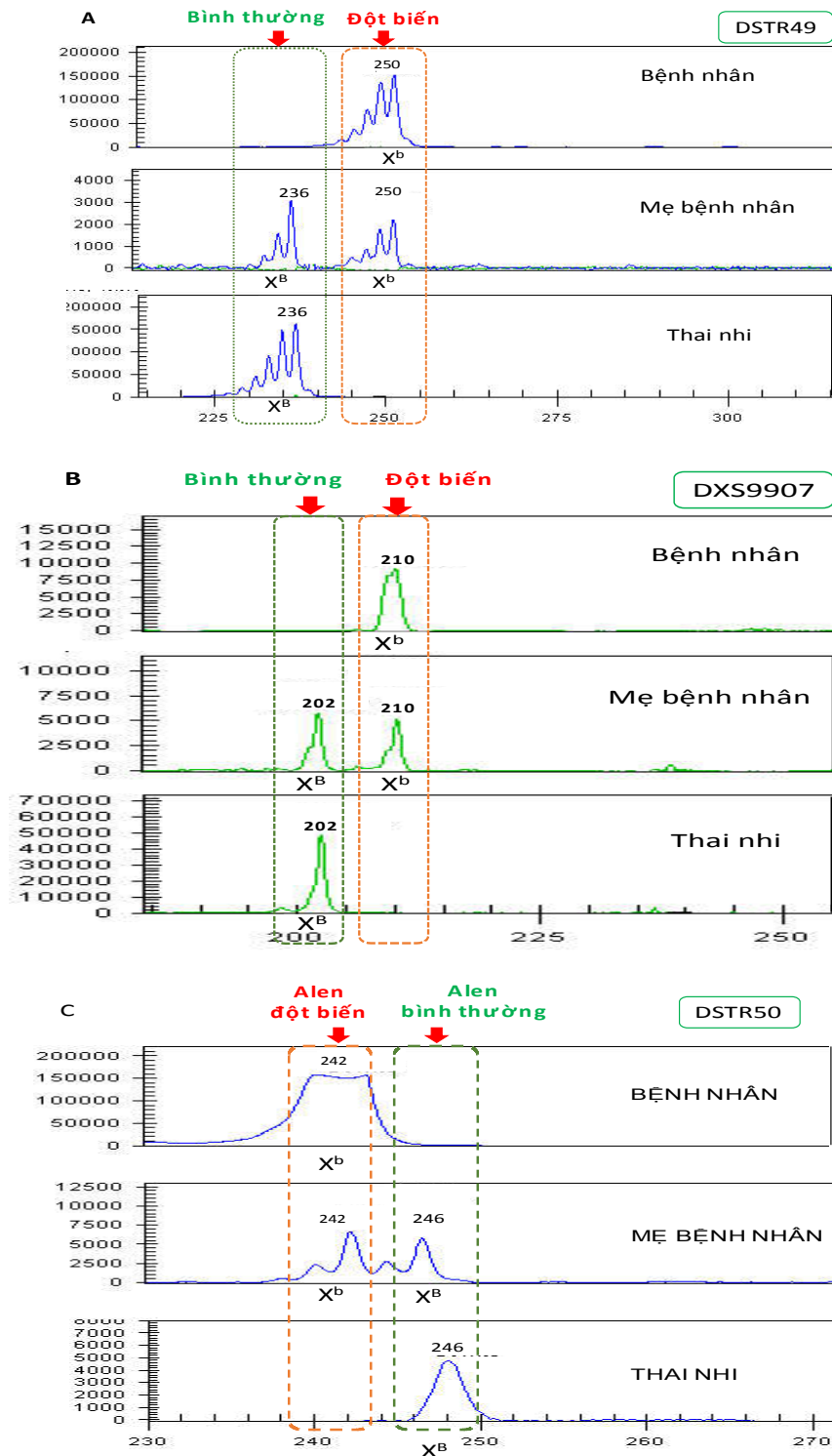
Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD cho thai phụ là người lành mang gen bệnh nhưng không xác định được đột biến

Qua phân tích phả hệ, thai phụ DMD.31 có hai con trai bị DMD được xác định là người lành mang gen bệnh. Tuy nhiên, kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen không phát hiện được đột biến ở thai phụ và con trai mắc DMD. Thai phụ mang thai lần 3, được tư vấn chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.



Hình 3.36. Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.31

Do không xác định được đột biến ở người bệnh DMD và thai phụ nên không thể chẩn đoán trước sinh bằng các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp (PCR, MLPA, giải trình tự gen). Thai nhi chỉ có thể được chẩn đoán trước sinh DMD bằng kỹ thuật chẩn đoán đột biến gián tiếp Microsatellite DNA.



Hình 3.37. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ DMD.31 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Tiến hành khuếch đại 5 marker STR có tỷ lệ dị hợp cao nhất tìm được qua nghiên cứu. Xác định được 3 marker dị hợp tử ở thai phụ bao gồm DXS9907, DSTR50 và DSTR49.

Phân tích hình ảnh STR cho thấy với marker DSTR49 (hình A), người bệnh DMD chỉ xuất hiện 1 đỉnh kích thước 250bp tương ứng với 1 alen trên nhiễm sắc thể X (X^bY). Ở thai phụ thấy xuất hiện 2 đỉnh kích thước 250bp và 236bp tương ứng với 2 alen trên 2 NST X (X^BX^b). Đỉnh alen kích thước 250bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD. Do đó xác định alen kích thước 250bp là alen bệnh, alen kích thước 236 bp là alen bình thường.

Phân tích tương tự với marker DXS9907 (hình B) và marker DSTR50 (hình C). Với marker DXS9907, hình ảnh phân tích cho thấy đỉnh alen kích thước 210bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD, do đó đỉnh kích thước 210bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 202bp là đỉnh alen bình thường. Với marker DSTR50, hình ảnh phân tích cho thấy đỉnh alen kích thước 242bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD, do đó đỉnh kích thước 242bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 246bp là đỉnh alen bình thường.

Kết quả phân tích mẫu ôi của thai nhi cho thấy thai nhi nhận các alen bình thường từ người mẹ ở cả 3 marker (marker DSTR49 nhận alen 236bp, marker DXS9907 nhận alen 202bp, marker DSTR50 nhận alen 246bp). Kết quả chẩn đoán thai nhi không mắc DMD.

Kết quả nuôi cấy tế bào ôi không phát hiện bất thường về số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể ở thai nhi qua nuôi cấy tế bào ôi.

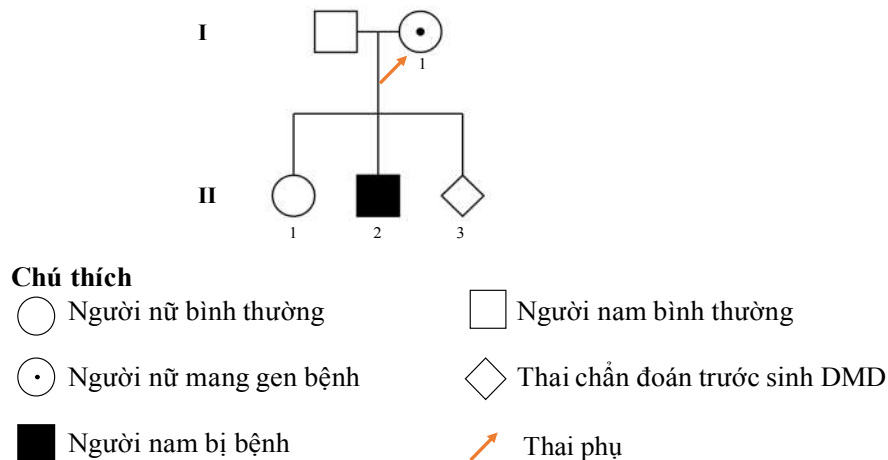
** Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD cho các thai phụ trong phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng: 23 thai phụ*

23 thai phụ thuộc các phả hệ chỉ có 1 thành viên nam bị DMD. Các thai phụ được xác định là người lành mang gen đột biến bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen. Tiến hành chẩn đoán trước sinh cho 25 thai nam từ 23 bà mẹ (trong đó có 2 thai phụ mang thai 2 lần).

Tiến hành chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 25 thai nhi bằng kỹ thuật Microsatellite DNA và các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp (PCR, MPLA, giải trình tự gen). Kết quả chẩn đoán 20 trường hợp thai nam bình thường và 5 thai nam bị DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD của thai phụ mang đột biến điểm thay thế 1 nucleotid

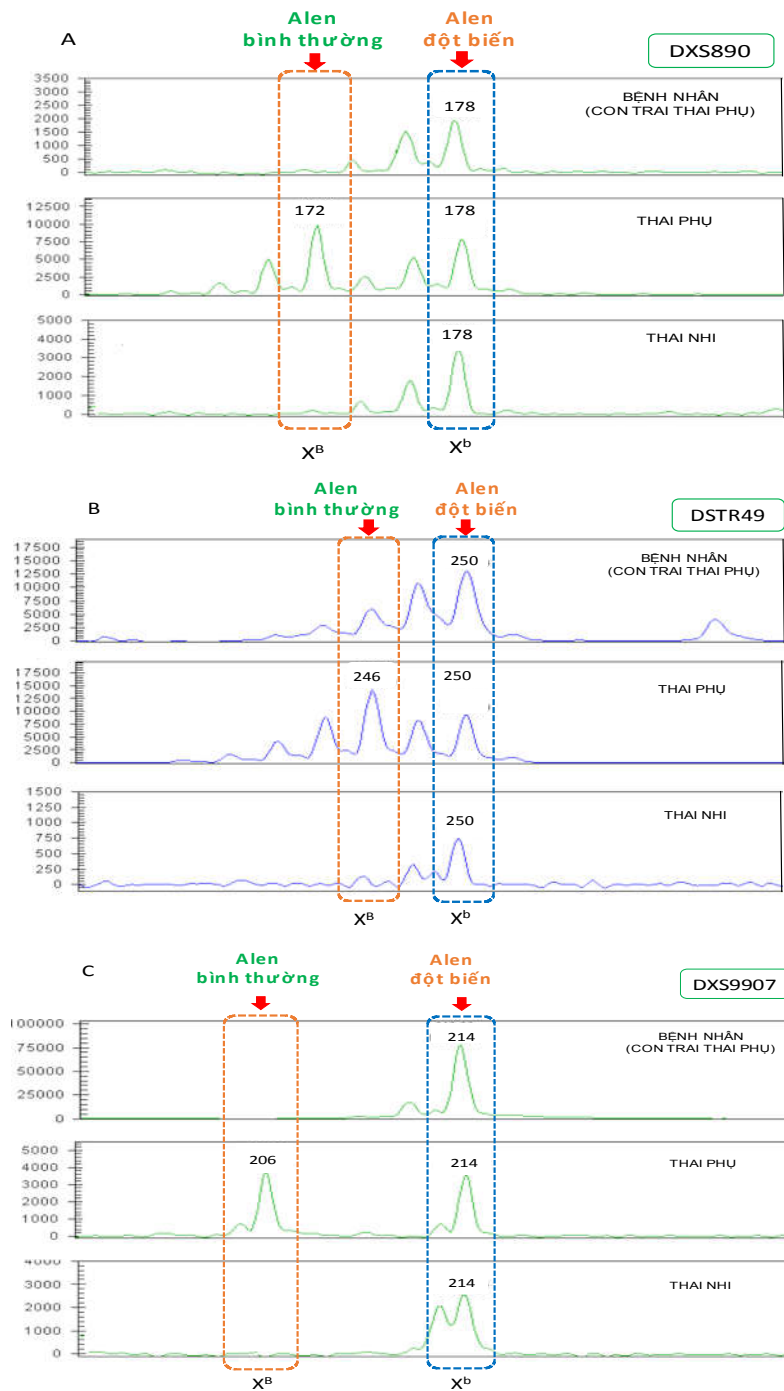
Phả hệ gia đình thai phụ DMD.32 có 1 người thành viên nam mắc DMD. Người bệnh được chẩn đoán mang gen đột biến điểm p.Arg2094Ter bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Thai phụ được xác định là người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Thai phụ mang thai lần 3, được tư vấn chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.



Hình 3.38. Sơ đồ phả hệ gia đình thai phụ DMD.32

Kỹ thuật Microsatellite DNA được thực hiện đồng thời cùng với kỹ thuật MLPA để chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite DNA



Hình 3.39. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ D.32 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

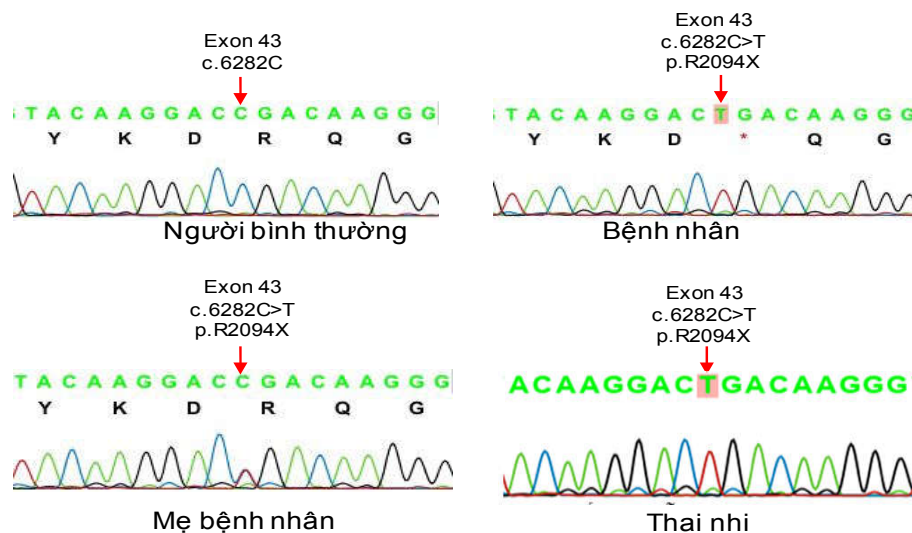
Với kỹ thuật Microsatellite DNA, khuếch đại được 3 marker STR dị hợp tử từ mẫu máu của thai phụ là DXS890, DSTR49 VÀ DXS9907.

Phân tích hình ảnh STR cho thấy với marker DXS890 (hình A), người bệnh DMD chỉ xuất hiện 1 đỉnh kích thước 178bp. Ở thai phụ thấy xuất hiện 2 đỉnh kích thước 178bp và 170bp. Đỉnh alen kích thước 178bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD. Do đó alen kích thước 178bp là alen bệnh, alen kích thước 170bp là alen bình thường.

Phân tích tương tự với marker DSTR49 (hình B) cho thấy đỉnh alen kích thước 250bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD, được xác định là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 246bp là đỉnh alen bình thường. Với marker DXS9907, đỉnh kích thước 214bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 206bp là đỉnh alen bình thường.

Kết quả phân tích mẫu ối của thai nhi cho thấy thai nhi nhận các alen bệnh từ mẹ ở cả 3 marker: marker DXS890 nhận alen 178bp, marker DSTR49 nhận alen 250bp, marker DXS9907 nhận alen 214bp. Kết quả chẩn đoán thai nhi bị mắc bệnh DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật giải trình tự gen



Hình 3.40. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng kỹ thuật giải trình tự gen của thai phụ DMD.32

Kết quả giải trình tự gen của người bệnh DMD phát hiện đột biến thay thế nucleotide C thành T tại vị trí c.6282 trên exon 43 của gen dystrophin, thay đổi bộ ba CGA mã hoá acid amin Arginine thành bộ ba mã kết thúc TGA tạo mã kết thúc sớm. Kết quả giải trình tự gen của thai phụ DMD.32 (mẹ người bệnh) cho thấy tại vị trí giống người con bị DMD xuất hiện 2 đỉnh chồng lên nhau, từ đó xác định mẹ người bệnh là người lành mang gen bệnh.

Kết quả giải trình tự gen ở thai nhi xác định có đột biến tại vị trí c.6282 giống người bệnh DMD. Kết quả chẩn đoán thai nhi mắc DMD.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi của thai phụ DMD.32 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA và MLPA là tương đồng nhau.

Kết quả nuôi cấy tế bào ối không phát hiện bất thường về số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể ở thai nhi.

3.2.2.2. Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD cho các thai phụ không mang gen bệnh

Trong nghiên cứu có 7 trường hợp thai phụ có tiền sử sinh 1 con trai mắc DMD nhưng xét nghiệm chẩn đoán người mang gen (MLPA, giải trình tự gen) không tìm thấy đột biến từ mẫu máu của thai phụ. Trong trường hợp này thai phụ có thể mang gen đột biến ở trạng thai khảm hoặc đột biến ở con trai thai phụ là đột biến mới.

Qua tư vấn, cả 7 thai phụ này đều có nguyện vọng chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi.

Bảng 3.13. Kết quả chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi của những thai phụ không phát hiện đột biến từ mẫu máu

		n	Tỷ lệ (%)
Thai nam	Bị bệnh	0	0
	Bình thường	4	57,1
Thai nữ	Di hợp tử	2	28,6
	Bình thường	1	14,3
Tổng		7	100

Nhận xét:

Trong 7 trường hợp chẩn đoán trước sinh, có 4 trường hợp mang thai nam và 3 trường hợp mang thai nữ. Chẩn đoán trước sinh cho kết quả cả 4 thai nam đều không mắc DMD chiếm tỷ lệ 57,1%; 2 thai nữ mang gen đột biến dị hợp tử chiếm tỷ lệ 28,6% và 1 thai nữ bình thường chiếm tỷ lệ 14,3%.

Cả 7 trường hợp đều được tư vấn giữ thai.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là bệnh lý di truyền thần kinh cơ hay gặp nhất trong nhóm bệnh lý loạn dưỡng cơ với tần suất 1/3600 trẻ trai, đặc trưng bởi sự yếu cơ tiến triển, phì đại bắp chân, tăng sinh tổ chức cơ và chậm phát triển trí tuệ. Người bệnh thường mất khả năng đi ở lứa tuổi 11-12 và tử vong ở lứa tuổi 20 do các biến chứng tim mạch và hô hấp [33],[51]. Loạn dưỡng cơ Duchenne là bệnh di truyền liên kết NST giới tính X và không có alen tương ứng trên NST Y, gây ra bởi đột biến gen dystrophin, một trong những gen lớn nhất cơ thể với kích thước 2,4 Mb gồm 79 exon mã hoá cho mRNA dài 14.000bp [1],[59]. Năm 1986, gen dystrophin đã được tìm ra bởi Monaco và cộng sự, từ đó hàng nghìn đột biến đã được mô tả trên khắp thế giới. Những hướng điều trị mới được nghiên cứu và thử nghiệm như liệu pháp gen, liệu pháp tế bào đã mở ra những triển vọng trong điều trị bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne. Những năm gần đây, với những tiến bộ trong chăm sóc và phục hồi chức năng đã giúp nâng cao chất lượng cuộc sống, đồng thời kéo dài thời gian đi lại cũng như tuổi thọ của người bệnh DMD [36],[37]. Tuy nhiên đến nay bệnh DMD vẫn chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu. Vì vậy, xác định người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh DMD đóng một vai trò quan trọng giúp phát hiện các trường hợp mắc DMD từ trong thời kỳ bào thai, từ đó đưa ra tư vấn cho thai phụ và gia đình, giúp giảm tỷ lệ sinh con mắc bệnh.

Do kích thước gen lớn, việc phát hiện đột biến trên gen dystrophin luôn là một thách thức. Rất nhiều kỹ thuật di truyền phân tử đã và đang được ứng dụng trong xác định người lành mang gen bệnh. Tuy nhiên trong các kỹ thuật đó thì kỹ thuật MLPA được đánh giá có nhiều ưu điểm vượt trội với khả năng

phát hiện các đột biến xóa đoạn cũng như lặp đoạn (chiếm 70-75%) trên toàn bộ 79 exon của gen dystrophin trong thời gian ngắn (từ 3-7 ngày) [85],[100],[101]. Còn với các đột biến điểm (chiếm tỷ lệ 25-30%), cần phải ứng dụng kỹ thuật giải trình tự 79 exon để xác định đột biến [2].

Chẩn đoán trước sinh bệnh DMD hiện nay thường được thực hiện bằng kỹ thuật PCR, MLPA hay giải trình tự gen, xác định chính xác các đột biến ở thai nhi dựa vào đột biến chỉ điểm ở người bệnh DMD trong phả hệ [46],[46]. Tuy nhiên, trong một số trường hợp không phát hiện thấy đột biến hoặc việc phát hiện đột biến gặp khó khăn do cấu trúc gen lớn. Hơn nữa, ở điều kiện Việt Nam, nhiều gia đình người bệnh có hoàn cảnh khó khăn, không có khả năng chi trả cho các xét nghiệm xác định đột biến gen thì việc ứng dụng kỹ thuật phân tích gián tiếp Microsatellite DNA dựa vào xác định alen đột biến (linkage analysis) đã giúp khắc phục những khó khăn trên với giá thành xét nghiệm rẻ và thời gian trả kết quả nhanh [15],[90],[102]. Nghiên cứu đã xác định người lành mang gen bệnh trong các phả hệ gia đình người bệnh DMD, chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.

4.1. Phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen

Loạn dưỡng cơ Duchenne là bệnh lý di truyền gen lặn, liên kết với NST giới tính X, không có alen tương ứng trên Y. Người mẹ mang gen đột biến dị hợp tử có khả năng truyền gen bệnh cho các con. 50% con trai sẽ bị DMD và 50% con gái sẽ là người lành mang gen bệnh giống mẹ [6]. Những người con gái mang gen bệnh sau khi trưởng thành và kết hôn sẽ lại có khả năng sinh con trai bị DMD. Theo các nghiên cứu, 2/3 người bệnh DMD nhận gen đột biến từ mẹ và 1/3 các trường hợp là đột biến mới phát sinh trong quá trình tạo giao tử. Chính vì vậy, việc chẩn đoán người lành mang gen bệnh và tư vấn trước sinh cho các thành viên nữ trong gia đình người bệnh đóng vai trò hết

sức quan trọng trong việc giảm tỷ lệ sinh con mắc bệnh, từ đó giúp giảm tỷ lệ bệnh DMD trong cộng đồng thông qua chẩn đoán trước sinh hay gần đây là chẩn đoán tiền làm tổ.

Người phụ nữ mang gen bệnh không có biểu hiện lâm sàng, chỉ một số ít trường hợp có tăng nhẹ nồng độ CK máu và khoảng 8% có biểu hiện yếu cơ nhẹ [4],[6], chính vì vậy xét nghiệm gen là phương pháp giúp chẩn đoán chính xác tình trạng mang gen đột biến ở các thành viên nữ trong gia đình người bệnh DMD. Từ năm 1986 khi gen dystrophin lần đầu được phát hiện, rất nhiều kỹ thuật di truyền phân tử sau đó đã được phát triển nhằm xác định đột biến gen dystrophin trên người bệnh DMD cũng như phát hiện người nữ mang gen đột biến dị hợp tử. Kỹ thuật Multiplex PCR với ưu điểm dễ thực hiện và giá thành hợp lý, tuy nhiên có hạn chế chỉ phát hiện được các trường hợp xoá đoạn xảy ra ở 25/79 exon thuộc 2 vùng “hot-spot” trên gen dystrophin [3],[56]. Kỹ thuật giải trình tự gen có thể xác định toàn bộ các đột biến nhưng thời gian thực hiện kéo dài và chi phí xét nghiệm rất cao. Chính vì vậy, khi kỹ thuật MLPA được ra đời và phát triển với những ưu điểm vượt trội như xác định được các đột biến xoá đoạn và lặp đoạn trên toàn bộ 79 exon, phân tích hơn 50 vùng DNA chỉ trong 1 phản ứng PCR, đã trở thành một kỹ thuật được ưu tiên áp dụng để xác định người lành mang gen bệnh xoá đoạn và lặp đoạn [89],[100],[103]. Trong những trường hợp đột biến điểm (chiếm tỷ lệ 25 – 30%), kỹ thuật giải trình tự gen sẽ được ứng dụng để phát hiện người lành mang gen bệnh. Trong nghiên cứu, chúng tôi thực hiện xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ (mẹ, chị gái, em gái, cô, dì, bác gái, bà ngoại,...) trong gia đình người bệnh DMD. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kết hợp kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen để chẩn đoán người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ (mẹ, chị gái, em gái, cô, dì, bác gái, bà ngoại) trong gia đình người bệnh DMD. Kỹ thuật MLPA sẽ được

thực hiện để xác định các đột biến xóa đoạn và lặp đoạn, còn kỹ thuật giải trình tự gen sẽ xác định các trường hợp mang gen đột biến điểm. Theo một số nghiên cứu, việc phối hợp 2 kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen sẽ giúp phát hiện được hầu hết các trường hợp người lành mang gen bệnh [84],[104]

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật MLPA sử dụng bộ kit đã được thương mại hóa là SALSA MLPA KIT P034-A2/P035-A2 của công ty MRC Hà Lan. Probemix P034/P035 DMD chứa các probe cho mỗi exon gen DMD trên vị trí Xp21.2 của nhiễm sắc thể và một probe cho exon DP427c. Bộ Kit gồm 80 probe được chia thành 2 probemix: P034 và P035. Probemix P034-A2 chứa 40 probe khuếch đại 40/79 exon và Probemix P035-A2 DMD chứa 39 probe khác nhau khuếch đại 39/79 exon trên gen dystrophin. Như vậy với hai phản ứng PCR, kỹ thuật MLPA có thể khảo sát toàn bộ 79 exon trên gen dystrophin, phát hiện đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen dystrophin chiếm tỷ lệ 70-75% các dạng đột biến.

Nghiên cứu tiến hành xác định tình trạng mang gen đột biến dị hợp tử cho 85 thành viên nữ trong 35 gia đình có thành viên nam mắc DMD, xác định được 52/85 thành viên nữ (61%) là người lành mang gen bệnh và 33/85 thành viên nữ (39%) không mang gen đột biến (hình 3.1). Việc xác định được 52 người lành mang gen đột biến dị hợp tử có ý nghĩa lớn trong tư vấn di truyền cũng như các phương pháp chẩn đoán trước sinh bệnh DMD và gần đây là chẩn đoán tiền làm tổ. Trong 52 thành viên nữ được chẩn đoán là người lành mang gen bệnh, có 41/52 người đã từng sinh con mắc DMD. Việc khẳng định tình trạng mang gen dị hợp tử ở các bà mẹ này giúp tư vấn chẩn đoán trước sinh cho các lần mang thai sau. Nghiên cứu cũng xác định được 11/52 thành viên nữ mang gen bệnh nhưng chưa sinh con hoặc đã sinh con nhưng không mắc DMD. Kết quả này có ý nghĩa lớn giúp giảm tỷ lệ sinh con mắc DMD trong cộng đồng thông qua tư vấn di truyền và tư vấn chẩn đoán

trước sinh khi các thành viên nữ này mang thai. Tại Việt Nam, nhiều gia đình vẫn còn chưa hiểu rõ về cơ chế di truyền của bệnh DMD. Trong các phả hệ gia đình đã có người mắc DMD, 1 số thành viên nữ sau khi sinh được một con trai khoẻ mạnh lại thường không xét nghiệm tình trạng mang gen đột biến cho mình, dẫn đến tình trạng không biết mình là người lành mang gen và sinh con mắc DMD ở những lần sinh sau. Chính vì vậy, việc xác định người lành mang gen là hết sức quan trọng và cần được tiến hành đối với tất cả các thành viên nữ trong phả hệ gia đình có người bệnh DMD.

Trong 85 thành viên nữ xác định được 45 bà mẹ có tiền sử sinh con mắc DMD và 40 thành viên nữ chưa sinh con hoặc sinh con khoẻ mạnh (bảng 3.1). Trong số 45 bà mẹ có con DMD, 41 người xác định được đột biến, chiếm tỷ lệ 91,1% và 4 người không xác định được đột biến, chiếm tỷ lệ 8,9%. Đột biến ở con trai mắc DMD của 4 bà mẹ này được xác định là đột biến mới. Theo nhiều nghiên cứu, tỷ lệ đột biến mới vào khoảng 30%. Tại nghiên cứu này, chúng tôi chỉ xác nhận 8,9% là đột biến mới. Sự khác nhau trong tỷ lệ đột biến mới xác định được trong nghiên cứu này so với các công bố khác là do số lượng các bà mẹ thống kê trong nghiên cứu của chúng tôi còn hạn chế nên tỷ lệ đột biến mới chưa đại diện được cho quần thể. Trong trường hợp không xác định được đột biến khi phân tích DNA mẫu máu của người mẹ, cần chú ý đến khả năng xảy ra hiện tượng đột biến ở thể khảm [105],[106]. Hiện tượng khảm đã được mô tả trong nhiều nghiên cứu trước đây và luôn cần được lưu ý, đặc biệt trong tư vấn chẩn đoán trước sinh bệnh DMD [107],[108],[109]. Trong số 40 thành viên nữ chưa sinh con hoặc sinh con khoẻ mạnh, tỷ lệ người lành mang gen bệnh là 27,5% (11/29 thành viên nữ). Qua đây có thể thấy tỷ lệ mang gen đột biến ở các bà mẹ có con bị DMD cao hơn nhiều so với nhóm các thành viên nữ khác trong phả hệ.

Theo bảng 3.2, trong 45 bà mẹ có con bị DMD xác định được 17 người thuộc các phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng (trong phả hệ có ít nhất 2 thành viên nam mắc DMD) và 28 bà mẹ thuộc các phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng (trong phả hệ chỉ có 1 thành viên nam mắc DMD). Dựa theo phân tích phả hệ xác định 17 bà mẹ này là người mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc. Tuy nhiên chúng tôi vẫn tiến hành phân tích mẫu DNA của các thành viên nữ này để xác định đột biến và để khẳng định kết quả phân tích phả hệ, đồng thời phát hiện các trường hợp đột biến thể khảm và coi đây là các mẫu chứng dương để xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ khác trong gia đình. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 17 bà mẹ được xác định là người lành mang gen bệnh bằng phân tích phả hệ đều được xác định là người mang gen đột biến dị hợp tử qua phân tích gen. Từ đó cho thấy phương pháp xác định người lành mang gen bệnh qua phân tích phả hệ là một phương pháp chính xác, có thể được sử dụng ở những nơi chưa có điều kiện thực hiện các kỹ thuật di truyền hay khi gia đình người bệnh không có điều kiện kinh tế. Phương pháp xác định người lành mang gen bệnh qua phân tích phả hệ cũng đã được công bố trong nhiều nghiên cứu trước đây như nghiên cứu của tác giả Hutton & Thompson hay tác giả Sibert và cộng sự [18],[110]. Tuy nhiên phương pháp phân tích phả hệ chỉ có thể sử dụng trong các phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng và xác định tình trạng mang gen ở các thành viên nữ đã có ít nhất một con mắc DMD mà không thể áp dụng được với tất cả các thành viên nữ trong phả hệ. Cũng theo bảng 3.8, trong các phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng, chúng tôi ghi nhận có 24 bà mẹ được xác định là người lành mang gen bệnh chiếm tỷ lệ 85,7%; 4 bà mẹ được xác định không mang gen bệnh chiếm tỷ lệ 14,3%. 4 bà mẹ người bệnh DMD không xác định thấy đột biến thì đột biến ở người con trai bị DMD có thể là đột biến mới phát sinh trong quá trình tạo giao tử.

Nghiên cứu xác định được 31 dạng đột biến trong 52 người lành mang gen bệnh, trong đó có 20 dạng đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất với 64,4%; 9 dạng đột biến điểm chiếm tỷ lệ 29% và 2 dạng đột biến lặp đoạn chiếm tỷ lệ 6,5% (hình 3.2). Tỷ lệ các dạng đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với tỷ lệ được công bố trong các nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới. Tác giả Zimowski và cộng sự công bố tỷ lệ đột biến xoá đoạn là 60-65%, tỷ lệ đột biến điểm là 25-35% và tỷ lệ đột biến lặp đoạn là 5-10%. Tác giả Wang và cộng sự công bố tỷ lệ các đột biến xoá đoạn, đột biến điểm, đột biến lặp đoạn trong nghiên cứu của mình lần lượt là 66,25%; 27,5% và 6,25% [89],[111]. Tác giả Cho A và cộng sự cũng thống kê trong nghiên cứu của mình tỷ lệ đột biến xoá đoạn, lặp đoạn và đột biến điểm lần lượt là 65,4%; 13,3%; 12,3% [53]. Còn theo nghiên cứu của tác giả Kesari và cộng sự (2008), đột biến xoá đoạn cũng là dạng đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất với 64%. Với khả năng khảo sát toàn bộ 79 exon chỉ với 2 phản ứng PCR, kỹ thuật M LPA được ứng dụng để chẩn đoán người lành mang gen đột biến xoá đoạn và lặp đoạn, còn kỹ thuật giải trình tự gen được ứng dụng phát hiện người lành mang gen đột biến điểm. Việc ứng dụng hai kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen đã xác định được tất cả các dạng đột biến trên gen Dystrophin trong nghiên cứu bao gồm đột biến xoá đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm.

Trong 85 thành viên nữ được phân tích gen xác định tình trạng mang gen đột biến, có 66 người được tiến hành phân tích bằng kỹ thuật MLPA xác định đột biến xoá đoạn và lặp đoạn và 19 người nữ được tiến hành phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm.

4.1.1. Xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA.

MLPA là kỹ thuật được ứng dụng xác định đột biến xoá đoạn và lặp đoạn trên toàn bộ 79 exon của dystrophin. Với các gia đình có người bệnh

DMD mang đột biến xoá đoạn và lặp đoạn, chúng tôi tiến hành kỹ thuật MLPA để xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ. Trong nghiên cứu, 66 thành viên nữ thuộc 25 gia đình được thực hiện kỹ thuật MLPA, phát hiện 40 thành viên nữ là người lành mang gen bệnh. Trong các dạng đột biến xác định được, đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ lớn với tỷ lệ 90,9%, đột biến lặp đoạn xuất hiện với tỷ lệ thấp (9,1%) (bảng 3.6). Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với các công bố khác khi đột biến xoá đoạn được xác định là dạng đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất (60-65%). Theo nghiên cứu của tác giả Vieitez và cộng sự năm 2017, đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất với 46,1%, đột biến lặp đoạn chiếm 19,7% và đột biến điểm chiếm tỷ lệ 34,2% [57]. Còn theo tác giả Basak và cộng sự công bố trong nghiên cứu vào năm 2006, đột biến xoá đoạn được tìm thấy ở 63% các trường hợp [59].

Trong nghiên cứu của chúng tôi 100% các đột biến đều tập trung ở 2 vùng “hot spot”, trong đó có 4 trường hợp đột biến xoá đoạn và lặp đoạn lớn kéo dài từ vùng 5’ tận đến vùng trung tâm gen dystrophin. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đây với công bố các đột biến xoá đoạn và lặp đoạn đa số đều tập trung tại hai vùng “hot spot” trên gen dystrophin là vùng 5’ tận và vùng trung tâm của gen dystrophin [6], [56],[59].

*** Phân tích các phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng**

Các phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng là các phả hệ có ít nhất hai thành viên nam bị mắc DMD. Xác định người lành mang gen bệnh có thể được thực hiện qua phân tích phả hệ. Trong những phả hệ có tiền sử gia đình, các bà mẹ có tiền sử sinh con mắc DMD sẽ là người mang gen dị hợp tử bắt buộc. Tuy nhiên chúng tôi vẫn thực hiện kỹ thuật MLPA cho các thành viên nữ này để khẳng định lại kết quả xác định người lành mang gen bệnh bằng phân tích phả hệ. Phả hệ gia đình người bệnh D.10 (hình 3.3), D.43 (hình

3.5), D.17 (hình 3.7), D.50 (hình 3.9) là các phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng: phả hệ D.10 có 7 thành viên nam bị bệnh, phả hệ D.17 có 2 thành viên nam bị bệnh, phả hệ D.43 có 3 thành viên nam bị bệnh và phả hệ D.50 có 1 thành viên nam bị bệnh và 2 thai nam được chẩn đoán trước sinh DMD đã đình chỉ thai nghén.

Phân tích kết quả xác định người lành mang gen của phả hệ D.10

Kết quả phân tích phả hệ D.10 (hình 3.3) cho thấy đây phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng với 7 thành viên nam mắc DMD và 14 thành viên nữ. Qua phân tích phả hệ xác định 6 bà mẹ có tiền sử sinh con mắc DMD chắc chắn là người lành mang gen bệnh (thành viên I₁, II₁, II₂, III₁, III₂, III₆). 8/14 thành viên nữ còn lại trong phả hệ cần được xác định người lành mang gen bệnh qua phân tích gen.

Kết quả phân tích MLPA từ DNA mẫu máu các thành viên nữ trong phả hệ người bệnh D.10 được mô tả ở hình 3.4. Kết quả phân tích gen của thành viên nữ II₁ cho thấy cường độ tín hiệu của đỉnh thấp bằng 1/2 so với mẫu người bình thường. Sau khi phân tích dựa trên RPA, ta có tỷ lệ RPA tại exon 11-15 của các thành viên trên so với chứng nhỏ hơn 0.5 trong khi của các exon khác dao động quanh 1, xác định thành viên nữ II₁ là người lành mang gen bệnh. Theo tác giả Lai, khi chiều cao đỉnh tín hiệu của người nữ giảm 35-50% so với mẫu chứng nữ thì người nữ được xác định mang gen bị đột biến dị hợp tử xoá đoạn exon tương ứng với đỉnh tín hiệu đó [83]. Còn theo tác giả Hwa, khi chiều cao đỉnh tín hiệu của exon bị đột biến ở người nữ bằng 35-65% so với chứng nữ thì người nữ này cũng được xác định mang gen đột biến dị hợp tử xoá đoạn gen [86]. Trong nghiên cứu, khi xác định người lành mang gen bệnh chúng tôi cũng nhận thấy chiều cao đỉnh tín hiệu tại vị trí các exon bị đột biến xoá đoạn đều giảm trên 35% so với mẫu chứng nữ bình thường. Kết quả MLPA xác định 10/14 thành viên nữ là người lành mang gen

bệnh trong phả hệ bao gồm các thành viên: I₁, I₂, II₁, II₂, II₄, II₆, IV₂, IV₄, IV₆, IV₉. 4/14 thành viên nữ không mang gen bệnh bao gồm các thành viên: III₁, III₈, IV₁, IV₁₁. Như vậy 6 thành viên nữ (I₁, II₁, II₂, III₁, III₂, III₆) được xác định là người lành mang gen bệnh qua phân tích phả hệ đều được khẳng định lại là người mang gen đột biến dị hợp tử qua phân tích gen bằng kỹ thuật MLPA.

Đây là một phả hệ gia đình lớn với 7 người bệnh DMD ở 3 thế hệ. Điều này cho thấy mặc dù gia đình đã có con trai bị DMD nhưng các thành viên nữ trong gia đình chưa được tư vấn cũng như chưa hiểu rõ về khả năng di truyền của bệnh lý dẫn đến vẫn sinh con mắc DMD ở thế hệ thứ 2, thậm chí là thứ 3. Trong 13 thành viên nữ được xét nghiệm gen, xác định được 10 thành viên nữ mang gen đột biến dị hợp tử chiếm tỷ lệ 76,9%. Đây là một con số lớn. Như vậy trong phả hệ gia đình này có thể thấy sự lan truyền gen bệnh cho thế hệ sau là khá cao. Nếu không thực hiện các kỹ thuật di truyền phát hiện người lành mang gen bệnh để tư vấn chẩn đoán trước sinh thì số người bệnh DMD trong phả hệ này sẽ tiếp tục tăng lên nhanh chóng.

Phân tích kết quả xác định người lành mang gen của phả hệ D.50

Phả hệ gia đình D.50 là phả hệ có tiền sử gia đình rõ ràng do trong phả hệ có một thành viên nam mắc DMD và một thành viên nữ có tiền sử mang thai được chẩn đoán trước sinh bị DMD. Các thành viên nữ trong phả hệ được thực hiện phân tích gen bằng kỹ thuật MLPA. Hình 3.8 thể hiện kết quả phân tích gen của các thành viên nữ trong phả hệ gia đình D.50 (hình 3.10). Hình 3.8A cho thấy các đỉnh tín hiệu tương ứng với exon 14 - 43 cao hơn 1,5 - 2 lần so với mẫu người bình thường. Tỷ lệ phân tích RPA của các exon dao động trong khoảng 1,5 - 2 trong khi các exon khác dao động quanh 1. Theo tác giả Lai và cộng sự, nếu đỉnh tín hiệu tăng 30-50% so với mẫu chứng nữ thì người nữ được xác định là người mang gen dị hợp tử đột biến lặp đoạn

[83]. Tác giả Schouten I.P cũng có kết luận tương tự khi cho rằng các thành viên nữ được chẩn đoán mang đột biến lặp đoạn nếu hình ảnh phân tích MLPA có đỉnh exon tăng từ 1,35 - 1,55 lần so với mẫu người bình thường [104]. Trong nghiên cứu, khi xác định người lành mang gen bệnh chúng tôi cũng nhận thấy chiều cao đỉnh tín hiệu tại vị trí các exon bị đột biến lặp đoạn đều tăng trên 50% so với mẫu chứng nữ bình thường. Từ đó có thể kết luận 2 thành viên nữ I₁ và II₁ là người lành mang gen dị hợp tử đột biến lặp đoạn.

*** *Phân tích phả hệ gia đình có tiền sử bệnh không rõ ràng***

Phả hệ không có tiền sử bệnh rõ ràng khi trong phả hệ chỉ có một thành viên nam mắc DMD. Xác định người lành mang gen qua phân tích phả hệ không thể thực hiện được ở các phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng. Phân tích phả hệ gia đình D.35 (hình 3.11), xác định đây là phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng do chỉ có 1 thành viên nam mắc DMD. Đột biến ở người bệnh DMD này được xác định là đột biến xoá đoạn. Trong trường hợp này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật MLPA để xác định người lành mang gen bệnh cho 5 thành viên nữ trong phả hệ bao gồm chị, mẹ, em họ, bà ngoại của người bệnh. Qua phân tích hình ảnh MLPA nhận thấy tín hiệu đỉnh tại vị trí các exon trên gen dystrophin đều giống như mẫu chứng bình thường (hình 3.12). Các thành viên nữ trong phả hệ này đều được xác định không mang gen đột biến, do đó đột biến ở thành viên nam mắc DMD trong gia đình là đột biến mới. Mặc dù không mang gen đột biến, nhưng do đã có tiền sử 1 lần sinh con mắc DMD nên vẫn cần tư vấn chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho bà mẹ này khi mang thai những lần sau.

4.1.2. *Xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen*

Kỹ thuật giải trình tự 79 exon được ứng dụng trong chẩn đoán các trường hợp đột biến điểm. Nghiên cứu đã thực hiện thành công kỹ thuật giải trình tự gen cho 19 thành viên nữ trong 10 phả hệ. Tỷ lệ người lành mang gen

bệnh trong các phả hệ chiếm tỷ lệ cao (63,2%) trong khi đó tỷ lệ người không mang gen bệnh chỉ chiếm 36,8%.

Có 9 dạng đột biến điểm đã được phát hiện trong đó phần lớn các đột biến xảy ra tại các exon (8/9 dạng đột biến), chỉ 1 đột biến xảy ra tại intron gây ảnh hưởng đến sự cắt nối gen dystrophin (bảng 3.8).

Phân tích kết quả xác định người lành mang gen của phả hệ D.81

Kết quả phân tích phả hệ D.81 (hình 3.13) cho thấy đây phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng với 2 thành viên nam mắc DMD và 3 thành viên nữ. Qua phân tích phả hệ xác định chắc chắn 2/3 thành viên nữ là người lành mang gen bệnh (thành viên I₁, II₂) do có tiền sử sinh con mắc DMD.

Kết quả giải trình tự gen từ DNA mẫu máu của 2 thành viên nữ I₁, II₂ trong phả hệ (hình 3.14) cho thấy chỉ có thành viên nữ I₁ là người lành mang gen đột biến. Thành viên nữ II₂ không tìm thấy đột biến từ DNA mẫu máu mặc dù qua phân tích phả hệ đã xác định chắc chắn thành viên nữ II₂ là người lành mang gen đột biến. Chúng tôi đã tiến hành phân tích gen từ DNA mẫu tóc của thành viên nữ này và xác định có mang gen đột biến dị hợp tử. Từ kết quả này có thể khẳng định thành viên nữ D.81 là người lành mang gen bệnh ở trạng thái khảm. Giả thuyết được đặt ra cho các trường hợp khảm là do sự phân chia bất thường của các NST trong những lần phân bào đầu tiên của hợp tử dẫn đến hình thành hai dòng tế bào khác nhau: một dòng tế bào mang gen đột biến và một dòng tế bào không mang gen đột biến. Giả thuyết thứ hai có thể do sự tự sửa chữa của tế bào. Gen dystrophin bị đột biến đã được sửa chữa thành gen bình thường ở một nhóm tế bào và hình thành dòng tế bào bình thường bên cạnh dòng tế bào mang gen đột biến [105],[106].

Hiện nay trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh, nếu không xác định được đột biến ở mẹ người bệnh DMD thì đột biến ở người bệnh thường được kết luận là đột biến mới. Theo thống kê, 2/3 người bệnh DMD nhận gen

đột biến từ mẹ và 1/3 là đột biến mới. Tuy nhiên một số nghiên cứu đã chỉ ra hiện tượng khảm dẫn đến những thay đổi trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh cũng như trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [107],[108]. Mặc dù hiện tượng khảm đã được mô tả lần đầu tiên vào những năm 1980 nhưng tình trạng này thường không được chú ý trong chẩn đoán trước sinh. Nghiên cứu của tác giả Van Essen AJ và cộng sự đã kết luận, ở các bà mẹ có tiền sử sinh con mắc DMD, nếu không phát hiện được đột biến từ DNA mẫu máu thì chỉ có 80% các trường hợp bà mẹ không mang gen đột biến, còn 20% các trường hợp là mang gen đột biến ở thể khảm [109]. Những bà mẹ có hiện tượng mang gen đột biến ở thể khảm vẫn cần được tư vấn chẩn đoán trước sinh khi mang thai. Chính vì vậy, việc chẩn đoán trước sinh DMD cần được tư vấn không chỉ với các bà mẹ là người lành mang gen bệnh mà cần được tư vấn ở tất cả các bà mẹ đã có tiền sử sinh con bị DMD.

Việc xác định người lành mang gen bệnh trong các gia đình có thành viên nam mắc DMD là cơ sở khoa học cho công tác tư vấn di truyền cũng như chẩn đoán trước sinh, giúp giảm tỷ lệ trẻ mắc bệnh DMD do các thành viên nữ trong các phả hệ phần lớn đều đang trong lứa tuổi sinh sản.

4.2. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

4.2.1. Xác định marker STR dị hợp tử gen dystrophin bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Microsatellite là các trình tự DNA lặp lại ngắn (STR), rải rác khắp bộ gen người. STR có tính đa hình cao được ứng dụng rộng rãi trong y học như: chẩn đoán trước sinh, chẩn đoán tiền làm tổ, chẩn đoán rối loạn di truyền đơn gen, lập bản đồ gen. Hiện nay ở Việt Nam có 13 marker STR được sử dụng trong chẩn đoán trước sinh DMD bao gồm 12 marker của gen dystrophin và 1 marker STR để xác định giới tính. Khi thực hiện kỹ thuật, mỗi thai phụ cần

được lựa chọn ít nhất 2 marker dị hợp tử (informatic marker) trong 12 marker do trong một số trường hợp nếu xảy ra tình trạng khuếch đại thất bại 1 marker thì có thể phân tích kết quả khuếch đại của các marker còn lại để cho kết quả chẩn đoán bệnh DMD ở thai nhi [112]. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng 6 marker STR và đánh giá tỷ lệ dị hợp tử cũng như tần suất phân bố các alen của từng marker, từ đó xác định các marker có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất và ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.

Nghiên cứu tiến hành thu thập mẫu máu của 65 thành viên nữ thuộc 65 gia đình không có quan hệ huyết thống, xác định tỷ lệ dị hợp tử và tần suất xuất hiện các alen của từng marker STR. 6 marker STR được phân tích trong nghiên cứu của chúng tôi bao gồm: DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907, DXS1036. Tỷ lệ dị hợp tử của các marker STR xếp lần lượt từ cao xuống thấp như sau: DSTR49 (86,2%), DXS890 (73,8%), DSTR50 (61,5%), DXS1067 (61,5%), DXS9907 (61,5%), DXS1036 (43,1%). Với 6 marker STR, xác định được 38 alen với tần suất xuất hiện dao động từ 0,00823 đến 0,49592. Trong 6 marker được nghiên cứu, marker DSTR49 tính đa hình cao nhất với số alen nhiều nhất (14 alen) và đây cũng là marker có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất. Phân tích tương tự cho thấy marker DXS1036 có tính đa hình thấp nhất với số alen ít nhất, đồng thời cũng là marker có tỷ lệ dị hợp tử thấp nhất. Từ đó có thể kết luận marker có càng nhiều alen, tính đa hình càng cao thì tỷ lệ dị hợp tử càng cao và ngược lại. Việc chẩn đoán trước sinh nên ưu tiên sử dụng các marker STR có tỷ lệ dị hợp tử cao do trong chẩn đoán trước sinh cần phải khuếch đại thành công ít nhất 2 marker STR dị hợp tử ở thai phụ. Sau khi xác định được tỷ lệ dị hợp tử của từng marker STR, chúng tôi nhận thấy 5 marker STR có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất bao gồm: DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907. Khi sử dụng 5 marker STR này trong chẩn đoán trước sinh, tỷ lệ khuếch đại được ít nhất 2/5 marker STR dị hợp tử là

97,76%. Chỉ 2,24% các trường hợp cần phải khuếch đại thêm các marker STR khác. Như vậy sử dụng 5 marker STR được xác định trong nghiên cứu của chúng tôi, thay vì 12 marker STR như hiện nay sẽ giúp giảm chi phí của xét nghiệm cũng như thời gian thực hiện kỹ thuật. Kết quả xác định các marker STR này còn có ý nghĩa lớn ứng dụng trong chẩn đoán tiền lâm tở bệnh DMD.

4.2.2. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Hiện nay, hai phương pháp lấy mẫu bệnh phẩm là sinh thiết gai rau và chọc ối thường được thực hiện để chẩn đoán trước sinh các bất thường NST cũng như một số bệnh lý di truyền đơn gen như Thalassemia, DMD, thoái hoá cơ tủy, ... Sinh thiết gai rau được khuyến cáo thực hiện ở tuổi thai sớm hơn chọc hút nước ối (từ 10 tuần đến 12 tuần 6 ngày) [66]. Tuy nhiên theo nhiều nghiên cứu, tỷ lệ sảy thai sau sinh thiết gai rau cao hơn chọc ối [68],[70],[71]. Theo tác giả Akolekar (2015) thống kê trên 42617 thai phụ chọc ối và 8899 thai phụ sinh thiết gai rau, tỷ lệ sảy thai sau chọc ối là 0,81% trong khi tỷ lệ sảy thai sau sinh thiết gai rau là 2,18% [70]. Như vậy tỷ lệ sảy thai sau chọc ối là rất thấp. Mặc dù sinh thiết gai rau có thể giúp chẩn đoán bệnh cho thai nhi ở tuổi thai nhỏ nhưng tỷ lệ tai biến, đặc biệt là sảy thai lại cao hơn chọc ối. Tỷ lệ thất bại trong nuôi cấy tế bào ối là 0,1% trong khi tỷ lệ này là 2,5-4,8% trong sinh thiết gai rau [68]. Trong nghiên cứu, chúng tôi lựa chọn thực hiện kỹ thuật chọc ối chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 51 thai nhi, không ghi nhận trường hợp nào sảy thai sau thủ thuật (bảng 3.11). Hiện nay các trung tâm chẩn đoán trước sinh có sự lựa chọn kích thước kim chọc ối khác nhau. Theo nhiều nghiên cứu công bố, phần lớn kim chọc ối được sử dụng là kim chọc dò tủy sống có kích thước 20-G hoặc 22-G. Theo nghiên cứu của tác giả A Athanasiadis (2017) với 3054 trường hợp chọc ối và nghiên

cứu của tác giả Kose SA (2016) với 271 trường hợp chọc ối thì tỷ lệ sảy thai sau chọc ối không có sự khác biệt giữa sử dụng kim 20-G và 22-G [113],[114]. Tuy nhiên một số tác giả khác trên thế giới cũng đã công bố kết quả chọc ối với kích thước kim nhỏ hơn. Tác giả Tchirikov M năm 2012 công bố kết quả chọc ối bằng kim có kích thước 29-G cho 316 thai phụ, kết quả không có trường hợp nào sảy thai sau thủ thuật và kết luận sử dụng kim kích thước nhỏ sẽ làm giảm tai biến sau thủ thuật [115]. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng kim chọc ối kích thước 27-G và không có trường hợp nào sảy thai sau thủ thuật. Việc sử dụng kim nhỏ sẽ làm giảm nguy cơ tai biến, tuy nhiên vẫn cần những nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để có thể so sánh tỷ lệ tai biến khi sử dụng các kim chọc ối có kích thước khác nhau.

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi từ 51 mẫu dịch ối của 45 thai phụ được mô tả trong hình 3.20. Trong 51 trường hợp chẩn đoán trước sinh DMD xác định có 6 thai nữ và 45 thai nam. Loạn dưỡng cơ Duchenne là bệnh di truyền gen lặn, liên kết NST giới tính X nên trong đa số các trường hợp bệnh chỉ biểu hiện ở trẻ nam. Xác định giới tính của thai nhi là bước đầu tiên trong chẩn đoán trước sinh DMD. Hiện nay trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD, giới tính của thai nhi sẽ được xác định thông qua phân tích các marker giới tính từ dịch ối. Phương pháp siêu âm xác định giới tính có thể xác định nhằm giới tính của thai trong các trường hợp thai nhi có những bất thường hệ sinh dục – tiết niệu như lỗ đái lệch thấp hay trong trường hợp thai có những bất thường NST giới tính kèm theo hay mắc những bệnh lý rối loạn chuyển hoá gây mờ hồ về giới tính như tăng sản thượng thận bẩm sinh. Kết quả chẩn đoán 3 thai nữ mang gen dị hợp (5,9%), 3 thai nữ bình thường (5,9%), 10 thai nam bị bệnh DMD (19,6%) và 35 thai nam bình thường (68,6%). 3 thai nữ được chẩn đoán mang gen dị hợp đều được tư vấn và tiếp tục theo dõi thai. Các trường hợp người nữ mang gen đột biến dị hợp

tử đa số không có biểu hiện lâm sàng, tuy nhiên lại có thể truyền gen bệnh cho con dẫn đến sinh con trai bị bệnh với tỷ lệ 50% và sinh con gái mang gen đột biến giống mình cũng với tỷ lệ 50%. Chính vì vậy những để tránh tiếp tục lan truyền gen đột biến trong quần thể, sau khi sinh những trẻ gái có mang gen dị hợp tử thì có thể tư vấn cho gia đình về phương pháp chẩn đoán tiền làm tổ bệnh DMD khi những trẻ gái này đến tuổi trưởng thành và lập gia đình. Phôi sẽ được phân tích gen và chỉ chuyển vào buồng tử cung những phôi nam và phôi nữ không mang đột biến gen dystrophin. 10 thai nam bị DMD sau khi được tư vấn có 9 trường hợp thai phụ quyết định đình chỉ thai nghén và 1 thai phụ vẫn quyết định giữ thai (bảng 3.12). Trong các đột biến xác định được ở thai nam bị DMD, đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất với 6 trường hợp (60%), 2 trường hợp đột biến lặp đoạn chiếm tỷ lệ 20% và 2 trường hợp đột biến điểm chiếm tỷ lệ 20%. Kết quả nghiên cứu tương đồng với kết quả của những nghiên cứu khác khi xác định đột biến xoá đoạn là dạng đột biến chiếm tỷ lệ cao như nghiên cứu của các tác giả Li và cộng sự năm 2009, tác giả Giliberto và cộng sự năm 2011, tác giả Wang và cộng sự năm 2017 [13],[95],[98].

Chẩn đoán trước sinh bệnh DMD hiện nay có thể sử dụng phương pháp chẩn đoán đột biến trực tiếp như PCR, MLPA, giải trình tự gen,... hoặc phương pháp xác định đột biến gián tiếp dựa trên phân tích alen đột biến Microsatellite DNA. Mỗi phương pháp chẩn đoán có những ưu, nhược điểm riêng và được ứng dụng trong phát hiện từng loại đột biến khác nhau. Với những kỹ thuật xác định đột biến trực tiếp như PCR, MLPA, giải trình tự gen,... thì việc xác định chính xác đột biến gen dystrophin ở thai phụ đóng vai trò quyết định và giúp những nhà di truyền lựa chọn phương pháp chẩn đoán đột biến cho thai nhi từ dịch ối. Kỹ thuật PCR mặc dù có quy trình đơn giản, dễ thực hiện với giá thành thấp tuy nhiên kỹ thuật này chỉ có khả

năng phát hiện các đột biến xóa đoạn, đặc biệt kỹ thuật Multiplex PCR chỉ có khả năng khảo sát 25/79 exon của gen dystrophin. Do vậy những trường hợp đột biến điểm và đột biến lặp đoạn sẽ nằm ngoài khả năng phát hiện của kỹ thuật này. Còn với kỹ thuật MLPA có khả năng xác định 70 – 75% các dạng đột biến bao gồm đột biến xóa đoạn và lặp đoạn tuy nhiên vẫn còn 25-30% là các đột biến điểm cần phải sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để xác định. [85],[116],[117]. Kỹ thuật giải trình tự gen có thời gian thực hiện lâu, trong khi chẩn đoán trước sinh cần cho kết quả sớm. Đặc biệt, trong một số trường hợp không phát hiện thấy đột biến hoặc việc phát hiện đột biến gặp khó khăn do cấu trúc gen lớn thì không thể chẩn đoán trước sinh bệnh DMD dựa vào các kỹ thuật xác định đột biến trực tiếp nêu trên. Và khi không xác định được đột biến chỉ điểm ở thai phụ và người bệnh DMD trong phả hệ thì sẽ không thể thực hiện chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi bằng các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp. Hơn nữa hiện tượng lẫn máu mẹ trong quá trình chọc ối có thể gây ảnh hưởng đến kết quả của các kỹ thuật này. Chính vì vậy khi kỹ thuật Microsatellite được đưa vào ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh dựa vào phân tích đột biến gián tiếp đã khắc phục được những hạn chế hiện nay trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của các kỹ thuật xác định đột biến trực tiếp. Trên thế giới, kỹ thuật Microsatellite đã được ứng dụng thành công trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, Hemophilia A và đặc biệt còn trở thành 1 phương pháp hiệu quả ứng dụng trong chẩn đoán tiền lâm tổ một số bệnh lý di truyền đơn gen [95], [118], [119]. Theo tác giả Wang và cộng sự (2017) nghiên cứu trên 131 gia đình người bệnh DMD ở Trung Quốc đã ứng dụng thành công các kỹ thuật phát hiện đột biến trực tiếp như PCR, MLPA và giải trình tự gen trong chẩn đoán trước sinh DMD, đồng thời sử dụng kỹ thuật phân tích gián tiếp Microsatellite DNA để khẳng định lại kết

quả chẩn đoán của các kỹ thuật trên cũng như phát hiện các trường hợp lẫn máu mẹ trong dịch ối gây sai lệch kết quả chẩn đoán [95]. Chính vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành ứng dụng kỹ thuật chẩn đoán gián tiếp Microsatellite DNA trong chẩn đoán trước sinh DMD bên cạnh các kỹ thuật di truyền phân tử phát hiện đột biến trực tiếp.

Chẩn đoán trước sinh thường được thực hiện cho các thai phụ là người lành mang gen bệnh. Tuy nhiên hiện nay chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cũng đã được đặt ra trong các trường hợp thai phụ đã có tiền sử sinh con mắc DMD nhưng lại được xác định là người không mang gen bệnh qua phân tích gen từ DNA mẫu máu. Đây là trường hợp mà đột biến ở người con thường được cho là đột biến mới. Tỷ lệ đột biến mới hiện nay được công bố trong nhiều nghiên cứu vào khoảng 30%, tuy nhiên trong số 30% này có 1 tỷ lệ không phải đột biến mới thực sự mà người mẹ có mang đột biến nhưng cơ thể khảm và gen đột biến gây bệnh DMD ở con trai là do nhận từ người mẹ. Trong kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh ở mục tiêu 1 của nghiên cứu, chúng tôi đã xác định được 1 trường hợp mẹ người bệnh DMD có đột biến ở trạng thái khảm (phả hệ gia đình người bệnh D.81, hình 3.13 & hình 3.14). Người mẹ này được xác định là người lành mang gen bệnh qua phân tích phả hệ (mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc) do có con trai và em trai đều bị mắc DMD. Tuy nhiên khi tiến hành phân tích gen của bà mẹ này thì không tìm thấy đột biến từ DNA mẫu máu nhưng lại thấy đột biến từ DNA mẫu tóc, khẳng định đây là trường hợp mang gen đột biến ở thể khảm. Chính vì vậy, với những trường hợp không phát hiện thấy đột biến qua phân tích gen từ DNA mẫu máu của các bà mẹ có tiền sử sinh con mắc DMD thì vẫn không thể khẳng định chắc chắn những bà mẹ này không mang gen đột biến do hiện tượng khảm có thể xảy ra. Mặc dù hiện tượng khảm xảy ra với tỷ lệ rất thấp, tuy nhiên vẫn cần được chú ý đặc biệt trong tư vấn chẩn đoán trước sinh.

Chính vì vậy chẩn đoán trước sinh bệnh DMD vẫn cần được tư vấn ở tất cả các thai phụ đã có tiền sử sinh con DMD, cho dù thai phụ được xác định là có hay không có mang gen đột biến. Theo hình 3.22, nghiên cứu được tiến hành với 45 thai phụ có tiền sử sinh con mắc DMD trong đó có 7 người không xác định thấy đột biến từ DNA mẫu máu và 38 thai phụ được xác định là người lành mang gen bệnh.

Trong nghiên cứu, chúng tôi ứng dụng thành công kỹ thuật chẩn đoán đột biến gián tiếp Microsatellite DNA dựa vào xác định alen đột biến (Linkage analysis) trong chẩn đoán trước sinh DMD với tất cả các dạng đột biến bao gồm đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm (hình 3.22). Ngoài ra, trong nghiên cứu có một trường hợp không xác định được đột biến chỉ điểm ở thai phụ và người bệnh DMD thì kỹ thuật Microsatellite DNA là kỹ thuật duy nhất có thể được ứng dụng để chẩn đoán trước sinh. Hơn nữa với giá thành rẻ hơn, kỹ thuật Microsatellite DNA giúp giảm gánh nặng kinh tế cho người bệnh. Thời gian thực hiện kỹ thuật ngắn giúp rút ngắn thời gian trả kết quả, đáp ứng được yêu cầu về thời gian trong chẩn đoán trước sinh. Kỹ thuật Microsatellite DNA có thể phát hiện được tình trạng lẫn tế bào máu mẹ trong dịch ối, một trong các vấn đề gây ảnh hưởng tới kết quả chẩn đoán của các kỹ thuật di truyền phân tử khác hiện nay [90],[95].

Hiện nay, bất thường nhiễm sắc thể là một trong những nguyên nhân chính gây đa dị tật về hình thái của thai nhi, trong đó hội chứng Down (3 NST 21), hội chứng Edwards (3 NST 18) hay hội chứng Patau (3 NST 13) là những bất thường hay gặp nhất [65],[118]. Vì vậy khi chọc hút nước ối để chẩn đoán trước sinh bệnh DMD, chúng tôi đồng thời thực hiện nuôi cấy tế bào ối làm nhiễm sắc thể để cho tất cả các trường hợp để chẩn đoán các bất thường NST có thể kèm theo ở thai nhi. Kết quả 51/51 thai nhi không phát hiện bất thường về cấu trúc và số lượng NST.

4.2.2.1. Chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho các thai phụ là người lành mang gen bệnh

Nghiên cứu đã tiến hành chẩn đoán trước sinh cho 44 thai nhi của 38 thai phụ là người lành mang gen bệnh trong đó gồm 41 thai nam (của 35 bà mẹ) được chẩn đoán trước sinh bệnh DMD và 3 thai nữ (của 3 bà mẹ) được chẩn đoán người lành mang gen bệnh.

Trong 35 thai phụ mang thai nam, qua phân tích phả hệ chúng tôi xác định 12 thai phụ thuộc những phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng. Những thai phụ này là người mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc. 16 thai nhi của 12 thai phụ này (do có 4 thai phụ mang thai 2 lần) đã được chẩn đoán trước sinh đồng thời bằng kỹ thuật Microsatellite DNA và kỹ thuật PCR, MLPA hoặc giải trình tự gen. Kỹ thuật Microsatellite cho kết quả tương đồng với các kỹ thuật khác và được thực hiện thành công trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD với tất cả các dạng đột biến bao gồm đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm. Trong khi đó kỹ thuật PCR chỉ có thể xác định đột biến xóa đoạn, kỹ thuật MLPA chỉ xác định được đột biến xóa đoạn và đột biến lặp đoạn, và kỹ thuật giải trình tự gen chỉ ưu tiên ứng dụng trong các trường hợp đột biến điểm do chi phí xét nghiệm cao.

15/16 thai nhi được chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite DNA và được đối chiếu kết quả bằng kỹ thuật PCR, MLPA hoặc giải trình tự gen. 1/16 trường hợp do không xác định được đột biến chỉ điểm ở người bệnh DMD và thai phụ nên không thể thực hiện chẩn đoán trước sinh bằng các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp. Trong trường hợp này, Microsatellite là kỹ thuật duy nhất có thể sử dụng để chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi.

Nghiên cứu đã xác định được 5 marker STR có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất là DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907 với tỷ lệ xuất hiện ít nhất 2 marker STR dị hợp tử trong số 5 marker này là 97,76%. Chúng tôi thực hiện

khếch đại 5 marker STR trên cho 12 bà mẹ, qua đó chẩn đoán trước sinh cho 16 thai nhi. Để có thể chẩn đoán trước sinh cho thai nhi, mỗi thai phụ cần khuếch đại được ít nhất 2 marker STR dị hợp tử. Kết quả cho thấy 11/12 thai phụ đã được khuếch đại thành công ít nhất 2 marker STR dị hợp tử và sử dụng các marker STR này trong chẩn đoán trước sinh bệnh lý DMD cho thai nhi, chỉ 1 thai phụ cần khuếch đại thêm các marker STR khác để tìm được marker STR dị hợp tử. Điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc giảm thời gian thực hiện kỹ thuật cũng như chi phí hoá chất cho xét nghiệm, giúp giảm thời gian trả kết quả cũng như giảm gánh nặng kinh tế cho người bệnh. Không chỉ vậy, việc xác định được các marker STR có tỷ lệ dị hợp cao còn có ý nghĩa thực tiễn trong chẩn đoán tiền lâm tổ bệnh DMD.

Sau khi khuếch đại được marker STR dị hợp tử, chúng tôi xác định alen bình thường và alen bệnh của từng marker STR và xác định alen người mẹ truyền cho thai nhi. Trong trường hợp thai nhi chỉ nhận từ mẹ các alen bình thường thì thai nhi được chẩn đoán không mắc DMD, còn nếu thai nhi nhận các alen bệnh từ mẹ thì thai nhi được chẩn đoán mắc bệnh DMD. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng kỹ thuật Microsatellite cho 16 thai nhi xác định có 5 thai nhi nhận alen bệnh từ mẹ, được chẩn đoán mắc DMD; 11 thai nhi nhận alen bình thường từ mẹ, được chẩn đoán không mắc bệnh. 15/16 trường hợp được đối chiếu kết quả chẩn đoán bằng kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp (PCR, MLPA, giải trình tự gen) đều cho kết quả tương đồng với kỹ thuật Microsatellite. 1/16 trường hợp thai nhi chỉ có thể thực hiện chẩn đoán trước sinh DMD bằng kỹ thuật Microsatellite DNA do không xác định được đột biến chỉ điểm ở thai phụ và người bệnh DMD trong gia đình nên không có kết quả đối chiếu với phương pháp chẩn đoán đột biến khác. Kết quả chẩn đoán trước sinh là tương đồng giữa hai phương pháp chẩn đoán đột biến trực tiếp và gián tiếp đã được kết luận trong nhiều nghiên cứu của các tác

giả khác nhau trên thế giới: tác giả Wang và cộng sự năm 2017 đã ứng dụng đồng thời các kỹ thuật PCR, MLPA, giải trình tự gen và kỹ thuật Microsatellite DNA trong chẩn đoán trước sinh DMD cho 131 thai nhi, tác giả Minh Hieu Ta và cộng sự năm 2014 đã kết luận 2 phương pháp chẩn đoán đột biến trực tiếp và gián tiếp là hoàn toàn tương đồng nhau trong chẩn đoán trước sinh DMD cho 8 thai nhi có nguy cơ cao mắc DMD [77],[95]. Như vậy kết quả thu được từ nghiên cứu của chúng tôi khi ứng dụng kỹ thuật Microsatellite DNA trong chẩn đoán trước sinh DMD là tương đồng với các tác giả khác. Kỹ thuật Microsatellite DNA đã được phối hợp với các kỹ thuật khác như PCR hoặc MLPA trong chẩn đoán đột biến xóa đoạn; phối hợp với kỹ thuật MLPA trong chẩn đoán đột biến lặp đoạn, và phối hợp với kỹ thuật giải trình tự gen trong chẩn đoán đột biến điểm.

Dystrophin là một trong những gen lớn nhất cơ thể, vì vậy việc xác định đột biến gen gặp nhiều khó khăn. Trong một số trường hợp các kỹ thuật di truyền phân tử hiện nay không thể xác định được dạng đột biến ở mẹ người bệnh cũng như người bệnh DMD trong gia đình. Trong các trường hợp này, chẩn đoán trước sinh bệnh DMD chỉ có thể sử dụng kỹ thuật Microsatellite DNA mà không thể dùng các phương pháp chẩn đoán đột biến trực tiếp như PCR, MLPA, giải trình tự gen,... Theo nghiên cứu của Wang và cộng sự (2017), Microsatellite DNA đã được kết luận là phương pháp có hiệu quả trong chẩn đoán trước sinh dựa vào phân tích sự di truyền của các alen trong trường hợp không tìm được đột biến ở người bệnh DMD [95]. Trong nghiên cứu chúng tôi cũng ghi nhận một trường hợp tương tự là thai phụ DMD.31. Theo phả hệ gia đình thai phụ (hình 3.36), thai phụ có 2 con trai được chẩn đoán mắc DMD với triệu chứng lâm sàng điển hình, xét nghiệm CK máu tăng cao và được chẩn đoán xác định bằng sinh thiết cơ. Các kỹ thuật xác định đột biến gen dystrophin đã được thực hiện từ DNA mẫu máu của người bệnh và

người mẹ (thai phụ), tuy nhiên không xác định được đột biến bằng cả hai kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen. Theo phân tích phả hệ, thai phụ được khẳng định là người lành mang gen bệnh do có 2 con trai bị DMD. Thai phụ mang thai lần 3 và cần được chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi. Trong trường hợp này, phương pháp chẩn đoán đột biến gián tiếp Microsatellite DNA qua phân tích sự di truyền các alen là lựa chọn duy nhất để chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi. Chúng tôi đã tiến hành khuếch đại 5 marker STR xác định được ở mục tiêu 1 và đã khuếch đại thành công 3 marker STR dị hợp tử ở thai phụ là DSTR 49, DSTR50 và DXS9907. Với marker DSTR49 (hình 3.37A), thai phụ xuất hiện 2 đỉnh có kích thước 250bp và 236bp tương ứng với 2 alen nằm trên 2 NST X ($X^B X^b$). Chúng tôi nhận thấy đỉnh alen kích thước 250bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD nên alen này được xác định là alen bệnh. Alen còn lại có kích thước 236bp là alen bình thường. Phân tích tương tự với marker DXS9907 (hình 3.37B) xác định alen kích thước 202bp là alen bình thường và marker DSTR50 (hình 3.37C) alen có kích thước 246bp là alen bình thường. Kết quả chẩn đoán trước sinh từ dịch ối cho thấy thai nhi được di truyền các alen có kích thước 202bp, 246bp và 251bp từ mẹ. Các alen này được xác định là các alen bình thường, thai nhi được chẩn đoán không mắc DMD. Hiện nay, mặc dù với sự phát triển mạnh mẽ của các kỹ thuật di truyền phân tử nhưng nhiều trường hợp vẫn không thể xác định được đột biến gen dystrophin ở người bệnh DMD hay mẹ người bệnh. Điều này là một thách thức với chẩn đoán trước sinh khi xác định đột biến chỉ điểm là bước đầu tiên của quá trình chẩn đoán trước sinh. Trong trường hợp này, kỹ thuật Microsatellite đã khắc phục được hạn chế của các kỹ thuật chẩn đoán trước sinh hiện nay như PCR, MLPA hay giải trình tự gen khi có thể chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho thai nhi không dựa vào đột biến chỉ điểm ở thai phụ hay người bệnh DMD trong gia đình mà thông qua

việc xác định thai nhi được di truyền từ mẹ alen bình thường hay alen bệnh lý, từ đó đưa ra chẩn đoán trước sinh cho thai nhi.

Để có thể ứng dụng các kỹ thuật PCR, MLPA hay giải trình tự gen trong chẩn đoán trước sinh đều cần xác định chính xác đột biến gen dystrophin ở người bệnh DMD và xác định tình trạng mang gen dị hợp tử ở thai phụ. Tuy nhiên trong điều kiện tại Việt Nam, còn nhiều gia đình người bệnh không có điều kiện kinh tế để chi trả cho các xét nghiệm chẩn đoán gen, đặc biệt kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm. Trong những trường hợp này, chẩn đoán trước sinh bằng Microsatellite DNA có thể được thực hiện mà không cần xác định chính xác đột biến ở thai phụ cũng như con trai mắc DMD, mà chỉ dựa vào các trình tự lặp lại ngắn STR có tính đa hình cao. Số lần lặp lại của các trình tự STR này đặc trưng cho từng cá thể và được di truyền qua các thế hệ theo quy luật Mendel. Chẩn đoán trước sinh được thực hiện thông qua việc xác định alen đột biến và sự di truyền của các alen này từ thai phụ cho thai nhi [102],[119],[122]. Các marker STR được tối ưu hoá bằng kỹ thuật single PCR và multiplex PCR. Marker STR dị hợp tử ở thai phụ là các marker có sản phẩm điện di mao quản cho 2 đỉnh khác nhau tương ứng với 2 alen. Sau khi xác định được các marker STR dị hợp tử ở thai phụ, alen bệnh lý cũng sẽ được xác định dựa vào so sánh kết quả từ mẫu máu thai phụ và mẫu máu của người bệnh DMD trong phả hệ. Do DMD là bệnh lý di truyền liên kết NST giới tính X không có alen tương ứng trên NST Y nên với mỗi vùng STR thai phụ sẽ có hai đỉnh tương ứng với 2 alen trên 2 NST X trong khi người bệnh DMD sẽ chỉ xuất hiện 1 đỉnh tương ứng với 1 alen trên 1 NST X. Alen nào ở thai phụ trùng với alen ở người bệnh DMD trong phả hệ thì đó là alen bệnh lý, alen còn lại là alen bình thường. So sánh alen ở mẫu ối với alen bệnh lý và alen bình thường sẽ xác

định được mẫu ối mang alen bệnh lý hay bình thường, từ đó chẩn đoán xác định thai nhi có mắc DMD hay không.

Phân tích kết quả chẩn đoán trước sinh DMD cho thai phụ DMD.28 được mô tả trong hình 3.34 và hình 3.35. Theo phả hệ (hình 3.33), thai phụ có em trai được chẩn đoán bị DMD với các triệu chứng yếu cơ điển hình, nồng độ CK máu cao và xác định mang đột biến lặp đoạn exon 14-43 gen dystrophin. Thai phụ được xác định là người lành mang gen bệnh với đột biến giống ở em trai mình bằng kỹ thuật MLPA. Thai phụ mang thai 2 lần và thai nhi được chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng kỹ thuật MLPA và Microsatellite DNA. Với kỹ thuật Microsatellite DNA (hình 3.34), 2 marker STR dị hợp tử được xác định từ mẫu máu của thai phụ là DSTR44 và DSTR49. Đỉnh alen trùng nhau ở thai phụ và người bệnh DMD được xác định là đỉnh alen bệnh. Từ hình 3.34 có thể khẳng định alen kích thước 180bp và 242bp là 2 alen bệnh. Phân tích mẫu ối của thai nhi thấy xuất hiện cả 2 đỉnh alen bệnh tương ứng với 2 marker STR DSTR44 và DSTR49. Thai nhi nhận alen bệnh từ mẹ và được chẩn đoán mắc DMD. Với kỹ thuật MLPA (hình 3.35), tại probe tương ứng với các exon 14-43 của mẫu ối thấy cường độ tín hiệu của đỉnh cao hơn 150-200% so với mẫu người bình thường. Sau khi phân tích dựa trên RPA ta có tỷ lệ RPA tại các exon từ 14 đến 43 của thai nhi so với chúng quanh mức 2 trong khi của các exon khác chỉ giao động xung quanh 1. Theo tác giả Hwa và cộng sự, nếu đỉnh tín hiệu tăng 200% so với mẫu chứng thì người nam được xác định là người mang đột biến lặp đoạn [123]. Tác giả Janssen và cộng sự (2015) cũng kết luận người bệnh được chẩn đoán mang đột biến lặp đoạn nếu kết quả phân tích MLPA cho tỷ lệ RPA tăng khoảng 200% (dao động từ 150-250%) so với mẫu người bình thường [103]. Từ đó có thể khẳng định thai nam mang gen đột biến lặp đoạn các exon từ 14 đến 43 được chẩn đoán mắc bệnh DMD. Kỹ thuật MLPA và Microsatellite

DNA có kết quả tương đồng trong chẩn đoán trước sinh DMD cho thai phụ DMD.28.

Những năm trở lại đây, các kỹ thuật di truyền ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh DMD ngày càng được phát triển mạnh mẽ. Rất nhiều tác giả trên thế giới đã công bố kết quả nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật di truyền phân tử để chẩn đoán trước sinh bệnh DMD. Năm 2013, tác giả Zhang và cộng sự đã ứng dụng thành công kỹ thuật real-time PCR trong chẩn đoán trước sinh DMD cho 30 gia đình người bệnh DMD [120]. Tác giả Li và cộng sự (2013) đã ứng dụng kỹ thuật MLPA trong chẩn đoán trước sinh DMD cho 155 thai phụ là người mang gen đột biến xóa đoạn và lặp đoạn [119]. Một số tác giả khác đã kết hợp 2 hay nhiều các kỹ thuật di truyền phân tử để chẩn đoán trước sinh DMD, giúp tăng tỷ lệ chẩn đoán so với việc chỉ sử dụng một kỹ thuật di truyền đơn lẻ. Tác giả Li và cộng sự năm 2009 đã kết hợp kỹ thuật MLPA và Multiplex PCR chẩn đoán trước sinh cho 8 thai phụ mang các đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen dystrophin gây bệnh DMD [98]. Còn trong nghiên cứu của mình năm 2009, tác giả Wang và cộng sự đã kết hợp kỹ thuật MLPA và Microsatellite DNA (linkage analysis) để chẩn đoán trước sinh cho 26 trường hợp thai có nguy cơ mắc DMD, kết luận việc phối hợp hai kỹ thuật MLPA và phân tích STR giúp tăng khả năng chẩn đoán trước sinh bệnh DMD [121]. Năm 2011, tác giả Giliberto đã chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 24 thai phụ mang gen đột biến dị hợp tử bằng việc kết hợp kỹ thuật Multiplex PCR và phân tích STR (Microsatellite DNA) [13]. Một nghiên cứu khác của tác giả Wang và cộng sự năm 2017 đã kết hợp kỹ các kỹ thuật di truyền phân tử chẩn đoán đột biến trực tiếp (MLPA, PCR, giải trình tự gen) và kỹ thuật Microsatellite DNA trong chẩn đoán trước sinh DMD cho 146 trường hợp thai phụ mang gen đột biến dị hợp, kết luận kỹ thuật Microsatellite DNA là kỹ thuật có độ tin cậy cao nên được sử dụng trong chẩn đoán trước sinh bệnh

DMD bên cạnh các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp [95]. Do gen dystrophin là một trong những gen có kích thước lớn nhất cơ thể với nhiều loại đột biến, việc sử dụng một kỹ thuật di truyền đơn lẻ sẽ không thể chẩn đoán hết được tất cả các trường hợp đột biến. Như vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi phối hợp các kỹ thuật Microsatellite DNA với các kỹ thuật PCR, MLPA, giải trình tự gen trong chẩn đoán trước sinh DMD cho kết quả tương đồng giống với các nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới. Như vậy qua các trường hợp chẩn đoán trước sinh, chúng tôi nhận thấy kỹ thuật Microsatellite DNA cho kết quả tương đồng với các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp và có khả năng ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh các trường hợp không tìm được đột biến ở thai phụ và người bệnh DMD. Hơn nữa, đây là một kỹ thuật đơn giản, giá thành thấp với thời gian trả kết quả nhanh, phát hiện được hiện tượng lẫn máu mẹ trong dịch ối gây sai lệch kết quả chẩn đoán [95],[122].

Nghiên cứu tiến hành chẩn đoán trước sinh cho 25 thai nam của 23 bà mẹ là người lành mang gen bệnh thuộc các phả hệ có tiền sử bệnh không rõ ràng. 25 trường hợp này được ứng dụng các kỹ thuật di truyền phân tử khác nhau để chẩn đoán trước sinh. Mỗi kỹ thuật di truyền phân tử có những ưu điểm và hạn chế riêng. Với kỹ thuật Multiplex PCR, mặc dù giá thành xét nghiệm thấp, thao tác kỹ thuật đơn giản và thời gian trả kết quả nhanh nhưng kỹ thuật này chỉ chẩn đoán được đột biến xóa đoạn ở 25 exon thuộc 2 vùng “hotspot” trên tổng số 79 exon của gen dystrophin. Kỹ thuật MLPA có thể khảo sát toàn bộ 79 exon của gen dystrophin và chẩn đoán các đột biến xóa đoạn và lặp đoạn, tuy nhiên giá thành xét nghiệm cao và không phát hiện được các đột biến điểm (chiếm 25 - 30% tổng số đột biến). Còn kỹ thuật giải trình tự gen có thể xác định toàn bộ các đột biến trên gen dystrophin nhưng giá thành xét nghiệm rất cao, thời gian trả kết quả lâu nên kỹ thuật này chỉ thường được

sử dụng chẩn đoán các trường hợp đột biến điểm. Chúng tôi tiến hành kỹ thuật Microsatellite cho các bà mẹ mang đột biến điểm, cho kết quả tương đồng với kỹ thuật giải trình tự gen.

4.2.2.2. Chẩn đoán trước sinh DMD cho các thai phụ không mang gen bệnh

Tỷ lệ tiếp tục sinh con mắc DMD ở các bà mẹ không mang gen bệnh đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu như theo tác giả Bakker và Van Essen AJ là 14-20%, hay theo tác giả Heldermeijer và cộng sự (2009) là 8,6% mà nguyên nhân có thể do tình trạng khảm [105],[124]. Theo tác giả Grimm và cộng sự (2012), kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen có khả năng chẩn đoán được 97% các trường hợp người lành mang gen bệnh, như vậy các thành viên nữ được xác định là không mang đột biến từ DNA mẫu máu thì vẫn có 3% khả năng là người lành mang gen bệnh [125]. Chính vì vậy mặc dù được xác định là không mang gen bệnh nhưng nếu đã có tiền sử sinh con mắc DMD thì các bà mẹ này vẫn cần được tư vấn di truyền. Việc chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cũng nên được cân nhắc trong các trường hợp này.

Trong 45 thai phụ được chọc hút nước ối chẩn đoán trước sinh, có 7 thai phụ được xác định không mang gen đột biến từ DNA mẫu máu. Tuy nhiên sau khi được tư vấn, các thai phụ này đều quyết định thực hiện chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi. Kết quả được mô tả trong bảng 3.13 với 4 thai nam bình thường, 2 thai nữ mang gen đột biến dị hợp tử và 1 thai nữ bình thường. 7 thai phụ đều có tiền sử sinh con trai bị DMD và các bà mẹ này đều đã được xác định là không mang gen đột biến bằng các kỹ thuật di truyền phân tử. Tuy nhiên qua phân tích kết quả chẩn đoán trước sinh, có 2 bà mẹ mang thai nữ có gen đột biến dị hợp tử nên khẳng định hai bà mẹ này phải là người lành mang gen bệnh (người mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc) do có con trai bị bệnh và mang thai nữ được chẩn đoán trước sinh có mang gen

đột biến. Từ kết quả có thể kết luận 2 bà mẹ này mang gen ở trạng thái khảm, khi được xác định mang gen bệnh qua phân tích phá hệ nhưng lại không xác định được đột biến gen từ DNA mẫu máu. Như vậy với những bà mẹ có con trai mắc DMD nhưng xét nghiệm máu không tìm thấy gen đột biến thì có thể được kết luận là không mang gen bệnh trong khi lại có mang gen bệnh nhưng ở trạng thái khảm. Nếu bỏ qua chẩn đoán trước sinh bệnh DMD ở những lần có thai sau thì nguy cơ có thể tiếp tục sinh con trai mắc bệnh. Kết quả càng khẳng định hiện tượng khảm mặc dù xảy ra với tỷ lệ thấp nhưng luôn cần được chú ý và tư vấn trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.

Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy việc xây dựng quy trình chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne cho các thành viên nữ trong phá hệ gia đình người bệnh DMD là rất cần thiết. Từ đó chúng ta có thể phát hiện một cách chính xác trong thời gian nhanh nhất các trường hợp thai nhi mắc bệnh để có tư vấn cụ thể cho từng gia đình thai phụ. Qua kết quả nghiên cứu, có thể thấy việc lựa chọn các kỹ thuật như MPLA, PCR hay giải trình tự gen trong chẩn đoán trước sinh sẽ tùy thuộc vào từng loại đột biến. Với đột biến xóa đoạn, có thể sử dụng kỹ thuật PCR hoặc MLPA. Với những trường hợp đột biến lặp đoạn sẽ sử dụng kỹ thuật MLPA và với những trường hợp đột biến điểm sẽ sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen trong chẩn đoán trước sinh. Kỹ thuật chẩn đoán gián tiếp Microsatellite DNA có thể sử dụng trong tất cả các trường hợp đột biến, đồng thời để phát hiện các trường hợp lẫn máu mẹ trong dịch ối gây sai lệch kết quả chẩn đoán. Đặc biệt trong các trường hợp không xác định được đột biến ở thai phụ và người bệnh, không thể ứng dụng các kỹ thuật chẩn đoán trực tiếp thì Microsatellite DNA sẽ là lựa chọn duy nhất để chẩn đoán trước sinh DMD.

Như vậy qua nghiên cứu chúng tôi nhận thấy Microsatellite DNA là kỹ thuật có thể ứng dụng trong mọi trường hợp chẩn đoán trước sinh khi thai phụ được xác định là người lành mang gen đột biến (xoá đoạn, lặp đoạn, đột biến điểm) và đặc biệt trong cả những trường hợp không xác định được đột biến ở thai phụ và người bệnh DMD.

KẾT LUẬN

1. Phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

Tiến hành xác định người lành mang gen bệnh cho 85 thành viên nữ trong 35 phả hệ gia đình DMD, kết quả có 52 người mang gen đột biến dị hợp tử (61%) và 33 người không mang gen đột biến (39%).

66/85 thành viên nữ được phân tích bằng kỹ thuật MLPA, xác định 40 người mang đột biến xoá đoạn và lặp đoạn (60,6%) và 26 người không mang gen đột biến (39,4%). Các đột biến đều tập trung ở 2 vùng “hot spot” của gen dystrophin là vùng 5’ tận và vùng trung tâm.

19/85 thành viên nữ được phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự gen, xác định 7 thành viên nữ không mang gen đột biến (36,8%) và 12 thành viên nữ mang gen đột biến điểm (63,2%), trong đó có 1 trường hợp mang gen đột biến dị hợp tử ở trạng thái khảm.

2. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite

Chọc ối chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 51 thai nhi có nguy cơ cao mắc DMD từ 45 bà mẹ. 100% các trường hợp đều lấy mẫu thành công.

Chẩn đoán trước sinh cho 51 thai nhi gồm 6 thai nữ và 45 thai nam trong đó phát hiện 3 thai nữ mang gen đột biến dị hợp tử chiếm tỷ lệ 5,9%; 3 thai nữ bình thường chiếm tỷ lệ 5,9%; 35 thai nam bình thường chiếm tỷ lệ 68,6%; 10 thai nam bị bệnh chiếm tỷ lệ 19,6%. 9/10 trường hợp thai nam mắc bệnh đã đình chỉ thai nghén, 01 trường hợp giữ thai.

Các trường hợp chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật Microsatellite đều cho kết quả tương đồng với kỹ thuật PCR, MLPA, giải trình tự gen.

Không phát hiện trường hợp thai có các bất thường NST kèm theo qua nuôi cấy tế bào ối làm NST đồ.

KHUYẾN NGHỊ

- 1 Cần xác định người lành mang gen bệnh cho tất cả các thành viên nữ trong gia đình người bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne để có kế hoạch quản lý, theo dõi và tư vấn di truyền.
- 2 Chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cần được tư vấn và thực hiện đối với tất cả các thai nhi của các thai phụ là người lành mang gen bệnh.
- 3 Các thành viên nữ không mang gen bệnh nhưng đã có tiền sử sinh con mắc DMD cần được tư vấn di truyền về hiện tượng khảm có thể xảy ra, từ đó cân nhắc về quyết định chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi khi mang thai.
- 4 Ứng dụng kỹ thuật Microsatellite DNA bên cạnh các kỹ thuật phát hiện đột biến trực tiếp trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD để đưa đến kết quả chẩn đoán tốt nhất.
- 5 Cần xây dựng quy trình chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho các thành viên nữ trong phả hệ gia đình có người bị DMD ở những cơ sở có đủ điều kiện thực hiện.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU
ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Linh Thuy Dinh, Duc Hinh Nguyen, Van Khanh Tran et al (2018) “Mosaicism in carrier of Duchenne muscular dystrophy mutation – implication for prenatal diagnosis”. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, Volume 57, Issue 6, p. 878-880.
2. Linh Thuy Dinh^{1*}, Van Khanh Tran^{1*}, Thanh Van Ta^{1,2}, Duc Hinh Nguyen² et all (2019) “Assessment of 6 STR loci for prenatal diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy”. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*
3. Đinh Thúy Linh, Trần Huy Thịnh, Trần Vân Khánh, Nguyễn Đức Hinh (2018). “Ứng dụng kỹ thuật Microsatellite DNA trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne” *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, số 3 năm 2018, tr 1.
4. Đinh Thúy Linh, Trần Vân Khánh, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Đức Hinh (2018). “Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne” *Tạp chí Sản phụ khoa*, tập 16, số 1_5, tr 31.
5. Đinh Thúy Linh, Trần Vân Khánh, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Đức Hinh (2018).” Ứng dụng kỹ thuật Microsatellite DNA trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne” *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 470, số chuyên đề tháng 9, tr 185.
6. Đinh Thúy Linh, Trần Vân Khánh, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Đức Hinh (2019). “Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne cho các thai phụ mang gen đột biến dị hợp tử bắt buộc bằng kỹ thuật Microsatellite” *Tạp chí Sản phụ khoa*, tập 16, số 03, tr 6-11.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Falzarano M.S., Scotton C., Passarelli C., et al. (2015). Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Mol Basel Switz*, **20(10)**, 18168–18184.
2. Matsuo M. (2002). Duchenne and Becker muscular dystrophy: from gene diagnosis to molecular therapy. *IUBMB Life*, **53(3)**, 147–152.
3. Juan-Mateu J., Gonzalez-Quereda L., Rodriguez M.J., et al. (2015). DMD Mutations in 576 Dystrophinopathy Families: A Step Forward in Genotype-Phenotype Correlations. *PloS One*, **10(8)**, e0135189.
4. Sakthivel Murugan S.M., Arthi C., Thilothammal N., et al. (2013). Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy using molecular methods. *Indian J Med Res*, **137(6)**, 1102–1110.
5. Helderma-van den Enden A.T.J.M., van den Bergen J.C., Breuning M.H., et al. (2011). Duchenne/Becker muscular dystrophy in the family: have potential carriers been tested at a molecular level. *Clin Genet*, **79(3)**, 236–242.
6. Birnkrant D.J., Bushby K., Bann C.M., et al. (2018). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol*, **17(3)**, 251–267.
7. Bushby K., Finkel R., Birnkrant D.J., et al. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*, **9(1)**, 77–93.
8. Mah J.K. (2016). Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropsychiatr Dis Treat*, **12**, 1795–1807.

9. Massalska D., Zimowski J.G., Roszkowski T., et al. (2017). Prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies: Underestimated problem of the secondary prevention of monogenetic disorders. *J Obstet Gynaecol Res*, **43**(7), 1111–1121.
10. Murugan S., Chandramohan A., and Lakshmi B.R. (2010). Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis. *Indian J Med Res*, **132**, 303–311.
11. Janssen B., Hartmann C., Scholz V., et al. (2005). MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics*, **6**(1), 29–35.
12. Okubo M., Minami N., Goto K., et al. (2016). Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. *J Hum Genet*, **61**(6), 483–489.
13. Giliberto F., Ferreiro V., Massot F., et al. (2011). Prenatal diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by short tandem repeat segregation analysis in Argentine families. *Muscle Nerve*, **43**(4), 510–517.
14. Harvey B. Sarnat (2010), *Nelson Textbook of Pediatrics “Muscular Dystrophy: Duchenne and Becker Muscular Dystrophy,”*.
15. Hashim R., Shaheen S., Ahmad S., et al. (2011). Comparison of serum creatine kinase estimation with short tandem repeats based linkage analysis in carriers and affected children of Duchenne muscular dystrophy. *J Ayub Med Coll Abbottabad JAMC*, **23**(1), 125–128.
16. Dubowitz V (1995). *Muscle Disorders in Childhood*. 2nd edition, Philadelphia, Pa: WB Saunders, pp 34-132.

17. Tạ Thành Văn *Bệnh loạn dưỡng cơ Duchene và Becker, Bệnh học phân tử*, Nhà xuất bản Y học.
18. Hutton E.M. and Thompson M.W. (1976). Carrier detection and genetic counselling in Duchenne muscular dystrophy: a follow-up study. *Can Med Assoc J*, **115(8)**, 749–752.
19. Manzur A.Y., Kuntzer T., Pike M., et al. (2008). Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*, (1), CD003725.
20. Rodino-Klapac L.R., Chicoine L.G., Kaspar B.K., et al. (2007). Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. *Arch Neurol*, **64(9)**, 1236–1241.
21. Matsuo M., Yagi M., and Takeshima Y. (2003). Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy with Oligo- nucleotides against an Exonic Splicing Enhancer Sequence. *Basic Appl Myol* **13(6)**, 281-285.
22. Bertoni C. (2008). Clinical approaches in the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD) using oligonucleotides. *Front Biosci J Virtual Libr*, **13**, 517–527.
23. Orrell R.W. (2012). Diagnosing and managing muscular dystrophy. *The Practitioner*, **256(1754)**, 21–24, 2–3.
24. Twee T Do (2018). Muscular Dystrophy: Background, Pathophysiology, Etiology.
25. Birnkrant D.J., Bushby K., Bann C.M., et al. (2018). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol*, **17(4)**, 347–361.
26. Yiu E.M. and Kornberg A.J. (2015). Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health*, **51(8)**, 759–764.

27. Escolar D.M., Buyse G., Henricson E., et al. (2005). CINRG randomized controlled trial of creatine and glutamine in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, **58**(1), 151–155.
28. Annexstad E.J., Lund-Petersen I., and Rasmussen M. (2014). Duchenne muscular dystrophy. *Tidsskr Den Nor Laegeforening Tidsskr Prakt Med Ny Raekke*, **134**(14), 1361–1364.
29. Nallamilli B.R.R., Ankala A., and Hegde M. (2014). Molecular diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Curr Protoc Hum Genet*, **83**, 9.25.1-29.
30. Gloss D., Moxley R.T., Ashwal S., et al. (2016). Practice guideline update summary: Corticosteroid treatment of Duchenne muscular dystrophy: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, **86**(5), 465–472.
31. McDonald C.M., Henricson E.K., Abresch R.T., et al. (2018). Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet Lond Engl*, **391**(10119), 451–461.
32. Brignol T.N., Fort P.E., Ventura D.F., et al. (2018). Cataract development associated with long-term glucocorticoid therapy in Duchenne muscular dystrophy patients. *J AAPOS Off Publ Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus*.
33. Birnkrant D.J., Panitch H.B., Benditt J.O., et al. (2007). American College of Chest Physicians consensus statement on the respiratory and related management of patients with Duchenne muscular dystrophy undergoing anesthesia or sedation. *Chest*, **132**(6), 1977–1986.
34. Ho P.P., Lahey L.J., Mourkioti F., et al. (2018). Engineered DNA plasmid reduces immunity to dystrophin while improving muscle force in a model of gene therapy of Duchenne dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **115**(39), E9182–E9191.

35. Foster K., Foster H., and Dickson J.G. (2006). Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther*, **13(24)**, 1677–1685.
36. Strehle E.-M. and Straub V. (2015). Recent advances in the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child*, **100(12)**, 1173–1177.
37. Birnkrant D.J., Bushby K., Bann C.M., et al. (2018). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *Lancet Neurol*, **17(5)**, 445–455.
38. Messina S. and Vita G.L. (2018). Clinical management of Duchenne muscular dystrophy: the state of the art. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*.
39. Muntoni F. (2010). The development of antisense oligonucleotide therapies for Duchenne muscular dystrophy: Report on a TREAT-NMD workshop hosted by the European Medicines Agency (EMA), on September 25th 2009. *Neuromuscul Disord*, **20(5)**, 355–362.
40. Takeshima Y., Yagi M., Wada H., et al. (2005). Intraperitoneal administration of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide against splicing enhancer sequence induced exon skipping in dystrophin mRNA expressed in mdx skeletal muscle. *Brain Dev*, **27(7)**, 488–493.
41. Malik V., Rodino-Klapac L.R., Viollet L., et al. (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, **67(6)**, 771–780.
42. Cirak S., Arechavala-Gomez V., Guglieri M., et al. (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet Lond Engl*, **378(9791)**, 595–605.

43. Pichavant C., Aartsma-Rus A., Clemens P.R., et al. (2011). Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*, **19(5)**, 830–840.
44. Aartsma-Rus A., Fokkema I., Verschuuren J., et al. (2009). Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat*, **30(3)**, 293–299.
45. Barthélémy F. and Wein N. (2018). Personalized gene and cell therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD*.
46. Hamzi K., Itto A.B., Itri M., et al. (2014). Prenatal diagnosis of BMD in Morocco: evolution and limits. *J Mol Neurosci MN*, **52(4)**, 459–460.
47. Bianco B., Christofolini D.M., Conceição G.S., et al. (2017). Preimplantation genetic diagnosis associated to Duchenne muscular dystrophy. *Einstein Sao Paulo Braz*, **15(4)**, 489–491.
48. Thornhill A.R. and Snow K. (2002). Molecular Diagnostics in Preimplantation Genetic Diagnosis. *J Mol Diagn JMD*, **4(1)**, 11–29.
49. Abbs S., Tuffery-Giraud S., Bakker E., et al. (2010). Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord NMD*, **20(6)**, 422–427.
50. Satre V., Monnier N., Devillard F., et al. (2004). Prenatal diagnosis of DMD in a female foetus affected by Turner syndrome. *Prenat Diagn*, **24(11)**, 913–917.
51. Dooley J., Gordon K.E., Dodds L., et al. (2010). Duchenne muscular dystrophy: a 30-year population-based incidence study. *Clin Pediatr (Phila)*, **49(2)**, 177–179.
52. Giliberto F., Radic C.P., Luce L., et al. (2014). Symptomatic female carriers of Duchenne muscular dystrophy (DMD): genetic and clinical characterization. *J Neurol Sci*, **336(1–2)**, 36–41.

53. Kesari A., Pirra L.N., Bremadesam L., et al. (2008). Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule. *Hum Mutat*, **29(5)**, 728–737.
54. Tuffery-Giraud S., Bérourd C., Leturcq F., et al. (2009). Genotype–phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD–DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat*, **30(6)**, 934–945.
55. Magri F., Govoni A., D’Angelo M.G., et al. (2011). Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol*, **258(9)**, 1610–1623.
56. Flanigan K.M., Dunn D.M., von Niederhausern A., et al. (2009). Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat*, **30(12)**, 1657–1666.
57. Vieitez I., Gallano P., González-Quereda L., et al. (2017). Mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in Spain: Study of 284 cases. *Neurol Barc Spain*, **32(6)**, 377–385.
58. Lai P.-S., Takeshima Y., Adachi K., et al. (2002). Comparative study on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations. *J Hum Genet*, **47(10)**, 552–555.
59. Basak J., Dasgupta U.B., Banerjee T.K., et al. (2006). Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in eastern India. *Neurol India*, **54(3)**, 310–311.
60. Nguyễn Thị Hoàn, Nguyễn Thanh Liêm, Vũ Chí Dũng, Nguyễn Thu Nhạn, Đặng Diễm Hồng, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Trần Văn Khánh, Masafumi Matsuo (2006). Đột biến mất đoạn gen dystrophin của các bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne/ Becker Việt Nam. *Hội Nhi Khoa Việt Nam Đại Hội Hội Nhi Khoa Việt Nam Lần Thứ XVIII 452006*, tr 202-8.

61. Dastur R.S., Gaitonde P.S., Khadilkar S.V., et al. (2008). Becker muscular dystrophy in Indian patients: analysis of dystrophin gene deletion patterns. *Neurol India*, **56(3)**, 374–378.
62. White S.J., Aartsma-Rus A., Flanigan K.M., et al. (2006). Duplications in the DMD gene. *Hum Mutat*, **27(9)**, 938–945.
63. Hwa H.-L., Chang Y.-Y., Huang C.-H., et al. (2008). Small mutations of the DMD gene in Taiwanese families. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*, **107(6)**, 463–469.
64. Steele M.W. and Breg W.R. (1966). Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet Lond Engl*, **1(7434)**, 383–385.
65. Cunningham, Leveno, Bloom, Hauth, Rouse, Spong (2010). William's Obstetrics. 23rd edition, McGraw Hill Companies, chap 12, pp 266–285.
66. Alfirevic Z., Navaratnam K., and Mujezinovic F. (2017). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*, **9**, CD003252.
67. Cruz-Lemini M., Parra-Saavedra M., Borobio V., et al. (2014). How to perform an amniocentesis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, **44(6)**, 727–731.
68. Ghi T., Sotiriadis A., Calda P., et al. (2016). ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, **48(2)**, 256–268.
69. Farrell S.A., Summers A.M., Dallaire L., et al. (1999). Club foot, an adverse outcome of early amniocentesis: disruption or deformation? CEMAT. Canadian Early and Mid-Trimester Amniocentesis Trial. *J Med Genet*, **36(11)**, 843–846.
70. Akolekar R., Beta J., Picciarelli G., et al. (2015). Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*, **45(1)**, 16–26.

71. Enzensberger C., Pulvermacher C., Degenhardt J., et al. (2012). Fetal loss rate and associated risk factors after amniocentesis, chorionic villus sampling and fetal blood sampling. *Ultraschall Med Stuttg Ger 1980*, **33(7)**, E75–E79.
72. Alfirevic Z., Sundberg K., and Brigham S. (2003). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*, **(3)**, CD003252.
73. Niederstrasser S.L., Hammer K., Möllers M., et al. (2017). Fetal loss following invasive prenatal testing: a comparison of transabdominal chorionic villus sampling, transcervical chorionic villus sampling and amniocentesis. *J Perinat Med*, **45(2)**, 193–198.
74. Keith Edmonds (2007). Dew-Hurst's textbook of obstetrics and gynaecology. Blackwell publishing, chap 16, pp 125–130.
75. Itto A.B., Hamzi K., Bellayou H., et al. (2013). Evolution of molecular diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Neurosci MN*, **50(2)**, 314–316.
76. Prior T.W. and Bridgeman S.J. (2005). Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn JMD*, **7(3)**, 317–326.
77. Ta M.-H., Tran T.H., Do N.-H., et al. (2013). Rapid method for targeted prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Vietnam. *Taiwan J Obstet Gynecol*, **52(4)**, 534–539.
78. Trần Văn Khánh, Matsafumi Matsuo và CS (2004). Chẩn đoán 85 bệnh nhân Việt Nam mắc bệnh nhược cơ Duchenne/ Becker bằng phương pháp PCR. *Tạp Chí Học Việt Nam*, Tr 33-38.
79. Nguyễn Thị Trang và cộng sự (2006). Phát hiện đột biến mất đoạn exon 46 và 51 gen dystrophin ở một số bệnh nhân DMD bằng kỹ thuật PCR. *Tạp Chí Nghiên Cứu Học*, **(45(5))**, tr. 18-23.

80. Beggs A.H., Koenig M., Boyce F.M., et al. (1990). Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet*, **86(1)**, 45–48.
81. Ligon A.H., Kashork C.D., Richards C.S., et al. (2000). Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. *Eur J Hum Genet EJHG*, **8(4)**, 293–298.
82. Gatta V., Scarciolla O., Gaspari A.R., et al. (2005). Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet*, **117(1)**, 92–98.
83. Lai K.K.S., Lo I.F.M., Tong T.M.F., et al. (2006). Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Clin Biochem*, **39(4)**, 367–372.
84. Ji X., Zhang J., Xu Y., et al. (2015). MLPA Application in Clinical Diagnosis of DMD/BMD in Shanghai. *J Clin Lab Anal*, **29(5)**, 405–411.
85. Li Q., Li S., Zhang H., et al. (2013). Clinical value of MLPA in the prenatal gene diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, **48(3)**, 161–164.
86. Hwa H.-L., Chang Y.-Y., Chen C.-H., et al. (2007). Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Identification of Deletions and Duplications of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene in Taiwanese Subjects. *J Formos Med Assoc*, **106(5)**, 339–346.
87. Lalic T., Vossen R.H.A.M., Coffa J., et al. (2005). Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet EJHG*, **13(11)**, 1231–1234.

88. Nguyễn Khắc Hân Hoan, Phạm Ngọc Khôi, Nguyễn Thị Phương Mai, Ngô Diễm Ngọc (2009). Phát hiện đột biến mất đoạn gen gây bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne và Becker bằng kỹ thuật MLPA. *Học TP Hồ Chí Minh*, **tập 13, phụ bản 2**, tr. 169-175.
89. Zimowski J.G., Massalska D., Holding M., et al. (2014). MLPA based detection of mutations in the dystrophin gene of 180 Polish families with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neurol Neurochir Pol*, **48(6)**, 416–422.
90. Carsana A., Frisso G., Tremolaterra M.R., et al. (2007). A Larger Spectrum of Intragenic Short Tandem Repeats Improves Linkage Analysis and Localization of Intragenic Recombination Detection in the Dystrophin Gene: An Analysis of 93 Families from Southern Italy. *J Mol Diagn*, **9(1)**, 64–69.
91. Malayeri F.A., Panjehpour M., Movahedian A., et al. (2011). Detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy carriers in a group of Iranian families by linkage analysis. *Acta Med Iran*, **49(3)**, 142–148.
92. Hearne C.M., Ghosh S., and Todd J.A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet TIG*, **8(8)**, 288–294.
93. Humberto Nicolini, Faustina Lalatta, Federica Nataci, Cristina Curcio, The-Hung Bui (2004). The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum Reprod Update*, **vol 10(no6)**, 541–548.
94. Shen X., Xu Y., Zhong Y., et al. (2013). Combination of multiple displacement amplification with short tandem repeat polymorphism in preimplantation genetic diagnosis. *Beijing Da Xue Xue Bao*, **45(6)**, 852–858.
95. Wang H., Xu Y., Liu X., et al. (2017). Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in 131 Chinese families with dystrophinopathy. *Prenat Diagn*, **37(4)**, 356–364.

96. Ye Y., Yu P., Yong J., et al. (2014). Preimplantational genetic diagnosis and mutation detection in a family with duplication mutation of DMD gene. *Gynecol Obstet Invest*, **78(4)**, 272–278.
97. Sullivan-Pyke C. and Dokras A. (2018). Preimplantation Genetic Screening and Preimplantation Genetic Diagnosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, **45(1)**, 113–125.
98. Li H., Ding J., Wang W., et al. (2009). Combining approach with multiplex PCR and MLPA to detect deletion and duplication in DMD patients, carriers, and prenatal diagnosis. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet*, **26(3)**, 318–322.
99. Trần Văn Khánh, Trần Quốc Đạt, Phạm Lê Anh Tuấn, Nguyễn Quý Hoài, Minh N.T., Nguyễn Thị Liên Hương, et al. (2016). Chẩn đoán tiền lâm tổ bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA. **11(03)**, 1–9.
100. Zhang Y., Liu X., He R., et al. (2014). Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by MLPA. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet*, **31(3)**, 338–343.
101. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA).
102. Alcántara Ortigoza M.A., Aguinaga Ríos M., González del Angel A., et al. (2009). [Prenatal molecular diagnosis of a DMD carrier female fetus by chorionic villus sampling and linkage analysis]. *Ginecol Obstet Mex*, **77(2)**, 103–109.

103. Janssen B., Hartmann C., Scholz V., et al. (2005). MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics*, **6(1)**, 29–35.
104. Schouten J.P., McElgunn C.J., Waaijer R., et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, **30(12)**, e57.
105. Bakker E., Veenema H., Den Dunnen J.T., et al. (1989). Germinal mosaicism increases the recurrence risk for “new” Duchenne muscular dystrophy mutations. *J Med Genet*, **26(9)**, 553–559.
106. Bermúdez-López C., García-de Teresa B., González-del Angel A., et al. (2014). Germinal mosaicism in a sample of families with Duchenne/Becker muscular dystrophy with partial deletions in the DMD gene. *Genet Test Mol Biomark*, **18(2)**, 93–97.
107. Taylor T.H., Gitlin S.A., Patrick J.L., et al. (2014). The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum Reprod Update*, **20(4)**, 571–581.
108. Ferreiro V., Szijan I., and Giliberto F. (2004). Detection of Germline Mosaicism in Two Duchenne Muscular Dystrophy Families Using Polymorphic Dinucleotide (CA)_n Repeat Loci Within the Dystrophin Gene. *Mol Diagn*, **7**.
109. Van Essen A.J., Abbs S., Baiget M., et al. (1992). Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum Genet*, **88(3)**, 249–257.
110. Sibert J.R., Harper P.S., Thompson R.J., et al. (1979). Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy. Evidence from a study of obligatory carriers and mothers of isolated cases. *Arch Dis Child*, **54(7)**, 534–537.

111. Wang X., Wang Z., Yan M., et al. (2008). Similarity of DMD gene deletion and duplication in the Chinese patients compared to global populations. *Behav Brain Funct BBF*, **4**, 20.
112. Edelmann J. and Szibor R. (2001). DXS101: a highly polymorphic X-linked STR. *Int J Legal Med*, **114(4–5)**, 301–304.
113. Athanasiadis A., Petrakis P., and Mikos T. (2017). Comparison of perinatal outcome after 2nd trimester amniocentesis using 22G and 20G needle. *Hippokratia*, **21(1)**, 60.
114. Köse S.A., Akkurt M.Ö., Yavuz A., et al. (2016). Conventional 22- and 20-gauge needle for second trimester amniocentesis: A comparison of short term outcomes. *Turk J Obstet Gynecol*, **13(1)**, 27–30.
115. Tchirikov M., Gatopoulos G., Steetskamp J., et al. (2011). A 29-gauge atraumatic needle for amniocentesis. *J Perinat Med*, **39(4)**, 431–435.
116. Singh R., Vijaya null, and Kabra M. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of exonal deletions in patients of duchenne muscular dystrophy. *Indian J Clin Biochem IJCB*, **21(1)**, 147–151.
117. Den Dunnen J.T. and Beggs A.H. (2006). Multiplex PCR for identifying DMD gene deletions. *Curr Protoc Hum Genet*, **Chapter 9**, Unit 9.3.
118. Carlson L.M. and Vora N.L. (2017). Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet Gynecol Clin North Am*, **44(2)**, 245–256.
119. Li T., Wu D., Hou Q., et al. (2013). Efficiency of multiplex ligation-dependent probe amplification combined with short tandem repeat linkage analysis for the prenatal diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet*, **30(1)**, 40–44.

120. Zhang T., Liu S., Wei T., et al. (2013). Development of a comprehensive real-time PCR assay for dystrophin gene analysis and prenatal diagnosis of Chinese families. *Clin Chim Acta*, **424**, 33–38.
121. Wang Q., Jin C.-L., Lin C.-K., et al. (2009). Prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Yi Chuan Hered*, **31(6)**, 600–604.
122. Delgado-Luengo W.N., Borjas-Fuentes L., Zabala-Fernández W., et al. (2002). Carrier detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy by analysis of STRs loci linked to the gene of dystrophin in Venezuelan families. *Invest Clin*, **43(4)**, 239–254.
123. Hwa H.-L., Chang Y.-Y., Chen C.-H., et al. (2007). Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of deletions and duplications of the Duchenne muscular dystrophy gene in Taiwanese subjects. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*, **106(5)**, 339–346.
124. Helderma-van den Enden A., de Jong R., den Dunnen J., et al. (2009). Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin Genet*, **75(5)**, 465–472.
125. GRIMM T., KRESS W., MENG G., et al. (2012). Risk assessment and genetic counseling in families with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol*, **31(3)**, 179–183.

PHIẾU THU THẬP SỐ LIỆU
(Xác định người lành mang gen bệnh)

Mã số

Họ và tên:	
Năm sinh:	SĐT:
Địa chỉ:	
Đột biến của bệnh nhân DMD:	
Phương pháp xét nghiệm:	
Phả hệ	
Dị hợp tử bắt buộc: Có Không	
Các thành viên được xác định người lành mang gen bệnh	
Kết quả xác định người mang gen	

PHIẾU THU THẬP SỐ LIỆU
(*Chẩn đoán trước sinh bệnh DMD*)

Mã số

Họ và tên thai phụ:	
Năm sinh:	SĐT:
Địa chỉ:	
DKS:	Ngày chọc ối:
Độ biến của thai phụ:	
Độ biến của bệnh nhân DMD:	
TS DMD của gia đình:	Giới tính thai:
Kết quả chọc ối: Tai biến sau thủ thuật	
Phương pháp xét nghiệm:	
Phả hệ	

BẢN CUNG CẤP THÔNG TIN CHO ĐỐI TƯỢNG THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tên nghiên cứu: *“Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatelite”.*

Mã số đối tượng:

Tài liệu này được thông báo đầy đủ đến các đối tượng tham gia nghiên cứu, không có trang hay phần nào trong tài liệu này được bỏ qua. Những nội dung trong tài liệu này được giải thích rõ bằng miệng với các đối tượng tham gia nghiên cứu.

1. Các vấn đề liên quan đến nghiên cứu

– Mục đích của nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành với hai mục tiêu:

- Phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen.
- Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne trên những người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA.

– Phương pháp tiến hành :

- *Phát hiện người lành mang gen bệnh trên các thành viên nữ trong gia đình người bệnh*
 - Mỗi người trong nhóm nghiên cứu 1 được lấy máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA (1,5 mg/mL).
 - Tách chiết DNA từ mẫu máu
 - Xác định đột biến gen dystrophin bằng kỹ thuật MLPA
 - Tư vấn di truyền đối với các thành viên nữ mang gen
- Các thai phụ là người lành mang gen khi mang thai sẽ được tư vấn chọc hút nước ối khi thai 17 tuần để làm xét nghiệm chẩn

đoán trước sinh bệnh lý loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite.

2. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng vào nghiên cứu

- Mục tiêu 1: các thành viên nữ (gồm mẹ, chị em gái và các dì) trong các gia đình bệnh nhân đã được phát hiện có đột biến gen dystrophin.
- Mục tiêu 2: các thai phụ mang thai từ 17 tuần – 22 tuần, được xác định có mang gen dystrophin bị đột biến và có nguyện vọng được chẩn đoán trước sinh.

3. Số người tham gia vào nghiên cứu : Dự kiến 100 người

4. Những khoản nào được chi trả trong nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện không bao gồm bất kì chi trả nào cho người bệnh

5. Cơ quản lý có thể kiểm tra hồ sơ của đối tượng: Trung tâm gen – protein, Trường Đại học Y Hà Nội

6. Người để liên hệ khi có câu hỏi về nghiên cứu và quyền của đối tượng nghiên cứu: Bác sỹ Đinh Thuý Linh– Trung tâm Sàng lọc, chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

Bệnh nhân hoặc người nhà bệnh nhân được giải thích rõ rằng sự tham gia là tình nguyện. Việc chấp thuận hay không chấp thuận tham gia vào nghiên cứu hoàn toàn không ảnh hưởng đến bệnh nhân/ người nhà bệnh nhân và đối tượng tham gia nghiên cứu có thể dừng không tiếp tục tham gia vào bất kỳ thời điểm nào của nghiên cứu. Các thông tin về bệnh nhân, người nhà bệnh nhân và kết quả chẩn đoán hoàn toàn được giữ bí mật và chỉ dùng với mục đích nghiên cứu thuộc phạm vi đề tài.

Hà Nội, ngày tháng năm

Họ tên và chữ ký của Nhà nghiên cứu

PHIẾU TÌNH NGUYỆN THAM GIA NGHIÊN CỨU

(Áp dụng cho đối tượng tình nguyện tham gia nghiên cứu không cần
bí mật vô danh)

Họ và tên đối tượng:.....

Tuổi :

Địa chỉ :

Sau khi được bác sỹ thông báo và giải thích cụ thể về ý nghĩa, mục đích, qui trình nghiên cứu, quyền lợi và nghĩa vụ của người tham gia nghiên cứu, quyền được tự do rút khỏi nghiên cứu, được đảm bảo bí mật cá nhân trong quá trình nghiên cứu và kết quả nghiên cứu của đối tượng tham gia vào nghiên cứu:

***“Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật
Microsatelite”***

Tôi (hoặc người đại diện trong gia đình) đồng ý tự nguyện tham gia vào nghiên cứu này. Tôi xin tuân thủ các quy định của nghiên cứu

Hà Nội, ngày tháng năm 20..

Họ tên của người làm chứng

(Ký và ghi rõ họ tên)

Họ tên của đối tượng

(Ký và ghi rõ họ tên)

Phụ lục 1

QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT DNA TỪ MÁU NGOẠI VI

- Máu có chống đông EDTA cần được tách trong vòng 24 giờ.
- Cho 0,5 ml máu tươi toàn phần đã chống đông vào ống Eppendorf 1,5 ml, sau đó thêm vào 0,5 ml dung dịch lysis buffer rồi để trên đá 10 phút.
- Ly tâm 8000 v/p trong 10 phút ở 4°C, bỏ dịch, thu cặn. Lặp lại quá trình này 4 lần.
- Cho 0,5 ml dung dịch K vào, ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, bỏ dịch, thu cặn.
- Cho 0,5 ml lysis buffer, 12,5 µl SDS 10%, 10 µl Protease K, ủ ở 56°C từ 2-3 giờ. Cho 0,5 ml dung dịch Phenol, Chloroform: Isoamyl, ly tâm 10000 v/p trong 10 phút ở 4°C, hỗn hợp được chia làm 3 phần: lớp dung dịch phía trên có chứa DNA, lớp ở giữa là cặn tế bào, lớp dưới cùng là dịch chiết.
- Hút lấy phần dịch chứa DNA phía trên cùng và tiến hành lặp lại bước trên một lần nữa, đảm bảo không còn tạp chất trong.
- Cho 0,5 ml chloroform: Isoamyl, ly tâm mẫu ở 10000 v/p trong 10 phút ở 4°C. Hút lấy phần dịch trên cùng, lặp lại 1 lần nữa.
- Tủa DNA bằng 1ml cồn tuyệt đối, cho thêm 50 µl Na acetat, để lạnh qua đêm ở -20°C. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, đổ dịch trên và thu tủa.
- Rửa tủa bằng cồn 70°. Tủa DNA được hoà tan bằng 50 ml nước tinh khiết hoặc TE. Phân tử DNA thu được sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm.

Phụ lục 2

QUY TRÌNH KỸ THUẬT MLPA

Biến tính DNA

- 50-200ng DNA của mẫu khảo sát pha loãng với 5 μ l TE.
- Biến tính DNA trong 5 phút ở 98°C.
- Làm mát hỗn hợp ở nhiệt độ 25°C.

Phản ứng lai

- Cho hỗn hợp chứa probe vào ống DNA.
- Ủ hỗn hợp ở 95°C trong 1 phút, sau đó ủ ở nhiệt độ 60°C trong 16 - 20 giờ.
Hai đoạn lai của 2 phân tử oligonucleotid sẽ gắn với DNA đích đặc hiệu ở vị trí sát nhau.

Phản ứng nối

- Cho hỗn hợp ligase-65 vào, ủ ở 54°C trong 15 phút để phản ứng nối xảy ra.
- Tăng nhiệt độ lên 98°C trong 5 phút để bất hoạt phản ứng nối.

Phản ứng khuếch đại gen PCR

- Thêm 10ml polymerase vào mỗi ống ở nhiệt độ phòng.
- Phản ứng PCR xảy ra ở điều kiện luân nhiệt: 95°C x 30", 60°C x 30", 72°C x 60", lặp lại 35 chu kỳ, sau đó ủ ở nhiệt độ 72°C trong 20 phút.
- Sau phản ứng PCR, mỗi probe sẽ được khuếch đại thành nhiều bản sao, sau đó được phân tách bằng phương pháp điện di mao quản.

Phụ lục 3

QUY TRÌNH KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN

Sản phẩm PCR sau khi được khuếch đại bằng những cặp mồi đặc hiệu sẽ được làm nguyên liệu cho kỹ thuật giải trình tự gen.

Phản ứng PCR giải trình tự phát hiện đột biến của gen dystrophin:

Master mix cho phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Nước cất	13
2	GA 10x buffer/EDTA	3,0
3	Big Dye V3.1	2,0
4	Mồi đơn (5pmol/µl)	1,0
5	Sản phẩm PCR cDNA (DNA) gen dystrophin đã được tinh sạch qua gel	1,0
	Tổng thể tích	20

+ Phản ứng PCR giải trình tự:

Chu trình nhiệt của phản ứng:

96°C: 1 phút

96°C: 10 giây

50°C: 5 giây x 25 chu kỳ

60°C: 4 phút

Giữ ở 4 - 15°C



+ Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự: sản phẩm PCR giải trình tự gen dystrophin được tinh sạch bằng cồn ethanol

• Thêm vào ống hỗn hợp phản ứng:

60 µl cồn tuyệt đối lạnh (giữ trong tủ -30°C)

5 µl EDTA 0,125M pH8

- Trộn đều rồi để ở nhiệt độ phòng 15 phút.
- Ly tâm 15000 vòng/phút x 15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Hút bỏ dung dịch giữ lại tủa DNA ở đáy ống
- Thêm 200 μ l Ethanol 70%, để lạnh (-30°C).
- Ly tâm 15000 vòng/phút x 10 phút ở nhiệt độ phòng, hút bỏ dung dịch, giữ lại tủa ở đáy ống.
- Để khô hoàn toàn.
- Thêm 20 μ l Hi-Di.
- Trộn đều

+ Điện di sản phẩm PCR giải trình tự gen dystrophin bằng hệ thống giải trình tự ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Trong trường hợp chưa điện di ngay sau khi thêm 20 μ l Hi-Di thì bọc kín mẫu bằng giấy bạc rồi bảo quản ở -20 đến -30°C, tránh ánh sáng. Khi điện di thực hiện các bước sau:

- Trộn đều rồi ủ ở 95°C trong 2 phút (trong block nhiệt)
- Làm lạnh tức thời trên nước đá.
- Trộn đều hỗn hợp
- Chuyển vào máy chạy theo trình tự

+ Phân tích kết quả:

So sánh kết quả giải trình tự các exon của gen dystrophin với trình tự gen chuẩn tương ứng của ngân hàng gen (GeneBank). Tại Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein sử dụng phần mềm CLC Main Workbench để phân tích kết quả giải trình tự gen.