

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS) là một trong những bệnh nội tiết di truyền. Trong đó, thể thiếu enzym 21-hydroxylase (21-OH) hay gặp với tỷ lệ 90%- 95%, bệnh biểu hiện với hai thể lâm sàng mất muối và nam hóa đơn thuần. Bệnh điều trị được bằng liệu pháp thay thế hormon suốt đời.

Bệnh mang đặc tính của di truyền đơn gen lặn, gen *CYP21A2* nằm trên nhiễm sắc thể thường, tuân theo quy luật của Mendel nên trong phả hệ của người bị bệnh có người mang gen dị hợp tử, có kiểu hình bình thường nhưng nguy cơ truyền gen bệnh cho con. Nếu hai người mang gen dị hợp kết hôn với nhau, khả năng 25% con sinh ra sẽ bị bệnh và 50% con là dị hợp tử. Trong quần thể, tỷ lệ mắc bệnh là 1/14.000, nhưng tỷ lệ người mang gen lại rất cao 1/60-1/83. Do vậy, nguy hiểm của bệnh di truyền đơn gen lặn là bệnh sẽ được di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác, nếu chúng ta không có biện pháp can thiệp phòng bệnh tích cực thì tỷ lệ bệnh trong quần thể sẽ tăng cao. Hiện nay, phương pháp phòng bệnh có hiệu quả nhất là tư vấn di truyền. Việc phát hiện người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh, giúp chẩn đoán bệnh sớm cho thai nhi. Nếu thai nhi bị bệnh là con gái, sẽ tiến hành điều trị sớm từ những tuần đầu của thai và tiếp tục điều trị ngay sau sinh, để làm giảm tình trạng nam hóa, có thể tránh được phẫu thuật chỉnh hình sau sinh cho trẻ. Nếu thai nhi bị bệnh là con trai tiến hành điều trị ngay sau sinh, để tránh cơn suy thượng thận cấp và đem lại sự phát triển bình thường về sau cho trẻ. Có nhiều công trình nghiên cứu về bệnh TSTTBS đã được công bố nhưng các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào phân tích các đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm, đặc điểm di truyền, điều trị, đột biến gen *CYP21A2*, còn nghiên cứu về người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh TSTTBS còn rất ít.

Xuất phát từ ý nghĩa thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: “*Phát hiện người lành mang gen đột biến CYP21A2 và chẩn đoán trước sinh bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzym 21-hydroxylase*”

2. Mục tiêu nghiên cứu

- 1/ Phát hiện người lành mang gen bệnh cho các thành viên gia đình bệnh nhân bị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzym 21-hydroxylase.
- 2/ Chẩn đoán trước sinh cho một số thai phụ mang gen đột biến gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzym 21-hydroxylase và tư vấn di truyền cho gia đình bệnh nhân.

3. Ý nghĩa thực tiễn và những đóng góp mới của đề tài

Nghiên cứu phát hiện đột biến gen ở các thành viên gia đình của người bệnh để tìm người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh cho những thai phụ là người mang gen để phát hiện bệnh sớm. Đây là một đóng góp mới trong lĩnh vực bệnh lý nội tiết di truyền ở nước ta, đồng thời nghiên cứu vừa có tính khoa học và vừa có tính nhân văn.

3.1. Phát hiện người lành mang gen đột biến sẽ giúp quản lý và tư vấn chẩn đoán trước sinh cho các thai phụ có nguy cơ cao. Tìm thấy gen đột biến *CYP21A2* ở bệnh nhân là cơ sở cần thiết để xét nghiệm tìm gen đột biến cho các thành viên của gia đình và dòng họ. Nhờ đó, bác sĩ có thể tư vấn di truyền tránh hai dị hợp tử kết hôn với nhau hoặc kết hôn cận huyết thống làm tăng tỷ lệ bị bệnh.

So với kết quả các nghiên cứu trước đây được thực hiện tại Bệnh viện Nhi Trung ương thì nghiên cứu này đã phát hiện thêm 7 đột biến điểm mới ở các thành viên gia đình bệnh nhân. Đây có thể xem là một đóng góp mới của tác giả.

3.2. Luận án đầu tiên nghiên cứu về chẩn đoán trước sinh của bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH. Chẩn đoán trước sinh giúp chẩn đoán bệnh sớm cho các thai nhi gái bị bệnh, từ đây có kế hoạch điều trị trước sinh tránh bất thường bộ phận sinh dục sớm ngay từ những tuần đầu của thời kỳ mang thai và nếu là thai nhi trai bị bệnh sẽ điều trị ngay sau sinh. Như vậy, bệnh được phát hiện sớm, tránh được các cấp cứu do cơn suy thượng thận cấp, dẫn đến tử vong cho trẻ ngay sau sinh và tránh được các bất thường bộ phận sinh dục nữ sau này.

Chẩn đoán trước sinh bằng chọc ối cho 12 thai phụ mang gen dị hợp tử; cho kết quả: 2 thai nhi bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH với kiểu đột biến p.R356W và 8 thai nhi là dị hợp tử với dạng đột biến xóa đoạn, p.I172N, Q318X & R356W và 3 thai nhi không mang gen gây bệnh. Số lượng thai nhi được chẩn đoán chưa nhiều, nhưng đây là kết quả của ứng dụng kỹ thuật mới, hiện đại của di truyền phân tử; giải trình tự gen và MLPA trong chẩn đoán trước sinh.

4. Cấu trúc của luận án

Luận án bao gồm 119 trang, bao gồm 4 chương: Chương 1: Tổng quan vấn đề nghiên cứu, 32 trang; Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu, 13 trang; Chương 3: Kết quả nghiên cứu, 32 trang; Chương 4: Bàn luận, 17 trang. Kết luận: 1 trang; Kiến nghị: 1 trang. Luận án có: 12 bảng, 3 biểu đồ, 46 hình ảnh, 90 tài liệu tham khảo (9 tiếng Việt, 81 tiếng Anh).

Chương 1 TỔNG QUAN

1.1. Đặc điểm bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH

1.1.1 Định nghĩa: TSTTBS thể thiếu 21-OH là bệnh gây nên do đột biến gen *CYP21A2* trên cánh ngắn của NST số 6(6p21) là gen mã hóa để tổng hợp enzym 21-OH. Khi gen *CYP21A2* bị đột biến gây giảm hoặc không tổng hợp được enzym 21-OH tham gia vào quá trình tổng hợp hormon vỏ thượng thận, dẫn đến không tổng hợp được aldosteron và cortisol làm tăng tổng hợp testosterone. Biểu hiện lâm sàng của bệnh gồm các triệu chứng của suy thượng thận cấp, rối loạn điện giải: giảm Na^+ , tăng K^+ , nam hóa ở trẻ gái, giả dậy thì sớm ở trẻ trai.

1.1.2. Cơ chế bệnh sinh

Quá trình chuyển hóa từ cholesterol tạo thành aldosteron, cortisol và testosterone, trong đó enzym 21-OH xúc tác cho sự chuyển hóa progesteron thành deoxycorticosteron và 17-hydroxyprogesteron thành 11desoxycortisol và cuối cùng là tổng hợp cortisol và aldosteron. Khi đột biến gen *CYP21A2* gây thiếu hụt enzym 21-OH sẽ dẫn đến giảm nồng độ của hai hormon này trong cơ thể. Đồng thời làm tăng tiền chất progesteron và 17-OHP dẫn đến tăng tổng hợp androgen. Ở trẻ gái do tăng testosterone ức chế sự phát triển của buồng trứng và gây nam hóa cơ quan sinh dục như: phì đại âm vật biểu hiện ngay sau khi sinh. Ở trẻ trai gây dậy thì sớm giả. Bệnh gây tăng phát triển cơ thể ở cả hai giới.

1.1.3 Vị trí, cấu trúc, chức năng gen *CYP21A2*

Gen *CYP21A2* nằm trên cánh ngắn của NST số 6 (6p21.3), nằm trong phức hợp MHC (major histocompatibility complex) của hệ thống HLA. Mỗi gen *CYP21A2* và *CYP21A1P* bao gồm 10 exon và có kích thước khoảng 30kb. Trình tự nucleotide của hai gen này tương đồng 98% trong các exon và

khoảng gần 96% trong các intron, do vậy trong quá trình phân bào giảm nhiễm, do sự thay đổi của trình tự nucleotid hoặc do sự đột biến mất đoạn giữa hai alen hoặc nhân đoạn, chuyển đoạn một cách hoàn toàn dẫn đến thay đổi cấu trúc của gen, gen *CYP21A2* bị thay thế bằng một đoạn của gen *CYP21A1P*. Chức năng của gen *CYP21A2* là mã hóa để tổng hợp enzym 21-OH, khi bị đột biến làm thay đổi cấu trúc của gen *CYP21A2*, nên không tổng hợp được enzym 21-OH, hoặc enzym 21-OH được tổng hợp không có hoạt tính dẫn đến các thể bệnh trên lâm sàng.

1.1.4 Các dạng đột biến trên gen *CYP21A2*

Cho đến nay, trên thế giới đã ghi nhận có hơn 100 các đột biến khác nhau gây bệnh TSTTBS do thiếu hụt 21-OH, các đột biến này bao gồm các đột biến điểm, mất đoạn nhỏ, thêm đoạn nhỏ và sắp xếp lại một cách phức tạp của gen. Trong đó 10 đột biến phổ biến nhất được phát hiện gây nên những thể lâm sàng khác nhau.

1.1.5. Đặc điểm lâm sàng và chẩn đoán

Thể nam hóa đơn thuần: Trẻ trai có dậy thì sớm già, dương vật to nhanh, có lông mu, trứng ca, giọng trầm,... tuổi xương tăng nhanh, chiều cao thấp khi ở tuổi trưởng thành. Ở trẻ gái, âm vật to giống như dương vật, môi lớn dính vào nhau, lỗ niệu đạo ở ngay dưới âm vật, và có các dấu hiệu nam hóa rõ hơn sau này: cao nhanh, lông mu, lông nách, trứng cá, cơ bắp phát triển...ngoại hình nam, không phát triển tuyến vú và buồng trứng gây rối loạn kinh nguyệt hoặc vô kinh. Thể mất muối: trẻ mất nước mạn tính, không tăng cân, nôn nhiều, biếng ăn và bỏ bú kèm rối loạn điện giải nặng có thể dẫn đến trụy mạch và tử vong. Xét nghiệm 17-OHP và testosterone tăng. Rối loạn điện giải hạ natri máu, tăng kali máu. Tìm thấy đột biến gen *CYP21A2*.

1.2 Phát hiện người lành mang gen bệnh

1.2.1. Đặc điểm di truyền của bệnh

Bệnh tuân theo quy luật di truyền đơn gen lặn, NST thường của Menden. Trong sơ đồ phả hệ có người lành mang gen bệnh. Bệnh xảy ra không liên tục qua các thế hệ mà thường xuất hiện trong cùng một thế hệ. Tỷ lệ nam và nữ bị bệnh như nhau. Nguy hiểm của bệnh khi bố và mẹ là hai dị hợp tử (người mang gen bệnh) nhưng không có biểu hiện lâm sàng của bệnh, nhưng di truyền gen bệnh cho con; 25% con mang đồng hợp tử gen bệnh (aa) sẽ biểu hiện bệnh trên lâm sàng, 50% con mang dị hợp tử lặn (Aa) không biểu hiện bệnh trên lâm sàng. Trong quần thể tỷ lệ người bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH là 1/14.000 – 1/20.000 trẻ sơ sinh, trong khi tỷ lệ người lành mang gen bệnh lại rất cao là 1/60- 1/83 tùy thuộc từng chủng tộc. Do vậy, khi không có biện pháp phòng bệnh tích cực thì tỷ lệ người bị bệnh sẽ tăng cao trong quần thể.

1.2.2. Các phương pháp phát hiện người lành mang gen bệnh

- Sử dụng phân tích sơ đồ phả hệ của gia đình để tìm ra người mang gen DHT bắt buộc.
- Phương pháp sinh hóa cho các thành viên gia đình: định lượng 17-OHP tăng ở những người mang gen. Nghiệm pháp kích thích ACTH cho kết quả có tăng nồng độ 17-OHP, cortisol so với người không mang gen.
- Xét nghiệm sinh học phân tử tìm gen đột biến *CYP21A2*.

1.2.3. Quản lý và tư vấn di truyền cho người lành mang gen

Hồ sơ bệnh lý của bệnh nhân và các thành viên gia đình có mang gen trong mỗi gia đình, dòng họ sẽ được quản lý tại phòng tư vấn di truyền. Các thông tin về bệnh sẽ là bằng chứng khoa học chặt chẽ giúp cho các bác sĩ di truyền tư vấn tiền hôn nhân, tư vấn chẩn đoán trước sinh với các thai phụ có nguy cơ cao sinh con bị bệnh để có kế hoạch điều trị sớm với thai bị bệnh.

1.3 Chẩn đoán trước sinh bệnh TSTTBS

1.3.1 Chỉ định

- + Vợ chồng đã được xác định là dị hợp tử mang gen *CYP21A2*.
- + Một trong hai vợ chồng bị bệnh TSTTBS, còn người kia là dị hợp tử.
- + Các thai phụ đã một lần sinh con bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH khi có thai tiếp theo cần thiết chẩn đoán trước sinh.

1.3.2. Các phương pháp chẩn đoán trước sinh bệnh TSTTBS

Trước hết cần phải lấy được tế bào của thai nhi để chiết tách DNA. Sau đó sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử.

- Phương pháp chọc ối dưới siêu âm: ở tuổi thai 15-18 tuần, lượng dịch ối hút ra trung bình 10-15ml. Nguy cơ xảy thai: <1%.

- Phương pháp sinh thiết gai rau: tiến hành tuần thai thứ 9-12, nguy cơ xảy thai khoảng 2-3%, sẽ giúp chẩn đoán bệnh sớm hơn nhưng hiện nay thủ thuật sinh thiết gai rau chưa được thực hiện rộng rãi ở Việt Nam.

- Kỹ thuật sinh học phân tử: sử dụng hai kỹ thuật:

+ Kỹ thuật giải trình tự gen: là một kỹ thuật phát hiện đột biến gen trực tiếp, có thể phát hiện tất cả các đột biến trên gen *CYP21A2*.

+ Kỹ thuật MLPA: phát hiện các đột biến mất đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn trên gen *CYP21A2*, kỹ thuật cho kết quả chính xác và nhanh.

1.4 Tình hình nghiên cứu bệnh TSTTBS ở Việt Nam

Ở nước ta việc chẩn đoán xác định bệnh và điều trị bệnh TSTTBS đã được quan tâm từ lâu. Bắt đầu với luận án TSYH của Võ Kim Huệ (2000) ngoài nghiên cứu về chẩn đoán điều trị, tác giả lần đầu công bố về đột biến gen *CYP21A2* do mất đoạn ở exon 6. Năm 2001, luận văn thạc sĩ của Thái Thiên Nam tiếp tục nghiên cứu về đột biến gen và bước đầu nghiên cứu về phát hiện người lành mang gen bệnh cho thân nhân gia đình. Năm 2007, luận án TSYH của Trần Kiêm Hào phát hiện thêm 3 đột biến điểm ngoài đột biến xóa đoạn ở bệnh nhân và gia đình của họ. Nghiên cứu phát hiện người lành mang gen bệnh cho bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH có đề tài của Thái Thiên Nam và Trần Kiêm Hào, nhưng với số lượng gia đình nghiên cứu ít (<5 gia đình) và sử dụng các kỹ thuật PCR. Chẩn đoán trước sinh cho bệnh TSTTBS chưa có đề tài được công bố.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mục tiêu 1: 130 thành viên trong gia đình bao gồm cha, mẹ, anh, chị, em ruột bệnh nhân TSTTBS đã được phát hiện đột biến gen *CYP21A2* đang theo dõi và điều trị tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa- Di truyền Bệnh viện Nhi Trung ương.

Mục tiêu 2: 12 thai phụ là người mang gen dị hợp tử, đã sinh con bị bệnh TSTTBS và lần mang thai tiếp theo có nguyện vọng được chẩn đoán trước sinh.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Đề tài được tiến hành tại :

- Khoa Nội tiết- Chuyển hóa – Di truyền Bệnh viện Nhi Trung ương.

- Trung tâm Nghiên cứu Gen và Protein trường Đại học Y Hà Nội.

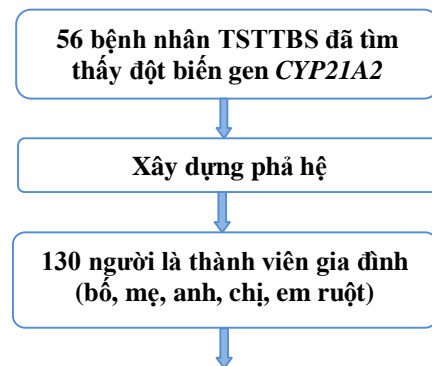
- Trung tâm Chẩn đoán trước sinh Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

Trong thời gian 3 năm từ tháng 9 năm 2011 đến tháng 9 năm 2014.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1.Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu tiền cứu, mô tả cắt ngang.

2.3.2.Cỡ mẫu: tiện ích; tất cả những thành viên gia đình gồm bố, mẹ, anh, chị, em ruột của 56 bệnh nhân đủ điều kiện nghiên cứu. Tất cả các mẹ của bệnh nhân mang thai lần tiếp theo trong thời gian nghiên cứu.



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.3.3 Phương pháp nghiên cứu lâm sàng và kỹ thuật di truyền phân tử:

- Đặc điểm đối tượng NC: bệnh nhân bị TSTTBS: tuổi, giới, thể bệnh.
- Xây dựng phả hệ gia đình cho từng bệnh nhân, ít nhất 3 thế hệ.
- Các thành viên gia đình: bố, mẹ, anh, chị, em ruột bệnh nhân được khám, tư vấn và lấy máu làm xét nghiệm phân tích gen *CYP21A2* bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen.
- Khi có kết quả những thành viên là DHT sẽ được tư vấn di truyền để theo dõi và thực hiện các biện pháp phòng bệnh khi cần thiết.

2.3.4 Phương pháp nghiên cứu lâm sàng, chọc ối và kỹ thuật di truyền phân tử:

- + Mỗi thai phụ có một hồ sơ theo dõi thai sản: tuổi của thai phụ và tuổi thai nhi khi chẩn đoán trước sinh.
- Sử dụng phương pháp chọc ối để lấy dịch ối, nuôi cấy tế bào ối, chiết tách DNA. Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen và MLPA để xác định đột biến trên gen *CYP21A2* cho thai nhi.
- Thông báo kết quả phân tích gen *CYP21A2* của thai nhi cho gia đình. Khi thai nhi bị bệnh sẽ giải thích để gia đình lựa chọn phương pháp điều trị.

2.4 Xử lý số liệu: các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê y học bằng chương trình EPIDATA 3.1.

2.5 Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu được tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học. Các thành viên gia đình tự nguyện tham gia nghiên cứu và được lập hồ sơ theo dõi và tư vấn di truyền. Các thông tin của mỗi gia đình sẽ được đảm bảo bí mật.

Chương 3.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tiến hành nghiên cứu 130 thành viên của 56 gia đình có con bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH và chẩn đoán trước sinh cho 12 thai phụ là DHT cho kết quả sau:

3.1 Đặc điểm nhóm nghiên cứu

3.1.1 Phân bố theo giới và tuổi của 56 bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH

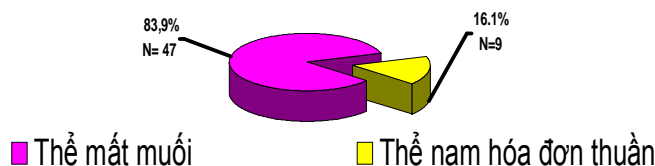
Bảng 3.1. Phân bố theo giới và tuổi của bệnh nhân tại thời điểm nghiên cứu

Nhóm tuổi	Nam		Nữ		Chung hai giới	
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %
Từ < 1 tuổi	19	63,3	12	46,2	31	55,4

Từ 1 - 5 tuổi	8	26,6	10	38,4	18	32,1
>5 tuổi	3	10,1	4	15,4	7	12,5
Tổng số	30	100	26	100	56	100

Nhóm trẻ dưới 5 tuổi chiếm nhiều hơn: 87,5%, nhóm tuổi trên 5 tuổi ít hơn: 12,5 %, trong đó lớn tuổi nhất là 9 tuổi. Bệnh nhân nam mắc bệnh chiếm tỷ lệ cao hơn so với nữ là 53,6%, sự khác biệt về giới không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.2 Phân bố thể bệnh của 56 bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH

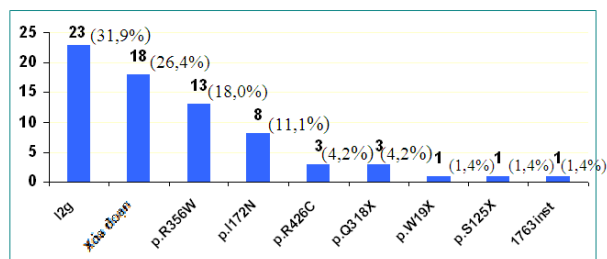


Biểu đồ 3.1. Phân bố theo thể lâm sàng của bệnh nhân nghiên cứu

Bệnh nhân thể mất muối hay gặp hơn chiếm tỷ lệ 83,9%, thể nam hóa đơn thuần chiếm tỷ lệ thấp hơn là 16,1%. Không có bệnh nhân thể không cổ điển.

3.1.3. Phân bố kiểu gen của 56 bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH

Bệnh nhân



Biểu đồ 3.2. Phân bố kiểu gen của bệnh nhân

Đột biến điểm tại intron 2 (I2g) chiếm tỷ lệ cao nhất: 31,9%, xóa đoạn: 26,4% và p.R356W: 18,0%.

3.1.4. Phân bố các thành viên gia đình của bệnh nhân

Bảng 3.2. Các thành viên trong gia đình bệnh nhân

Thành viên gia đình	n	Tỷ lệ %
Bố	55	42,3
Mẹ	56	43,2
Anh trai	5	3,8
Chị gái	6	4,6
Em trai	5	3,8
Em gái	3	2,3
Tổng số	130	100

Trong 130 thành viên gia đình được phân tích gen, có 56 người mẹ và 55 người bố tỷ lệ: 85,5% (1 người bố vì đã mất nên không phân tích được gen). Anh, chị, em ruột bệnh nhân có 19 người (tỷ lệ 14,5%) đã được phân tích gen, trong đó: anh trai: 3,8%, chị gái: 4,6%, em trai: 3,8%, em gái: 2,3%.

3.1.5. Phân bố tuổi của bố, mẹ khi làm xét nghiệm

Bảng 3.3. Phân bố tuổi của bố, mẹ khi làm xét nghiệm

Thành viên gia đình	n	Tuổi trung bình
Bố	55	32,6±5,3 năm
Mẹ	56	29,8±6,7 năm
Tổng số	111	

Bố, mẹ bệnh nhân đều trong độ tuổi sinh đẻ, bố bệnh nhân có độ tuổi trung bình là 32,6±5,3 năm, bố có tuổi lớn nhất là 38 tuổi và thấp nhất 22 tuổi. Tuổi trung bình của mẹ: 29,8±6,7 năm, lớn nhất là 37 tuổi, thấp nhất 21 tuổi.

3.1.6. Đặc điểm thai phụ được chẩn đoán trước sinh

Có 12 thai phụ được tiến hành chẩn đoán trước sinh. Các thai phụ đã sinh một con bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH, có mang gen đột biến DHT *CYP21A2*, đây là lần mang thai tiếp theo.

Bảng 3.4. Đặc điểm tuổi của mẹ và thai nhi khi chẩn đoán trước sinh

Thành viên gia đình	n	Tuổi trung bình
Thai phụ	12	32,9 ± 3,4 năm
Thai nhi	13	16,3 ± 1,5 tuần

Tuổi thai phụ khi chọc ối chẩn đoán trước sinh trung bình: 32,9 ± 3,4 năm, trong đó mẹ có tuổi lớn nhất là 37 và tuổi nhỏ nhất là 23 tuổi.

Tuổi trung bình của thai nhi khi chọc ối là 16,3tuần.

3.2 Kết quả nghiên cứu của mục tiêu 1

Chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen và MLPA phát hiện đột biến xóa đoạn và 8 loại đột biến điểm của 55 bố và 56 mẹ và 19 anh, chị, em bệnh nhân.

3.2.1 Kết quả phân tích gen cho bố, mẹ bệnh nhân

Bảng 3.5. Tỷ lệ các dạng đột biến gen *CYP21A2* ở bố, mẹ của bệnh nhân

STT	Dạng đột biến	bố (n)	Tỷ lệ %	mẹ (n)	Tỷ lệ %
1	12g	20	35,7	19	33,8
2	Xóa đoạn	13	25,0	18	30,4
3	p.R356W	13	23,2	9	16,1
4	p.I172N	3	5,4	6	10,7
5	p.R426C	2	3,5	2	3,6
6	p.Q318X	3	5,4	1	1,8
7	p.S125X	1	0	0	1,8
8	p.W19X	1	1,8	0	0

9	c.1763insT	0	0	1	1,8
	Tổng số	56	100	56	100

Có 55 bố được phân tích gen trong đó tỷ lệ đột biến dạng I2g chiếm cao nhất 20/56 (35,7%), đột biến xóa đoạn 25%, 01 bố không phát hiện thấy gen đột biến, có 02 bố cùng mang 2 gen đột biến điểm p.Q318X và p.R356W trên một alen. Có 56 mẹ được phân tích gen trong đó, tỷ lệ đột biến I2g chiếm 19/56 (33,8%), xóa đoạn: 30,4%.

3.2.2. Kết quả phân tích gen của anh chị em bệnh nhân

Trong nghiên cứu có 19 anh, chị, em bệnh nhân được phân tích gen, trong đó có 4 người không mang gen đột biến và 1 chị gái có kiểu hình bình thường, nhưng chưa được phân tích gen, 14 người mang gen dị hợp tử với các dạng đột biến được phân tích trong bảng 3.6:

Bảng 3.6. Tỷ lệ mang gen đột biến của anh, chị, em bệnh nhân

STT	Các anh, chị, em bệnh nhân	I2g (n)	Xóa đoạn (n)	p.R356W (n)	p.I172N (n)
1	Anh trai	2	1	0	0
2	Chị gái	2	1	1	1
3	Em trai	2	0	1	1
4	Em gái	2	0	0	0
	Tổng số	8	2	2	2

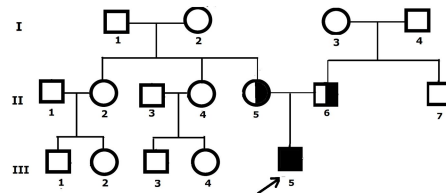
Có 14 anh, chị, em bệnh nhân mang gen dị hợp tử. Ba anh trai mang gen đột biến: I2g: 2 và xóa đoạn:1. Năm chị gái mang đột biến dị hợp tử: I2g: 2, xóa đoạn: 1, p.I172N: 1, p.R356W:1. Bốn em trai mang dị hợp tử: I2g: 2;p.R356W:1;p. I172N:1. Chỉ có 2 em gái mang gen đột biến dị hợp tử I2g.

3.2.3. Minh họa kiểu gen đột biến của thành viên gia đình bệnh nhân

Nghiên cứu tìm thấy có 9 dạng đột biến trên gen *CYP21A2* hay gặp; đột biến điểm chiếm tỷ lệ: 69,6%, đột biến xóa đoạn: 30,4%.

Minh họa phả hệ và kiểu gen đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự gen của gia đình bệnh nhân TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH

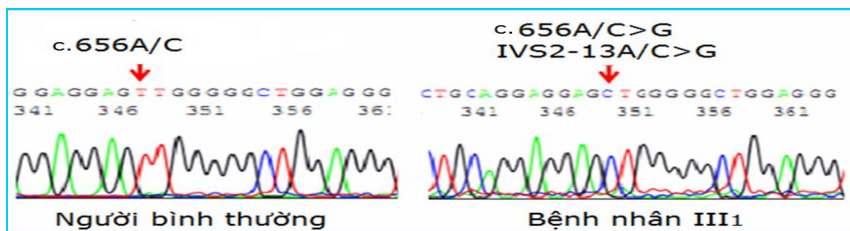
❖ Hình ảnh đột biến I2g/I2g (c.656A/C>G) gia đình bệnh nhân 01

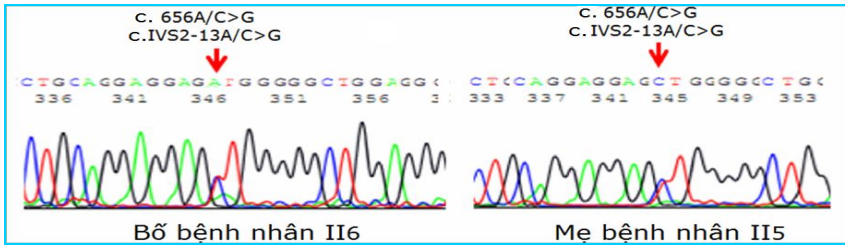


Hình 3.1. Phả hệ gia đình số 01

Phả hệ của gia đình số 1 có 3 thế hệ, thế hệ thứ 1 và thứ 2 không có người bị bệnh. Ở thế hệ thứ 3, 1 con trai (III.5), 4 tuổi bị bệnh TSTTBS thể mất muối. Có mang gen đột biến *CYP21A2* kiểu I2g. Các anh, chị (III.1, III.2, III.3, III.4) của bệnh nhân không có biểu hiện bệnh. Bố (II.6) 27 tuổi và mẹ (II.5) 26 tuổi theo quy luật di truyền là người lành mang gen bệnh.

Kiểu gen của gia đình số 01



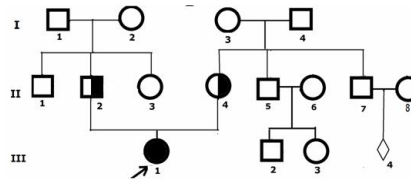


Hình 3.2. Kết quả giải trình tự gen (chiều ngược) gia đình 01

Hình ảnh giải trình tự gen vị trí intron 2, c.656A/C>G có hình ảnh cho thấy bố, mẹ người mang gen đột biến dị hợp tử c.656A/C>G (I2g). Bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử I2g do nhận 1 alen đột biến từ bố và 1 alen đột biến từ mẹ.

Minh họa kiểu gen đột biến xóa đoạn bằng kỹ thuật MLPA của gia đình bệnh nhân TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH

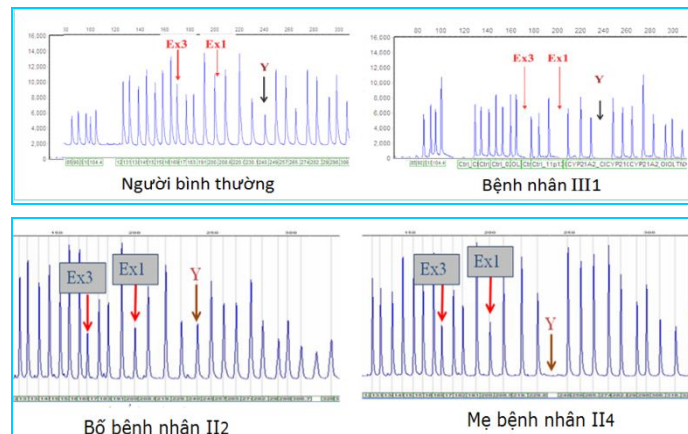
Hình ảnh đột biến xóa đoạn tại exon 1 và exon 3.



Hình 3.3. Phả hệ gia đình số 34

Gia đình có con gái (III.1) 8 tuổi bị bệnh TSTTBS thể mất muối nặng, mang đột biến xóa đoạn tại exon 1 và exon 3 trên gen *CYP21A2*. Bố (II.2) 27 tuổi và mẹ (II.4) 25 tuổi. Hai em họ (III.2 và III.3) không có biểu hiện bệnh, có 1 em III.4 chưa sinh (thai 17 tuần). Trong phả hệ, cả 3 thế hệ không ai mắc bệnh như bệnh nhân.

Kiểu gen của gia đình số 34

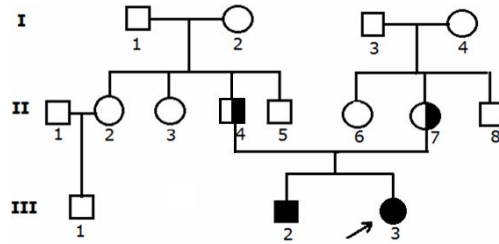


Hình 3.4. Kết quả đột biến gen của gia đình số 34

Hình ảnh phân tích gen bằng kỹ thuật MLPA trên gen *CYP21A2* cho thấy: chiều cao đỉnh của các gen ở người bình thường, mẫu bố và mẹ là tương đương nhau, trong khi đó chiều cao các đỉnh của exon 1, exon 3 của bố, mẹ bệnh nhân chỉ bằng 1/2 so với người bình thường, chứng tỏ bố, mẹ bệnh nhân là người mang gen bệnh.

Minh họa kiểu gen đột biến dị hợp tử kép

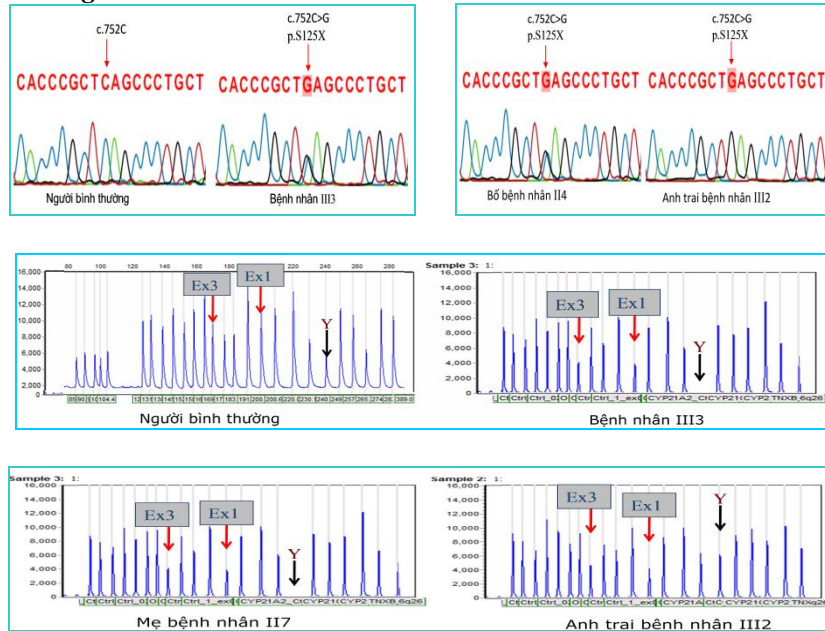
Phả hệ gia đình có đột biến điểm biến đổi S125X/xóa đoạn.



Hình 3.5. Phả hệ gia đình mã số 25

Gia đình có 2 con, con gái III3 bị bị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh, thể mất muối với kiểu gen p.S125X và xóa đoạn. Anh trai cũng bị bệnh và kiểu gen sau khi phân tích là dị hợp tử kép giống em gái: xóa đoạn và p.S125X. Bố mẹ là người lành mang gen bệnh. Trong gia đình không có ai bị bệnh giống bệnh nhân

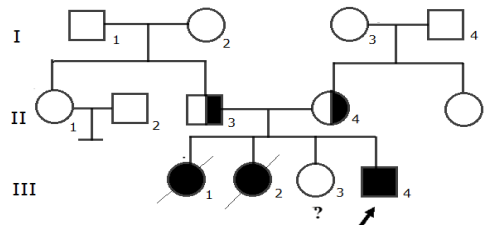
Kiểu gen của gia đình số 25



Hình 3.6. Kiểu gen đột biến của gia đình số 25

Sau khi phân tích gen mẹ (II.7) bệnh nhân mang gen xóa đoạn, bố (II.4) mang đột biến điểm p.S125X. Bố mẹ đều mang gen dị hợp tử khác nhau, di truyền các alen lặn gây bệnh, kiểu gen của hai anh em cùng giống nhau, đều mang đột biến dị hợp tử kép trong một gia đình.

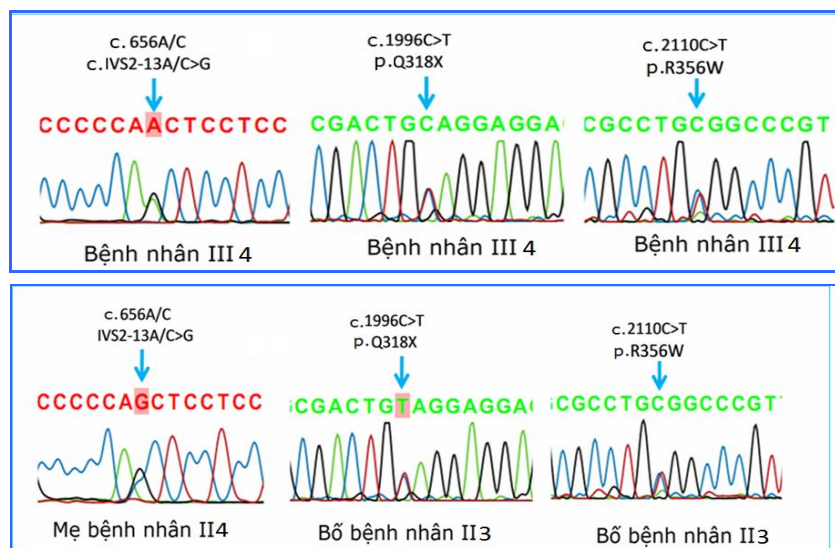
Phả hệ gia đình mang đột biến dị hợp tử kép p.I2g / Q318 và R356W



Hình 3.7. Phả hệ gia đình mã số 49

Phân tích phả hệ có 3 thế hệ, thế hệ 1 và 2, không ai mắc bệnh giống bệnh nhân. Ở thế hệ thứ 3 gia đình có hai con gái đầu bị mất trong thời kỳ sơ sinh, 1 con trai 2 tuổi bị bệnh TSSTBS thể mất muối với kiểu gen I2g và 2 đột biến trên cùng 1 alen p.Q138X & R356W. Bố mẹ và chị gái (III.3) có kiểu hình bình thường

Kiểu gen của gia đình có đột biến I2g và Q138X & R356W



Hình 3.8. Kiểu gen của gia đình mã số 49

Phân tích gen cho gia đình nhận thấy có 3 đột biến: I2g, p.Q318X & p.R356W. Bố mang đột biến dị hợp tử kép p.Q318X và p.R356W mẹ mang gen dị hợp tử I2g. Bệnh nhân nhận 1 alen p.Q318X và p.R356W từ bố và 1 alen I2g từ mẹ.

3.2. Kết quả nghiên cứu của mục tiêu 2

12 thai phụ đã có con bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH, lần có thai tiếp theo được tư vấn di truyền chẩn đoán trước sinh. Chẩn đoán trước sinh được tiến hành khi thai 15-16 tuần bằng phương pháp chọc ối. Tế bào ối sau nuôi cấy được chiết tách DNA và được kiểm tra độ tinh sạch trên máy Nano drop và sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen và MLPA thu được kết quả sau:

3.2.1 Kết quả đột biến gen của thai nhi

Nghiên cứu phát hiện được đột biến xóa đoạn và 3 loại đột biến điểm của thai nhi.

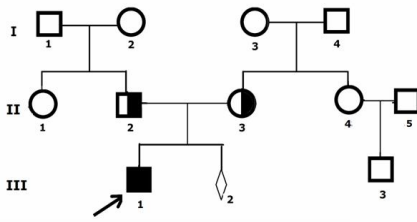
Bảng 3.8. Phân bố kiểu gen đột biến của gia đình và thai nhi

TT	Kiểu gen bệnh nhân (alen)	Bố (alen)	Mẹ (alen)	Thai nhi
1	I2g/I2g	I2g	I2g	Thai gái, bình thường
2	p.R356W/R356W	p.R356W	p.R356W	Thai trai. Năm 2012 p.R356W/R356W
				Thai gái. Năm 2014 p.R356W/R356W
3	xóa đoạn/xóa đoạn	xóa đoạn	xóa đoạn	Thai trai, xóa đoạn
4	I2g/1762inst	I2g	1762inst	Thai trai, bình thường
5	p.R356W/Xóa đoạn	p.R356W	xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
6	I2g/xóa đoạn	p.I2g	xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
7	xóa đoạn/xóa đoạn	xóa đoạn	xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
8	p.Q318X/R356W & R356W	p.Q318X & R356W	p.R356W	Thai trai, p.Q318X & R356W
9	I2g/xóa đoạn	xóa đoạn	I2g	Thai trai, bình thường

10	I2g/xóa đoạn	I2g	xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
11	xóa đoạn/xóa đoạn	xóa đoạn	xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
12	p.I172N/I172N	p.I172N	p.I172N	Thai trai, p.I172N

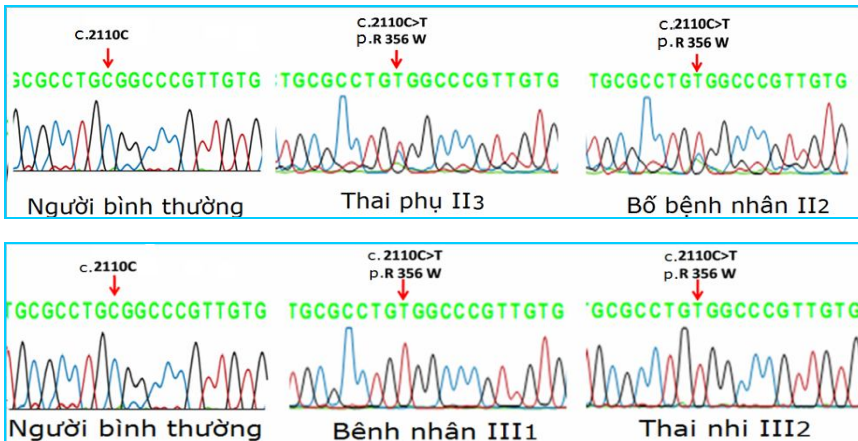
Sau khi phân tích gen cho 13 thai nhi; 3 thai nhi bình thường, 2 thai nhi bị bệnh, 8 thai nhi có mang gen đột biến dị hợp tử. Trong 8 thai nhi mang gen dị hợp tử có các dạng đột biến; 6: xóa đoạn, 1: p.I172N và 1 thai nhi mang dị hợp tử kép p.Q318X&R356W.

3.2.2. Hình ảnh minh họa gia đình được chẩn đoán trước sinh
Kết quả chẩn đoán trước sinh của gia đình bệnh nhân số 06
Phả hệ của gia đình bệnh nhân số 06



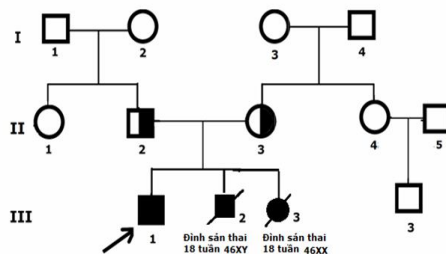
Hình 3.9A. Phả hệ của gia đình số 06, năm 2012

Ở thế hệ thứ 3, gia đình có 1 con trai 7 tuổi bị bệnh TSTSBS thể mất muối mang gen gây bệnh *CYP21A2* dạng p.R356W/R356W. Bố 37 tuổi, mẹ 35 tuổi là người lành mang gen bệnh dạng đột biến p.R356W. Tiền sử gia đình không ai bị bệnh giống bệnh nhân. Mẹ bệnh nhân được chẩn đoán trước sinh năm 2012, khi thai nhi 16 tuần.

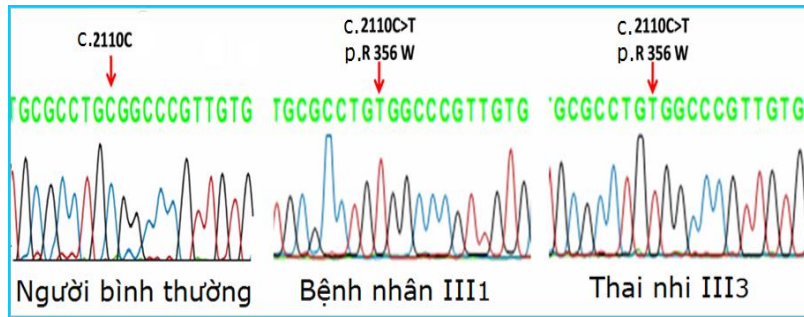


Hình 3.10A. Kiểu gen của gia đình và thai nhi mã số 06

Phân tích gen bằng phương pháp giải trình tự gen *CYP21A2* và nuôi cấy nhiễm sắc thể, thai nhi là một bé trai, có kiểu gen đồng hợp tử lặn dạng đột biến p.R356W giống anh trai. Gia đình đã được các bác sĩ tư vấn, sau khi bàn bạc với gia đình, thai phụ xin hủy thai khi thai 18 tuần. Hai năm sau, năm 2014, mẹ mong muốn sinh thêm con, sau khi mang thai với tuổi của mẹ là 37 và được quản lý thai tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. Khi thai 16 tuần, thai phụ được chọc ối và phân tích gen cho thai nhi. Phả hệ của gia đình số 06 năm 2014 hình 3.20B



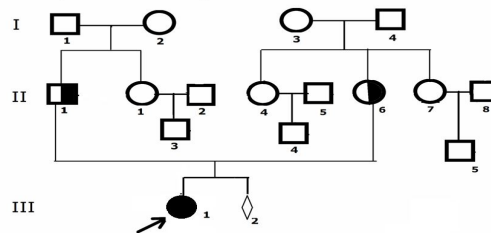
Hình 3.9B. Phả hệ của gia đình số 06, năm 2014



Hình 3.10B. Kiểu gen của mẹ và thai nhi năm 2014

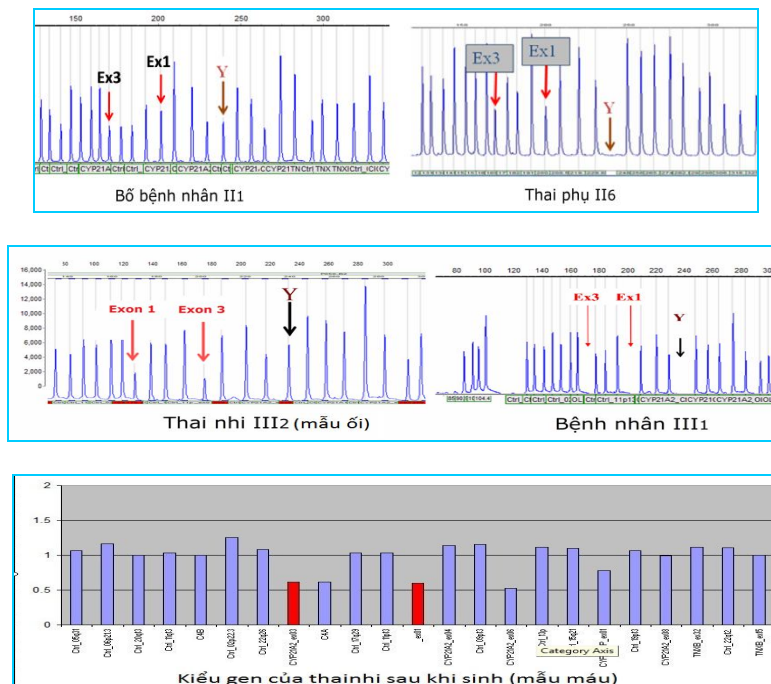
Hình ảnh giải trình tự gen *CYP21A2* của thai nhi là thai gái nhưng cũng mang gen đột biến đồng hợp tử dạng p.R356W giống anh trai nên gia đình xin đình sản lúc thai 18 tuần.

Kết quả chẩn đoán trước sinh của gia đình bệnh nhân số 45
Phả hệ của gia đình và thai nhi số 45



Hình 3.11. Phả hệ của gia đình mã số 45

Trong phả hệ của gia đình có 1 con gái 4 tuổi bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH, mất muối nặng mang gen đột biến xóa đoạn ở exon 1 và exon 3. Bố 33 tuổi, mẹ 29 tuổi là hai người mang gen dị hợp tử xóa đoạn ở exon 1 và exon 3. Lần có thai thứ 2 thai phụ, đã tiến hành chẩn đoán trước sinh khi thai 16 tuần.



Hình 3.12. Kiểu gen của thai nhi và gia đình

Kiểu gen của thai nhi mang đột biến xóa đoạn ở exon 1 và exon 3 dị hợp tử giống với kiểu gen của bố mẹ đã được xác định.

Chương 4 **BÀN LUẬN**

4.1 Đặc điểm của nhóm nghiên cứu

56 bệnh nhân bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH, trong đó tuổi của nhóm bệnh nhân dưới 1 tuổi: 55,4%, trẻ từ 1 đến 5 tuổi: 32,1%, trẻ trên 5 tuổi: 12,5%. Bệnh nhân nghiên cứu chủ yếu ở nhóm dưới 5 tuổi (87,5%), cho thấy bệnh TSTTBS đã được chẩn đoán sớm hơn và điều trị sớm. Phân tích 56 gia đình của bệnh nhân bị TSTTBS, xây dựng phả hệ cho mỗi gia đình tối thiểu 3 thế hệ, có 130 thành viên của gia đình gồm: 56 người mẹ, 55 người bố (có 1 bố của bệnh nhân đã mất) và 19 anh, chị, em ruột của bệnh nhân. Tuổi của bố và mẹ đều trong lứa tuổi sinh đẻ. Bố lớn tuổi nhất là 38 tuổi, thấp nhất là 22 tuổi. Tuổi lớn nhất của mẹ là 37 tuổi, nhỏ nhất là 21 tuổi, nhóm mẹ có tuổi dưới 30 tuổi chiếm 78,6%, đây là lứa tuổi sinh đẻ phù hợp của các thai phụ. Có 19 anh, chị, em ruột của bệnh nhân, trong đó có 5 anh trai, 5 em trai, 6 chị gái, 3 em gái. Tuổi của anh, chị, em ruột lớn nhất là 8 tuổi, nhỏ nhất là sơ sinh.

Phân tích tìm đột biến gen cho gia đình của 56 bệnh nhân bị TSTTBS trong 3 năm, lập hồ sơ theo dõi và tư vấn giáo dục về bệnh cho các thành viên gia đình, nhưng chỉ có 12 người mẹ, khi mang thai đã liên hệ với các bác sĩ xin tư vấn di truyền và có nguyện vọng được chẩn đoán trước sinh sớm. Không có chị, em gái bệnh nhân được chẩn đoán trước sinh do còn nhỏ. Các thai phụ đang mang thai dưới 15-16 tuần, có 1 người mẹ được chẩn đoán trước sinh 2 lần năm 2012 và năm 2014.

Đặc điểm kiểu gen của bệnh nhân

Đặc điểm kiểu gen của 56 bệnh nhân như sau: 41 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử và 15 bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử kép. Vị trí đột biến tại intron 2 (I2g) hay gặp với tỷ lệ: 31,9%, đột biến xóa đoạn: 26,4%, p.R356W: 18,1%, p.I172N: 11,1% và các đột biến khác với tỷ lệ thấp; p.Q318X, p.R426C, p.S125X, p.W19X, c.1763insT. Đột biến dị hợp tử kép hay gặp trong nghiên cứu là I2g và xóa đoạn kết hợp với đột biến điểm khác Một nghiên cứu tại Nhật năm 2002, nhận thấy tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến I2g có tăng cao hơn các đột biến khác là 39,8%. Nghiên cứu của Hoa Kỳ, năm 2010, tại bang California đột biến đồng hợp tử tại intron 2 là 23,4%, khi phân tích gen cho 213 bệnh nhân và 232 thành viên gia đình bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

4.2. Kết quả phát hiện người lành mang gen đột biến CYP21A2 cho các thành viên gia đình bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH

4.2.1. Phân bố dạng đột biến trên gen CYP21A2 của thành viên gia đình

Đột biến trên gen CYP21A2 đã được tìm thấy cho đến nay là hơn 100 loại khác nhau. Bệnh tuân theo quy luật di truyền đơn gen lặn, việc phát hiện đột biến gen cho bệnh nhân là chỉ điểm quan trọng để phân tích gen cho các thành viên gia đình, tìm người mang gen dị hợp tử trong dòng họ để quản lý và tư vấn di truyền. Trong quần thể số người lành mang gen bệnh lớn hơn số người bị bệnh rất nhiều. Bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH là 1/10.000- 1/20.000 trẻ sơ sinh, trong khi đó tỷ lệ người mang gen bệnh là 1/55-1/83, khi hai dị hợp tử kết hôn với nhau thì khả năng sinh con bị bệnh 25%. 50% con là DHT, gen bệnh được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác. Khi hai cá thể kết hôn họ hàng hoặc trong quần thể cô lập thì nguy cơ tăng tỷ lệ mắc bệnh vì các gen gây bệnh dễ dàng có cơ hội tổ hợp lại với nhau để sinh ra trẻ bị bệnh. Khi con bị bệnh (aa) thì chắc chắn bố mẹ là hai dị hợp tử (Aa).

Trong 130 thành viên của gia đình đã được phân tích gen chúng tôi nhận thấy tỷ lệ mang gen của các thành viên gia đình là 95,4% và tỷ lệ không mang gen là 4,6%. Bố mẹ có mang gen dị hợp tử là 84,6%, anh, chị, em ruột bệnh nhân 10,7%, người không mang gen 4,7%. Nghiên cứu tại Macedonia, năm 2010 trên 51 bệnh nhân và 70 thành viên gia đình, tỷ lệ bố mẹ có mang đột biến gen là 45,6%. Trong kết quả phân tích gen của chúng tôi có 1 trường hợp con có mang gen đột biến đồng hợp tử I2g, mẹ là người mang gen dạng dị hợp tử I2g, bố không phát hiện thấy đột biến giống như bệnh nhân. Trong trường hợp này chúng tôi có thể lý giải đột biến mới có thể xảy ra ở quá trình phân bào giảm nhiễm, trong quá trình hình thành giao tử, đột biến thường xảy ra ở vị trí intron 2 với tần số chuyển đoạn là $1/10^4$ hoặc bố cũng mang một gen đột biến khác mà với phương pháp hiện tại của chúng tôi

đang sử dụng chưa phát hiện được. Năm 2011, trong một nghiên cứu tại Trung Quốc, lập phá hệ và phân tích gen cho 2 gia đình có con bị bệnh TSTTBS, trong đó có 1 gia đình, mang dị hợp tử. Gia đình có 3 con gái, con gái đầu bị bệnh có mang đột biến p.I172N, biểu hiện kiểu hình thể nam hóa đơn thuần. Bệnh nhân nhận 1 alen đột biến p.I172N từ bố mà không phát hiện thấy đột biến xóa đoạn, chuyển đoạn hay đột biến điểm nào khác. Mẹ và em gái thứ 2 của bệnh nhân không có mang gen đột biến, em gái út có mang gen dị hợp tử giống bố p.I172N (c.1004T>A). Theo tác giả người con gái đầu bị bệnh có thể mang thêm một đột biến mới xảy ra trong quá trình phiên mã liên quan đến sự chuyển đoạn của gen *CYP21A2*. Có 6 gia đình có bố, mẹ là người mang gen dị hợp tử, sinh hai con đều bị bệnh TSTTBS. Bệnh thường xuất hiện trong cùng một thể hệ, phân tích phá hệ cho 3 thể hệ nhận thấy bệnh di truyền không liên tục qua các thế hệ, bệnh gặp ở thế hệ thứ 3.

Theo nghiên cứu của Trần Kiên Hào (2007), khi làm xét nghiệm gen cho 5 gia đình tìm thấy 3 người mẹ, 2 người bố có mang gen đột biến I2g và đột biến mất đoạn 8bp. Đặc biệt có hai bố mẹ mang dị hợp tử kép vừa đột biến điểm vừa đột biến xóa đoạn trên cùng một alen.

4.2.2. Các kỹ thuật sử dụng để phát hiện đột biến trên gen *CYP21A2* ở bố, mẹ, anh, chị, em ruột bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH

Đột biến tìm thấy trên gen *CYP21A2* ở bệnh nhân TSTTBS là đột biến chỉ điểm để phát hiện đột biến cho các thành viên gia đình nhanh chóng và ít tốn kém. Nhờ hai kỹ thuật giải trình tự gen và kỹ thuật MLPA để tìm vị trí đột biến điểm và các đột biến xóa đoạn, lập đoạn từ đó phát hiện ra người mang gen dị hợp tử. Đây là hai kỹ thuật hiện đại và chính xác hiện nay. Sau khi phân tích 130 thành viên gia đình có 9 dạng đột biến, gồm có; I2g: 47/130 (36,5%), xóa đoạn 33/130 (25,4%), p.R356W (18,5%) và các đột biến khác ít gặp như: p.Q318X, p.I172N, p.R426C, p.S125X, p.W19X. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi giống với các nghiên cứu khác trên thế giới.

4.2.3. Bàn luận về các trường hợp phá hệ gia đình được minh họa

Phân tích phá hệ của gia đình số 01 ở hình 3.1 và 3.2 cho thấy gia đình có 1 con trai bị bệnh TSTTBS thể mất muối được chẩn đoán khi 3 tuần tuổi với diễn hình của con suy thượng thận cấp. Bệnh nhân bị đột biến ở intron 2 trên gen *CYP21A2* dạng đột biến đồng hợp tử IVS2-13A/C>G (c.656A/C>G), bố mẹ có thể là người mang gen dị hợp tử và trong phá hệ không ai bị mắc bệnh giống bệnh nhân. Sau khi phân tích gen cho bố, mẹ chúng tôi nhận thấy bố bệnh nhân có mang gen dị hợp tử IVS2 -13A/C>G (c.656T/G>C) và mẹ cũng mang đột biến dị hợp tử tại vị trí IVS2 -13A/C>G (c.656T/G>C). Từ kết quả xét nghiệm cho gia đình bệnh nhân số 01 chúng tôi khẳng định bệnh nhân đã nhận một alen bị đột biến tại intron 2 từ bố và 1 alen từ mẹ.

Nghiên cứu của Violeta. A năm 2010 tại Macedona cho bệnh nhân và gia đình nhận thấy tỷ lệ phát hiện mang I2g ở thành viên gia đình là: 12,9%. Nghiên cứu nhận thấy dạng đột biến P30L có tỷ lệ cao hơn: 20%, tỷ lệ khác nhau này trong các nghiên cứu có liên quan đến chủng tộc. Đây cũng là một dạng đột biến hay gặp trên thế giới cũng như các báo cáo gần đây của các nước châu Á như Nhật Bản, Trung Quốc.

Phân tích phá hệ gia đình số 27, cho thấy gia đình có con trai bị bệnh với kiểu hình thể mất muối, mang gen đột biến điểm ở vị trí p.R356W đồng hợp tử. Bố mẹ sau khi phân tích gen là người mang gen dị hợp tử, trong dòng họ không ai bị bệnh như bệnh nhân. Đây là dạng đột biến gây thể lâm sàng mất muối nặng. Đột biến dạng p.R356W có tỷ lệ cao hơn ở các nước Châu Á khác từ 9,5% - 19,2% ở người Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Malaysia. Đột biến làm thay thế nucleotide 2110C>T làm cho bộ ba thứ 356 CGG mã hóa cho Arginin bị chuyển thành TGG mã hóa cho Tryptophan (R356W) gây mất khả năng tổng hợp enzym, đột biến này đưa đến hậu quả làm nồng độ enzym giảm nặng, không đo được, gây bệnh cảnh lâm sàng là thể mất muối nặng.

Phân tích phá hệ của gia đình số 08 cho thấy gia đình có hai con; con gái đầu có kiểu hình bình thường, con trai sau khi sinh có kiểu hình bình thường, khi trẻ 3 tuổi gia đình thấy trẻ luôn lớn hơn bạn bè, kèm theo bộ phận sinh dục, dương vật phát triển ngày càng to hơn so với bạn bè cùng lứa tuổi. Gia đình đưa trẻ đi khám và được chẩn đoán dậy thì sớm giả của bệnh TSTTBS. Sau khi phân tích gen của con trai cho kết quả mang dạng đột biến đồng hợp tử p.I172N (c.999T>A) ở exon 4, với kiểu hình thể nam hóa đơn thuần. Kết quả phân tích gen của các thành viên gia đình cho thấy bố mẹ bệnh nhân có mang gen đột biến p.I172N dạng dị hợp tử, chị gái (III4) là người lành có mang gen đột biến giống

bố mẹ. Kết quả cho thấy người con trai thứ hai II2 nhận hai alen bị bệnh, 1 từ bố và 1 alen từ mẹ, nhưng chị gái chỉ nhận 1 alen bị bệnh từ bố hoặc mẹ nên là người lành mang gen bệnh giống bố mẹ. Dạng đột biến p.I172N hay gặp trên thế giới với tỷ lệ khoảng 1,6- 19 %. Đột biến I172N ở vị trí 9994T>A làm giảm hoạt động emzym, nhưng có thể đo được theo báo cáo khoảng 0 - 2%, do vậy dạng đột biến này có thể có kiểu hình mất muối nhẹ hoặc nam hóa đơn thuần, tùy thuộc vào hoạt động của enzym trong mỗi cơ thể. Trong nghiên cứu của chúng tôi có 3 gia đình mang đột biến đồng hợp tử I172N, có hai bệnh nhân có mang kiểu hình thể NHĐT và 1 có kiểu hình thể mất muối, kết quả này của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu Krone. N, năm 2000 ở Đức của 155 bệnh nhân TSTTBS trong đó dạng đột biến p.I172N có tỷ lệ: 19,7%, đột biến cho hai kiểu hình nam hóa đơn thuần hoặc mất muối.

4.3 CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH CHO THAI PHỤ ĐÃ CÓ CON BỊ BỆNH TSTTBS THỂ THIỂU 21-OH

Chẩn đoán trước sinh là một trong những biện pháp phòng bệnh di truyền có hiệu quả. Bệnh TSTTBS sẽ được phát hiện sớm từ trong thai. Bệnh điều trị được bằng thuốc dexamethasone khi còn trong thai. Nếu chẩn đoán trước sinh thai nhi bị bệnh là gái sẽ tiến hành điều trị ngay, sau khi trẻ sinh ra tiếp tục điều trị sớm theo phác đồ để kết quả điều trị đạt được hiệu quả cao và tránh phẫu thuật chỉnh hình cho bệnh nhân gái sau sinh.

Khoa NT-CH-DT Bệnh viện Nhi Trung ương đã thành lập câu lạc bộ “Bệnh TSTTBS” hơn 16 năm nay. Tại các buổi sinh hoạt của câu lạc bộ “Bệnh TSTTBS” được tổ chức hàng năm ở Bệnh viện Nhi Trung ương, các gia đình bệnh nhân TSTTBS đều được giải thích rõ về bệnh của con họ. Các phương pháp điều trị và chăm sóc, cách phát hiện các biến chứng của bệnh cho trẻ. Đồng thời giải thích cách di truyền bệnh trong gia đình cho các thế hệ con cháu tiếp theo của họ. Từ sự hiểu biết đó họ sẽ tự nguyện hợp tác với bác sĩ trong việc tuân thủ điều trị cho trẻ bị bệnh, hợp tác tham gia xét nghiệm phát hiện người lành mang gen bệnh và chấp nhận chẩn đoán trước sinh khi mẹ bệnh nhân có thai tiếp theo. Hoặc những thành viên khác của gia đình là người lành mang gen bệnh xây dựng gia đình khi họ mang thai. Trong thời gian 3 năm, chúng tôi tư vấn di truyền cho các thành viên của 56 gia đình, mới tiến hành chẩn đoán trước sinh cho 12 thai phụ có mang gen dị hợp tử, có nguy cơ cao sinh con bị bệnh. Trong nghiên cứu của chúng tôi 12 người đều là mẹ bệnh nhân có thai con tiếp theo. Còn số chị em gái không có vì đang còn bé tuổi. Số lượng các mẹ và chị, em gái của bệnh nhân được phân tích gen 65 trong đó có 56 bà mẹ, số lượng này vẫn còn ít cần tiếp tục với số lượng lớn hơn.

Kết quả phân bố kiểu gen của thai nhi và gia đình, có 12 thai phụ được chẩn đoán trước sinh có 1 thai phụ được chẩn đoán 2 lần, 13 thai nhi đã được xét nghiệm gen, trong đó có 8 thai nhi mang gen đột biến dạng dị hợp tử và 2 thai nhi bị bệnh, 3 thai nhi hoàn toàn bình thường. Hai thai nhi mang đột biến đồng hợp tử p.R356W và 6 thai nhi mang đột biến dị hợp tử xóa đoạn, 1 đột biến p.I172N và 1 đột biến dị hợp tử kép 2 đột biến điểm trên cùng 1 alen (p.Q318X & R356W). Đây là dạng đột biến hay gặp ở bệnh nhân Việt Nam và trên thế giới.

Trong nghiên cứu này của chúng tôi chỉ có 2 thai nhi con của một bà mẹ được chẩn đoán bệnh TSTTBS, trong đó có 1 thai nhi là gái. Vì gia đình đã có 1 con bị bệnh nên cả hai lần gia đình đều quyết định đình sản. Do đó chúng tôi không có trường hợp nào để điều trị trước sinh cho thai nhi gái. Trong số 8 thai nhi là dị hợp tử và 3 thai nhi bình thường hoàn toàn có 2 trẻ sau sinh có điều kiện kiểm tra lại đột biến gen đều phù hợp với chẩn đoán trước sinh. Các trẻ khác đều bình thường hoàn toàn nên gia đình không cho đến kiểm tra lại.

Sinh ra một người con bị bệnh TSTTBS là một gánh nặng rất lớn về kinh tế, nhất là các gia đình có hoàn cảnh khó khăn. Phải theo đuổi điều trị suốt đời cho con họ. Hơn nữa nó còn gây một gánh nặng về tâm lý cho bệnh nhân và gia đình. Do đó yêu cầu đặt ra cho chúng ta là phải thực hiện một cách tích cực biện pháp phòng bệnh chủ động bằng phát hiện người lành mang gen bệnh và thực hiện triệt để chẩn đoán trước sinh chứ không phải để họ sinh ra con bị bệnh rồi chúng ta mới điều trị. Đó cũng là nguyện vọng của chúng tôi khi tiến hành đề tài nghiên cứu này .

KẾT LUẬN

Trong thời gian 3 năm nghiên cứu, có 130 thành viên của 56 gia đình bệnh nhân bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH được phân tích gen và chẩn đoán trước sinh cho 12 thai phụ là người mang gen dị hợp tử trên gen *CYP21A2* cho kết quả:

1. Kết quả phát hiện đột biến gen của người lành mang gen bệnh cho các thành viên 56 gia đình bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH do đột biến gen *CYP21A2* :

Có 9 loại đột biến được tìm thấy gồm đột biến xóa đoạn và 8 loại đột biến điểm. Trong đó đột biến điểm I2g, p. R356W và đột biến xóa đoạn là hay gặp:

- 56 người mẹ (100%) đều là dị hợp tử mang gen bệnh *CYP21A2* với các đột biến: I2g: 33,8%, xóa đoạn: 30,4%, p.R356W: 16,1%, p.I172N: 10,7%, p.R426C: 3,6%, p.Q318X: 1,8%, 1763insT: 1,8%.

- 54 người bố (98,2 %) là dị hợp tử mang gen bệnh *CYP21A2* với các đột biến: I2g: 35,7%, xóa đoạn: 25%, p.R356W: 23,2%, p.I172N: 5,4%, p.R426C: 3,5%, p.Q318X: 5,4%, p.W19X: 1,8%, p.S125X: 1,8%. Có 1 người bố chưa phát hiện được đột biến.

- 19 anh, chị, em của bệnh nhân: có 73,7% dị hợp tử mang gen *CYP21A2* với các đột biến: I2g: 64,3%, xóa đoạn: 21,5%, p.R356W: 7,1%, p.I172N: 7,1% và 26,3% không mang gen bệnh là người bình thường hoàn toàn.

2. Kết quả chẩn đoán trước sinh cho thai phụ mang gen dị hợp tử *CYP21A2*

Chẩn đoán trước sinh cho 12 thai phụ mang gen dị hợp tử *CYP21A2* ở tuần thai 14-16 đã phát hiện: đột biến xóa đoạn và 3 loại đột biến điểm ở thai nhi. Có 2 thai nhi bị bệnh với đột biến đồng hợp tử p. R356W. Có 8 thai nhi mang gen dị hợp tử gồm; 6 thai nhi mang đột biến xóa đoạn, 1 thai nhi mang đột biến p.I172N và đặc biệt có 1 thai nhi mang dị hợp tử kép với 2 đột biến điểm p.Q318X & R356W. Có 3 thai nhi bình thường hoàn toàn.

KHUYẾN NGHỊ

1. Cần sớm phát hiện người lành mang gen bệnh trong các gia đình bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH để có kế hoạch quản lý, theo dõi và tư vấn di truyền.
2. Giáo dục cho cộng đồng về sự nguy cơ cao truyền bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH nếu kết hôn cùng huyết thống hoặc ở các quần thể cô lập, để tránh sinh con bị bệnh.
3. Hướng dẫn gia đình hợp tác với bác sĩ trong việc điều trị cho bệnh nhân và phát hiện người lành mang gen bệnh cho tất cả thành viên các thế hệ của hai bên nội ngoại để tư vấn di truyền tiến tới chẩn đoán trước sinh cho những cặp vợ chồng là hai dị hợp tử để phát hiện bệnh sớm, điều trị sớm tránh tử vong hoặc tàn tật cho trẻ.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGÔ THỊ THU HƯƠNG

PH, T HIỒN NG|êI LμNH MANG GEN sÉT BIỐN CYP21A2 Vμ
CHÈN sO,N TR|íc SINH BỒNH T;NG SμN TH|íNG THỀN
BỀM SINH THỐ THIỔU ENZYM 21- HYDROXYLASE

Chuyên ngành : Nhi khoa

Mã số : 62720135

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2015

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

**Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Trần Văn Khánh
2. PGS.TS. Nguyễn Phú Đạt**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

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

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2015

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội
- Thư viện Thông tin Y học Trung ương

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

1. Ngô Thị Thu Hương, Trần Văn Khánh, Nguyễn Việt Tiến, Nguyễn Phú Đạt, Tạ Thành Văn (2013). Xác định đột biến gen và phát hiện người lành mang gen bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase. *Tạp chí nghiên cứu Y học tập 82(2), trang 187-194.*
2. Ngô Thị Thu Hương, Trần Văn Khánh, Nguyễn Việt Tiến, Nguyễn Phú Đạt, Tạ Thành Văn (2013). Chẩn đoán trước sinh bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase. *Tạp chí nghiên cứu Y học tập 82(2), trang 194-200.*

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (Congenital Adrenal hyperplasia - CAH) is a disease of the endocrine genetics. CAH is an autosomal recessive disorder of the genes located on the short arm of chromosome 6, caused by deficiency for one of the five steroidogenic enzymes involved in cortisol biosynthesis accounts for about 90-95% of all CAH cases. CAH has been traditionally divided into three forms; severe salt wasting (SW), less severe simple virilizing (SV) and asymptomatic non – classic (NC) form.

CAH follows the rules of Mendel, of which heterozygous carriers having normal phenotype, but when getting married and giving birth, can transmit a 25% chance of having the CAH and a 50% chance of having mutation gene to their children. In the population, neonatal screening suggests the incidence of CAH cases is approximately 1 / 14,000, however the incidence of heterozygous carriers is very high, approximately 1/60-1/83. The danger of CAH is the ability to transmit mutation of gene *CYP21A2* from generation to generation, which will increase the rate of infection in the population.

Currently, the most effective method of prevention is genetic counseling. The early detection of the disease gene carriers and prenatal diagnosis reinforce early treatment for fetus. For female fetus, early treatment will take place during pregnancy and after birth in order to help inhibit virilization and avoid genitalia reconstruction surgery after birth. For male fetus carrying CAH, treatment can be conducted immediately after birth to avoid adrenal insufficiency level attacks and bring the normal development to children. There have been many studies on CAH cases announced, but these researches mainly focused on the analysis of the clinical features, laboratory, genetic characteristics, treatment, *CYP21A2* gene mutations. Meanwhile, researches on heterozygous carriers and prenatal diagnosis for CAH are very limited.

Stemming from the practical significance, we conduct the research topic: "Detecting carriers *CYP21A2* gene mutations and prenatal diagnosis of congenital diseases can increase the upper 21-hydroxylase enzyme deficiency"

2. Objectives of the study

1 / Detection of heterozygous carriers among family members with CAH due to 21-hydroxylase deficiency.

2 / Prenatal diagnosis for heterozygous carrying women with CAH due to 21-hydroxylase deficiency and genetic counseling.

3. Practical significance and contribution of the study

The findings of the study including the detection of the mutation in the patient's relatives such as parents, siblings to find out who carry genetic diseases; and the prenatal diagnosis in gene carriers to early detect the ability of infection in children are the new contributions to the field of endocrine genetic disease in our country. This is a study of both scientific and humane meaning.

3.1. Detection of gene mutation carriers will help manage and consult about prenatal diagnosis for women at high risk. *CYP21A2* gene mutations detection in patients is an essential basis to test the gene mutation for the other members of the family. The detection of heterozygous carriers is an evidence for genetic counseling in order to prevent the marriages between heterozygous carriers and inbreeding marriages which can increase the incidence of disease.

In comparison with the results of previous studies conducted in the National Hospital Pediatric, this study has discovered seven new mutations in the patient's parents. This can be considered as a new contribution of the author.

3.2. This is the first research on prenatal diagnosis of CAH due to 21-hydroxylase deficiency in Vietnam. Prenatal Diagnosis helps early diagnose sick female fetus, hence conduct prenatal treatment plan to prevent genital abnormalities as early as the first week of pregnancy. In case of sick male fetus, the treatment will take place immediately after birth. Thus, the disease is detected early, avoiding the adrenal crises, leading to death for infants immediately after birth.

Prenatal diagnosis using amniocentesis technique in 12 pregnant women with heterozygous gene results in: 3 normal fetuses, 2 fetuses with CAH and 8 heterozygous carrying fetuses

2 fetuses CAH due to 21-OH deficiency with mutant p.R356W, 8 fetuses was heterozygous with deletion, p.I172N, Q318X & R356W and 3 fetuses was normal. Although the number of fetuses diagnosed is not much, this is the result of the application of new techniques, modern molecular genetics; sequencing and MLPA in prenatal diagnosis.

4. Structure of the thesis

The thesis has 100 pages. Apart from the introduction and conclusion, the thesis consists of four chapters: Chapter 1: Overview of the Research, 32 pages; Chapter 2: Objectives and Methodology, 13 pages; Chapter 3: Results of the research, 32 pages; Chapter 4: Discussion, 17 pages. The thesis has 12 tables, 3 graphs, 46 pictures, 90 references (9 Vietnamese, English 81).

Chapter 1

OVERVIEW

1.1. Characteristics of the disease CAH due to 21-hydroxylase deficiency

1.1.1 Definition: CAH due to 21-hydroxylase deficiency is an autosomal recessive genetic disorder on the short arm of chromosome 6. The disease is caused by mutations in the *CYP21A2* gene encoding the steroid 21-hydroxylase enzyme. 21-hydroxylase deficiency causes inadequately synthesized cortisol. Disease signs include: premature pubarche in children, severe cystic acne, hirsutism, and oligomenorrhea in young women, shock and severe hyponatremia are much more likely in CAH, hyperkalemia, hyperreninemia and hypovolemic.

1.1.2. Pathophysiological mechanisms

Metabolism of cholesterol forming aldosterone, cortisol and testosterone, 21-OH enzyme which catalyzes the conversion of progesterone into deoxycorticosteron the 11- and 17-hydroxyprogesteron desoxycortisol and finally cortisol and aldosterone synthesis. When the *CYP21A2* gene mutations cause the enzyme 21-OH deficiency leads to decreased levels of two hormones in the body. At the same time increases the precursor progesterone and 17-OHP leads to increased androgen synthesis. In girls by increasing testosterone inhibits the development of the ovaries and cause of male genital organs such as clitoral hypertrophy expression immediately after birth. In boys cause early puberty author. The disease can cause increased muscle development in both sexes.

1.1.3 Location, structure, function *CYP21A2* gene

The gene encoding 21-hydroxylase, *CYP21A2* is located in the HLA class III region on the short arm of chromosome 6p21.3. system. The *CYP21A2* gene and *CYP21A1P* pseudogene each contain 10 exons spaced over 3.0Kb, their nucleotide sequences are 98% identical in exons and approximately 96% identical in introns.

Intergenic recombinations are responsible for 95% of the mutations associated with 21-hydroxylase deficiency. Among the intergenic recombinations, approximately 75% is represented by mutations normally present in the pseudogene and possibly transferred to the functional gene by microconversion events. The remaining 20-25% of mutations are *CYP21A2* gene deletions or *CYP21A1P/CYP21A2* chimeric genes

1.1.4 The types of mutations in the CYP21A2 gene

Most of the mutant alleles in *CYP21A2* are generated by recombinations between the pseudo and active genes. More than 100 mutations have been catalogued; these include point mutations, small deletions, small insertions, and complex gene rearrangements that affect 21-OH enzyme activity to varying extents ranging from mild to severe loss of function.

1.1.5. The clinical and diagnostic

Classic simple virilizing: Boys with precocious puberty fake penis fast, pubic hair, caviar, deep voice, increased bone ... age, low height in adulthood. In girls, the clitoris to like penises, big lips stick together, the orifice beneath the clitoris, and there are signs of better men later: high fast, pubic hair, armpit hair, acne, muscle development ... looks male, not developing breast and ovarian disorders of menstruation or amenorrhea. Classic salt wasting: children with chronic dehydration, weight gain, vomiting, anorexia and not feeding associated with severe electrolyte disturbances may lead to circuit failure and death. 17-OHP test and increase testosterone. Electrolyte disorders hyponatremia, hyperkalemia. Found *CYP21A2* gene mutations.

1.2 Heterozygous carriers

1.2.1. Genetic disease characteristics

CAH follows the rules of Mendel, of which heterozygous carriers having normal phenotype, but when getting married and giving birth, can transmit a 25% chance of having the CAH and a 50% chance of having mutation gene to their children. There is the equal rate between male and female. In the population, neonatal screening suggests the incidence of CAH cases is approximately 1/14,000, however the incidence of heterozygous carriers is very high, approximately 1/60-1/83. The danger of CAH is the ability to transmit mutation of gene *CYP21A2* from generation to generation, which will increase the rate of infection in the population.

1.2.2 Heterozygous carrier detection methods

- Use the genetic family diagram analysis.
- Biochemical method for family members: 17-OHP quantitative increase in the heterozygous carriers after ACTH stimulation test.
- Molecular biology tests to detect *CYP21A2* mutation gene.

1.2.3 Heterozygous carrier management and counseling

Medical report of the patient and family members is recorded in genetic counseling office. The medical information is a strong evidence for genetic doctors to counsel about re-marriage, prenatal diagnosis for women who have high risk in giving birth, and have treatment plan.

1.3 Prenatal diagnosis for CAH

1.3.1 Indication

- + The couple was identified as heterozygous *CYP21A2* gene.
- + Wife or husband is detected with CAH and the other is heterozygous carrier.
- + The pregnant women had children with CAH need prenatal diagnosis for next pregnancy.

1.3.2 The prenatal diagnosis methods

Fetal cells are needed to detect for DNA extraction before prenatal diagnose, then use DNA for molecular genetic analysis.

- Amniocentesis under ultrasound method: 15-18 weeks in pregnancy, amniotic fluid extraction approximately 10-15ml. The risk of miscarriage is <1%.

- Chorionic villus sampling method: 9-12 weeks in pregnancy, the risk of miscarriage is about 2-3%. This method will detect CAH earlier but is not applied widely in Vietnam right now.

- Molecular biology techniques: using two techniques:

+ Sequencing technique helps to detect gene mutations directly, and can detect all mutations on *CYP21A2* gene.

+ MLPA technique: to detect the deletion mutation, impairment mutation, or transferring mutation on *CYP21A2* gene. This technique provides accurate and fast results.

1.4 The CAH researching situation in Vietnam

CAH is researched for a long time in Vietnam. In 2010, Vo Kim Hue has researched and announce the first time about mutation *CYP21A2* in exon 6. In 2001, Thai Thien Nam kept researching about mutation *CYP21A2* gene and researched initially about heterozygous carriers among family members. In 2007, Tran Kiem Hao relaised 3 more spot mutation and deletion mutation in patients and family members. However, Thai Thien Nam and Tran Kiem Hao researched at small quantition (< 5 families) and used PCR techique. This techique detected only 3 families having *CYP21A2* mutations. Prenatal diagnosis for CAH is researched in Vietnam yet.

Chapter 2

OBJECTS AND RESEARCHING METHODS

2.1. Object

Objective 1: 130 family members (including father, mother, siblings... of the CAH patient who have founded *CYP21A2* mutation, is treating in Endocrinology - Metabolism – Genetics Department – National Hospital of Pediatric)

Objective 2: 12 pregnant women who are heterozygous carriers, had CAH children, and want to have prenatal diagnosisa for subsequent pregnancy.

2.2. Location and time

Research at:

- Endocrinology-Metabolism-Genetics Department–National Hospital of Pediatric.
- Center for Gene and Protein Research - Hanoi Medical University.
- Prenatal Diagnostic Department–National hospital of obstetrics and gynecology.

Time: three years from September 2011 to September 2014.

2.3 Research Methodology

2.3.1.Design Research: prospective study, cross-sectional descriptive.

2.3.2.Template: Utility; all family members including father, mother, siblings of 56 patients who are eligible to be detected. All patients' mothers with subsequent pregnancies.

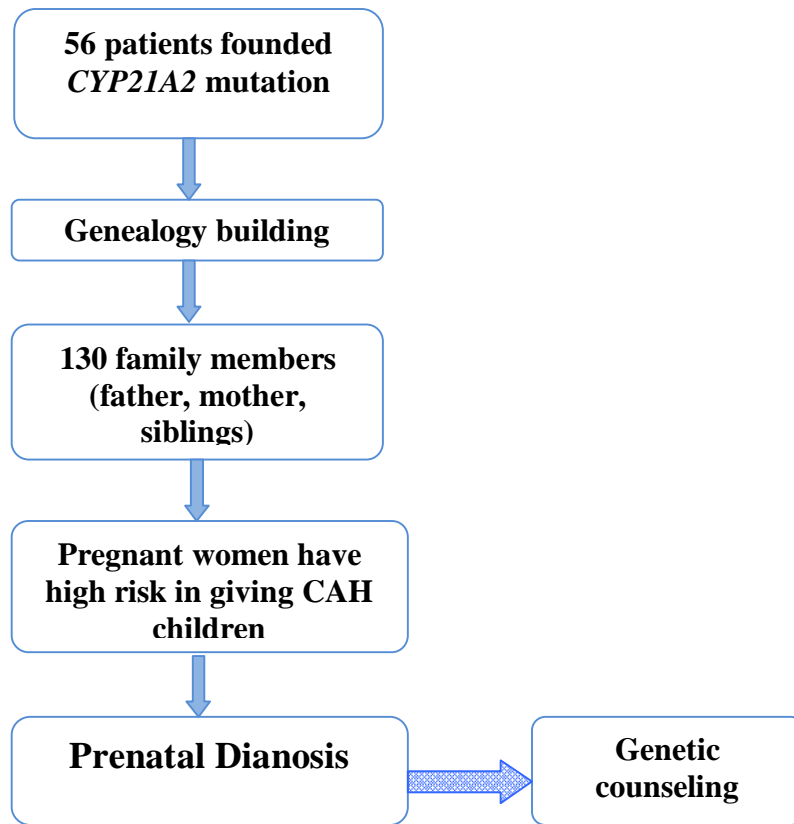


Figure 2.1. Researching diagram

2.3.3 Clinical research methodology and molecular genetic technique: objectives 1

- CAH patients characteristics: age, gender, physical illness.
- Genealogy family for at lease 3 generations.
- Family members: father, mother, siblings...are checked, counseled, and taken blood to analize and find *CYP21A2* mutations by MLPA and sequencing technique.
- When having mutation results, heterozygous carriers in family are counseled about genetic then are managed when necessary.

2.3.4. Methods of clinical studies, amniocentesis and molecular genetic techniques: Object2

- + Each pregnant woman has private medical report: age, fetal age when diagnosed before birth.
- + Use amniocentesis method to get amniotic fluid, then rasaise amniotic cell and extract DNA. Using genetic sequencing and MLPA techniques to identify mutations in the *CYP21A2* gene for the fetus.

+ Announce results after analysing for fetal's parents. If the fetal gets disease, the doctor will explain for them to choose the treatment.

2.4. Data Analyzing: use EPIDATA 3.1. programme to analyze data.

2.5 Ethical Issues in Researching

Research subject follows ethical rules. The family members voluntarily participated in the research and are kept medical information for counseling. The information of each family will be guaranteed confidentiality.

Chapter 3

RESEARCHING RESULT

130 members of 56 families having CAH children and prenatal diagnosis for 12 pregnant women having heteozygous provide following results:

3.1 Researching characteristics

3.1.1 Distribution age and gender of the 56 patients with CAH due to 21-OH deficiency.

Table 3.1. Distribution gender and age of the patient

Ages	Man		Female		Total	
	n	%	n	%	n	%
< 1 age	19	63,3	12	46,2	31	55,4
1 to 5 age	8	26,6	10	38,4	18	32,1
>5 age	3	10,1	4	15,4	7	12,5
Total	30	100	26	100	56	100

Groups of children under 5 years old accounts for 87.5%; 5-year-old age group accounts less than 12.5%, in which the oldest child is 9 years old. Male patients have higher ratio in compare with female: 53.6%. The gender difference is not significant ($p > 0.05$).

3.1.2 Ditributation phenotypes of 56 patients with CAH due to 21-OH deficiency

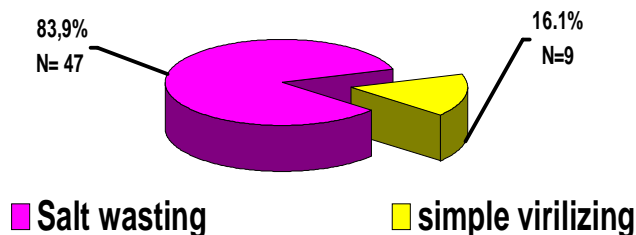


Figure 3.1. Distribution of patients to clinical research

Salt wasting patients are more common with 83.9%, simple virilising accounts lower with 16.1%. There is not non-classical form.

3.1.3. Distribution of genotypes of 56 patients with CAH due to 21-OH deficiency

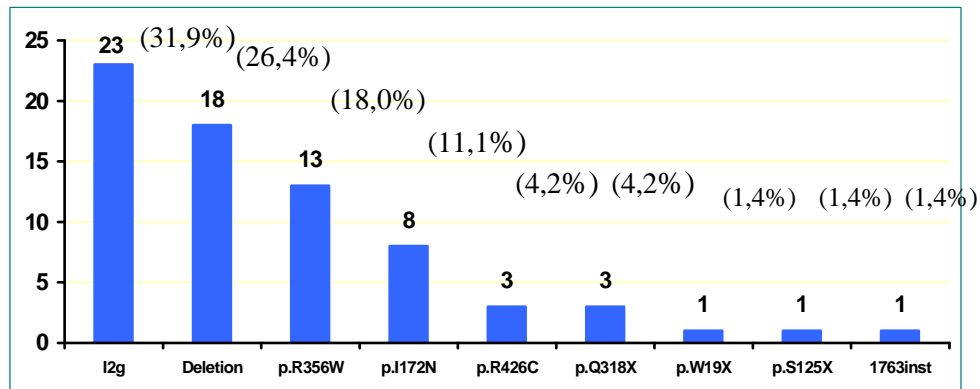


Chart 3.2. Plan type genotype patients

Point mutation in intron 2 (I2g) accounts for the highest percentage: 31.9%, delete mutation: 26.4% and p.R356W: 18.0%.

3.1.5. Distribution of patients' family members

Table 3.2. The patients' family members

The patients' family members	n	%
Father	55	42,3
Mother	56	43,2
Older Brother	5	3,8
Older Sister	6	4,6
Younger brother	5	3,8
Younger sister	3	2,3
Total	130	100

130 family members are analyzed genes include: 56 mothers and 55 fathers account for 85.5,% percentage (1 dad was dead). Siblings are 19 people (14.5%) are analyzed genes, including: older brother 3.8%, older sister: 4.6%, younger brother: 3.8 %, younger sister: 2.3%.

3.1.5. Age distribution of the parents

Table 3.3. Age distribution of the parents when tested

The patients' family members	n	Medium age
Father	55	32,6±5,3 years old
Mother	56	29,8±6,7 years old
Total	111	

The parents of patients of childbearing age. Average age of father is 32.6 ± 5.3 years old. The highest age is 38 and the youngest 22-year-old. The average age of the mother: 29.8 ± 6.7 years old, the highest age is 37 year and youngest age is 21 years old.

3.1.6. Dianosis characteristics of pregnant women before giving birth

There are 12 pregnant women are diagnosed before giving birth. These women had children with CAH and have heterozygous, and is at subsequent pregnancy.

Table 3.4. Age characteristics of maternal and fetal

The members of family of patients	n	Medium age
Pregnance woman	12	32,9 ± 3,4 years old
Fetus	13	16,3 ± 1,5 weeks

Average age for prenatal diagnosis is 32.9 ± 3.4 years, in which the highest age is 37 and yougest age is 23.

The average age of the fetal when amniocentesis is 16,3 weeks.

3.2 The results of objective 1

We use genetic sequencing and MLPA techniques to detect deletion mutation and 8 point mutations of 55 fathers and 56 mothers and 19 siblings.

3.2.1 Results of gene analysis for patients' parents

Table 3.5. The proportion of the CYP21A2 gene mutations in parents' patients

STT	Mutations genes	Father(n)	%	Mother (n)	%
1	I2g	20	35,7	19	33,8
2	Deletions	13	25,0	18	30,4
3	p.R356W	13	23,2	9	16,1
4	p.I172N	3	5,4	6	10,7
5	p.R426C	2	3,5	2	3,6
6	p.Q318X	3	5,4	1	1,8
7	p.S125X	1	0	0	1,8
8	p.W19X	1	1,8	0	0
9	c.1763insT	0	0	1	1,8
	Total	56	100	56	100

There are 55 fathers have analyzed gene, in which I2g mutation accounts for the highest ratio 20/56 (35.7%), deletion mutation 25%, 01 father is not identified, 02 fathers have 2 mutation genes in one allele: p.Q318X and p.R356W. There are 56 mothers are analyzed, in which I2g mutation accounts for the highest ratio 19/56 (33.8%), deletion mutation 30.4%.

3.2.2. The genetic analysis results of patients' siblings

There are 19 siblings in this study, in which there are 4 people who do not have mutations and 1 older sister is normal pernotis but is not analysed yet. 14 people are heterozygous carriers with mutation kinds:

Table 3.6. The genetic mutation ratio of patient's siblings

No	Patient's siblings	I2g (n)	Deletion (n)	p.R356W (n)	p.I172N (n)
1	Brother	2	1	0	0
2	Sister	2	1	1	1
3	Younger brother	2	0	1	1
4	Younger sister	2	0	0	0
	Total	8	2	2	2

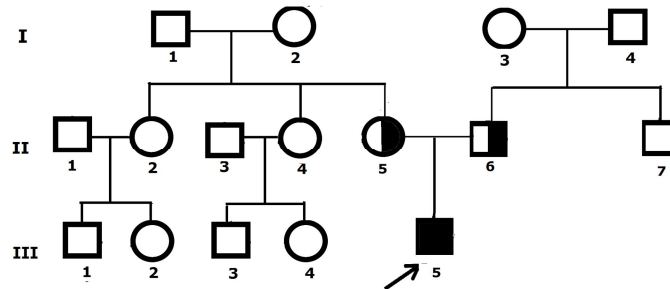
Three older brothers have I2g mutations: 2 and delete mutation: 1 person. Five older sisters have heterozygous mutation: I2g: 2, delete: 1, p.I172N: 1, p.R356W: 1. Four younger boys are heterozygous carriers: I2g: 2; p.R356W: 1; p. I172N: 1. Only 2 younger girls have heterozygous mutation I2g.

3.2.3. Genotype Mutation Illustrations

There are 9 kinds of *CYP21A2* mutations are common in this study: Point mutations: 69.6%, deletion mutation: 30.4%.

Genealogy illustrations and genotype mutations kinds by genetic sequencing technique for CAH patients' family.

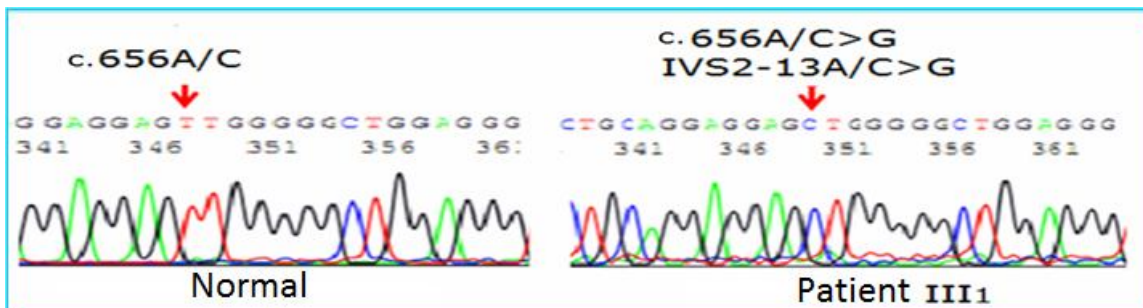
Mutation Image I2g / I2g (c.656A / C> G) of the patient's family



Hình 3.1. Genealogy of family No 01

Pedigree of no.1 family has three generations, the first and the second generation do not have the disease people. There is one 4 year-old boy has CAH on the 3rd with salt wasting and have I2g mutation. The patients' siblings who are normal phenotyp (III.1, III.2, III.3, III.4). Dad (II.6) is 27 year-old, and mother (II.5) 26 year-old are heterozygous carriers according to gentic disease rules.

Genotypes of 01 families



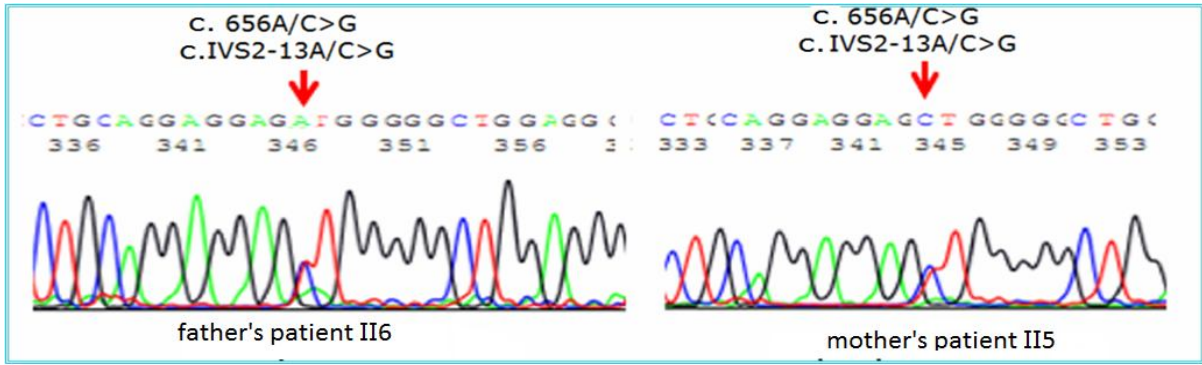


Photo 3.2. Sequence of family No 1

Genetic sequencing result show that parents are heterozygous carriers. Patients have homorozygous I2g due to receiving one mutation alen from father and one mutation alen from mother.

Deletion mutation illustration by MLPA technique in CAH patient family

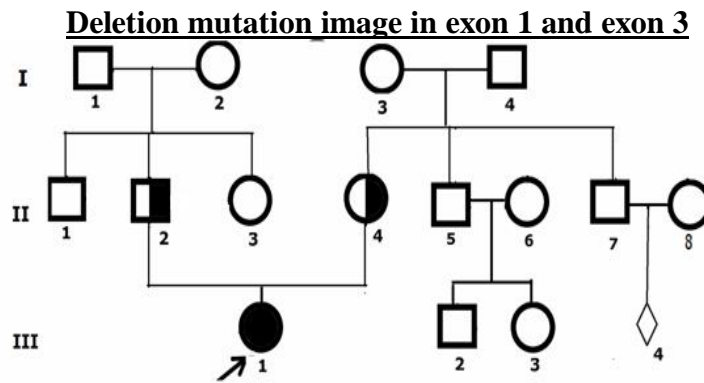
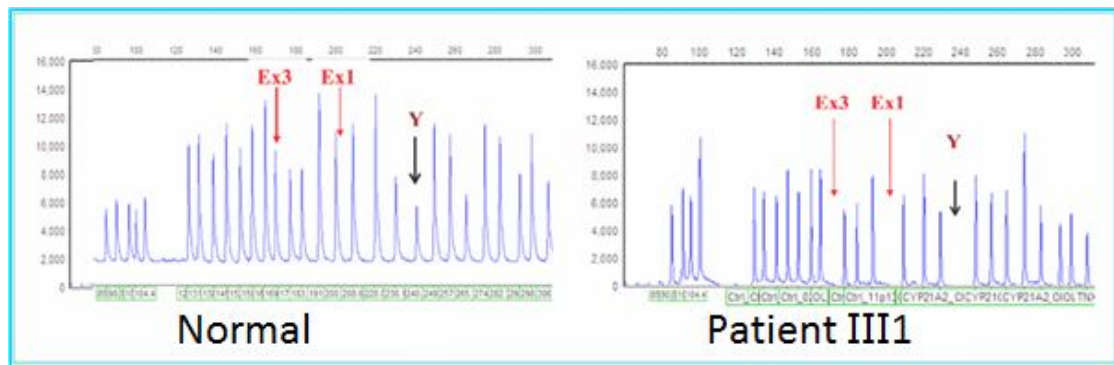


Photo 3.3. Genealogy of family No 34

Family has 8 year-old daughter with salt wasting CAH and deletion mutation at exon 1 & 3. Father is 27 year-old and mother is 25 year-old. 2 cousins are normal phernotyp. There is one cousin who are fetal at 17 weeks. In this genealogy, there is no person who has this desiease.

Type mutation genes of family No 34



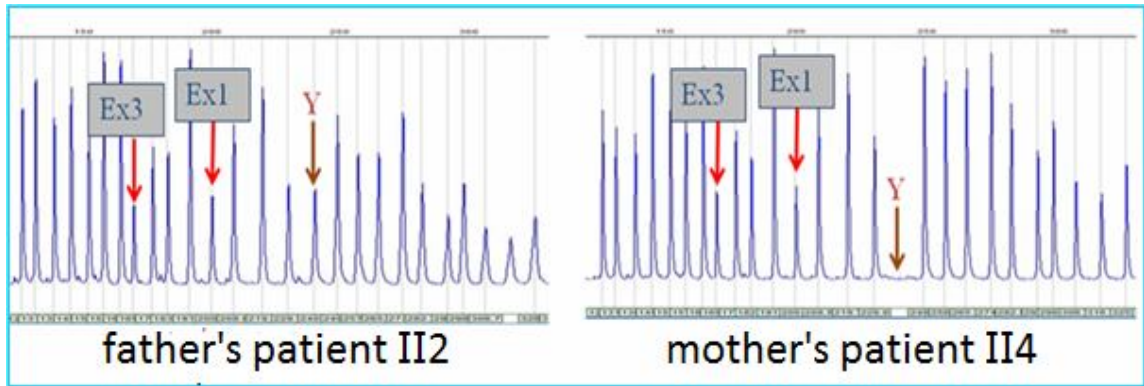


Photo 3.4. MLPA of family numero 34

Genetic analysing image shows: genetic peak high of normal people and parents is adequate; peak high of exon 1 & 3 is $\frac{1}{2}$ in compare with the normal people. It means that parents are heterozygous carriers.

Heterozygous double mutation illustration

Genealogy family S125X point turning point mutation / deletion

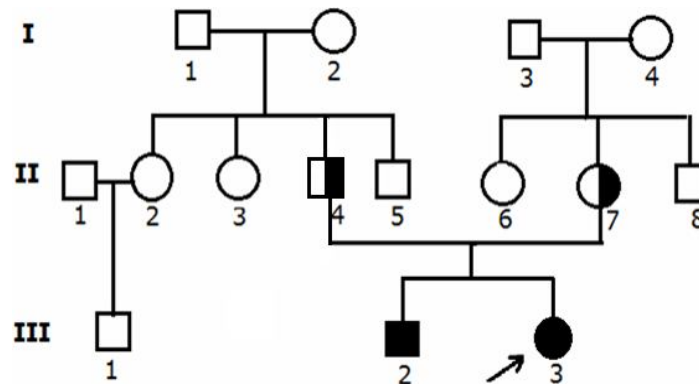
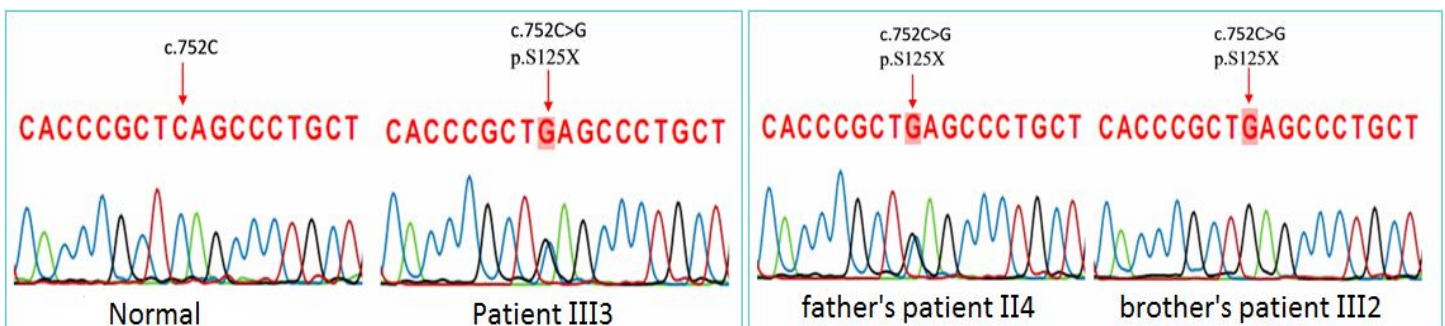


Photo 3.5. Genealogy of family No 25

The family has two children, daughter has salt wasting CAH with p.S125X and delete mutations. The older brother has the same disease and has the same gene. Parents heterozygous carriers. There is no person who has this disease in the genealogy.

Types mutation of genes family No 25



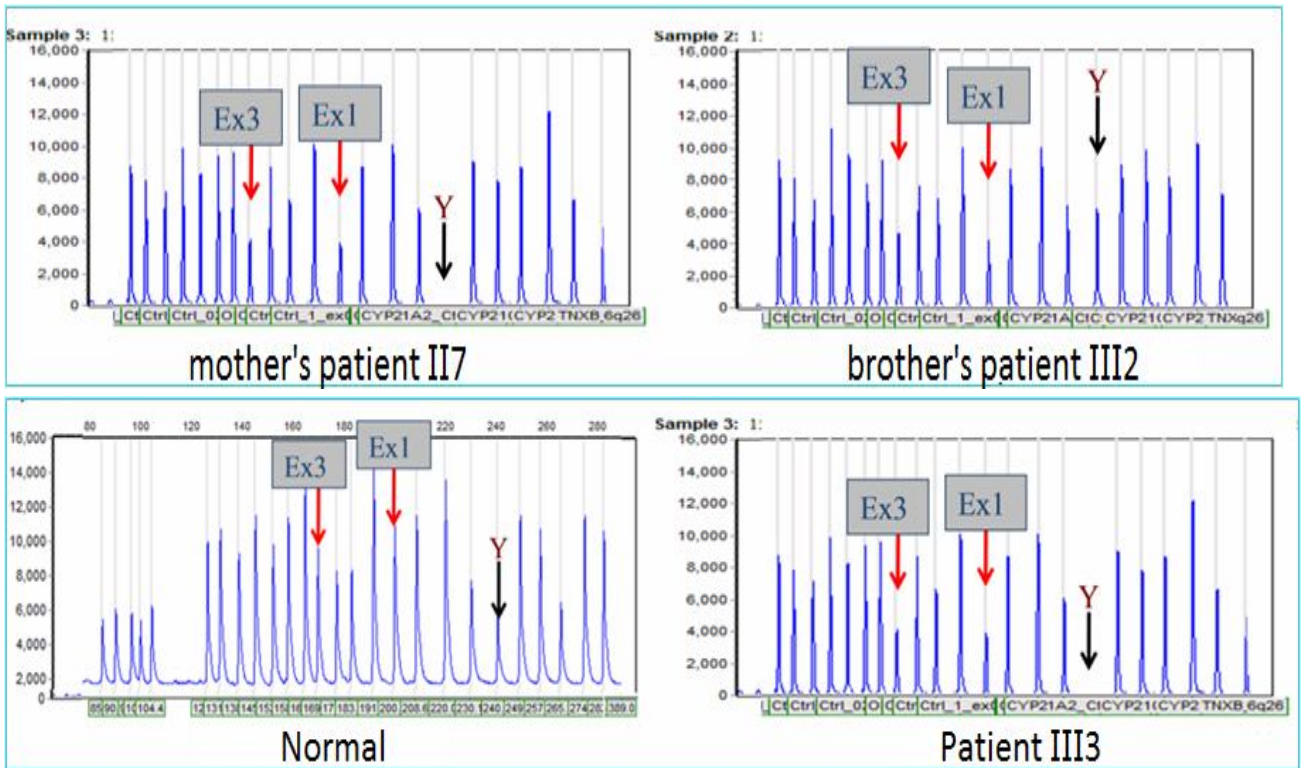


Photo 3.6. Genes of family numero 25

After genetic analyzing research, mother has deletion mutation, father has point mutation p.S125X. The parents have difference mutation cause alen muation to children, then the children get disease.

Genealogy family heterozygous mutation dual p.I2g/Q318 and p.R356W

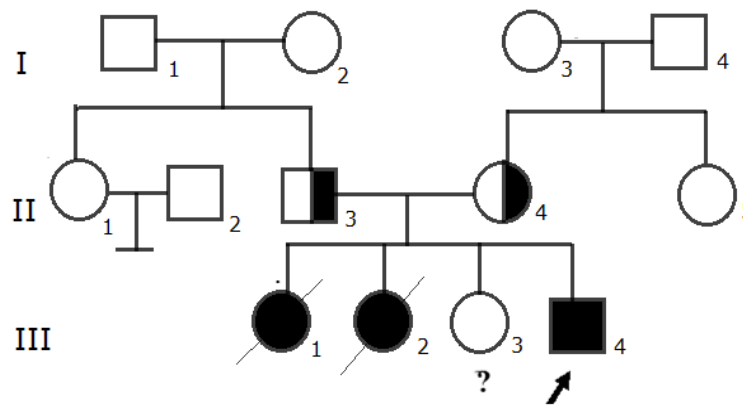


Photo 3.7. Genealogy of family No 49

Genealogy analysis in 3 generations, the first and the second generation do not have the disease people. In the thirty generation, this family has 2 daughter who has died in the neonatal period There is one 2 year-old boy has CAH on the 3rd with salt wasting and have I2g mutation and 2 mutations p.Q318X&R356W on the same allen. Parents and sister' patient are normal phenotyp (II3, II4,III.3).

Genotypes of families with mutations R356W & I2g and Q138X

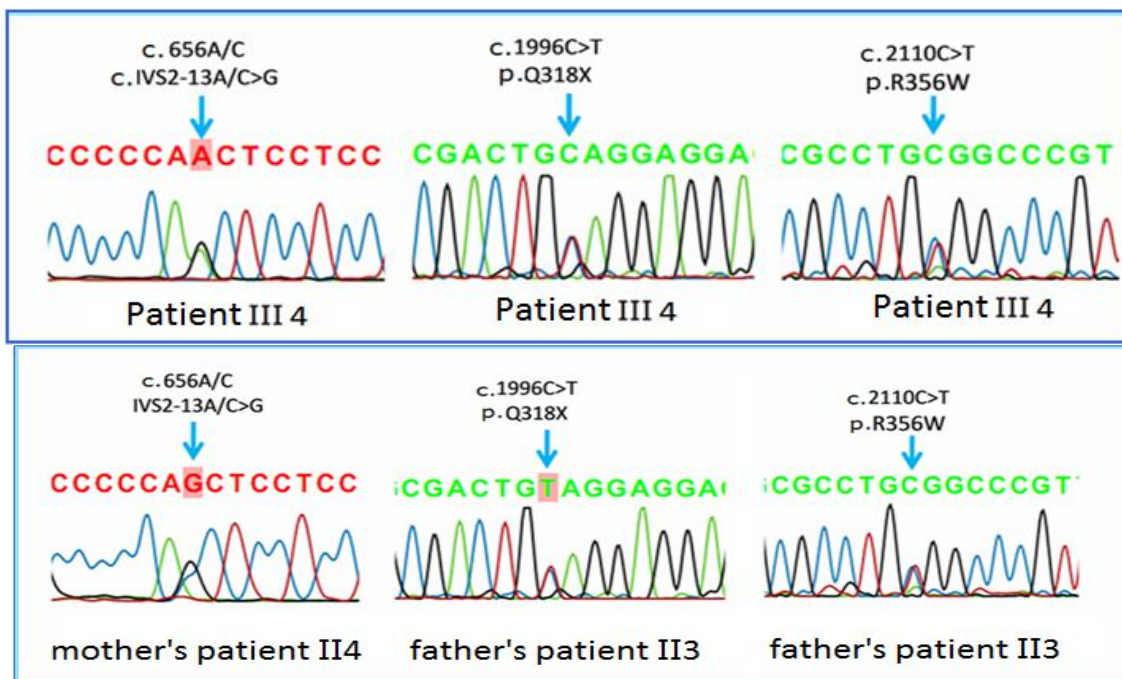


Photo 3.8. Genes of family numero 25

Analysis of gene family: mutations I2g, p.Q318X & p.R356W. Dad mutant heterozygotes and p.R356W mother p.Q318X double heterozygous gene I2g. Patients receive one allele from the father and p.Q318X and p.R356W I2g 1 allele from the mother.

3.2. Findings of the objective 2

There are 12 pregnant women who have CAH children, are counseled and diagnosed before giving birth. Diagnosis is carried when the fetal is at 15 – 16 weeks by amniocentesis method.

3.2.1 Results of the fetal gene mutations

We found deletions mutation and 3 point mutations of the fetus.

Table 3.8. Mutant genotype distribution of family and pregnancy

No	Mutations (alen)	Father (alen)	Mother (alen)	Fetus
1	I2g/I2g	I2g	I2g	Female, normal
2	p.R356W/R356W	p.R356W	p.R356W	Male. p.R356W/R356W. 2012
				Female, p.R356W/R356W. 2014
3	deletion/deletion	deletion	deletion	Male, deletion
4	I2g/1762inst	I2g	1762inst	Male, normal
5	p.R356W/deletion	p.R356W	deletion	Female, deletion

6	I2g/deletion	p.I2g	deletion	Female, deletion
7	deletion/deletion	deletion	deletion	Female, deletion
8	p.Q318X/R356W & R356W	p.Q318X & R356W	p.R356W	Male, p.Q318X & R356W
9	I2g/deletion	deletion	I2g	Male, normal
10	I2g/deletion	I2g	deletion	Female, deletion
11	deletion/deletion	deletion	deletion	Female, deletion
12	p.I172N/I172N	p.I172N	p.I172N	Male, p.I172N

After genetic analyzing for 13 fetals: 3 normal fetal, 2 disease fetals, 8 fetals have heterozygous mutations. In 8 fetals who have heterozygous mutations; 6: delete mutation, 1: p.I172N and 1 fetal has heterozygous double mutation: p.Q318X & R356W.

3.2.2. Image of family is diagnosed before birth

Prenatal diagnosis of the patient's family 06

Genealogy of the family of the 06 patients

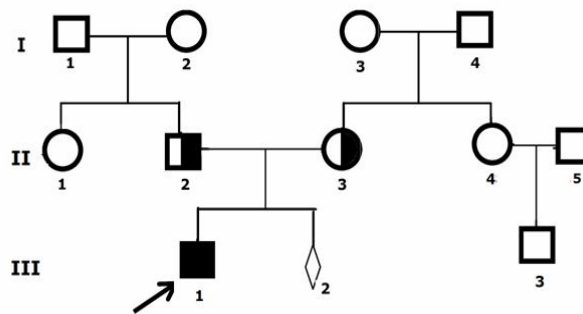
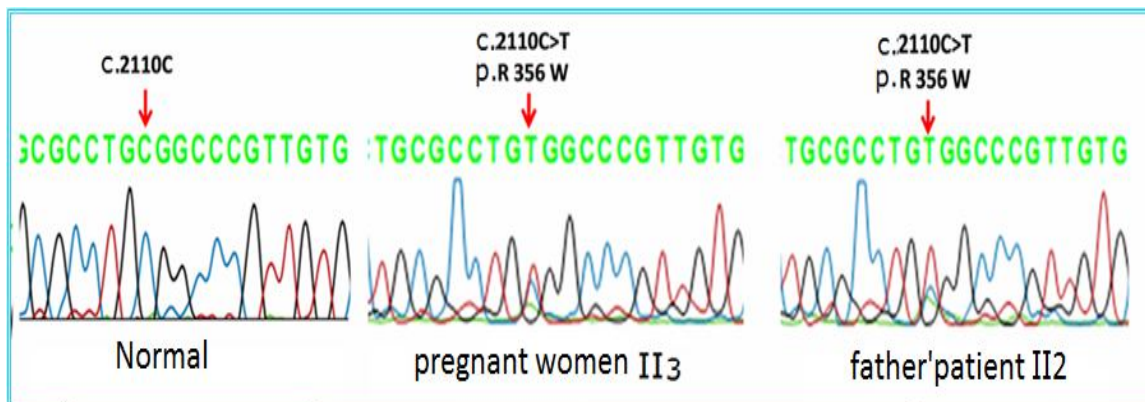


Photo 3.9A. Genealogy of family No 06, 2012

In the 3rd generation, family 1 7-year-old son took ill can CAH salt. Were identified disease genes have mutated gene CYP21A2 p.R356W / R356W. 37-year-old father, mother is 35 years old healthy people carry the gene mutation p.R356W. Family history like no one ill patients. Mother of patients are diagnosed before birth in 2012, when the fetus of 16 weeks.



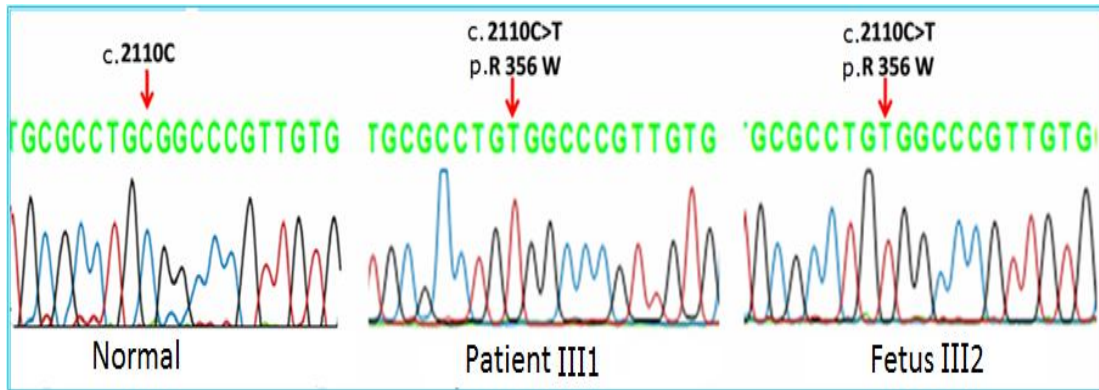


Photo 3.10A. Genes of family and fetus No 06

Analysis of gene sequencing method CYP21A2 gene and chromosome culture, the fetus is a boy, with the genotype homozygous recessive mutations p.R356W like brothers. The family has been consulting doctors, after consultation with the family, please cancel pregnant women 18 weeks pregnant.

Two years later, in 2014, she wants more children, pregnant after the age of 37 his mother was pregnant and managed in the Central Maternity Hospital. When 16 weeks pregnant, pregnant women are amniocentesis and fetal genetic analysis.

Genealogy of the Family No 06, 2014

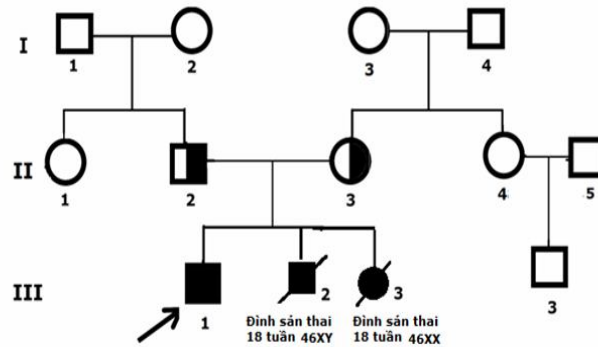


Photo 3.9B. Genealogy of family and fetus, 2014

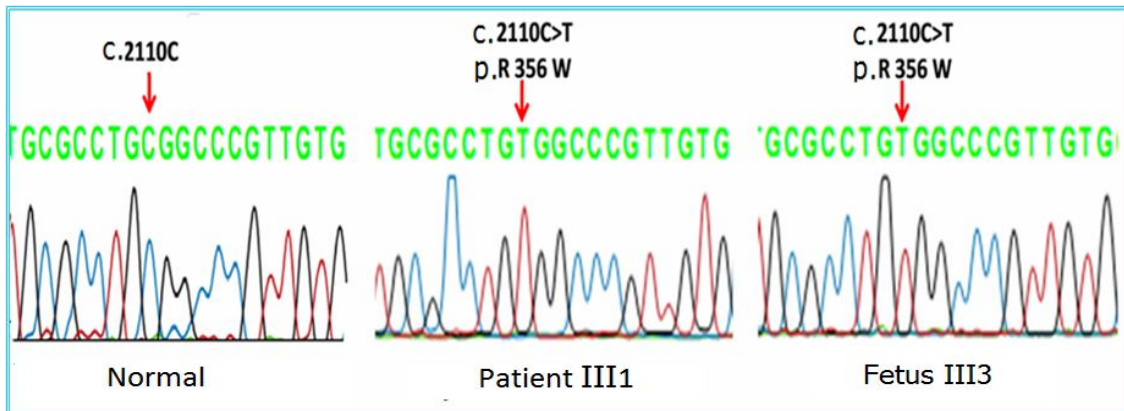


Photo 3.10B. Genes of family and fetus, 2014

Photos of the *CYP21A2* gene sequencing fetus is female fetuses but also gene homozygous mutant forms brother p.R356W same family so please suspend pregnant at 18 weeks pregnant.

Prenatal diagnosis of the patient's family 45

Genealogy of the family and baby number 45

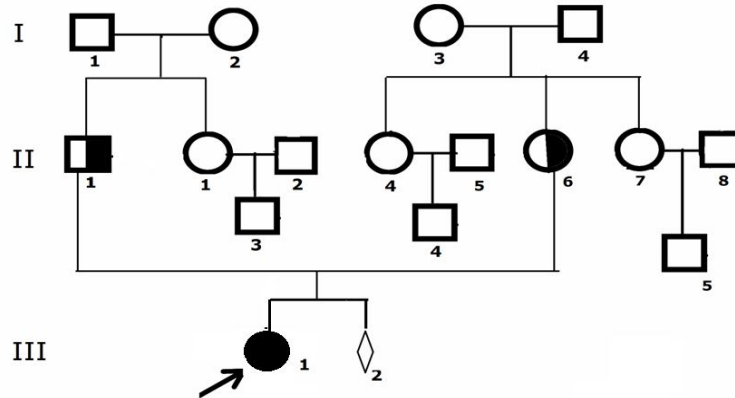
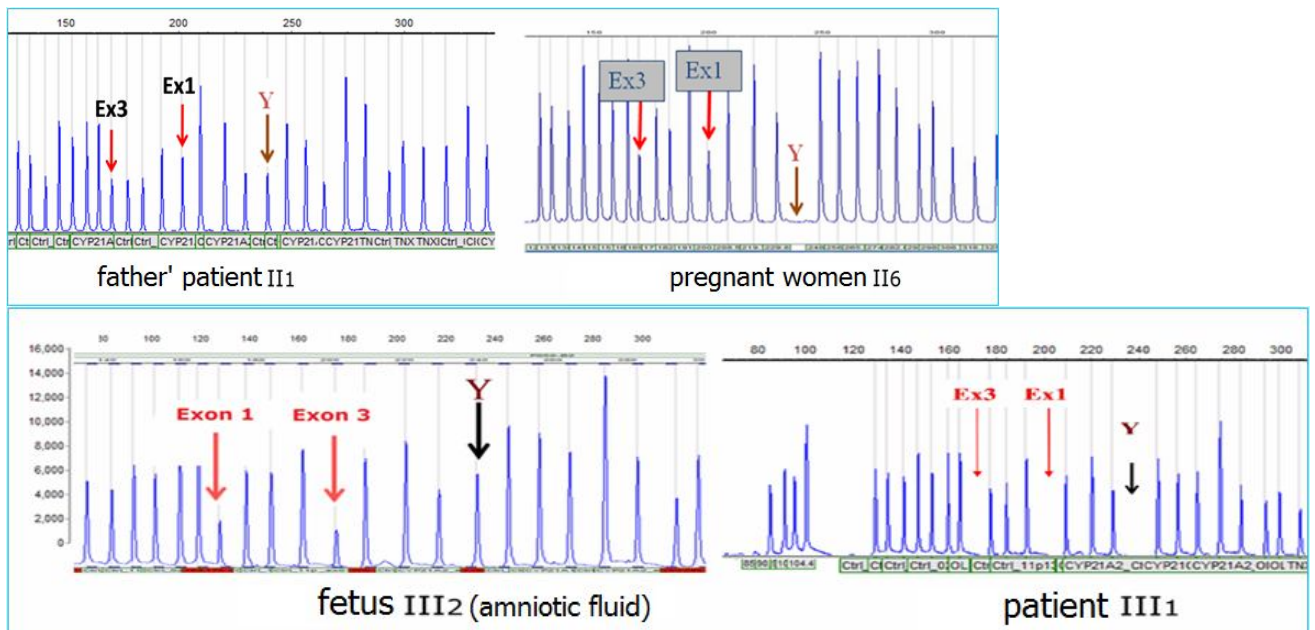


Photo 3.11. Genealogy of family No 45

In the genealogy of the family has one daughter, 4-year-old ill be missing 21-OH TSTTBS, loss of salt gene deletion mutation in exon 1 and exon paragraph 3. 33-year-old father, mother, 29, is two heterozygous gene delete the paragraph element in exon 1 and exon 3. 2nd time pregnant women, conducted prenatal diagnosis at 16 weeks pregnant.



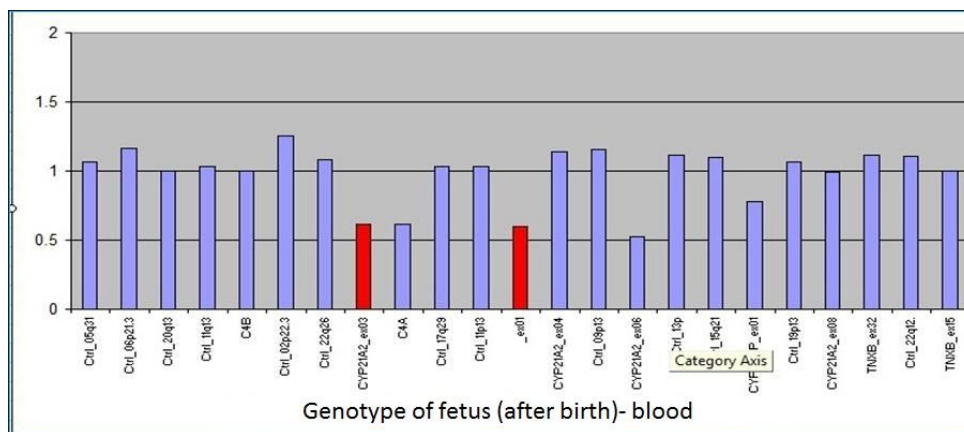


Photo 3.12. Genes of family and fetus,

Fetal genotype mutations in exon 1 and delete paragraph 3 heterozygous exon resemble parental genotypes were identified.

Chapter 4 DISCUSSION

4.1 Characteristics of the study group

The study group consists of 56 patients with CAH, in which the group of patients under 1 year of age: 55.4%; children 1 to 5 years of age: 32.1% and children over 5 years old: 12.5%. Patients in the study group are primarily under 5 years of age (87.5%), proving that TSTTBS disease was diagnosed early and treated early. The thesis analyses 56 families of patients with CAH, with genealogy at least three generations built for each family, total includes 130 members including: 56 mothers, 55 fathers (1 father passed away) and 19 siblings of patients. Age of those fathers and mothers are in the appropriate range of age. The oldest father is 38 years old; the youngest is 22 years old. The oldest mother is 37 years old, the youngest is 21 years old. Those mothers of age group under 30 is 78.6%, which is perfect age of women for pregnant. There are 19 siblings of patients, including five older brothers, five younger brothers, six older sisters, three younger sisters. The oldest among those siblings is 8 years old, and the youngest is newborns.

After analysing of gene mutations for those families of 56 patients with CAH in 3 years, the author collected the records and consulted all the family members. However, only 12 expectant mothers contacted the doctor early to receive genetic counselling and prenatal diagnosed. Neither older sister nor younger sister of patients with CAH receives prenatal diagnosed because of their young ages. Those pregnant women were prenatal diagnosed when their fetus is less than 15-16 weeks, one mother was prenatal diagnosed 2 times in 2012 and 2014.

Characteristics of patients' genotype

Characteristics of 56 patients' genotype are as follows: 41 patients with homozygous mutations and 15 patients with heterozygous mutations. The position of mutation in intron 2 (I2g) is at common rate: 31.9%, mutants deleted segment: 26.4%, p.R356W: 18.1%, p.I172N: 11.1% and the other mutations with low rate; p.Q318X, p.R426C, p.S125X, p.W19X, c.1763insT. Heterozygous mutations often show in the study are either I2g or deleted mutations combined with other point mutation. A study in Japan in 2002 found that the proportion of I2g mutations is higher than other groups:

39.8%. Another study of the United States, 2010, in California proved that homozygous mutation in intron 2 was 23.4% found in genetic analysis of 213 patients and 232 family members by gene sequencing techniques.

4.2. Results of analysing heterozygous mutations in *CYP21A2* for the family members of patients with CAH

*4.2.1. Distribution of mutations in the *CYP21A2* of family members*

More than 100 different types of mutations in *CYP21A2* have been found so far. CAH follows the rules of Mendel, of which heterozygous carriers having normal phenotype, but when getting married and giving birth, can transmit a 25% chance of having the CAH and a 50% chance of having mutation gene to their children. In the population, neonatal screening suggests the incidence of CAH cases is approximately 1 / 14,000, however the incidence of heterozygous carriers is very high, approximately 1/60-1/83. The danger of CAH is the ability to transmit mutation of gene *CYP21A2* from generation to generation, which will increase the rate of infection in the population. When the parents have heterozygous mutations, the risk of giving birth to a child with CAH will increase.

In the 130 members of the families have been analyzed, we found that the proportion of the *CYP21A2* heterozygous mutations among those family members is 95.4%, and the percentage of no mutation is 4.6%. Among those, the parents having heterozygous mutations were 84.6%, the siblings having mutations were: 10.7% and people who do not have mutations were 4.7%. A research in Macedonia, in 2010, on 51 patients and 70 family members, in which those parents with mutation *CYP21A2* is 45.6%. In our study, we have one patient carrying the homozygous mutation I2g, whose mother has heterozygous mutation I2g, but the mutation alike was undetectable in the father. In this case, we can explain that the de novo recombination may occur in the process of meiosis, during gamete formation. or the father also carries the mutation that is not detectable with current methods. In 2011, researchers in China analysed *CYP21A2* for 2 families having children with CAH, in which one family has heterozygous genes. The family has three daughters; the eldest one has CAH with p.I172N mutations, which is simple virilising. The patient received one mutant allele from the father p.I172N, other mutations such as deletion fragments, point mutations or gene conversion were not detected. The mother and 2nd sister of the patient do not have gene mutation, the youngest sister has the same p.I172N heterozygous (c.1004T> A) as the father. According to the authors, in this case, the new mutation might occur during conversion involved in the process of meiosis, during gamete formation of the *CYP21A2* [53]. In our study, there are 6 families with parents who have heterozygous gene, whose two children were born with CAH. The CAH usually occurs in the same generation, our analysis of generation pedigree for genetic disease found that the CAH does not transmit continuously through the generations, the CAH often occurs in the 3rd generation.

According to a research conducted by Tran Kiem Hao (2007), when analyzing gene of 5 families, three mothers and two fathers were found carrying the mutations I2g and deletions 8bp. Especially, there were two parents carrying the heterozygous gamete which has point mutations and deletion mutations on the same allele.

*4.2.2. The technique used to detect mutations in the *CYP21A2* of the parents and siblings of those patients with CAH*

Finding mutations in *CYP21A2* of the patients with CAH is quick and inexpensive mutations detecting technique to detect mutations for family members. Thanks to two

techniques: gene sequencing technique and MLPA technique to locate point mutations and deletion mutations, duplication mutations, the author is able to detect people carrying heterozygous mutations. These are two modern and accurate techniques at the present. After analysing 130 family members having 9 types of mutation, including; I2g: 47/130 (36.5%), deletion 33/130 (25.4%), p.R356W (18.5%), and other less common mutations such as p.Q318X, p.I172N, p.R426C, p.S125X, p.W19X. The results of our study are similar to other studies in the world.

4.2.3. Discuss the case of family pedigree is shown

Analysis of family 01's genealogy illustrated in Figure 3.1 and 3.2 shows that there is one son with CAH type salt washing was diagnosed at 3 weeks old, with typical symptom of acute adrenal insufficiency. The patient has mutations in the intron 2 of *CYP21A2*, type homozygous mutations IVS2-13A / C> G (c.656A / C> G), parents may have heterozygous mutations, and there is no one in their genetic genealogy has the same mutations as the patient. After analysing the gene of the parents, we found both of them having heterozygous mutations at IVS2 -13A / C> G (c.656T / G> C). From the test results, we confirmed that our patient received a mutant allele in intron 2 from the father and another from the mother.

A research implemented by Violeta, 2010, on patients and families in Macedona showed that the detection rate of I2g among those family members was 12.9%. The study also found that P30L mutation has a higher rate: 20%, which is related to race. This is a common type of mutations in the world according to recent reports of the Asian countries like Japan, China.

According to analysis of genealogy of family no 27, the family has a son with CAH type salt washing and point mutations in homozygous p.R356W. Parents are heterozygous carriers, no one in the family carrying mutation like the patients. This type of mutation can cause acute salt washing. This mutation type p.R356W has higher rate in Asian countries, from 9.5% - 19.2% in the China, Japan, India, Malaysia. This mutation alters nucleotide 2110C> T, causing 356 CGG triplet coded for Arginin be converted to TGG coded for tryptophan (R356W), leading to inability of enzyme synthesis and severe reduction of enzyme concentration, causing severe acute salt washing.

Analysis of pedigree of family no 08 shows that the family has with two children; the first daughter has normal phenotype, the second son had a normal phenotype after being born. When the son was 3 years old, he was always taller than his friends, with genital abnormalities: penis was bigger than his peers. After genetic analysing, the child was found carrying homozygous mutation p.I172N (c.999T> A) at exon 4, type simple virilising. The results of the genetic analysis of family members showed that the parents of patients have heterozygous mutations p.I172N, as well as the sister (III4). P.I172N is a common mutation in the world, at the rate of about 1,6 -19%. I172N mutation at position 9994T> reduces enzyme activity, but according to reports, the enzyme can be measured about 0-2%, so this mutant phenotype can be light salt washing or simple virilising, depending on the activity of each enzyme in the body. In our study, there are 3 families carrying homozygous mutation I172N, in which, two patients with simple virilising type and 1 patient has salt washing type. Our results are consistent with study of Krone. N, in 2000 in Germany on 155 patients with CAH, in which the rate of p.I172N was 19.7%, which are SV and SW.

4.3. Prenatal diagnosis for pregnant women with heterozygous mutations

Prenatal diagnosis is an effective method to prevent genetic disease. Fetus with CAH could be detected early. This disease can be treated by medicine dexamethasone for fetus. Female fetus with CAH will be treated as soon as possible and after birth to achieve positive result and avoid genital surgery.

Endocrinology-Metabolism-Genetics Department of National Pediatric Hospital has established a CAH club more than 16 years ago. At annual club meeting, patients and their families are given information and explanation about CAH as well as treatment, caring methods and side-effect detection methods. The doctors explain the transfer of CAH in the family. Thanks to those information, the family members would voluntarily coordinate with doctors in diagnose their children's CAH and to detect carriers of heterozygous mutations as well as prenatal diagnosis. In a three year period, we have consulted for 56 families (130 people) and prenatal diagnosed to 12 pregnant women having heterozygous, who have a high risk of giving birth to a child with CAH. The female siblings of the patients were too young to be prenatal diagnosed. The number of the patients' mothers and female siblings having mutation analyzed is still small so this analysis should be conducted in a larger scale.

Prenatal diagnosis using amniocentesis technique in 12 pregnant women with heterozygous gene results in: 3 normal fetuses, 2 fetuses with CAH and 8 heterozygous carrying fetuses. 2 fetuses CAH due to 21-OH deficiency with mutation p.R356W, 6 fetuses are heterozygous with deletion, p.I172N, Q318X & R356W and 3 fetuses are normal. Those mutations are common in Vietnam and the world.

In our study, there is a mother receiving prenatal diagnosis twice. In 2010, she had a male fetus with CAH who was terminated. In 2014, she had a female fetus with CAH but the family did not want treatment and decided to terminate the pregnancy. Therefore, there is no female fetus case receiving early treatment. Among 8 fetus carrying heterozygous and 3 normal ones, there were two got mutation checked and the results were correspondent with prenatal diagnosis. Other fetus were normal so their family did not require recheck.

Giving birth and raising a child with CAH are a burden for the family and society. The patient needs medicine continuously in his lifetime and the CAH influences the patient and family's psyche. Therefore, it is essential to detect the people carrying heterozygous and practice prenatal diagnosis to proactively prevent the disease. This is also our desire when we conduct this study.

CONCLUSION

In 3 years of researchs, 130 members of 56 families having CAH children have analysis mutation in genes *CYP21A2* and prenatal diagnosis for 12 pregnant women having heterozygous provide following results:

1. Results of analysing heterozygous mutations in *CYP21A2* for 56 family members of patients with CAH due to 21-OH deficiency.

- There are 9 kinds of *CYP21A2* mutations are common in this study; point mutations and deletion. Deletion and 2 types point mutations: I2g, p.R345W are most common. The results obtained:

- 56 Mothers are heterozygous carriers (100%) with mutations: I2g: 33%, deletion: 30,4%, p.R356W: 16,1%, I172N: 10,7%, P426C: 3,6%, p.Q318X: 1,8%, 1763insT:1,8%.

- 54 Father are common heterozygous carriers (98,2%) with mutations: I2g: 35,7%, deletion: 25%, p.R356W: 23,2%, I172N: 5,4%, P426C: 3,5%, p.Q318X: 5,4%, p.W19X:1,8%, p.S125X: 1,8%. 01 father is not identified.

- 19 siblings of patient CAH in study: 73,7% heterozygous carriers gene *CYP21A2* with mutations: I2g: 64,3%, deletion:21,5%, p.R356W: 7,1%, p.I172N: 7,1%. 26,3% normal.

2. Prenatal diagnosis for pregnant women with heterozygous of gene *CYP21A2*

Prenatal diagnosis using amniocentesis technique in 12 pregnant women with heterozygous gene at 15 – 16 weeks. We found deletions mutation and 3 point mutations of the fetus. 3 normal fetal, 2 disease fetals, 8 fetals have heterozygous mutations. In 8 fetals who have heterozygous mutations; 6: delete mutation, 1: p.I172N and 1 fetal has heterozygous double mutation: p.Q318X & R356W.

RECOMMEND

- Early detecting heterozygous mutation within family members of patients with CAH to plan, manage and monitor as well as genetic consult;
- Organising conference and meeting about CAH to raise the society awareness about CAH to prevent giving birth to children with CAH.
- Consulting family members to coordinate with doctors in diagnosing patients and detecting heterozygous mutation carriers for other members. As a result, prenatal diagnosis will be conducted early to avoid fatality or sexual disability of the children.

Published articles

1. Journal of Medical Research. Volume 82, No2- April. 2013. Mutation and carrier detection of congenital adrenal hyperplasia caused by 21- hydroxylase. 189-194.
2. Journal of Medical Research. Volume 82, No2- April. 2013. Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase. 194-200.