BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

AN THÙY LAN

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG VÀ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN CỦA HỘI CHỨNG PRADER-WILLI

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

AN THÙY LAN

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG VÀ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN CỦA HỘI CHỨNG PRADER-WILLI

Chuyên ngành: Y Sinh học - Di truyền

Mã số: 62720111

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Phan Thị Hoan

HÀ NỘI - 2019

Lời cảm ơn

*Lời đầu tiên tôi xin được cảm ơn những **bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi và gia đình các em,** họ đã truyền cho tôi nghị lực, lòng kiên trì và sức mạnh để tôi nghiên cứu sâu sắc về bệnh lý này - một bệnh lý hiếm gặp. Tôi hy vọng rằng sau khi nghiên cứu này được công bố, sẽ có nhiều người biết về bệnh này, nhiều nhân viên y tế cập nhật được việc chẩn đoán sớm và quản lý điều trị tốt, mang lại cho các em và gia đình một tương lai tươi sáng hơn!*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **Trường Đại học Y Hà Nội, phòng Quản lý đào tạo Sau Đại học, Bộ môn Y sinh học - Di truyền** là nơi tôi đã học tập và **Bệnh viện Nhi Trung Ương** là nơi tôi công tác, đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận án này.*

*Tôi xin cảm ơn **PGS.TS. Phan Thị Hoan**, là người thầy vô cùng tâm huyết, đã truyền đạt cho tôi nhiều kiến thức quý báu trong học tập và nghiên cứu, người đã đồng hành và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình hoàn thành luận án này!*

*Tôi xin gửi lời cảm ơn tới **GS.TS. Nguyễn Thanh Liêm**, là người đầu tiên truyền cho tôi lòng say mê nghiên cứu khoa học, tạo điều kiện cho tôi bước những bước đi đầu tiên trong sự nghiệp của mình.*

Tôi cảm ơn những người bạn đã luôn bên tôi.

*Luận án này tôi dành tặng cho **người cha** đã khuất của tôi và **mẹ tôi** là người thầy đầu tiên và mãi mãi trong cuộc đời tôi.*

Tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình, chồng và hai con đã luôn ở bên tôi, dành cho tôi vô vàn tình yêu thương trong cuộc đời này!

Hà nội, ngày   tháng   năm 2019

An Thùy Lan

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là An Thùy Lan, nghiên cứu sinh khóa 31 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Y sinh học - Di truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của thầy: Phó giáo sư. Tiến sĩ. Phan Thị Hoan
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 nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận tại 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

Nghiên cứu sinh

An Thùy Lan

MỤC LỤC

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
aCGH	Comparative genome Hybridization microarray	Lai so sánh hệ gen
AS	Angelman Syndrome	Hội chứng Angelman
BMI	Body mass index	Chỉ số khối cơ thể
CQSD		Cơ quan sinh dục
FISH	Fluorescence in situ hybridization	Lai tại chỗ huỳnh quang
GH	Growth hormon	Hormon tăng trưởng
IC	Imprinting centre	Trung tâm dấu ấn di truyền
ID	Imprinting defect	Khiếm khuyết dấu ấn di truyền
IGF1	Insulin like growth factor 1	Yếu tố tăng trưởng giống insulin
KT		Kỹ thuật
MS-MLPA	Methylation specific-multiplex ligation dependent probe amplification	Khuếch đại đa đầu dò đặc hiệu methyl hóa
MS-PCR	Methylation specific-polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi đặc hiệu methyl hóa
mUPD	Maternal uniparental disomy	Hai nhiễm sắc thể cùng nguồn mẹ
NST		Nhiễm sắc thể
PTTTVĐ		Phát triển tâm thần vận động
PWCR	Prader-Willi critical region	Vùng gen Prader-Willi
PWS	Prader-Willi Syndrome	Hội chứng Prader-Willi
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Kỹ thuật nghiên cứu tính đa hình chiều dài các phân đoạn DNA

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC HÌNH

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng Prader-Willi (Prader-Willi Syndrome - PWS) là hội chứng bệnh di truyền gây nên do mất hoạt động chức năng của các gen trên nhánh dài gần tâm vị trí q11-q13 của nhiễm sắc thể (NST) số 15 có nguồn gốc từ bố. Các triệu chứng thường gặp trong hội chứng này là: giảm cử động thai, giảm trương lực cơ, béo phì, chậm phát triển tâm thần vận động, tầm vóc thấp, chân tay nhỏ, bộ mặt bất thường, thiểu năng sinh dục, và hầu hết đều vô sinh.

Mã số bệnh tật của PWS theo ICD - 10: Q87.1; theo OMIM: 176270.

Tỷ lệ mắc PWS trong quần thể ước tính 1/10.000 - 1/30.000 [1]. Theo hiệp hội Prader-Willi quốc tế, trên thế giới hiện nay có khoảng 350.000 - 400.000 bệnh nhân được chẩn đoán mắc PWS, trong đó 17.000 - 20.000 bệnh nhân đang sống ở Hoa Kỳ [2].

Nguyên nhân của PWS do mất chức năng của các gen trên NST 15 vùng q11-q13 có nguồn gốc từ bố. Các gen trên vùng này hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền (genetic imprinting) - di truyền đơn alen (monoallelic), chỉ hoạt động trên NST 15 nguồn gốc bố, không hoạt động trên NST 15 nguồn gốc mẹ [3]. Các nguyên nhân gây PWS gồm: do mất đoạn NST 15q11-q13 nguồn gốc bố; do hai NST số 15 đều có nguồn gốc mẹ (maternal Uniparental Disomy - mUPD, do khiếm khuyết dấu ấn di truyền (Imprinting Defect - ID).

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

Xét nghiệm di truyền tế bào: phân tích NST đồ với kỹ thuật băng G phát hiện các bất thường NST như: mất đoạn NST 15q11-q13, chuyển đoạn NST 15 với một NST khác trong bộ NST dẫn đến mất đoạn NST 15q11-q13.

Xét nghiệm lai giữa di truyền tế bào và phân tử: kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (Fluorescence In Situ Hybridization - FISH), kỹ thuật này chẩn đoán nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13.

Xét nghiệm di truyền phân tử: dựa trên nguyên lý phát hiện mất đoạn NST 15q11-q13 hay phát hiện bất thường methyl hóa tại vùng gen Prader-Willi. Các kỹ thuật phổ biến đang được nhiều trung tâm di truyền trên thế giới áp dụng như: lai so sánh bộ gen (array Comparative Genome Hybridization - aCGH), phản ứng chuỗi đặc hiệu methyl hóa (Methylation Specific Polymerase Chain Reaction - MS-PCR), khuếch đại đa đầu dò đặc hiệu methyl hóa (Methylation Specific Multiplex Ligation dependent Probe Amplification - MS-MLPA), phân tích tính đa hình DNA của bố mẹ, giải trình tự gen.

Tại Việt Nam, tỷ lệ mới mắc của PWS chưa được xác định do đây là bệnh di truyền hiếm gặp. Tại Bệnh viện Nhi Trung ương, PWS mới được đưa vào chẩn đoán và quản lý bệnh nhân từ năm 2007. Bệnh do mất hoạt động chức năng của các gen vùng NST 15q11-q13 là vùng có chứa số lượng gen nhiều, cơ chế hoạt động dấu ấn di truyền phức tạp, bệnh nhân có biểu hiện lâm sàng nặng, đa dạng, nên có thể gặp ở nhiều chuyên khoa khác nhau. Do vậy việc nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng và di truyền của PWS có vai trò hướng cho các bác sĩ lâm sàng trong chẩn đoán và chỉ định các xét nghiệm chẩn đoán xác định PWS. Việc lựa chọn kỹ thuật xét nghiệm phù hợp để chẩn đoán xác định bệnh và chẩn đoán bệnh sớm có ý nghĩa rất quan trọng trong điều trị và quản lý bệnh nhân nhằm cải thiện các triệu chứng nặng, giảm tỷ lệ biến chứng và tăng chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân mắc PWS.

Xuất phát từ những lý do trên đây, đề tài **"Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và biến đổi di truyền của hội chứng Prader-Willi"** được tiến hành với hai mục tiêu sau:

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

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

Chương 1
TỔNG QUAN

1.1. Khái niệm

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

Tỷ lệ mắc bệnh giữa các nghiên cứu trên các quốc gia khác nhau, tuy nhiên không có minh chứng bệnh phụ thuộc vào chủng tộc hay có xu hướng tăng. Tại Hoa Kỳ, tỷ lệ lưu hành bệnh trong quần thể 1/16.062 đến 1/25.000 [4], [5]. Tỷ lệ mắc bệnh ở Thụy Điển là 1/8000 dân [6], ở Vương quốc Anh là 1/45.000 dân [7]. Tại Việt Nam chưa có thống kê tỷ lệ mắc PWS, tại bệnh viện nhi Trung ương, PWS được đưa vào chẩn đoán từ 2007, mỗi năm tiếp nhận thêm 10 - 12 bệnh nhân mới.

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

Hội chứng PWS có thể chẩn đoán dựa vào các tiêu chuẩn lâm sàng, chẩn đoán xác định bằng các kỹ thuật xét nghiệm di truyền tế bào và di truyền phân tử.

Trong phân loại bệnh quốc tế, PWS được ký hiệu OMIM 176270.

1.2. Lịch sử nghiên cứu hội chứng Prader-Willi

Ngay từ năm 1680 qua bức vẽ một em bé gái của họa sỹ Juan Carreno de Miranda người Tây Ban Nha, quan sát các đặc điểm đặc biệt về ngoại hình của em bé có thể nhận định đây là bệnh nhân PWS [8]. Tuy nhiên đến năm

1887, bệnh nhân PWS đầu tiên được miêu tả bởi Langdon-Down, bệnh nhân là bé gái tuổi dậy thì, chậm phát triển tâm thần vận động, tầm vóc thấp, thiểu năng sinh dục, béo phì [9]. Năm 1956, một nhóm ba bác sỹ người Thụy Sỹ là Andrea Prader, Alexis Labhart và Heinrich Willi công bố một nhóm 9 bệnh nhân với các triệu chứng: giảm trương lực cơ giai đoạn sơ sinh, bú kém, cần phải hỗ trợ ăn uống, ở trẻ nam gặp ẩn tinh hoàn 1 bên hoặc 2 bên, tầm vóc thấp, tuổi xương thấp so với tuổi thực, chân tay nhỏ, bộ mặt bất thường, chậm phát triển tâm thần vận động, béo phì tập trung vùng thân, khởi phát các biến chứng của béo phì như bệnh tim mạch, tiểu đường. Bệnh được đặt tên là hội chứng Prader-Willi. Năm 1980 nhóm nghiên cứu này ghi nhận các biểu hiện về thay đổi hành vi và tâm lý trong các bệnh nhân PWS. Năm 1981 Ledbetter và cộng sự phát hiện nguyên nhân PWS do mất đoạn nhỏ trên nhánh dài NST số 15 vị trí 15q11-q13 khi phân tích NST với kỹ thuật băng có độ phân giải cao [10]. Năm 1989 Nicholls và cộng sự phát hiện ra cơ chế dấu ấn di truyền (di truyền đơn alen - monoallelic) [11]. Năm 1993 Holm và cộng sự công bố bảng kiểm các tiêu chuẩn chẩn đoán PWS trên lâm sàng [12].

1.3. Đặc điểm lâm sàng của hội chứng Prader-Willi

Các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân mắc PWS đặc trưng bởi các triệu chứng khác nhau qua các giai đoạn:

+ Từ 0 - 2 tuổi: giảm trương lực cơ, khó khăn trong ăn uống (bú kém, phải ăn qua sonde hoặc đút thìa trong giai đoạn sơ sinh).

+ Từ 2 - 6 tuổi:

Giảm trương lực cơ với tiền sử bú kém.

Chậm phát triển tâm thần vận động.

+ Từ 6 - 12 tuổi:

Tiền sử giảm trương lực cơ và bú kém.

Chậm phát triển tâm thần vận động.

Ăn uống mất kiểm soát, béo phì trung tâm.

+ Từ 13 tuổi đến tuổi trưởng thành:

Nhận thức kém, thường chậm phát triển tâm thần mức độ trung bình.

Ăn uống mất kiểm soát, béo phì trung tâm.

Thiểu năng sinh dục.

Rối loạn hành vi điển hình.

1.3.1. Tiền sử thai nghén

Trẻ mắc PWS có tiền sử giảm trương lực cơ xảy ra từ giai đoạn bào thai, biểu hiện thai giảm cử động, thai không xoay gây tình trạng ngôi ngược, tăng tỷ lệ đẻ mổ. Cân nặng lúc sinh, chiều dài, chỉ số khối cơ thể (body mass index - BMI) của trẻ PWS thấp hơn trẻ bình thường 15% - 20% [13].

1.3.2. Giảm trương lực cơ

Giảm trương lực cơ là một triệu chứng điển hình của bệnh có ở các giai đoạn phát triển tùy mức độ, biểu hiện nặng nề trong giai đoạn sơ sinh và trẻ nhỏ, mức độ ít hơn ở trẻ lớn, ở người trưởng thành giảm trương lực cơ thường nhẹ. Hầu hết các trường hợp ở giai đoạn sơ sinh có giảm trương lực cơ, mệt mỏi, bú kém, khó cho ăn. Có một tỷ lệ nhỏ bệnh nhân PWS có giảm trương lực cơ nặng tồn tại khi trẻ hơn 2 tuổi, là những trường hợp không phổ biến và bắt buộc tìm nguyên nhân. Cần đề ra chẩn đoán phân biệt với các bệnh cơ do đột biến gen ti thể hoặc các bệnh cơ khác.

Giảm trương lực cơ làm trẻ chậm biết ngồi, chậm biết đi, gây cong vẹo cột sống. Các phương pháp điều trị làm tăng quá trình tạo khối cơ. Tập thể dục và giảm cân là mấu chốt để điều trị triệu chứng cong vẹo cột sống của bệnh nhân PWS.

Trong nghiên cứu của Kamaludin trên chuột bị bất hoạt một trong các gen của vùng gen Prader-Willi (Prader-Willi critical region - PWCR) là gen

MAGEL2. Những con chuột có đột biến ở gen *MAGEL2* có giảm trương lực cơ nặng nề. Những con chuột không có gen *MAGEL2* có nhiều triệu chứng giống như PWS: bất thường về chức năng nội tiết, vô sinh, bất thường hành vi, tăng lượng mô mỡ. Nhóm nghiên cứu cũng nhận ra rằng những con chuột bị mất gen *MAGEL2* có giảm khối lượng cơ, giảm sức mạnh cơ, giảm độ hoạt động và sức bền. Nguyên nhân ban đầu được đưa ra do các tế bào cơ không sử dụng được năng lượng cung cấp qua thức ăn [14].

1.3.3. Phát triển tâm thần và đặc điểm tính cách

Chậm phát triển tâm thần vận động xảy ra ở 90% - 100% các bệnh nhân PWS, trẻ chậm biết đi so với các trẻ cùng độ tuổi (biết ngồi lúc 12 tháng, biết đi lúc 24 tháng). Chậm phát triển ngôn ngữ là một triệu chứng điển hình của bệnh, hầu hết các bệnh nhân PWS có chậm phát triển tâm thần vận động ở mức độ trung bình (IQ: 60 - 70), 40% ở ranh giới giữa bình thường và chậm phát triển tâm thần mức độ nhẹ, 20% chậm phát triển tâm thần mức độ nặng [15]. Khả năng nhận thức thấp hơn so với trẻ bình thường cùng độ tuổi. Khả năng nhận thức bao gồm các kỹ năng đọc, làm toán, kỹ năng quan sát trực quan, trí nhớ ngắn hạn và dài hạn. Tuy nhiên những đặc điểm này không giống nhau ở các trẻ, đa phần các trẻ có thể biết đọc, biết viết, làm các phép toán đơn giản.

Các đặc điểm phát triển tính cách cũng biểu hiện sớm, ương bướng, giận giữ, khó bảo, khó kiểm soát hành vi, khó thay đổi các thói quen, phát hiện thấy ở 70% - 90% số bệnh nhân PWS [16]. Nói dối, ăn cắp, thái độ thống trị cũng phổ biến. Mặc dù những vấn đề này không phải có riêng ở PWS mà còn có ở các hội chứng khác có kèm triệu chứng chậm phát triển tâm thần, trẻ thường có các câu hỏi lặp lại và không có câu trả lời.

Một số bằng chứng cho thấy các bệnh nhân PWS ở nhóm mất đoạn NST 15q11-q13 có nhiều triệu chứng nặng nề hơn các nhóm khác [17].

Trong nhóm nguyên nhân của PWS do 2 NST 15 nguồn gốc mẹ có một số trường hợp bị tự kỷ, nguyên nhân của hội chứng tự kỷ là nhân đoạn vùng sát tâm trên nhánh dài NST số 15 trùng với vùng gen Prader-Willi [18].

1.3.4. Ăn không kiểm soát và béo phì

Ngược lại với quan điểm trong PWS chỉ có 2 giai đoạn dinh dưỡng khác nhau là: chậm phát triển thể chất giai đoạn trẻ nhỏ và ăn uống không kiểm soát, béo phì trung tâm giai đoạn trẻ lớn, một nghiên cứu trên nhiều trung tâm của Miller nhận thấy có sự chuyển tiếp rất phức tạp gồm 7 giai đoạn trong suốt quá trình phát triển của bệnh nhân PWS điển hình [19], cụ thể như sau:

Giai đoạn 0: trong tử cung, thai nhi giảm vận động, chậm phát triển hơn so với những lần mang thai trước. Thai giảm vận động dẫn đến tình trạng ngôi ngược và tỷ lệ đẻ mổ tăng cao ở những phụ nữ sinh con mắc PWS.

Giai đoạn 1: giảm trương lực cơ và không béo phì. Giai đoạn này thường kéo dài 0 - 25 tháng, trung bình 9 tháng.

Giai đoạn 1a: từ 0 - 9 tháng biểu hiện giảm trương lực cơ toàn thân, không bú được, phải hỗ trợ ăn uống thường ăn qua sonde trong những tháng đầu.

Giai đoạn 1b: từ 9 - 25 tháng trẻ bắt đầu bắt kịp nhịp độ phát triển cân nặng của trẻ bình thường.

Giai đoạn 2: bắt đầu tăng cân.

Giai đoạn 2a: trung bình ở độ tuổi từ 2 tuổi đến 8 tuổi, giai đoạn này trẻ bắt đầu tăng cân nhưng chưa liên quan đến chế độ ăn.

Giai đoạn 2b: tuổi khởi phát trung bình là 4,5 tuổi, biểu hiện tăng cân liên quan đến lượng thức ăn đưa vào của trẻ.

Giai đoạn 3: bắt đầu xuất hiện triệu chứng ăn không kiểm soát, tuổi khởi phát trung bình 8 tuổi.

Giai đoạn 4: trẻ lớn, người trưởng thành, tiếp tục giai đoạn ăn uống không kiểm soát được.

Béo phì: chứng ăn không kiểm soát bắt đầu ở giai đoạn 3, nguyên nhân do bất thường vùng dưới đồi gây mất cảm giác no. Trẻ có những hành động tích trữ và lục lọi thức ăn, ăn cả những đồ không ăn được thậm chí lấy trộm hay tự động đi mua đồ ăn. Béo phì là hậu quả của việc ăn nhiều, đặc điểm béo vùng bụng, mông, đùi, xảy ra ở cả 2 giới. Béo phì và các biến chứng của béo phì liên quan đến tỷ lệ bệnh tật và tỷ lệ chết của bệnh nhân.

Một vài nghiên cứu đưa ra kết luận nồng độ Ghrelin tăng ở những trẻ lớn và người lớn mắc PWS tại thời điểm trước và sau bữa ăn [20], [21]. Ghrelin hay "hunger hormon", là hormon nhóm peptid được tiết ra bởi các tế bào ghrelinergic nằm trong ống tiêu hóa. Ghrelin có tác dụng gây cảm giác đói, gây thèm ăn, nồng độ tăng trước bữa ăn và giảm sau bữa ăn.

Tuy nhiên có một số nghiên cứu khác cho thấy khi sử dụng một số thuốc gây giảm nồng độ Ghrelin, dù dùng trong thời gian ngắn hay dài cũng không có tác động gây giảm cân hay giảm cảm giác thèm ăn của trẻ mắc PWS. Như vậy việc giải thích cơ chế gây chứng ăn không kiểm soát và béo phì của trẻ PWS vẫn chưa thực sự sáng tỏ.

1.3.5. Bộ mặt bất thường

Bộ mặt mang những đặc điểm đặc trưng: sống mũi hẹp, trán cao hẹp, mắt hình oval, cằm nhỏ, môi trên mỏng, môi dưới trễ. Các đặc điểm này có thể xuất hiện ngay sau đẻ hoặc xuất hiện dần qua thời gian.

Bàn tay, bàn chân nhỏ, thiểu sản xương trụ, trẻ nhỏ có mu bàn tay và ngón tay tròn múp. Da, tóc, mắt sáng màu hơn anh chị em ruột.

Da tóc có màu nhạt hơn những thành viên khác trong gia đình xảy ra trên các bệnh nhân bị thiếu 1 bản sao của gen *OCA2*. Gen *OCA2* là một trong những gen mã hóa thụ thể GABA, hoạt động không tuân theo quy luật dấu ấn di truyền. Do vậy những đặc điểm này chỉ có trên những bệnh nhân PWS thuộc nhóm nguyên nhân mất đoạn NST số 15 vị trí q11-q13 có nguồn gốc bố. Những tế bào bị mất 1 bản sao của gen *OCA2* bị thiếu hụt tổng hợp hoặc suy giảm chức năng của protein P, làm gián đoạn việc sản sinh melanin dẫn đến giảm sắc tố da và tóc nhạt màu [22], [23].

1.3.6. Thiểu năng sinh dục

Ở cả hai giới, thiểu năng sinh dục biểu hiện bằng thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài, dậy thì muộn, thường vô sinh. Thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài biểu hiện từ lúc mới sinh và tồn tại suốt đời. Nam có dương vật nhỏ, bìu ít nếp nhăn, nhạt màu, ẩn tinh hoàn một bên hoặc hai bên gặp ở 80% - 90% [24]. Nữ có thiểu sản âm vật, môi lớn, môi bé.

Trong nghiên cứu của Crino trên 84 bệnh nhân PWS (42 nam, 42 nữ) ở độ tuổi 2 - 35 tuổi [25], đã đưa ra các chỉ số liên quan đến thiểu năng tuyến sinh dục như sau:

Nam: ẩn tinh hoàn gặp ở 100%, tinh hoàn nhỏ 76%, thiểu sản bìu 69%.

Nữ: thiểu sản âm vật, môi lớn, môi bé gặp ở 76%, vô kinh nguyên phát gặp ở 56%, kinh nguyệt bất thường, xuất hiện thoáng qua gặp ở 44% các bệnh nhân lớn hơn 15 tuổi.

Cả hai giới: mọc lông tại bộ phận sinh dục sớm gặp ở 14%, dậy thì sớm gặp ở 3,6%.

Thiểu năng sinh dục thường do thiếu hụt GnRH nghiêm trọng làm cho nồng độ LH, FSH thấp, dẫn đến tình trạng dậy thì muộn, không hoàn thiện dậy thì hoặc rối loạn. Hình thành đặc tính sinh dục phụ sớm xảy ra 15% - 20% ở cả hai giới. Ở nữ thường có vô kinh nguyên phát hay vòng kinh dài. Hầu hết bệnh nhân PWS đều vô sinh. Trước đây nguyên nhân của thiểu năng sinh dục ở cả hai giới được cho là do thiểu sản vùng dưới đồi, tuy nhiên gần đây nhiều nghiên cứu mới nhận thấy có sự kết hợp giữa thiểu sản vùng dưới đồi và thiếu hụt hormon tiên phát.

1.3.7. Tầm vóc thấp

Tầm vóc thấp ở cả hai giới, bắt đầu biểu hiện rõ sau 10 tuổi. Nếu không được điều trị thì chiều cao trung bình của nam là 155cm, của nữ là 148cm. Bàn tay, bàn chân nhỏ, chiều dài bàn chân trung bình người nam trưởng thành 22,3cm, của người nữ là 20,3cm. Nồng độ hormon tăng trưởng (Growth Hormon - GH) ở nhóm bệnh nhân PWS do mUPD thấp hơn bệnh nhân ở nhóm mất đoạn [26]. Điều trị GH giúp phân bố lại mỡ trong cơ thể, tăng khối lượng cơ, tăng chiều cao, giảm chỉ số BMI, phát triển kỹ năng vận động thô, phát triển ngôn ngữ và giảm các rối loạn hành vi. Đánh giá hiệu quả điều trị GH bằng đo hoạt độ IGF1 (Insulin like growth factor 1 - IGF1), chu vi vòng đầu và chỉ số BMI.

1.3.8. Các vấn đề rối loạn nội tiết khác

Thiếu hụt hormon tuyến thượng thận trung tâm (Central Adrenal Insufficiency - CAI). Trong nghiên cứu của de Lind van Wijngaarden trên các bệnh nhân PWS, thử nghiệm sử dụng đơn liều metyrapone qua đêm (metyrapone gây ức chế sản xuất cortisol), cho thấy 60% các bệnh nhân PWS có CAI và có thể đây là nguyên nhân gây tử vong đột ngột của bệnh nhân PWS [27]. Nghiên cứu của Scaroni nhận định bước đầu mối liên hệ giữa tình trạng tử vong đột ngột trong giai đoạn đầu điều trị GH [28], tuy nhiên kết quả nghiên cứu này chưa hoàn toàn sáng tỏ và còn nhiều tranh cãi.

Thiếu hụt hormon tuyến giáp: gặp ở 25% bệnh nhân PWS, độ tuổi chẩn đoán trung bình 2 tuổi [29].

Hạ đường huyết và đái tháo đường: gặp ở 25% bệnh nhân PWS nhóm người lớn có đái tháo đường không phụ thuộc Insulin, tuổi khởi phát trung bình 20 tuổi [30]. Trong vòng 15 năm gần đây, việc chẩn đoán sớm, tăng khả năng giáo dục của bố mẹ bệnh nhân, điều trị GH làm giảm lượng bệnh nhân PWS mắc đái tháo đường typ 2.

1.3.9. Một số triệu chứng khác

Khi thống kê các triệu chứng lâm sàng trên các bệnh nhân PWS, còn có thể gặp các triệu chứng sau [24]:

Rối loạn giấc ngủ: rối loạn nhịp thở liên quan giấc ngủ như ngừng thở khi ngủ, rối loạn chu kỳ giấc ngủ, hay ngủ ngày. Béo phì làm tình trạng này trầm trọng hơn.

Giảm thị lực và lác: 60% - 70%.

Thiểu sản khớp hông: 10% - 20%.

Cong vẹo cột sống: 40% - 80%, tuổi khởi phát đa dạng, không liên quan đến việc điều trị GH.

50% bệnh nhân PWS có viêm đường hô hấp tái phát nhiều lần, chưa có nghiên cứu nào cho thấy rằng bệnh nhân PWS có suy giảm miễn dịch, do vậy nguyên nhân của viêm đường hô hấp tái phát có thể do giảm trương lực cơ hô hấp, giảm phản xạ ho.

Gãy xương do loãng xương.

Phù chân.

Tăng ngưỡng đau: đôi khi do bệnh nhân không nhận biết được những tổn thương nặng.

Giảm tiết nước bọt: gây khô miệng, nước bọt dẻo, sâu răng và có thể gây nên những khó khăn về phát âm.

Tăng phản xạ nôn: nôn là triệu chứng trầm trọng của bệnh.

Co giật (10% - 20%), dễ kiểm soát.

Giảm sinh sắc tố: giảm sắc tố da và tóc nhạt màu.

Loét da: có thể nhiễm trùng da vết thương hở mạn tính hoặc sẹo.

Dễ bầm tím: chưa rõ nguyên nhân.

Thay đổi cảm nhận nhiệt độ và điều chỉnh thân nhiệt: thay đổi nhiệt độ môi trường gây hạ thân nhiệt hoặc sốt kéo dài không rõ nguyên nhân ở trẻ nhỏ.

1.3.10. Tỷ lệ tử vong

Tỷ lệ tử vong của bệnh nhân PWS cao hơn nhóm kiểm chứng, với các triệu chứng chậm phát triển tâm thần, béo phì và các biến chứng. Tỷ lệ tử vong trung bình là 3% mỗi năm. Nguyên nhân tử vong ở nhóm bệnh nhân nhỏ thường do viêm đường hô hấp và các nhiễm trùng cơ hội. Ở nhóm bệnh nhân người lớn, nguyên nhân tử vong thường do biến chứng tim mạch, huyết khối, đái tháo đường… Một số trường hợp hiếm gặp tử vong do vỡ dạ dày hoặc cơn ngừng thở lúc ngủ.

60% bệnh nhân PWS có suy tuyến thượng thận, bệnh nhân không thích ứng được với những tình huống stress cấp tính dẫn đến tử vong đột ngột và không giải thích được.

1.3.11. Cải thiện các triệu chứng lâm sàng trên bệnh nhân điều trị GH

Điều trị GH được coi là phương pháp điều trị tiến bộ duy nhất đối với các bệnh nhân PWS. FDA Hoa Kỳ và các nước châu Âu cho phép sử dụng GH trong điều trị PWS từ năm 2000. 40% - 60% các bệnh nhân PWS có thiếu hụt GH [31]. Nhiều nghiên cứu đã công bố tác dụng của GH trên bệnh nhân PWS bao gồm tăng khối lượng cơ, giảm khối lượng mỡ, tăng mật độ xương, tăng chiều cao và đạt chiều cao tối đa ở người trưởng thành [32], [33]. Hơn nữa điều trị GH còn được chứng minh cải thiện sức mạnh, sự nhanh nhẹn và phát triển vận động tinh và vận động thô của bệnh nhân PWS, GH cũng làm cân bằng nitrogen, giảm đốt cháy năng lượng, duy trì khối lượng cơ mặc dù hạn chế lượng calo đưa vào cơ thể [34]. Tuy nhiên thiếu hụt GH không phải nguyên nhân duy nhất gây bất thường trong mô hình tăng trưởng của bệnh nhân PWS, do vậy điều trị GH làm tăng khối lượng cơ, nhưng một số các tính trạng khác vẫn không được cải thiện như bàn tay bàn chân nhỏ [31].

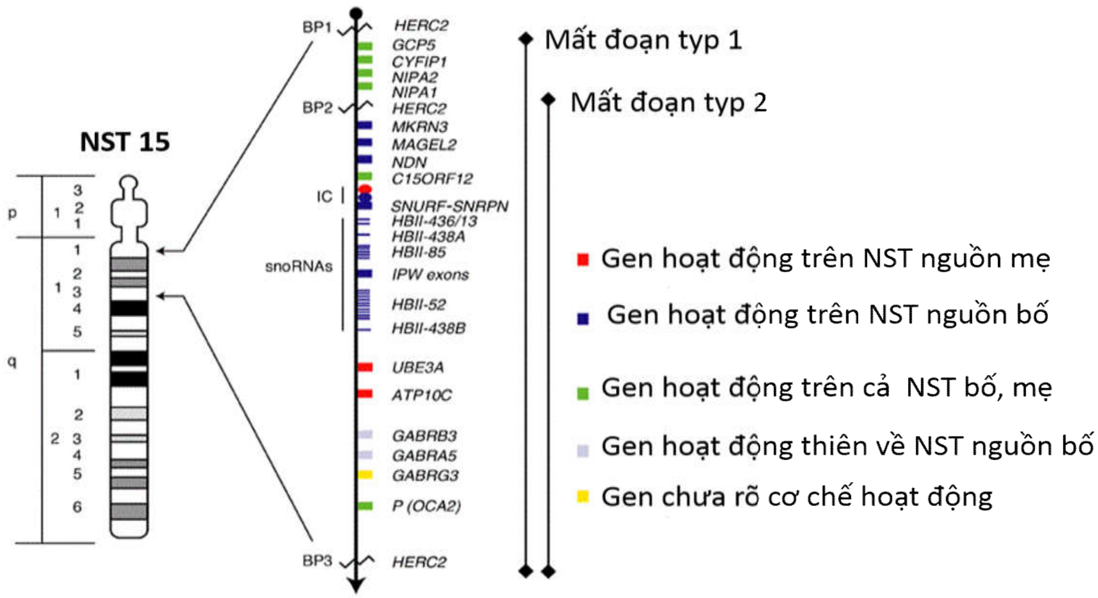
Việc điều trị GH trên người lớn chưa có nhiều thống kê, tuy nhiên các nghiên cứu cũng cho thấy bổ sung GH làm gia tăng đáng kể khối lượng cơ, giảm khối lượng mỡ, không thay đổi BMI, tuy nhiên không tăng mật độ xương. Ở bệnh nhân người lớn, khó phân biệt được tác động của GH hay của hormon sinh dục, do vậy cần nhiều bằng chứng xác thực hơn nữa về điều trị GH ở người lớn [35].

Về tác dụng không mong muốn và các biến chứng của việc điều trị GH cũng được nhiều nghiên cứu thông báo như tử vong đột ngột trong khi điều trị GH do các bệnh lý đường hô hấp, tắc nghẽn phổi [36]. Các nguyên nhân khác gây tử vong đột ngột của bệnh nhân PWS liên quan đến điều trị GH: ngưng thở do giảm trương lực cơ, amidal to, tăng mô bạch huyết [37]. Do vậy đánh giá chức năng hô hấp trước khi điều trị và theo dõi trong giai đoạn đầu sau khi điều trị GH cần tuân thủ. Các tác dụng phụ nặng nề này cũng có liên quan đến thời gian bắt đầu điều trị GH, theo khuyến cáo của hiệp hội Prader-Willi Hoa kỳ nên bắt đầu điều trị GH cho trẻ trước khi khởi phát thừa cân, béo phì, thường áp dụng sau 6 tháng và trước 2 tuổi [38]. Xu hướng điều trị GH sớm trước 3 tháng tuổi không chứng minh hiệu quả hơn trong việc cải thiện các triệu chứng lâm sàng [39].

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

1.4.1. Cấu trúc vùng gen Prader-Willi

Vùng gen Prader-Willi (Prader Willi Critical Region - PWCR) nằm trên NST số 15 vị trí q11-q13, thuộc nhánh dài gần tâm NST số 15, có kích thước 5 - 6Mb. Vùng này bao gồm một số gen kích thước 2,5Mb liên quan đến cơ chế dấu ấn di truyền, mất hoạt động của nhóm gen trong vùng gen này gây nên PWS [1], [40], [41]. PWS được xem là một ví dụ điển hình của cơ chế dấu ấn di truyền trong hệ thống gen người. Kích thước của vùng gen mất có liên quan đến biểu hiện kiểu hình của bệnh [42].



Hình 1.1. Tóm tắt bản đồ gen và cơ chế hoạt động vùng 15q11-q13 [42]

Gen màu đỏ chỉ hoạt động trên NST nguồn gốc mẹ. Gen màu xanh nước biển chỉ hoạt động trên NST nguồn gốc bố. Gen màu xanh lá cây hoạt động trên cả NST nguồn gốc bố và mẹ. Gen màu xám hoạt động thiên về nguồn gốc bố. Gen màu vàng chưa rõ cơ chế hoạt động.

Các gen nằm trên NST số 15 vị trí 15q11-q13 được chia làm 4 vùng:

Vùng 1: giữa hai điểm BP1 và BP2 gồm 4 gen: *NIPA1, NIPA2, CYF1P1, GCP5*, các gen này hoạt động không theo quy luật dấu ấn di truyền (non-imprinted).

Vùng 2: hay còn gọi là vùng gen Prader-Willi (PWCR), chỉ biểu hiện chức năng trên NST có nguồn gốc từ bố, hoạt động tuân theo quy luật dấu ấn di truyền, bao gồm các gen: *MKRN3, MAGEL2, NECDIN (NDN), C15ORF12, bicistronic SNURF-SNRPN [1]*. Trung tâm dấu ấn di truyền (Imprinting Centre - IC) nằm tại gen *SNRPN*, do vậy các phòng xét nghiệm lấy gen *SNRPN* để làm gen ứng cử trong chẩn đoán hội chứng Prader-Willi [43].

Vùng 3: hay còn gọi là vùng gen Angelman, chỉ biểu hiện chức năng trên NST 15 có nguồn gốc từ mẹ, hoạt động tuân theo quy luật dấu ấn di truyền, trong đó 2 gen *UBE3A, ATP10C* được dùng để chẩn đoán hội chứng Angelman.

Vùng 4: gồm một nhóm gen mã hóa thụ thể *GABA (GABRB3, GABRA5, GABRG3), OCA2* (chứng bạch tạng), *HERC2*. Các gen này hoạt động không tuân theo quy luật dấu ấn di truyền.

Vai trò của các gen trong hội chứng Prader-Willi:

Gen SNURF- SNRPN

Gen *SNURF-SNRPN* nằm ở trung tâm vùng gen Prader-Willi (PWCR), là một gen rất phức tạp, dài 465kb, gồm 148 exon, mã hóa 2 protein [44], [45]. Exon 4 - 10 mã hóa protein SmN, là một protein tham gia vào việc nối mRNA. *SNURF* được mã hóa bởi exon 1 - 3, sản xuất ra một chuỗi polypeptid không rõ chức năng. Tại đầu 5’ của gen *SNURF-SNRPN* có hơn 95% dinucleotid CpG, gọi là đảo CpG, bao trùm cả vùng promoter, exon 1 và intron 1, dài khoảng 1kb. Đảo CpG không bị methyl hóa trên alen có nguồn gốc từ bố sẽ ở trạng thái hoạt động, bị methyl hóa trên alen có nguồn gốc từ mẹ nên ở trạng thái bất hoạt [46], [47].

Vùng khởi động tối thiểu của gen *SNRPN* (minimal promotor region), bao gồm 71bp ở vùng upstream và 51bp của exon 1, là thành phần cơ bản cấu tạo nên trung tâm dấu ấn di truyền IC (Imprinting Centre).

Gen *SNURF-SNRPN* điều khiển vùng hotspot (vùng gen trọng điểm) của 6 gen snoRNA thông qua cơ chế điều hòa gen, các gen này không mã hóa protein. Thay đổi vùng không mã hóa protein này có thể gây biểu hiện bệnh lý PWS. Trong nghiên cứu của Wu và cộng sự trên 9 bệnh nhân chẩn đoán lâm sàng mắc PWS, xét nghiệm di truyền không mất đoạn NST 15q11-q13 và không thuộc nhóm mUPD (maternal uniparental disomy), nhóm nghiên cứu khảo sát các đột biến bất hoạt trên 11 gen PWCR, bao gồm: *SNURF-SNRPN*, gen này liên quan đến trung tâm dấu ấn di truyền IC, và các gen: *MKRN3, NDN, IPW, HBII-85, HBII-13, HBII-436, HBII438a, PAR1, PAR5*. Kết quả chỉ tìm thấy 1 đột biến bất hoạt tại vùng khởi động tối thiểu của gen *SNRPN* (minimal promoter), không có đột biến nào trên các gen còn lại [48].

Họ các gen snoRNA

Các gen *snoRNA* nằm trong các bản ghi của gen *SNURF-SNRPN* tại PWCR, biểu hiện trên các bản sao đơn: *SNORD64, SNORD107, SNORD108, SNORD109A, SNORD109B*, và các cụm *SNORD115, SNORD116*.

Các gen *snoRNA* liên quan đến một vài triệu chứng của PWS, nghiên cứu của Wirth và cộng sự trên 6 bệnh nhân có bất thường cấu trúc NST dạng chuyển đoạn cân bằng với NST 15 tại vị trí q11-q13 thấy những bệnh nhân này có kiểu hình PWS hoặc giống PWS [49].

Các gen *snoRNA* chính liên quan đến biểu hiện kiểu hình của PWS là *SNORD116* và *SNORD109* [50]. Một số nghiên cứu tiếp theo cũng chỉ ra mối liên hệ giữa sự mất đoạn gen *SNORD116* và gen *SNRPN* [51], [52]. Các nghiên cứu này báo cáo 3 trường hợp mất đoạn 175 - 236kb bao gồm gen *SNORD116*, cả 3 trường hợp này đều có các đặc điểm điển hình của PWS: giảm trương lực cơ giai đoạn sơ sinh, phải hỗ trợ cho ăn, tăng cân nhanh sau 2 tuổi, thiểu năng sinh dục, chậm phát triển tâm thần, chậm phát triển ngôn ngữ và rối loạn hành vi. Tuy nhiên cả 3 bệnh nhân này có các triệu chứng không thuộc PWS như: tầm vóc cao, đầu to, bộ mặt không đặc trưng cho PWS, bàn tay bàn chân không nhỏ [53]. Như vậy có thể bước đầu nhận định rằng *SNORD116* cũng có vai trò trong cơ chế bệnh sinh của PWS.

Gen MAGEL2

Gen *MAGEL2* nằm sát gen *NDN*. *MAGEL2* biểu hiện mạnh nhất trong giai đoạn phát triển muộn của vùng dưới đồi và một số vùng não khác. Gen này được xem là có liên quan đến các biểu hiện rối loạn ăn uống của bệnh nhân PWS. Wevrick chỉ ra trên chuột nghiên cứu, mất đoạn gen *MAGEL2* gây các biểu hiện: chậm phát triển giai đoạn sơ sinh, tăng cân béo phì sau cai sữa, suy giảm tuyến yên, vô sinh [54]. Nghiên cứu của Schaaf phát hiện trên 2 bệnh nhân PWS có đột biến điểm trên gen *MAGEL2* [55].

Gen NDN

Là một trong các gen ứng cử trong PWS, mã hóa protein mage-necdin, có vai trò trong phát triển hệ thần kinh và chống lại quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis), tác động chủ yếu lên vùng dưới đồi và một số vùng khác của não bộ ở giai đoạn muộn của phôi thai và giai đoạn sớm ngay sau sinh [56].

Gen MKRN3

Gen *MKRN3* mã hóa protein Finger ring makorin 3, không hoạt động trên alen có nguồn gốc mẹ do sự methyl hóa tại đầu 5' cấu tạo bởi các đảo CpG. Chức năng của gen này đối với PWS chưa được làm sáng tỏ. Trong nghiên cứu của Macedo cho thấy tăng tình trạng dậy thì sớm trung tâm (central precociuos puberty - CPP) nếu không có sự hoạt động của gen *MKRN3* nguồn gốc bố do mất đoạn PWCR, hai NST 15 nguồn gốc mẹ hay khiếm khuyết quá trình dấu ấn di truyền [57].

Dậy thì sớm trung tâm là quá trình dậy thì xảy ra ở trẻ gái dưới 8 tuổi và trẻ trai dưới 9 tuổi, tần suất mắc 1/5000 - /10000 trẻ, phổ biến ở trẻ gái hơn so với trẻ trai. Gọi là dậy thì sớm trung tâm do nguyên nhân tại não bộ, kích thích tăng sản xuất các hormon sinh dục.

Một nghiên cứu khác trên 1 bệnh nhân nữ có mất đoạn gen *MKRN3, MAGEL2* và *NDN*, bệnh nhân có một vài đặc điểm của PWS, được chẩn đoán dậy thì sớm trung tâm. Một vài nghiên cứu khác báo cáo những bệnh nhân PWS có kèm theo dậy thì sớm trung tâm. Do vậy để phân biệt hai hội chứng này cần làm các xét nghiệm giải trình tự gen hoặc phân tích methyl hóa [58].

Gen dấu ấn di truyền trong PWS (Imprinted In Prader-Willi Syndrome - IPW)

IPW là một tập hợp các RNA dài không mã hóa protein (long noncoding RNAs - lncRNAs), tương tác với các protein trong cấu trúc sợi chromatin bị biến thể nhờ cấu trúc thứ phát của chúng, *IPW* có thể có vai trò trên các locus gen hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền tác động lên PWCR gây PWS [59]. Đột biến các gen vùng này có thể gây nên PWS, chiếm tỷ lệ <1%, là những trường hợp bệnh nhân có đầy đủ các tiêu chuẩn lâm sàng chẩn đoán PWS nhưng kết quả xét nghiệm di truyền không có bất thường quá trình methyl hóa tại PWCR. Trong nghiên cứu của Stelzer, đã tạo ra các tế bào gốc đa năng (induced pluripotent stem cells - iPSCs) có các sai lệch khác biệt trong vùng ảnh hưởng của NST số 15. Trong nghiên cứu PWS - iPSCs và iPSCs nhân tạo, họ thấy sự điều chỉnh đáng kể sự biểu hiện của hầu hết các gen có nguồn mẹ (maternally expressed genes - *MEGs*) tại locus *DLK-DIO3* cũng hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền nhưng trên NST số 14. Cũng trong nghiên cứu đó họ phát hiện ra *IPW* - tập hợp các RNA dài không mã hóa protein là một bộ điều chỉnh của *DLK-DIO3*, sự biểu hiện quá mức của *IPW* trong PWS và iPSCs dẫn đến sự giảm biểu hiện các gen *MEGs.* Sự thay đổi biểu hiện gen *MEGs* này dẫn đến sự thay đổi methyl hóa DNA. Kết quả của nghiên cứu này đưa ra kết luận vai trò của *IPW* trong PWS, có thể do rối loạn điều hòa locus *DLK-DIO3* hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền nằm ngoài PWCR [59].

1.4.2. Cơ chế của quy luật dấu ấn di truyền

1.4.2.1. Khái niệm chung về quy luật dấu ấn di truyền

Dấu ấn di truyền (genetic imprinting) là cơ chế bình thường trong điều hòa gen (hay còn gọi là cơ chế di truyền đơn alen). Ở các cơ thể lưỡng bội 2n, hầu hết các gen trên các NST có sự hoạt động không theo cơ chế dấu ấn di truyền, nghĩa là trên mỗi locus chứa mỗi alen của cặp alen thì mỗi alen đều có hoạt động chức năng để đóng góp vào sự biểu hiện ra ngoài kiểu hình của locus gen đó (cơ chế biallelic). Còn một số ít các gen lại hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền, nghĩa là sự biểu hiện hay không biểu hiện của alen thuộc locus gen đó phụ thuộc vào NST có chứa locus là nguồn bố hay mẹ (cơ chế monoallelic).

Cơ chế của quy luật dấu ấn di truyền là sự methyl hóa DNA tại các base Cytosin. Các gen không bị methyl hóa sẽ ở trạng thái hoạt động, các gen bị methyl hóa sẽ bị bất hoạt [60].

1.4.2.2. Cơ chế dấu ấn di truyền trong hội chứng Prader-Willi

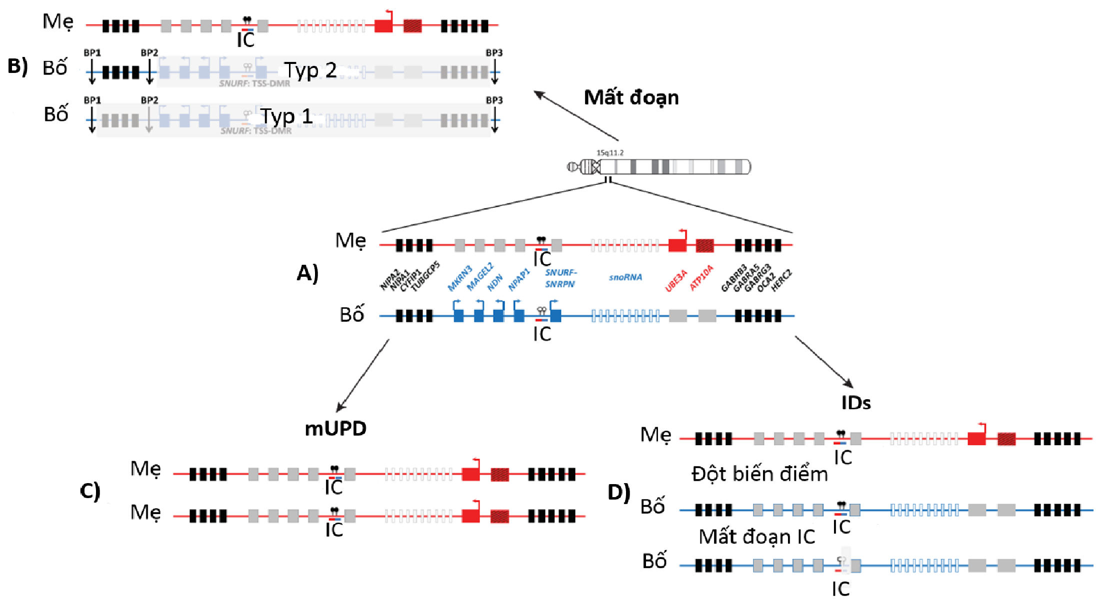
Trên nhánh dài vùng gần tâm NST số 15 vị trí q11-q13 chứa 2,5Mb chất liệu di truyền liên quan đến cơ chế dấu ấn di truyền trong hội chứng Prader-Willi (Prader-Willi Syndrome - PWS) và hội chứng Angelman (Angelman Syndrome - AS). Trên NST số 15 có nguồn gốc từ bố, vị trí q11-q13 mang một số gen gọi là vùng gen Prader-Willi (Prader Willi Critical Region - PWCR), nếu mất chức năng hoạt động bình thường của các gen này bệnh nhân sẽ mắc PWS. Nguyên nhân có thể do: mất đoạn NST số 15 nguồn gố bố vị trí q11-q13; hai NST số 15 đều có nguồn gốc mẹ; khiếm khuyết dấu ấn di truyền dẫn đến sai lạc trong việc điều khiển hoạt động bình thường của các gen vùng Prader-Willi. Vùng IC nằm kề gen *SNRPN* có độ lớn 3kb [61]. IC được cấu tạo chủ yếu từ vùng khởi động tối thiểu của gen *SNRPN* (minimal promotor region), vùng này bao gồm 71bp của vùng upstream và 51bp của exon 1.

Sự hoạt động của các gen trong vùng PWCR tuân theo quy luật dấu ấn di truyền. Các gen này chỉ hoạt động trên alen có nguồn gốc từ bố, không hoạt động trên alen có nguồn gốc từ mẹ.

SNURF-SNRPN là gen nằm ở trung tâm PWCR, gồm 148 exon, chỉ hoạt động trên alen có nguồn gốc từ bố. Tại đầu 5' của gen *SNURF-SNRPN* có hơn 95% dinucleotid CpG, gọi là đảo CpG, bao trùm cả vùng promoter, exon 1 và intron 1, dài khoảng 1kb. Đảo CpG không bị methyl hóa trên alen có nguồn gốc từ bố nên sẽ ở trạng thái hoạt động, bị methyl hóa trên alen có nguồn gốc từ mẹ nên ở trạng thái bất hoạt [46], [47]. Methyl hóa là hiện tượng gắn thêm một gốc CH3 vào C-5 của Cytosine.

1.4.3. Các nhóm nguyên nhân gây hội chứng Prader-Willi

Hội chứng Prader-Willi do sự mất chức năng hoạt động bình thường của các gen ở vùng gen Prader-Willi trên NST 15q11-q13 có nguồn gốc từ bố.



Hình 1.2. Các nhóm nguyên nhân gây hội chứng Prader-Willi [62]

A) Người bình thường: trên NST 15 nguồn gốc bố vùng IC và vùng PWCR hoạt động (các gen màu xanh); vùng ASR (Angelman Syndrome Region - vùng gen Angelman) bất hoạt (vùng gen màu đỏ); trên NST15 nguồn mẹ: vùng IC và vùng ASR hoạt động, vùng PWCR bất hoạt; B) PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 nguồn gốc bố: mất đoạn typ 1 từ BP1 đến BP3, mất đoạn typ 2 từ BP2 đến BP3, C) PWS do nguyên nhân hai NST 15 cùng nguồn mẹ, D) PWS do khiếm khuyết dấu ấn di truyền ID: đột biến điểm IC hoặc đột biến mất đoạn IC.

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

- Mất đoạn trên NST số 15 nguồn gốc từ bố tại vị trí q11-q13, tỷ lệ 65% - 75%.

- Hai NST 15 đều có nguồn gốc từ mẹ (maternal Uniparental Disomy - mUPD), tỷ lệ 20% - 30%.

- Khiếm khuyết dấu ấn di truyền (Imprinting Defect - ID), tỷ lệ 1% - 5%.

- Chuyển đoạn tương hỗ giữa NST số 15 và NST khác gây mất đoạn NST số 15 vị trí q11-q13, tỷ lệ dưới 1%.

1.4.3.1. Mất đoạn nhiễm sắc thể số 15 nguồn gốc bố vị trí q11-q13

Chiếm 65% - 75% các bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi là do mất đoạn trên NST số 15 có nguồn gốc từ bố vị trí q11-q13, là các đột biến mới (*de novo*). Tỷ lệ mắc 1/8000 trẻ đẻ sống. Thông thường không xác định được nguyên nhân gây mất đoạn và nguy cơ tái xuất hiện PWS trong những lần sinh sau thấp (<1%).

Các mất đoạn chủ yếu chia thành 2 typ: typ 1 mất đoạn giữa hai điểm đứt gãy BP1 và BP3, typ 2 mất đoạn giữa hai điểm đứt gãy BP2 và BP3 của PWCR. Kích thước của đoạn bị mất khoảng 5 - 6Mb, kích thước đoạn mất lớn hay nhỏ có ảnh hưởng đến kiểu hình của bệnh nhân [63]. Một số rất ít các trường hợp là mất đoạn không điển hình, kích thước đoạn mất có thể dài hoặc ngắn hơn mất đoạn typ 1, typ 2.

Các mất đoạn này có thể phát hiện qua phân tích NST với kỹ thuật băng G đặc biệt là kỹ thuật băng có độ phân giải cao. Sử dụng kỹ thuật này có thể phát hiện được các bất thường cấu trúc NST khác như đảo đoạn hay chuyển đoạn. Kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (Fluorescence *In Situ* Hybridization - FISH) được sử dụng để xác định mất đoạn NST số 15 vị trí q11-q13. Đây là tiêu chuẩn vàng để xác định nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST số 15 vị trí q11-q13.

1.4.3.2. Hai đoạn nhiễm sắc thể 15q11-q13 cùng nguồn gốc mẹ (Maternal Uniparental Disomy of chromosome 15 - mUPD)

Uniparental Disomy (UPD) xảy ra khi con nhận cả hai NST hoặc chỉ một đoạn nhỏ trên NST từ cùng nguồn bố hoặc mẹ. Tỷ lệ UPD chiếm 2,8/10000 thai, hiện tượng này gặp ở hầu hết các NST trừ NST số: 12, 18, 19. Hiện tượng trẻ nhận cả hai NST cùng nguồn gốc mẹ có liên quan đến tuổi mẹ cao [64], [65], [19].

Trong các nguyên nhân gây PWS, tỷ lệ mUPD chiếm tỷ lệ 20% - 30%.

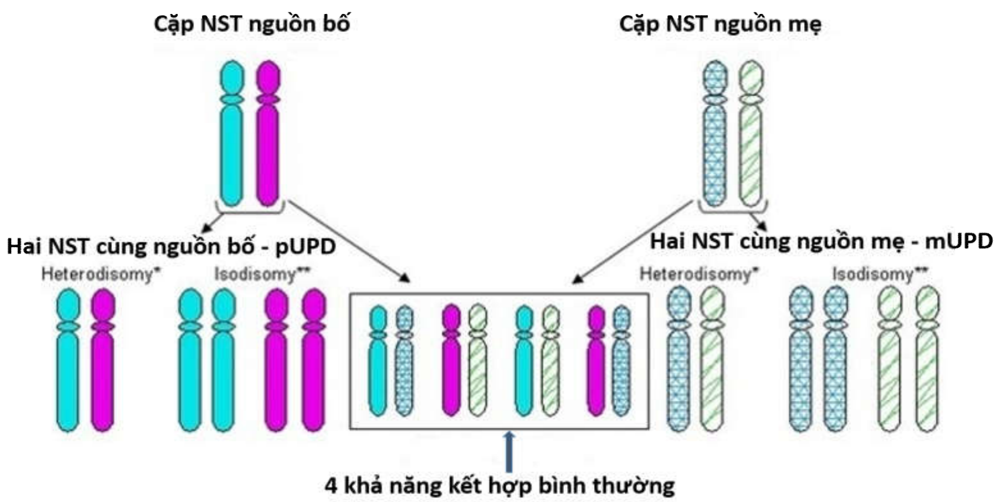
Hai cơ chế chính giải thích cho hiện tượng hai NST có cùng nguồn gốc mẹ:

Trứng không phân ly mang hai NST 15 (ovum disomic) thụ tinh với tinh trùng bình thường tạo thành phôi mang 3 NST 15, trong quá trình phát triển 1 NST 15 nguồn bố mất đi, kết quả phôi vẫn có 46 NST nhưng mang 2 NST cùng nguồn gốc mẹ, gây hội chứng Prader-Willi [66], hiện tượng này được gọi là giải cứu tình trạng tam nhiễm (trisomy rescue).

Tinh trùng không có NST 15 (nullisomic), do kết quả của tình trạng không phân ly cặp NST 15 trong phân bào giảm nhiễm, thụ tinh với trứng bình thường. Do vậy có hiện tượng gấp đôi NST 15 trong hợp tử dẫn đến kết quả phôi mang 2 NST 15 nguồn gốc mẹ, gây hội chứng Prader-Willi [67], hiện tượng này được gọi là giải cứu tình trạng đơn nhiễm (monosomy rescue).

Một số trường hợp hiếm gặp gây nên tình trạng 2 NST 15 nguồn gốc mẹ: lỗi xảy ra sau thụ tinh do tái tổ hợp tế bào sinh dưỡng hoặc chuyển gen; mẹ mang chuyển đoạn hòa hợp tâm (Robertsonian) [68].

Năm 1989, nghiên cứu đầu tiên về hội chứng Prader-Willi do hai NST 15 có nguồn gốc từ mẹ được công bố, chiếm tỷ lệ 25% các bệnh nhân PWS. Di truyền hai NST 15 cùng nguồn gốc từ mẹ, mất sự biểu hiện của gen trên NST số 15 nguồn gốc bố vị trí q11-q13 gây nên những biểu hiện kiểu hình của bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi.



Hình 1.3. Các cơ chế gây tình trạng hai NST có cùng nguồn gốc bố hoặc mẹ [69]

Heterodisomy: hai NST của con thừa hưởng nguyên vẹn cặp NST của bố hoặc mẹ. Isodisomy: hai NST của con thừa hưởng từ 1 trong hai NST của bố hoặc mẹ, sau đó có sự nhân đôi NST đó.

1.4.3.3. Khiếm khuyết dấu ấn di truyền (Imprinting Defect)

Khiếm khuyết dấu ấn di truyền chiếm 1% - 3% bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi do mất chức năng hoạt động của các gen trên NST 15 có nguồn gốc từ bố vị trí q11-q13. Trong số các bệnh nhân này có 15% - 20% do mất đoạn rất nhỏ tại vùng trung tâm dấu ấn di truyền (IC) kích thước 5kb - 200kb, còn lại do các đột biến điểm khác.

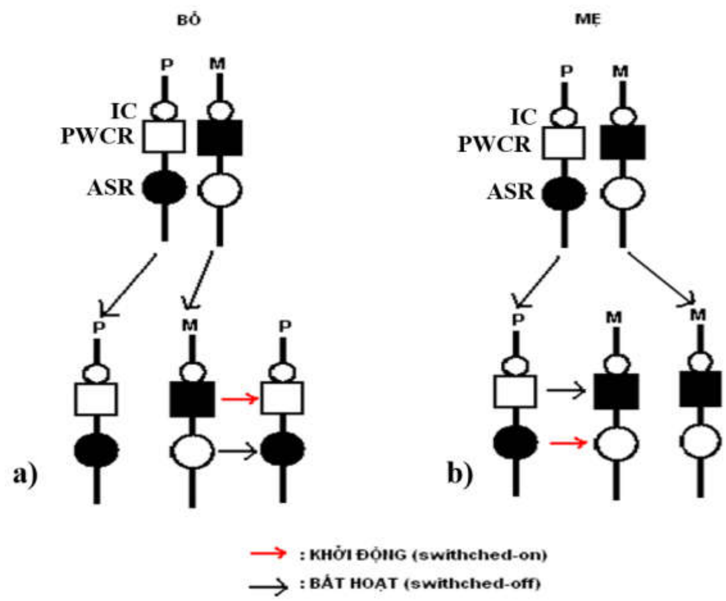
Ở người bình thường trên NST 15 nguồn gốc từ bố có vùng gen Prader-Willi hoạt động, vùng gen Angelman bị bất hoạt, ngược lại trên NST 15 nguồn gốc từ mẹ có vùng gen Prader-Willi bị bất hoạt và vùng gen Angelman hoạt động. Khi giảm phân tạo giao tử sẽ có sự khởi động (swithched-on) và bất hoạt (swithched-off) trạng thái hoạt động của các gen để đảm bảo người con sẽ nhận được vùng gen Prader-Willi hoạt động trên NST 15 có nguồn gốc từ bố và vùng gen Angelman hoạt động trên NST 15 có nguồn gốc từ mẹ. Do đó trong quá trình giảm phân tạo giao tử của người bố và người mẹ diễn ra như sau:

Người bố: tinh trùng nhận NST 15 nguồn gốc từ bố của ông ta giữ nguyên trạng thái hoạt động của vùng gen Prader Willi và bất hoạt vùng gen Angelman, đồng thời tinh trùng nhận NST 15 nguồn gốc từ mẹ của ông ta phải khởi động lại sự hoạt động của vùng gen Prader-Willi và bất hoạt sự hoạt động của vùng gen Angelman.

Người mẹ: tế bào trứng nhận NST 15 nguồn gốc từ mẹ của bà ta giữ nguyên trạng thái hoạt động của vùng gen Angelman và bất hoạt vùng gen Prader Willi, đồng thời tế bào trứng nhận NST 15 nguồn gốc từ bố của bà ta phải bất hoạt vùng gen Prader-Willi và khởi động lại sự hoạt động của vùng gen Angelman.

Trung tâm dấu ấn di truyền (Imprinting Centre - IC) điều khiển sự bất hoạt và khởi động lại này. Khi có khiếm khuyết trong cơ chế dấu ấn di truyền (Imprinting Defect - ID) loại giao tử có nguồn gốc từ bố có vùng gen Prader-Willi bị bất hoạt không được khởi động lại trạng thái hoạt động, đứa trẻ nhận giao tử đó sẽ bị mắc hội chứng Prader-Willi.

Các khiếm khuyết trung tâm dấu ấn di truyền IC có thể xuất hiện đột ngột trong quá trình tạo giao tử hoặc do di truyền từ người bố khi người bố nhận chiếc NST bị khiếm khuyết vùng IC từ mẹ của mình, người bố này không bị PWS (vì gen này nằm trên NST nguồn gốc từ mẹ của ông ta nên bất hoạt) nhưng ông ta có thể truyền NST bị khiếm khuyết vùng IC này sang cho con (NST này trở thành NST có nguồn gốc từ bố sẽ được khởi động vùng gen PWS và bất hoạt vùng gen AS nên đứa trẻ sẽ mắc PWS). Người bố này có nguy cơ sinh con mắc PWS là 50% trong mỗi lần sinh. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho những gia đình mang khiếm khuyết này.



Hình 1.4. Quá trình tạo giao tử

Hình a): quá trình tạo giao tử của NST 15 nguồn gốc bố.

Hình b): quá trình tạo giao tử của NST 15 nguồn gốc mẹ.

P - Nguồn gốc từ bố (Paternal): NST 15 nguồn gốc bố có vùng IC và vùng PWCR hoạt động (màu trắng), vùng ASR bất hoạt (màu đen); M - nguồn gốc từ mẹ (Maternal): NST 15 nguồn gốc mẹ có vùng IC và vùng ASR hoạt động (màu trắng), vùng PWCR bất hoạt (màu đen).

1.4.3.4. Chuyển đoạn tương hỗ nhiễm sắc thể số 15 vị trí q11-q13 với nhiễm sắc thể khác, kèm theo mất đoạn vùng 15q11-q13 gây PWS

<1% bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi do mang các chuyển đoạn giữa NST số 15 và NST khác gây mất đoạn NST số 15 nguồn gốc bố ở vị trí q11-q13.

Người nam mang chuyển đoạn cân bằng giữa NST số 15 vị trí q11-q13 với một NST khác, có khả năng di truyền NST số 15 bị mất đoạn vùng q11-q13 cho con của mình gây nên PWS. Trong trường hợp này khả năng mắc PWS trong những lần sinh sau cao hơn, lên tới 25%.

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

1.5.1. Kỹ thuật di truyền tế bào

Kỹ thuật di truyền tế bào quan sát và nghiên cứu các vật chất di truyền ở mức độ tế bào đó là NST (NST ở kỳ giữa, NST ở gian kỳ …). Để phân tích các bất thường về cấu trúc NST dựa vào băng NST. Băng NST (band) được định nghĩa là một phần của NST, các băng này phân chia NST thành các đoạn bởi các phần sáng hoặc tối với các phương pháp nhuộm băng khác nhau [70].

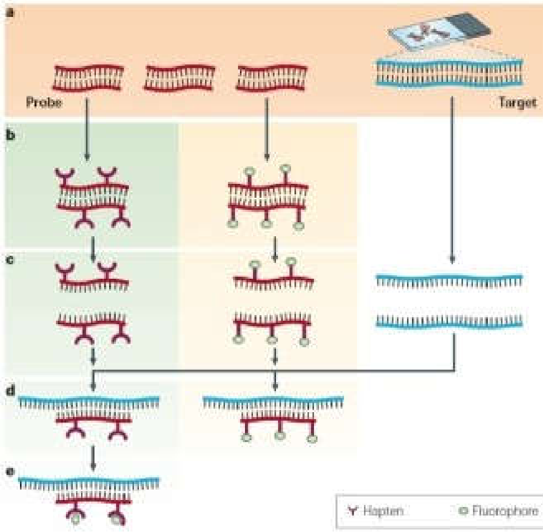
Kích thước đoạn NST bị mất trong PWS là rất nhỏ, chỉ có thể phát hiện với kỹ thuật băng G có độ phân giải cao, do vậy trong quá trình nuôi cấy ngoài sử dụng các hóa chất thông thường có sử dụng thêm FudR (fluorodeoxyuridine) và BrdU (5 - bromodeoxyuridine). Với kỹ thuật nhuộm băng G vùng băng màu đậm là vùng giàu AT, nhân đôi chậm và chứa ít gen. Ngược lại vùng băng màu sáng là vùng băng giàu GC, nhân đôi sớm hơn và là vùng chứa nhiều gen. Dựa vào sự phân bố các băng đậm nhạt như vậy sẽ phát hiện được các biến đổi về cấu trúc NST. Để phát hiện được mất đoạn nhỏ trong PWS, yêu cầu mức độ băng của NST sau khi nhuộm phải đạt được từ 600 - 800 băng khi có ít nhất 3 tiêu chuẩn trong các tiêu chuẩn sau: 2p25.2 rõ; 2q37.2 rõ; 10q21.1 và 10q21.3 phân tách ra; 17q22-q24 phân tách thành 3 băng tối [71].

Tuy nhiên hiện nay hầu hết các labo xét nghiệm di truyền không áp dụng kỹ thuật phân tích NST băng G có độ phân giải cao để xác định mất đoạn NST 15q11-q13, do sự phát triển của các kỹ thuật lai giữa di truyền và phân tử hay kỹ thuật di truyền phân tử với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, quy trình thực hiện đơn giản với giá thành hợp lý. Do vậy trong thực hành lâm sàng chẩn đoán PWS, kỹ thuật phân tích NST đồ băng G thường được áp dụng để phát hiện các bất thường NST kèm theo, trong đó có các chuyển đoạn NST 15 chứa PWCR với các NST khác gây mất đoạn NST 15q11-q13, với mục đích tư vấn di truyền và chỉ định chẩn đoán trước sinh những lần sinh con sau nếu chuyển đoạn NST đó có nguồn gốc từ bố bệnh nhân.

1.5.2. Kỹ thuật lai giữa di truyền tế bào và phân tử

Kỹ thuật FISH là kỹ thuật lai giữa di truyền tế bào và di truyền phân tử được các nhà di truyền tế bào nghiên cứu, cho phép xác định được vị trí của các trình tự DNA đặc biệt trên NST. Bắt đầu từ thí nghiệm lai tại chỗ đầu tiên năm 1969 của Gall và Pardue [72], rất nhiều biến thể của quy trình này đã được phát triển để nâng cao độ nhạy của kỹ thuật. Ngày nay kỹ thuật lai tại chỗ phổ biến nhất sử dụng các đầu dò huỳnh quang để phát hiện các trình tự DNA, do vậy kỹ thuật có tên gọi lai tại chỗ huỳnh quang - FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Năm 1953, James Watson và Francis Crick đã mô tả thành công chuỗi DNA của các sinh vật dựa trên hệ thống các liên kết hydro giữa hai mạch của một sợi xoắn kép: A-T, G-C. Các liên kết hydro này bị phá vỡ dưới tác động của nhiệt hay hóa chất, chuỗi xoắn có thể tái cấu trúc lại. Khả năng tái cấu trúc này của sợi kép DNA là cơ sở nền tảng cho các phép lai phân tử.

Các bước cơ bản của kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang FISH được tiến hành như sau: biến tính trình tự đích và đầu dò đã gắn huỳnh quang (probe) bằng nhiệt hoặc hóa chất. Bước biến tính này giúp bẻ gãy các liên kết hydro cũ và hình thành các liên kết hydro mới giữa trình tự đích và đầu dò ở đoạn lai. Trình tự đích và đầu dò được trộn với nhau, đầu dò sẽ bổ sung đặc hiệu với một trình tự nhất định trên các NST cần khảo sát. Phép lai FISH phát hiện vị trí của phân tử lai trên NST ở kỳ giữa hoặc gian kỳ. Dựa trên việc phân tích các tín hiệu huỳnh quang quan sát được trên kính hiển vi huỳnh quang để xác định được các bất thường NST bao gồm các bất thường cấu trúc NST dạng mất đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn, đảo đoạn hay những lệch bội NST.



a) DNA đích và DNA dò được trộn với nhau

b) Trước khi lai, đầu dò được gắn huỳnh quang trực tiếp fluorophore (ảnh bên phải) hoặc gián tiếp qua các hapten (ảnh bên trái).

c) Biến tính các DNA dò và DNA đích

d) Kết hợp DNA dò và DNA đích theo nguyên tắc bổ sung

e) Phát tín hiệu lai

Hình 1.5. Nguyên lý của kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang - FISH [73]

Kỹ thuật FISH ứng dụng trong chẩn đoán PWS sử dụng đầu dò *SNRPN* đặc hiệu cho vùng gen trên NST 15q11.2, dùng để chẩn đoán xác định các trường hợp mắc PWS thuộc nhóm mất đoạn NST 15q11-q13 có nguồn gốc bố chiếm tỷ lệ 65% - 75% tổng số bệnh nhân PWS.

Hạn chế của kỹ thuật FISH: không xác định được những trường hợp bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 dạng không điển hình, trong đó đoạn mất kích thước rất nhỏ, ngoài vùng bao phủ của đầu dò.

1.5.3. Kỹ thuật di truyền phân tử

Một số kỹ thuật di truyền phân tử được áp dụng trong chẩn đoán PWS: aCGH chẩn đoán xác định những trường hợp bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13; Southern blot, MS-PCR, MS-MLPA để xác định tình trạng methyl hóa phản ánh sự hoạt động của gen *SNRPN*; phân tích microsatellite xác định nguyên nhân hai NST số 15 nguồn gốc mẹ (mUPD); một số kỹ thuật khác phát hiện khiếm khuyết di truyền như kỹ thuật giải trình tự gen. Mỗi phương pháp đều có giá trị nhất định, việc chỉ định các xét nghiệm phụ thuộc vào mục đích: chẩn đoán xác định, chẩn đoán nhóm nguyên nhân hay tư vấn di truyền.

Các xét nghiệm di truyền phân tử được áp dụng phổ biến nhất dựa vào tình trạng methyl hóa khác nhau của các gen trong vùng PWCR trên NST số 15 nguồn gốc bố và mẹ, phân tích methyl hóa DNA chẩn đoán được hơn 99% các bệnh nhân PWS [74]. Một số rất ít các trường hợp PWS còn lại (< 1%) do đột biến các gen *IPW* là một tập hợp các RNA không mã hóa protein, việc xác định đột biến các gen này (nằm ngoài vùng PWCR) chúng tôi không đề cập trong nghiên cứu. Sự khác nhau thể hiện ở nồng độ dinucleotid CpG hay đảo CpG. Đảo CpG tập trung nhiều tại vùng khởi động của gen, tại nucleotid Cytosine. Tại các gen hoạt động có vùng khởi động không bị methyl hóa, tại các gen bất hoạt vùng khởi động bị methyl hóa. Như vậy trên NST số 15 nguồn gốc mẹ, vùng khởi động của các gen PWCR bị methyl hóa, các gen bị bất hoạt; trên NST số 15 nguồn gốc bố, vùng khởi động của các gen PWCR không bị methyl hóa, các gen ở trạng thái hoạt động.

1.5.3.1. Kỹ thuật lai so sánh hệ gen (array Comparative Genomic Hybridization - aCGH)

Kỹ thuật lai so sánh hệ gen cổ điển CGH bản chất cũng như kỹ thuật FISH nhưng cho phép đánh giá trên toàn bộ bộ NST, xác định tình trạng mất cân bằng NST. Kỹ thuật CGH phát hiện được những bất thường NST trong giới hạn 10 - 20Mb [75].

Kỹ thuật aCGH là bước tiến bộ của kỹ thuật CGH cổ điển, phát hiện được những bất thường NST nhỏ như các dạng vi mất đoạn, hoặc vi nhân đoạn.

Nguyên tắc của kỹ thuật aCGH: so sánh mẫu DNA cần phân tích với mẫu DNA chứng, thông qua sự khác biệt giữa hai mẫu DNA để phát hiện các trường hợp mất đoạn hay nhân đoạn DNA. Nguyên lý của kỹ thuật dựa trên khả năng bắt cặp hay lai giữa mạch đơn của DNA này với mạch đơn của DNA khác theo nguyên tắc bổ sung giữa các nucleotide (A-T, G-C).

Áp dụng kỹ thuật aCGH trong chẩn đoán PWS:

+ Chẩn đoán xác định những trường hợp bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13, xác định kích thước đoạn mất, có vai trò trong nghiên cứu đối chiếu biểu hiện lâm sàng và biến đổi di truyền.

+ Đối với những trường hợp bệnh nhân PWS do chuyển đoạn NST 15 với NST khác gây mất đoạn NST 15q11-q13, kỹ thuật aCGH chẩn đoán xác định mất đoạn NST 15q11-q13, kích thước đoạn mất, ngoài ra phát hiện được bất thường của NST chuyển đoạn với NST 15 dạng mất đoạn hay thêm đoạn, từ đó đánh giá các triệu chứng liên quan đến bệnh cảnh chung của PWS giúp cho việc tiên lượng, điều trị hiệu quả hơn.

1.5.3.2. Kỹ thuật phản ứng chuỗi đặc hiệu methyl hóa (Methylation Specific Polymerase Chain Reaction - MS-PCR)

Kỹ thuật MS-PCR là kỹ thuật PCR cải tiến nhằm phát hiện các gen đột biến bị methyl hóa (các nucleotid bị gắn gốc Methyl - CH3, gen bị bất hoạt). Kỹ thuật này sử dụng muối bisulfite để tạo ra sự biến đổi phân tử DNA, sau đó mới tiến hành phản ứng PCR nhân đoạn phân tử DNA đã biến đổi, bisulfite có tác dụng biến Cytosin không methyl hóa thành Uracil, còn Cytosine bị methyl hóa sẽ không bị biến đổi [76].

Vùng gen PWS trên NST 15q11-q13 nguồn gốc từ mẹ bị methyl hóa, do vậy trong trường hợp hai NST 15 cùng nguồn mẹ hay mất đoạn NST 15q11-q13 có nguồn gốc bố hoặc khiếm khuyết dấu ấn di truyền đều cho hình ảnh kết quả MS-PCR như nhau: chỉ xuất hiện sản phẩm PCR bị methyl hóa nguồn gốc từ mẹ. Như vậy kỹ thuật này chẩn đoán được hơn 99% các bệnh nhân tuy nhiên không phân biệt được các nhóm nguyên nhân PWS do mất đoạn NST 15q11.2; hai NST 15 có nguồn gốc từ mẹ hay khiếm khuyết trung tâm dấu ấn di truyền.

1.5.3.3. Kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò đặc hiệu Methyl hóa (Methylation Specific Multiplex Ligation- dependent probe Amplification - MS-MLPA)

MS-MLPA là một phương pháp bán định lượng, phát hiện thay đổi số lượng bản sao và tình trạng methyl hóa. Các bước tiến hành phản ứng MS-MLPA cũng giống như trong kỹ thuật MLPA tiêu chuẩn, tuy nhiên trong kỹ thuật MS-MLPA sử dụng enzym giới hạn nhạy cảm với methyl để khảo sát tình trạng methyl hóa.

Để chẩn đoán PWS, sử dụng các loại kit MS-MLPA thương mại của MRC-Holland [77]. Thông thường những kit này bao gồm các đầu dò đặc hiệu cho vùng NST 15q11-q13 để khảo sát sự thay đổi số lượng bản sao. Trong các đầu dò này sẽ có đầu dò có gắn các enzym cắt giới hạn nhận diện điểm nhạy cảm với tình trạng methyl hóa: enzym HhaI, do vậy sau khi lai chỉ có chuỗi methyl hóa mới bị khuếch đại và có tín hiệu [77], [78].

Bằng cách so sánh độ cao các đỉnh của tín hiệu các sản phẩm khuếch đại vùng gen NST 15q11-q13 với độ cao của vùng gen kiểm chứng, phát hiện sự thay đổi của số lượng các bản sao, do vậy phát hiện được các trường hợp mất đoạn NST 15q11-q13 và phân loại mất đoạn typ 1, typ 2, mất đoạn không điển hình, mất đoạn vùng IC trong nhóm ID. Để phát hiện sự sai lệch về methyl hóa, so sánh độ cao của các tín hiệu trước và sau khi biến tính bằng enzym cắt giới hạn với độ cao mẫu kiểm chứng, từ đó xác định bệnh nhân mắc PWS khi thấy tín hiệu methyl hóa tăng gấp đôi so với mẫu kiểm chứng.

Như vậy áp dụng kỹ thuật MS-MLPA đã chẩn đoán xác định được hơn 99% bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 nguồn gốc từ bố, do 2 NST 15 cùng nguồn gốc từ mẹ (mUPD), hoặc khiếm khuyết dấu ấn di truyền ID. So với các kỹ thuật di truyền phân tử xuất hiện trước như Southern blot hay MS-PCR ưu điểm của kỹ thuật MS-MLPA là xác định được những trường hợp mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1, typ 2, mất đoạn không điển hình, đặc biệt là phát hiện được các trường hợp đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC trong nhóm ID có nguy cơ cao sinh con mắc PWS ở những lần sinh sau. Hạn chế của kỹ thuật MS-MLPA là không phân biệt giữa các trường hợp mUPD và khiếm khuyết vùng trung tâm dấu ấn di truyền ID do đột biến điểm.

1.5.3.4. Khảo sát tính đa hình của DNA

Để chẩn đoán xác định nhóm bệnh nhân PWS do có hai NST 15 có nguồn gốc mẹ, dựa vào nguyên lý khảo sát tính đa hình của DNA. Có thể sử dụng kỹ thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Kỹ thuật nghiên cứu tính đa hình chiều dài các phân đoạn DNA) dựa trên điểm cắt bởi các enzym giới hạn hoặc nghiên cứu cấu trúc đa hình thái lặp lại là các microsatellite, với cấu trúc TG hoặc TA lặp lại (Sort Tandem Repeat - STR) [79]. Kỹ thuật này chỉ áp dụng trên các bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định nhưng chưa phân loại nhóm nguyên nhân do mất đoạn NST 15q11-q13, hai NST số 15 nguồn gốc mẹ (mUPD) hay do khiếm khuyết dấu ấn di truyền (ID).

1.5.3.5. Kỹ thuật giải trình tự gen

Trong nhóm bệnh nhân PWS do nguyên nhân khiếm khuyết dấu ấn di truyền (ID), có 15% - 20% do đột biến mất đoạn vùng trung tâm dấu ấn di truyền (IC). Các bệnh nhân PWS do mất đoạn IC hầu hết có tính chất di truyền, do bố bệnh nhân có mang mất đoạn IC nguồn gốc từ mẹ ông ta, nguy cơ sinh con mắc PWS ở các lần sinh của người bố này là 50% [80]. Các trường hợp này cần được tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh ở những lần sinh sau. 80% - 85% các trường hợp khiếm khuyết dấu ấn di truyền ID còn lại do các đột biến điểm IC.

Để phát hiện mất đoạn IC sử dụng phương pháp MS-MLPA (trình bày ở trên), để phát hiện các đột biến điểm sử dụng phương pháp giải trình tự gen.

Giải trình tự DNA là phương pháp cho phép phân tích một cách chính xác trình tự nucleotid của từng gen hoặc của một vùng gen được quan tâm.

Phương pháp hiện nay được sử dụng phổ biến nhất trong các phòng xét nghiệm di truyền là phương pháp giải trình tự DNA tự động, dựa trên nguyên lý của phương pháp Sanger, được mô tả lần đầu tiên bởi Sanger và cộng sự vào năm 1977. Người ta dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại dNTP. Nhờ vậy phản ứng giải trình tự có thể được thực hiện trong một ống nghiệm và chỉ cần điện di trên một hàng chứ không phải trên 4 hàng khác nhau như trước đây. Đối với phương pháp này, hệ thống điện di thường sử dụng là điện di mao quản. Mỗi khi có một vạch điện di đi qua, phân tử dNTP cuối cùng ở đầu 3’ của đoạn DNA sẽ phát ra một màu huỳnh quang tương ứng, máy sẽ ghi nhận màu sắc và 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. Phương pháp này cho phép xác định hầu hết các đột biến điểm, đột biến mất đoạn nhỏ hoặc lặp đoạn của gen.

1.6. Nghiên cứu về hội chứng Prader-Willi trên thế giới và tại Việt Nam

Trên thế giới, nghiên cứu về PWS rất phong phú đa dạng: biểu hiện lâm sàng, biến đổi di truyền, phương pháp điều trị,… Tại châu Á, một số nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng và di truyền của PWS trên số lượng ít bệnh nhân (n = 30-31) ở Trung Quốc và Hàn Quốc [81], [82]. Trong các nghiên cứu này mô tả các đặc điểm lâm sàng, cách thức tiếp cận chẩn đoán, phân tích sự cải thiện các triệu chứng lâm sàng sau điều trị GH. Tại Hoa Kỳ, nghiên cứu của Merlin và các cộng sự, tiến hành trên 510 bệnh nhân, sử dụng các kỹ thuật xét nghiệm di truyền tiên tiến để chẩn đoán PWS như MS-MLPA, microarray độ phân giải cao sử dụng các đầu dò đa hình đơn nucleotide (high-resolution SNP microarray). Với các kỹ thuật này nghiên cứu đã phân loại các bất thường di truyền gây PWS: mất đoạn typ 1, mất đoạn typ 2, mất đoạn IC, mUPD dạng heterodisomy, isodisomy một phần hay hoàn toàn, từ đó đưa ra mối liên hệ giữa đặc điểm lâm sàng và các biến đổi di truyền, tiên lượng và định hướng trong điều trị, quản lý bệnh nhân, nhận định nguy cơ sinh con bệnh ở những lần sinh sau [83]. Nghiên cứu của Kim S.J trên 88 bệnh nhân PWS đa chủng tộc tại Hoa Kỳ do mất đoạn NST 15q11-q13, phát hiện 7 bệnh nhân có mất đoạn NST 15q11-q13 không thuộc nhóm điển hình typ 1 hay typ 2, các bệnh nhân này mang các mất đoạn NST 15 kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn các thể điển hình. Phân tích các đặc điểm lâm sàng từ đó xác định vai trò các gen trong biểu hiện kiểu hình của bệnh nhân [84]. Tác giả Matsumura báo cáo một trường hợp bệnh nhân PWS mất đoạn NST 15q11-q13 do chuyển đoạn giữa NST 15 và NST 22, bệnh nhân mang những đặc điểm lâm sàng nặng nề, ngoài các đặc điểm lâm sàng điển hình của PWS, bệnh nhân còn mang những dị tật trong hội chứng Cat-eye do nhân đoạn NST 22q11 [85].

Tại châu Âu: nghiên cứu của Cesline trên 61 bệnh nhân PWS tại Pháp, nghiên cứu của Cizmecioglu trên 90 bệnh nhân PWS tại Đức. Các nghiên cứu này chú trọng về vấn đề thách thức trong việc đưa ra chẩn đoán sớm PWS trong độ tuổi sơ sinh, từ đó có các can thiệp điều trị tốt nhất cho bệnh nhân, giảm tối đa các biến chứng của tình trạng giảm trương lực cơ, can thiệp hỗ trợ cho ăn, giảm tình trạng bệnh nhân phải nhập viện vì các bệnh lý đường hô hấp nặng, nhằm nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân PWS ngay sau sinh [86], [87]. Các nghiên cứu về từng đặc điểm lâm sàng nặng của các bệnh nhân PWS cũng được tiến hành, như về tình trạng thừa cân béo phì, giảm trương lực cơ, cong vẹo cột sống, chậm phát triển tâm thần vận động,… [88], [29], [89], [90].

Tại Việt nam, Bệnh viện Nhi Trung ương bắt đầu tiến hành chẩn đoán và điều trị các bệnh nhân PWS từ 2007, hiện nay là nơi quản lý hầu hết các bệnh nhân PWS của cả nước. Có một số nghiên cứu về PWS trong nước được công bố, như đề tài tốt nghiệp bác sỹ nội trú năm 2012 tại trường đại học Y Hà nội của Nguyễn Thị Mai, nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của PWS, trên 28 bệnh nhân PWS [91]. Trong nghiên cứu này với số lượng bệnh nhân ít, về lâm sàng tác giả mới chỉ thống kê một số triệu chứng chính của bệnh như: giảm trương lực cơ, béo phì, thiểu năng sinh dục, chậm phát triển tâm thần vận động, bộ mặt bất thường… tuy nhiên chưa phân tích được sự thay đổi các triệu chứng này theo từng giai đoạn phát triển của trẻ, từ đó có ý nghĩa trong thực hành chẩn đoán bệnh trên lâm sàng. Về xét nghiệm di truyền chẩn đoán bệnh, tác giả sử dụng kỹ thuật FISH là kỹ thuật chỉ xác định được 70%-75% số lượng bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11.2. Bùi Phương Thảo và cộng sự nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm của bệnh nhân PWS trên 26 bệnh nhân năm 2013, 80 bệnh nhân năm 2015 [92], [93]. Các công bố này dưới dạng bản tóm tắt các nghiên cứu trên bệnh nhân PWS tại Việt nam, tổng kết các triệu chứng lâm sàng của PWS, áp dụng kỹ thuật FISH để chẩn đoán các bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11.2.

Năm 2017, An Thùy Lan và cộng sự công bố tóm tắt nghiên cứu trên 118 bệnh nhân PWS về các đặc điểm lâm sàng và biến đổi di truyền của PWS, áp dụng các kỹ thuật chẩn đoán PWS là kỹ thuật FISH và MS-PCR. Các nghiên cứu này bước đầu đưa ra các đặc điểm lâm sàng và biến đổi di truyền của các bệnh nhân PWS tại Việt Nam.

Về sàng lọc và chẩn đoán trước sinh PWS đang áp dụng tại Việt Nam:

Để sàng lọc trước sinh PWS, có thể áp dụng kỹ thuật xét nghiệm sàng lọc trước sinh không xâm lấn NIPT, sàng lọc được những trường hợp thai nguy cơ cao mắc PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 và 4 hội chứng vi mất đoạn các NST khác.

Chẩn đoán trước sinh, áp dụng kỹ thuật Bobs, chẩn đoán xác định được những trường hợp PWS do mất đoạn NST 15q11-q13. Kỹ thuật này được chỉ định cho những thai phụ có nguy cơ cao với các xét nghiệm sàng lọc triple test, double test, như vậy ngoài phát hiện mất đoạn NST 15q11-q13 còn phát hiện được 8 hội chứng do vi mất đoạn ở các NST khác.

Đối với những cặp vợ chồng có nguy cơ cao sinh con mắc PWS:

- Người chồng mang NST 15 chuyển đoạn cân bằng với 1 NST khác trong bộ NST gây mất đoạn NST 15q11-q13 có nguy cơ truyền NST mất đoạn này sang con gây PWS.

- Người chồng có đột biến mất đoạn IC trên NST 15q11-q13 có nguồn gốc từ người mẹ anh ta và truyền NST đột biến này cho con gây PWS.

Chỉ định xét nghiệm chẩn đoán trước sinh có thể thực hiện kỹ thuật phân tích NST băng G kết hợp với các kỹ thuật như FISH hoặc Bobs, MS-PCR hoặc MS-MLPA ở tế bào ối.

Chương 2
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại Bệnh viện nhi trung ương trong thời gian từ 2009 - 2018.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

101 bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng mắc hội chứng Prader-Willi tại Bệnh viện nhi trung ương, bao gồm 36 trường hợp nghiên cứu hồi cứu (2009 - 2013) và 65 trường hợp nghiên cứu tiến cứu (2013 - 2018).

2.2.1. Tiêu chuẩn chọn đối tượng nghiên cứu

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

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

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

Bảng điểm Holm [12]:

Triệu chứng nặng: gồm 7 triệu chứng

Một triệu chứng nặng = 1 điểm.

1. Giảm trương lực cơ trung tâm khởi phát từ thời kỳ sơ sinh và tăng dần.
2. Cần phải hỗ trợ trong quá trình ăn uống, chậm lớn trong giai đoạn dưới 1 tuổi.
3. Tăng cân nhanh hơn so với chiều cao trong giai đoạn 2 - 6 tuổi, béo phì trung tâm.
4. Các đặc điểm khuôn mặt điển hình của hội chứng Prader-Willi: thái dương hẹp, khe mắt hình hạnh nhân, sống mũi hẹp, môi trên rất mỏng, khóe miệng hướng xuống dưới.
5. Thiểu sản sinh dục.
6. Chậm phát triển tâm thần vận động.
7. Chứng ăn không kiểm soát.

Triệu chứng nhẹ: gồm 9 triệu chứng

Một triệu chứng nhẹ = 0,5 điểm.

1. Giảm vận động trong thời kỳ bào thai, khóc yếu.
2. Các đặc điểm về phát triển tính cách: hay tức giận, ngang bướng, khó kiểm soát hành vi bản thân.
3. Rối loạn giấc ngủ: cơn thức tỉnh bất thường, cơn ngừng thở.
4. Tầm vóc thấp.
5. Giảm sắc tố da.
6. Bàn tay, bàn chân nhỏ.
7. Bất thường mắt: lác trong, cận thị.
8. Giảm tiết nước bọt: nước bọt dẻo.
9. Bất thường phát triển ngôn ngữ.

2.2.2. Tiêu chuẩn loại trừ đối tượng nghiên cứu

- Các bệnh nhân không được đánh giá đầy đủ các triệu chứng lâm sàng và các xét nghiệm theo mẫu bệnh án.

- Các bệnh nhân bỏ nghiên cứu.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Hội chứng Prader-Willi là bệnh hiếm, tỷ lệ mắc bệnh thấp nên nghiên cứu chọn mẫu theo phương pháp chọn mẫu thuận tiện trên cơ sở bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ.

Nghiên cứu một loạt các ca bệnh (case series study).

Nội dung nghiên cứu bao gồm:

- Nghiên cứu các đặc điểm lâm sàng: đánh giá tại thời điểm chẩn đoán, theo dõi tiến cứu và hồi cứu.

- Các biến đổi di truyền gây mất hoạt động chức năng vùng gen PWS trên NST 15 nguồn gốc bố.

2.3.1. Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng

Hỏi bệnh và tiền sử.

Phỏng vấn cha mẹ về thời gian khởi phát bệnh, các dấu hiệu của bệnh, thói quen ăn uống, đặc điểm giấc ngủ, các đặc điểm tính cách, quá trình theo dõi và điều trị trước khi đến khám ở Bệnh viện Nhi trung ương.

Phỏng vấn cha mẹ về tiền sử mang thai: cử động thai nhi, đẻ thường hay đẻ mổ, cân nặng lúc đẻ.

Khám bệnh:

- Đánh giá sự tăng trưởng về thể chất: kết quả tăng trưởng thể chất được đánh giá theo bảng chuẩn của trẻ em trên toàn thế giới (cả trẻ em Việt Nam) của tổ chức Y tế Thế giới WHO 2006.

+ Cân nặng: khi cân, trẻ mặc quần áo mỏng, xa bữa ăn và sau khi đi vệ sinh.

+ Chiều cao nằm:

Áp dụng đo chiều dài cơ thể tư thế nằm đối với trẻ ≤ 24 tháng. Dụng cụ: thước nhựa cứng Seca, có chặn đầu và chân, thước chia đến milimet.

Cách đo: để thước trên mặt phẳng ngang, đặt trẻ ở tư thế nằm ngửa trên thước đo, đầu trẻ chạm sát tấm chắn cố định phía trên của thước đo ghi chỉ số 0, cố định đầu trẻ bởi một người giữ, người thứ hai dùng 1 tay cố định đầu gối trẻ để chân trẻ thẳng áp sát thước, tay kia di chuyển tấm chặn di động của thước sát gót, đảm bảo bàn chân vuông góc với thước đo, ghi lại kết quả bằng cm với 1 chữ số lẻ.

+ Chiều cao đứng:

Áp dụng đo chiều cao cơ thể trẻ > 24 tháng. Dụng cụ: thước đo có độ chia milimet, chiều cao đứng là chiều cao từ mặt đất đến đỉnh đầu. Trẻ đứng tự nhiên, đi chân không, đầu thẳng, đuôi mắt và lỗ tai ngoài tạo thành đường thẳng song song với mặt đất. Bốn điểm chạm đất: chẩm, lưng, mông, gót chân. Thước nâng áp sát đỉnh đầu và vuông góc với thước đo, chiều cao đứng tính từ mặt đất đến điểm cao nhất của đỉnh đầu, ghi kết quả bằng cm với 1 chữ số lẻ.

Tính chỉ số BMI = cân nặng/(chiều cao)², trong đó cân nặng tính theo đơn vị kilogram (kg), chiều cao tính theo đơn vị mét (m).

Đánh giá BMI:

<18,5: thiếu cân

18,5 - 25: bình thường

25 - 29,9: thừa cân

≥ 30: béo phì

- Đánh giá sự phát triển tâm thần vận động bởi các bác sĩ chuyên ngành tâm thần.

+ Trẻ dưới 6 tuổi: đánh giá bằng test Denver II (DDST - Denver Developmental Screening Test) đã được áp dụng tại Bệnh viện nhi Trung ương từ năm 2004. Đánh giá dựa trên bốn khả năng hoạt động của bệnh nhân: vận động thô sơ, ngôn ngữ, vận động tinh tế - thích ứng, cá nhân - xã hội. Chỉ số phát triển DQ = tuổi phát triển / tuổi thực x 100%.

Kết quả phân loại chỉ số phát triển DQ dựa trên tỷ lệ % trẻ làm được, chia theo mức độ như sau [94]:

DQ ≥ 75%: không chậm phát triển tâm thần.

DQ > 66,7 - <75%: chậm phát triển tâm thần nhẹ.

DQ > 50% - ≤66,7%: chậm phát triển tâm thần trung bình.

DQ ≤ 50%: chậm phát triển tâm thần nặng.

+ Trẻ trên 6 tuổi được đánh giá bằng test Raven, gồm hai loại: PMS (Progressive Matrices) là bài trắc nghiệm không màu gồm 60 câu hỏi từ dễ đến khó và PMC là bài trắc nghiệm gồm 36 câu hỏi có màu. Cả hai loại đều được sử dụng linh hoạt tùy đối tượng, là những bài trắc nghiệm phi ngôn ngữ, áp dụng được cho cả những trẻ chậm nói, chậm phát triển tâm thần…

Đánh giá chậm phát triển tâm thần theo Tổ chức y tế thế giới (WHO) và Hiệp hội tâm thần Mỹ (DMS-IV), sử dụng chỉ số IQ [95], [96], [97], [98], [99]:

IQ $\geq$ 70: không chậm phát triển tâm thần.

50 $\leq$ IQ < 70: chậm phát triển tâm thần nhẹ.

35 $\leq$ IQ < 50: chậm phát triển tâm thần trung bình.

IQ < 35: chậm phát triển tâm thần nặng.

Đánh giá chỉ số DQ, IQ và phân loại CPTTT do các bác sỹ chuyên ngành tâm thần thực hiện. Các test đánh giá chỉ số DQ, IQ được sử dụng trong nghiên cứu này là test Raven và test Denver II (phụ lục).

- Khám trương lực cơ thực hiện bởi các bác sĩ chuyên khoa nhi, cách khám:

Độ chắc của cơ: nắn bóp các cơ của bệnh nhân xem có rắn chắc hay nhão.

Độ ve vẩy: hai tay người khám nắm 2 đùi bệnh nhân trong tư thế nằm, lắc qua lắc lại với 1 cường độ giống nhau ở 2 bên. Ở chi trên: cầm cẳng tay bệnh nhân lắc qua lắc lại theo chiều gấp duỗi.

Độ gấp duỗi: người khám gấp duỗi cổ tay, cẳng tay; cổ chân, cẳng chân bệnh nhân.

Bệnh nhân được chẩn đoán có giảm trương lực cơ khi giảm độ chắc của cơ, tăng độ ve vẩy và tăng độ gấp duỗi.

- Khám cơ quan sinh dục và các đặc tính sinh dục phụ:

+ Khám tinh hoàn: bệnh nhân đứng hoặc nằm ngửa, người khám sờ nắn tinh hoàn hai bên để xác định có ẩn tinh hoàn hay không, đối chiếu kết quả siêu âm tinh hoàn. Chẩn đoán ẩn tinh hoàn khi khám lâm sàng không thấy tinh hoàn (1 hoặc 2 bên) trong bìu, siêu âm xác định vị trí tinh hoàn ẩn trong ổ bụng, ống bẹn hoặc không quan sát được.

Đối với những trường hợp có tinh hoàn trong bìu, sử dụng thước Prader so sánh với các đơn vị thể tích có sẵn trên thước để tính ra thể tích.

+ Bìu có nhạt màu và thiểu sản không.

+ Đo chiều dài dương vật: đo bằng thước cứng từ gốc dương vật (vùng tiếp giáp giữa dương vật và xương mu) đến đầu ngoài dương vật (không gồm phần da bao quy đầu).

So sánh thể tích tinh hoàn và chiều dài dương vật với “Các giá trị sinh học người Việt Nam thập kỷ 90 thế kỷ XX” để xác định những trường hợp bệnh nhân có thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài [100].

+ Thiểu sản âm vật, môi bé, môi lớn.

+ Lông sinh dục.

+ Phát triển tuyến vú.

+ Tuổi xương: thực hiện tại khoa chẩn đoán hình ảnh bệnh viện nhi trung ương, chụp Xquang xương cổ tay bàn tay trái. Nhận định kết quả dựa trên atlas tuổi xương bàn tay trên phim kỹ thuật số, dựa trên atlas tuổi xương cổ điển của Greulich và Pyle [101].

Dậy thì sớm: khi các đặc tính sinh dục đầu tiên xuất hiện trước 10 tuổi ở trẻ trai và trước 8 tuổi ở trẻ gái, tuổi xương và chiều cao lớn hơn tuổi thực, thể tích tinh hoàn lớn hơn so với tuổi thực ở trẻ trai, phát triển tuyến vú sớm ở trẻ gái.

Dậy thì muộn: khi trẻ trai > 15 tuổi, trẻ gái > 13 tuổi chưa xuất hiện đặc tính sinh dục phụ đầu tiên, tuổi xương, chiều cao, thể tích tinh hoàn, phát triển tuyến vú chậm hơn so với tuổi thực.

- Mô tả đặc điểm khuôn mặt: trán hẹp, mắt hình quả hạnh, môi trên mỏng, môi dưới trễ, cằm nhỏ, sống mũi hẹp; dấu hiệu bàn tay bàn chân nhỏ, dấu hiệu bàn chân phẳng.

- Khám chuyên khoa cột sống: chẩn đoán cong vẹo cột sống.

- Khám chuyên khoa mắt: lác mắt, giảm thị lực hay các dị tật mắt khác.

2.3.2. Nghiên cứu các đặc điểm di truyền

Mẫu bệnh phẩm:

2ml máu tĩnh mạch có chống đông heparin để xét nghiệm phân tích nhiễm sắc thể đồ và xét nghiệm lai tại chỗ huỳnh quang FISH.

2ml máu tĩnh mạch chống đông EDTA, tách chiết DNA thực hiện các xét nghiệm di truyền phân tử: MS-PCR và MS-MLPA.

Các kỹ thuật xét nghiệm di truyền:

Xét nghiệm phân tích NST, FISH, MS-MLPA được tiến hành tại khoa Di truyền và sinh học phân tử - Bệnh viện nhi trung ương.

Xét nghiệm MS-PCR tiến hành tại Trung tâm di truyền y học - Trung tâm y học Aasn - Seoul - Hàn Quốc.

2.3.2.1. Kỹ thuật di truyền tế bào phân tích NST nhuộm băng G

Các bước tiến hành như sau:

Lấy 2ml mẫu máu toàn phần được lấy vô trùng chống đông Heparin.

Môi trường nuôi cấy tế bào: RPMI 1640 (môi trường dư thymidin, hóa chất của hãng Gibco - Mỹ), Fetal Bovin Serum, PHA (phytohemagglutinine, hóa chất của hãng Gibco - Mỹ).

Mẫu nuôi cấy trong flask vô trùng thể tích 25ml, 13 - 15 giọt máu toàn phần trong 8ml môi trường, flask nuôi cấy đặt trong tủ ấm 37°C, thời gian 72h. Trước khi thu hoạch 30 phút bổ sung Cholcemid.

Thu hoạch tế bào: nhược trương bằng dung dịch KCl, nồng độ 0,075M. Định hình tế bào bằng dung dịch Carnoy, tỷ lệ 3 methanol : 1 axit acetic.

Nhuộm tiêu bản bằng kỹ thuật băng G và nhuộm Giemsa.

Lập Karyotype: xếp bộ NST theo quy ước quốc tế. Chụp ảnh một số tế bào ở kỳ giữa, tách rời từng NST xếp cặp theo quy ước quốc tế.

Mục đích áp dụng kỹ thuật phân tích NST nhuộm băng G trong PWS: phát hiện các bất thường NST trong đó có chuyển đoạn giữa NST số 15 và NST khác, gây mất đoạn NST 15q11-q13 là một trong những nhóm nguyên nhân gây PWS có tính chất di truyền nếu bất thường NST có nguồn gốc từ bố bệnh nhân.

2.3.2.2. Kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH)

Kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH) sử dụng các đầu dò gắn huỳnh quang để phát hiện trình tự DNA. Áp dụng kỹ thuật FISH chẩn đoán được 65% - 75% các trường hợp mắc PWS do mất đoạn NST 15q11.2 nguồn gốc bố.

Mẫu bệnh phẩm: sử dụng tế bào máu ngoại vi sau khi nuôi cấy theo quy trình phân tích NST, các bước tiến hành như sau:

+ Tạo tiêu bản.

+ Đánh dấu vùng lai bằng bút kim cương.

+ Phủ đầu dò (probe) lên vùng lai: thường dùng 0,5 - 1 µl/ 1 lần.

+ Dán lamen lên vùng lai.

+ Biến tính bằng nhiệt, điều kiện 77°C trong 5 phút.

+ Lai ở điều kiện 37°C trong vòng 16 - 24h.

+ Bóc lamen dán, rửa bằng dung dịch PBS có bổ sung NP40.

+ Phủ dapi II lên vùng lai, dán lamen lên vùng phủ dapi II.

+ Phân tích tín hiệu huỳnh quang trên kính hiển vi huỳnh quang.

Chẩn đoán bệnh nhân mắc PWS bằng kỹ thuật FISH sử dụng 3 đầu dò:

1. Đầu dò *SNRPN, snoRNA, UBEA3* đặc hiệu cho vùng gen trên NST 15q11.2 (vị trí gen nằm giữa 15q11-q13), tín hiệu lai có màu đỏ, (ký hiệu Red - R).
2. Đầu dò PML để kiểm chứng vùng gen trên NST 15q24, tín hiệu lai có màu xanh lá cây, (ký hiệu Green - G).

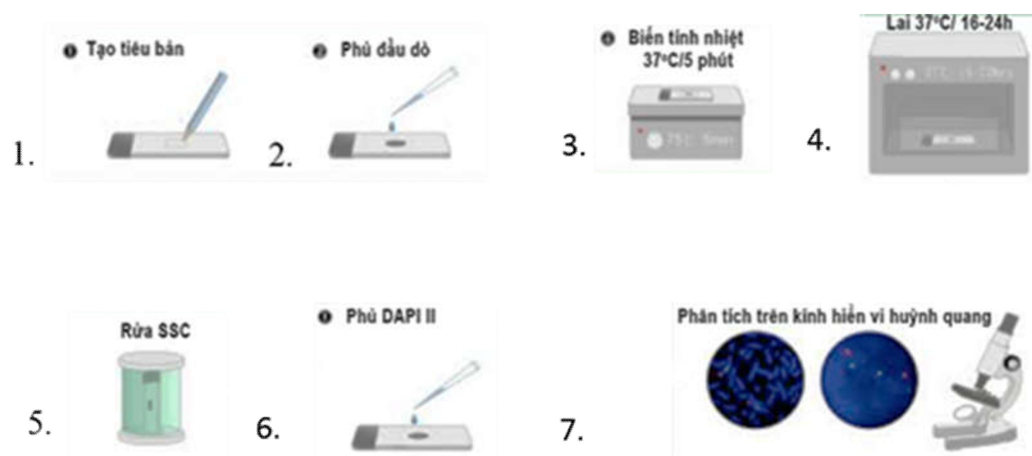
3. Đầu dò vùng tâm (centromere) dùng để kiểm chứng, tín hiệu lai có màu aqua, (ký hiệu A).

Phân tích kết quả dưới hệ thống kính hiển vi huỳnh quang sử dụng phần mềm ISIS (metasystem):

+ Người không bị mất đoạn NST 15q11.2: trên 1 tế bào gian kỳ hay 1 cụm NST kỳ giữa có hai tín hiệu đỏ của gen *SRNPN*, 2 tín hiệu xanh lá cây của gen *PML*, 2 tín hiệu aqua của vùng tâm, kết quả lai 2R2G2A.

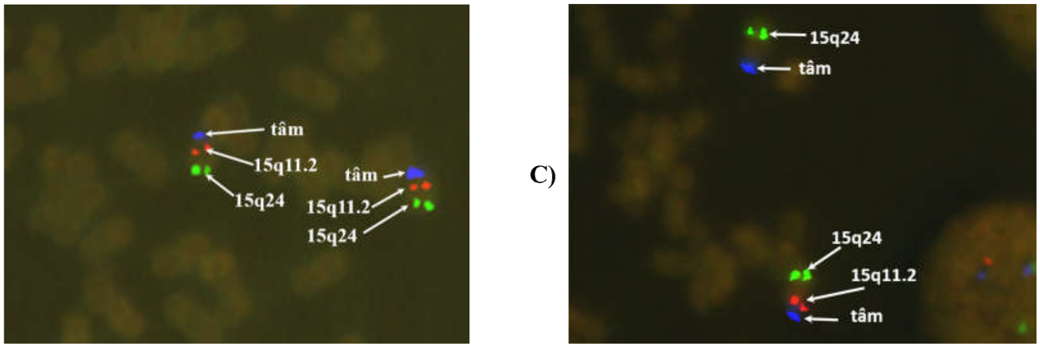
+ Bệnh nhân PWS bị mất đoạn 15q11.2: trên 1 tế bào gian kỳ hoặc 1 cụm NST kỳ giữa chỉ có 1 tín hiệu đỏ của gen *SNRPN*, 2 tín hiệu xanh lá cây của gen PML và 2 tín hiệu aqua của vùng tâm, kết quả lai 1R2G2A.

Áp dụng kỹ thuật FISH trong PWS chẩn đoán được những bệnh nhân mắc PWS do mất đoạn NST 15q11.2 nguồn gốc từ bố, chiếm tỷ lệ 65% - 75% những trường hợp PWS. Hạn chế của kỹ thuật FISH là không phân biệt được mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1 hay typ 2. Kỹ thuật FISH cũng không phát hiện được những trường hợp mất đoạn NST 15q11-q13 dạng không điển hình trong đó kích thước đoạn mất rất nhỏ, nằm ngoài vùng phủ của các đầu dò.



A)

B) C)



Hình 2.1. Quy trình làm kỹ thuật FISH và nhận định kết quả

A) Quy trình làm FISH, B) Kết quả FISH không mất đoạn NST 15q11.2 (2R2G2A). C) Kết quả FISH mất đoạn NST 15q11.2 (1R2G2A).

2.3.2.3. Kỹ thuật phản ứng chuỗi đặc hiệu methyl hóa (Methylation Specific Polymerase Chain Reaction - MS-PCR)

Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số

Mẫu bệnh phẩm: 2ml máu ngoại vi chống đông bằng EDTA

Nguyên lý chung: phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA.

Các bước tiến hành:

+ Cho 20 µl Protease QIAGEN vào mỗi ống li tâm 1,5ml, sau đó cho tiếp 200µl mẫu máu vào trong ống.

+ Thêm 200 µl dung dịch đệm, trộn đều.

+ Ủ 56°C trong 10 phút.

+ Thêm 200 µl Ethanol (96 - 100%), trộn đều.

+ Chuyển toàn bộ hỗn hợp trên vào cột lọc QIAamp, ly tâm cột lọc 8000 vòng/phút trong 1 phút. Sau đó bỏ dịch nổi, chuyển cột lọc sang ống 2 ml sạch khác.

+ Thêm 500 µl dung dịch đệm AW1, ly tâm ống với tốc độ 8000 vòng/phút trong 1 phút, hút bỏ dịch nổi, chuyển cột lọc sang ống 2 ml sạch khác.

+ Thêm 500 µl dung dịch đệm AW2, ly tâm ống với tốc độ 13000 vòng/phút trong 3 phút, hút bỏ dịch nổi, chuyển cột lọc sang ống li tâm 1,5 ml vô trùng.

+ Thêm 200 µl dung dịch AE vào cột lọc, ủ nhiệt độ phòng trong 1 phút, sau đó ly tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 1 phút thu DNA tổng số.

+ DNA tổng số sau khi tách chiết được đo nồng độ và tinh sạch bằng máy Nano Drop, kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280nm.

Kỹ thuật MS-PCR

Kỹ thuật MS-PCR là kỹ thuật PCR cải tiến nhằm phát hiện các gen đột biến bị methyl hóa (các nucleotid bị gắn gốc Methyl - CH3, gen bị bất hoạt). Kỹ thuật này sử dụng bổ sung muối bisulfite để tạo ra sự biến đổi phân tử DNA, sau đó mới tiến hành phản ứng PCR nhân đoạn phân tử DNA đã bị biến đổi, bisulfite có tác dụng biến Cytosin không methyl hóa thành Uracil, còn Cytosine bị methyl hóa sẽ không bị biến đổi [76]. So với kỹ thuật Southern Blot, kỹ thuật MS - PCR chỉ cần một lượng rất nhỏ DNA [102].

Áp dụng kỹ thuật MS-PCR trong chẩn đoán hội chứng Prader-Willi

Hóa chất sử dụng:

NaOH 1N.

Natri Bisulfite 3,5M: Hòa tan 4,05g natri bisulfite trong 7 ml nước cất, điều chỉnh pH đến 5,0 (sử dụng NaOH 5N), thêm 0,5 ml hydroquione 20mM và điều chỉnh thể tích thành 10 ml.

Bộ kit EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo).

Quy trình kỹ thuật MS-PCR

Xử lý DNA với Bisulfite:

- 1 g DNA được hòa tan trong 20 ul dung dịch DW, biến tính ở 94°C trong 5 phút và giữ lạnh trong đá 5 phút.

- Thêm 5 ul NaOH 1N và ủ ở 37°C trong 10 phút. Thêm 250ul dung dịch natri bisulfite 3,5 M và sau đó được ủ ở 50°C.

Tinh sạch DNA đã xử lý với bisulfite

- Thêm 400ul dung dịch đệm M-Binding buffer vào 100ul DNA đã xử lý bằng Bisulfite. Sau đó chuyển toàn bộ dung dịch vào cột lọc Zymo-Spin™ IC. Ly tâm với tốc độ 10000 x g trong 30 giây, bỏ dịch nổi. Thêm 100ul dung dịch đệm M-Wash buffer và ly tâm với tốc độ 10000 x g trong 30 giây. Thêm 200ul dung dịch đệm M-Desulphonation và ủ ở nhiệt độ phòng từ 15-20 phút. Sau đó ly tâm với tốc độ 10000 x g trong 30 giây và bỏ dịch nổi. Tiếp thục thêm 200ul dung dịch M-Wash vào cột lọc và ly tâm với tốc độ tương tự. Tiến hành lặp lại bước thêm dung dịch M-wash và ly tâm để loại bỏ dịch nổi lần nữa. Sau đó chuyển cột lọc sang ống 1,5ml sạch, vô trùng. Thêm 10ul dung dịch đệm M-elution và ly tâm thu DNA tinh sạch.

Thực hiện phản ứng PCR

Phản ứng PCR lần 1 được thiết kế với các thành phần sau: 2,5ul dung dịch10X PCR buffer, 2ul $MgCl_2$ 15mM, 2ul dNTP 25mM, H_2O, 0,2ul 5U Taq polymerase (Invitrogen), 1ul mồi xuôi (10 uM/ul), 1ul mồi ngược (10 uM/ul), và 1µl DNA đã biến tính bằng bisulfite. Phản ứng bao gồm cả mẫu DNA chứng dương tính và bình thường cho từng loại đột biến và mẫu chứng không có DNA. Phản ứng PCR được chạy với máy PCR Eppendorf Thermocycler (Germany), với các trình tự mồi được thiết kế theo các nghiên cứu của Trung tâm Y học Aasn - Hàn Quốc như sau:

Mồi xuôi: 5’-GGTTTTTTTTATTGTAATAGTGTTGTGGGG-3’

Mồi ngược: 5’-CTCCAAAACAAAAACTTTAAACCCAAATTC-3’

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR lần 1:

95°C	5 phút	
95°C	15 giây	35 chu kỳ
56°C	30 giây	
72°C	30 giây	
72°C	10 phút	
Giữ lạnh	20°C	

Phản ứng PCR lần 1 có độ lớn 408bp được sử dụng để chạy PCR lần 2 (Nested PCR) với các thành phần hỗn hợp tương tự như phản ứng PCR lần 1. Sản phẩm PCR lần 2 có kích thước 340 bp được điện di trên gel Agarose 1% pha trong 1X TBE buffer và 2µl Ethidium Bromide ở 110V trong khoảng 1 - 1.5h, Marker 100bp. Trình tự mồi cho phản ứng PCR lần 2:

Mồi xuôi - nested: 5'-GGTTTTAGGGTTTAGTAGTTTTTTTTTTTTAGG-3'

Mồi ngược - nested: 5'-CAATACTCCAAATCCTAAAAACTTAAAATATC-3'

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR lần 2

95°C	5 phút	
95°C	15 giây	35 chu kỳ
52°C	30 giây	
72°C	30 giây	
72°C	10 phút	
Giữ lạnh	20°C	

Với thiết kế phản ứng MS-PCR này sẽ chẩn đoán xác định được hội chứng Prader-Willi và hội chứng Angelman, do cùng khảo sát tình trạng methyl hóa trên cả NST nguồn bố và mẹ.

Điện di sản phẩm PCR và phân tích kết quả:

Để phân biệt đoạn gen *SNRPN* có nguồn gốc từ bố hay từ mẹ. Sản phẩm PCR thu được sẽ được tiến hành sử dụng phương pháp enzym cắt giới hạn *HhaI* để phân biệt. Quy trình được tiến hành theo các bước sau:

Sản phẩm PCR sau đó được ủ với enzym cắt giới hạn *HhaI* (Invitrogen) với các thành phần như sau: trộn 2ul 10X buffer Tango; 0,5ul enzyme *HhaI* và 16,5ul dH_2O. Sau đó ủ hỗn hợp ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ.

Kết quả được phân tích dựa trên nguyên tắc so sánh sản phẩm PCR sau khi cắt bằng enzym *HhaI* của bệnh nhân ở từng giếng với giếng của mẫu chứng dương và mẫu chứng bình thường:

+ Người bình thường: có sản phẩm PCR methyl hóa nguồn gốc mẹ kích thước 224pb, 116bp và sản phẩm PCR không methyl hóa nguồn gốc bố 340pb.

+ Bệnh nhân PWS: chỉ có sản phẩm PCR methyl hóa nguồn gốc mẹ kích thước 224pb và 116pb.

+ Bệnh nhân AS: chỉ có sản phẩm PCR không methyl hóa nguồn gốc bố kích thước 340pb.

Áp dụng kỹ thuật MS-PCR chẩn đoán được hơn 99% các bệnh nhân mắc PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 nguồn gốc từ bố, hai NST 15 nguồn gốc từ mẹ hay do khiếm khuyết dấu ấn di truyền. Hạn chế của kỹ thuật này là không phân biệt được các nhóm nguyên nhân trên. Trong nghiên cứu này, những bệnh nhân đã được chẩn đoán lâm sàng mắc PWS nhưng với kỹ thuật FISH không phát hiện mất đoạn NST 15q11.2 này áp dụng kỹ thuật MS-PCR để chẩn đoán xác định các trường hợp bệnh nhân PWS do mUPD hoặc khiếm khuyết dấu ấn di truyền ID.

2.3.2.4. Kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò đặc hiệu Methyl hóa (Methylation - Specific Multiplex Ligation - dependent probe Amplification - MS - MLPA)

MS-MLPA là một phương pháp bán định lượng, phát hiện thay đổi số lượng bản sao và tình trạng methyl hóa.

Các bước tiến hành phản ứng MS-MLPA giống như trong kỹ thuật MLPA tiêu chuẩn, tuy nhiên trong kỹ thuật MS-MLPA sử dụng enzym cắt giới hạn HhaI.

Áp dụng kỹ thuật MS-MLPA trong chẩn đoán hội chứng Prader-Willi

Mẫu bệnh phẩm: 2 ml máu ngoại vi chống đông EDTA, tách DNA tổng số như trong quy trình làm kỹ thuật MS-PCR (đã trình bày ở trên).

Kit SALSA MS-MLPA Probemix ME028-C1 Prader-Willi/Angelman bao gồm 47 (MS-MLPA) đầu dò với các sản phẩm khuếch đại có độ lớn từ 129 đến 481 nucleotide. Trong đó, 6 probe MS-MLPA có trình tự bao gồm vùng nhận diện của enzym cắt *HhaI* và trình tự methyl hóa tương ứng với vùng NST 15q11-q13 [77], [78], [103].

Áp dụng kỹ thuật MS-MLPA chẩn đoán được hơn 99% các bệnh nhân mắc PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 nguồn gốc từ bố, do hai NST 15 nguồn gốc từ mẹ hay do khiếm khuyết dấu ấn di truyền. So với kỹ thuật MS-PCR, ưu điểm của kỹ thuật này là phân biệt được nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 đồng thời phân loại được mất đoạn typ 1 hay typ 2, xác định được các trường hợp mất đoạn không điển hình kích thước rất nhỏ, xác định được mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC. Hạn chế của kỹ thuật này là không phân biệt được các bệnh nhân PWS do hai NST 15 cùng nguồn gốc mẹ và các bệnh nhân PWS do đột biến điểm vùng trung tâm dấu ấn di truyền IC.

Bảng 2.1. Danh sách các đầu dò (probe) của bộ kit MEO28-C1 cho KT MS-MLPA

Chiều dài (nt)	Đầu dò MLPA	Gene/exon	Vị trí gắn HhaI	Vị trí phân giải genbank	Alen in dấu	Khoảng cách tới đầu dò tiếp theo
436	20702-L29063	NIPA1		NM_144599.4; 272-273		214,0 kb
154	02018-L00865	TUBGCP5		NM_052903.4; 897-898		964,5 kb
172	20688-L2851	MKRN3		NM_005664.3; 1296-1297		77,5 kb
418	11155-L29062	MAGEL2 - Exon 1		NM_019066.4; 3692-3693		4,1 kb
232	20701-L28529	**MAGEL2 - Exon 1**	+	**NM_019066.4; 369 nt trước exon 1, mồi ngược**	**Nguồn mẹ**	38 kb
427	04026-L29645	NDN		NM_002487.2; 1028-1027, mồi ngược		1137,6 kb
SNRPN		**NM_022807.3**				
288	15261-L16736	**U1B (IC)**		175-176 [Exon 1]		6,1 kb
239	20692-L15415	**U1B*(IC)**		271-272 [Exon 2]		64,9 kb
278	12179-L13382	Intron u2		8.2 kb sau exon u2 [Exon 3]		12,3 kb
270	12182-L28519	Intron u2		12.9 kb trước exon u5 [Exon 4]		13,4 kb
256	20694-L28518	U5		376 nt sau exon u5 [Exon 4]		0,6 kb
391	12477-L13519	U5		986 nt sau exon u5 [Exon 4]		33,8 kb
250	11181-L13997	**Exon 3 (đảo CpG)**	+	**7.2 kb trước exon 3 [Exon 5]**	**Nguồn mẹ**	0,1 kb
178	04106-L13905	**Exon 3 (đảo CpG)**	+	**7.1 kb trước exon 3 [Exon 5]**	**Nguồn mẹ**	0,3 kb
190	04104-L04294	**Exon 3 (đảo CpG)**	+	**6.8 kb trước exon 3 [Exon 5]**	**Nguồn mẹ**	0,3 kb
142	20687-L2850	**Exon 3 (đảo CpG)**	+	**6.6 kb trước exon 3 [Exon 5]**	**Nguồn mẹ**	12,5 kb
294	01318-L13088	Exon 3		726-725 mồi ngược [Exon 6]		8,3 kb
409	11177-L2852	Exon 7		1089-1090 [Exon 9]		75,7 kb
214	12719-L28514	SNORD116-1		NR_003316.1; 474 nt sau phiên mã ngược		24,4 kb
472	12721-L13796	SNORD116-11		NR_003326.2; 426 nt sau phiên mã		15,9 kb
326	20697-L28525	SNORD116-23		NR_003337.2; 464 nt sau phiên mã ngược		247,8 kb
UBE3A		**NM_130838.1**				
355	02034-L12925	Exon 9		2368-2369		20,3 kb
301	12082-L28520	Exon 4		1640-1641		11,1 kb
160	04620-L00863	Exon 3		614-615		4,2 kb
195	20689-L28513	Exon 2		94-95		29,8 kb
373	10878-L11548	Exon 1		33-34		33,5 kb
184	19804-L28512	**Upstream (NM_ 000462.3, Exon 1)**	+	**252 kb trước exon 1 (53-54)**	**N/A**	252,8 kb
364	20695-L28523	ATP10A - Exon 15		NM_024490.3; 3235-3236		171,9 kb
226	20691-L28515	ATP10A - Exon 1		NM_024490.3; 494 nt trước exon 1		684,3 kb
220	01315-L00868	GABRB3 - Exon 9		NM_021912.4; 1233-1234		19,6 kb
382	10874-L11544	GABRB3 - Exon 7		NM_021912.4; 796-797		1399,8 kb
137	20700-L28528	OCA2 - Exon 23		NM_000275.2; 2498-2499		187,1 kb
317	20698-L28526	OCA2 - Exon 3		NM_000275.2; 7 nt sau exon 3, mồi ngược		1246,0 kb
202	01314-L00867	APBA2; bên ngoài vùng PWS/AS		NM_005503.3; 2605-2606		

Các bước tiến hành kỹ thuật MS-MLPA:

+ Biến tính và lai các đầu dò

Lấy 25ng DNA cùng với 5 µl dung dịch đệm TE (10 mMtris-HCl (pH 8,5) và 1 mM EDTA.

Ủ mẫu theo chu trình 98°C trong 10 phút, sau đó đợi mẫu giảm nhiệt độ xuống 25°C .

Thêm 1,5 µl dung dịch SALSA probemix và 1,5µl dung dịch MLPA buffer vào mỗi tuyp và trộn đều.

Ủ mẫu theo chu trình: 95°C trong 1 phút và 60°C trong 16 giờ.

+ Phản ứng ghép nối

Sau lai, hỗn hợp được pha loãng với 3µl dung dịch đệm Ligase A và H_2O đến thể tích cuối cùng là 20 µl, chia đều vào 2 ống. Khi nhiệt độ giảm đến 49°C, ống 1: thêm 0,25µl Ligase-65 (MRC-Holland), 5 U HhaI (promega) và 1,5µl dung dịch đệm Ligase B; ống 2: thêm 0,25µl Ligase-65 (MRC-Holland), H_2O và 1,5µl dung dịch đệm Ligase B .

Ủ 30 phút ở 49 °C, sau đó ủ 5 phút ở 98°C.

+ Phản ứng PCR:

Thực hiện phản ứng PCR: Phản ứng PCR được thực hiện với sự có mặt của các thành phần sau: 20µl PCR master mix bao gồm 5 µl của sản phẩm ghép nối ở trên, PCR buffer, dNTPs, SALSA polymerase và PCR primer.

Đặt mẫu vào máy gia nhiệt ở nhiệt độ 60°C thực hiện phản ứng PCR.

Chu trình nhiệt:

Biến tính 95° trong 5 phút

95°C	40 giây	32 chu kỳ
65°C	30 giây	
72°C	60 giây	

Bảng 2.2. Trình tự các đầu dò đặc hiệu Methyl hóa trong KT MS-MLPA

Chiều dài	Đầu dò SALSA MLPA	Trình tự mồi và các vị trí gắn Enzym HhaI
142	20687-L28509	CGGTATTTAGGGGGTGTTGA**GCGC**AGGT-AGGTGTATAATAGTGACCACTGCGTGGTGGA
178	04106-L13905	CCGCTGCTGCAGCGAGTCTG**GCGC**AGAGT-GGAGCGGCCGCCGGAGATGCCTGACGCATC
184	19804-L28512	CTAGCCGCGAGATCCGTGTGTCTCCCAAGA-TGGTG**GCGC**TGGGCTCGGGGTGACTACAGGA
190	04104-L04294	CACCGATGGTATCCTGTCCGCTCGCAT-TGGG**GCGC**GTCCCCCATCCGCCCCCAACTGTGGT
232	20701-L28529	TCTGGGCTAAGATGTGAGGCGGAGAATGAA-AAAA**GCGC**ATTTACATAAGAGAGTTCCAGG
250	11181-L13997	GGAGGGAGCTGGGACCCCTGCA-CTGCGGCAAACAAGCACGCCT**GCGC**GGCCGC

Chú thích: Các vị trí gắn enzym HhaI đánh dấu "GCGC", vị trí nối đánh dấu "-"

- Sản phẩm PCR chuyển vào rack 96 giếng và chạy trên máy ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer machine (Applied Biosystem, Hoa Kỳ).

Sử dụng phần mềm Coffalyser.Net để phân tích kết quả:

Ở người bình thường: đỉnh tín hiệu các đầu dò vùng gen trên NST 15q11-q13 ở ngưỡng 1 (số lượng bản sao là 1) và tại các vị trí gắn enzym HhaI có chuỗi không methyl hóa nguồn gốc bố và chuỗi methyl hóa nguồn gốc mẹ nên các đỉnh tín hiệu ở ngưỡng 0,5.

Bệnh nhân được chẩn đoán mắc PWS khi có bất thường tình trạng methyl hóa: tại các vị trí gắn enzym HhaI chỉ có chuỗi methyl hóa nguồn gốc mẹ, các đỉnh tín hiệu ở ngưỡng 1. Hình ảnh bất thường methyl hóa của các bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13, mUPD hay ID đều giống nhau: đỉnh tín hiệu các đầu dò gắn enzym HhaI ở ngưỡng 1.

Kỹ thuật MS-MLPA phát hiện được những trường hợp PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 và đột biến mất đoạn IC bằng cách so sánh độ cao của các đỉnh tín hiệu các sản phẩm khuếch đại vùng gen trên NST 15q11-q13 với độ cao của mẫu kiểm chứng, phát hiện sự thay đổi của số lượng các bản sao:

Bệnh nhân mắc PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 khi đỉnh các tín hiệu các đầu dò vùng gen này ở ngưỡng 0,5. Kỹ thuật MS-MLPA phân biệt được các trường hợp PWS do mất đoạn 15q11-q13 thuộc typ 1 (BP1-PB3) hay typ 2 (BP2-BP3), mất đoạn không điển hình.

Bệnh nhân mắc PWS do đột biến mất đoạn IC: đỉnh tín hiệu tại vị trí đầu dò UB1 và UB1* là hai đầu dò đánh dấu vùng IC ở ngưỡng 0,5, đỉnh tín hiệu các đầu dò còn lại của NST 15q11-q13 đều ở ngưỡng 1.

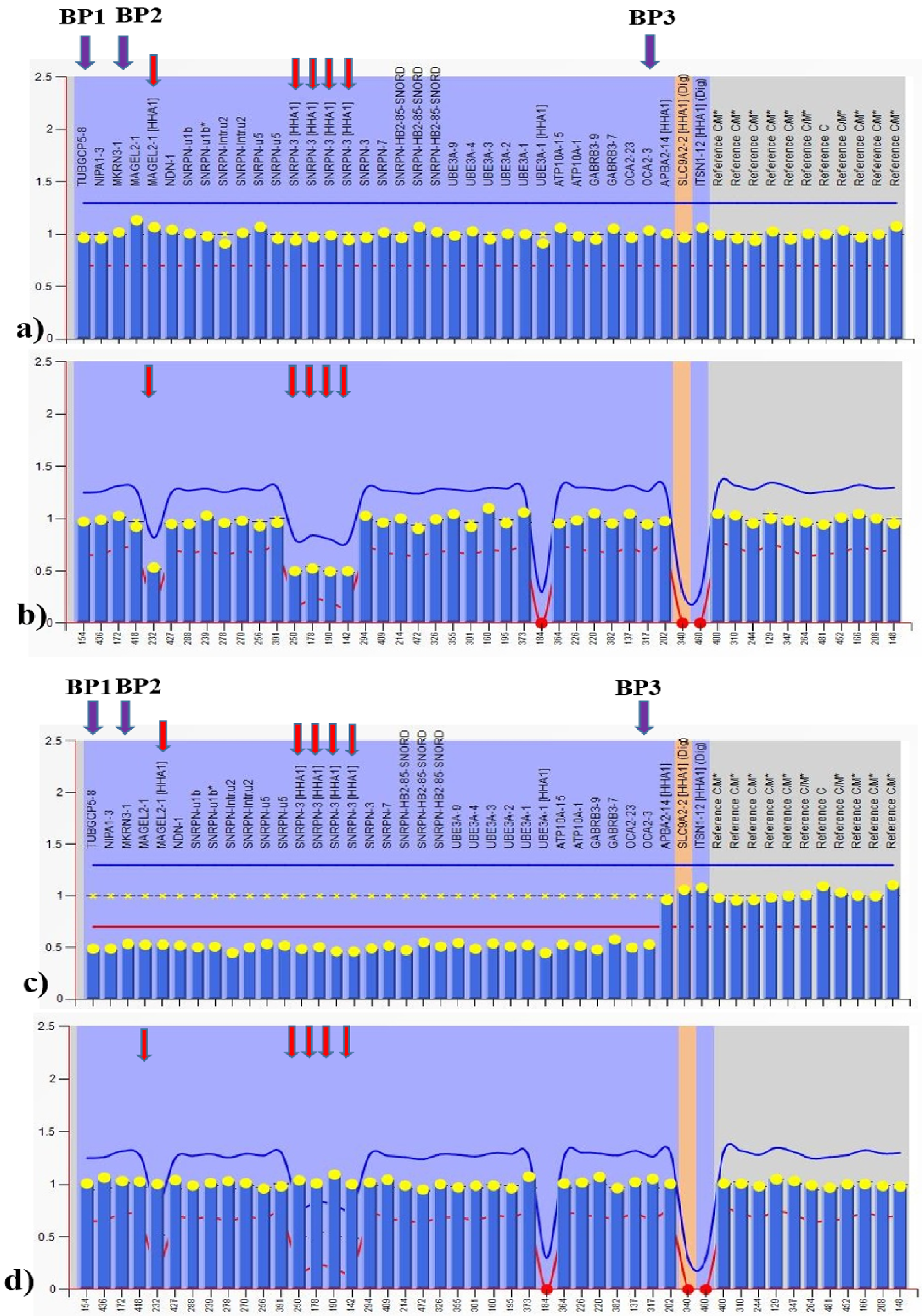
Bệnh nhân mắc PWS do mUPD hay ID do đột biến điểm IC: đỉnh tín hiệu các đầu dò vùng gen trên NST 15q11-q13 ở ngưỡng 1.

Bảng 2.3. Nhận định kết quả số lượng bản sao và tình trạng methyl hóa trong kỹ thuật MS-MLPA

Tình trạng gen vùng 15q11**	**PWS do mất đoạn** M-	**PWS do UPD*** **và ID** MM	**Mẫu kiểm chứng** PM
Số lượng bản sao	1	2	2
Tỷ lệ số lượng bản sao	1/2	1/1	1/1
Tỷ lệ % methyl hóa	100%	100%	50%
Tỷ lệ methyl hóa sau khi gắn enzym HhaI	1/1	1/1	1/2

***M (maternal, nguồn mẹ), P (paternal, nguồn bố)*

**Trong nhóm UPD và ID, với kỹ thuật MS-MLPA chỉ phân biệt được nhóm bệnh nhân PWS do nguyên nhân đột biến mất đoạn vùng trung tâm dấu ấn di truyền IC, không phân biệt được những bệnh nhân do có 2 alen cùng nguồn gốc mẹ (mUPD) và nhóm bệnh nhân do đột biến điểm vùng trung tâm dấu ấn di truyền.*



Hình 2.2. Phân tích kết quả MS-MLPA

Hình a: *hình ảnh kết quả MS-MLPA của người bình thường, thể hiện đỉnh tín hiệu các gen vùng NST 15q11-q13.* ***Hình b:*** *hình ảnh kết quả MS-MLPA của người bình thường, thể hiện tình trạng methyl hóa tại các vị trí có gắn enzym HhaI.* ***Hình c****: mất đoạn NST 15q11-q13 có nguồn bố, loại mất đoạn typ 1 (BP1-BP3).* ***Hình d****: bất thường methyl hóa .*

Nhận định kết quả: hình a và b là hình ảnh kết quả MS-MLPA của người bình thường. So sánh hình a và c để đánh giá mất đoạn vùng gen 15q11-q13, hình a của người bình thường các đỉnh tín hiệu của toàn bộ gen vùng 15q11-q13 đều ở ngưỡng 1, hình c là mẫu của bệnh nhân mất đoạn 15q11-q13, các đỉnh tín hiệu của vùng gen này ở ngưỡng 0,5. Các mũi tên màu tím chỉ các vị trí đánh dấu BP1, BP2, BP3 dùng để phân loại bệnh nhân mất đoạn gen typ 1 (BP1-BP3) và typ 2 (BP2-BP3). So sánh hình b và d để đánh giá tình trạng methyl hóa của vùng gen 15q11-q13 tại các vị trí đầu dò gắn enzym HhaI (mũi tên chỉ màu đỏ), sau khi lai chỉ có chuỗi methyl hóa mới bị khuếch đại và có tín hiệu. Hình b của người bình thường tại các vị trí này có chuỗi không methyl hóa nguồn gốc bố và chuỗi methyl hóa nguồn gốc mẹ, các đỉnh tín hiệu ở ngưỡng 0,5; hình d là mẫu bệnh nhân chỉ có chuỗi methyl hóa nguồn gốc mẹ, các đỉnh tín hiệu ở ngưỡng 1.

Nghiên cứu này đã chuẩn hóa và thực hiện kỹ thuật MS-MLPA trên 7 bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 nguồn gốc bố (đã chẩn đoán xác định bằng kỹ thuật FISH) với mục đích phân loại các bệnh nhân mất đoạn typ 1 và mất đoạn typ 2, từ đó đưa ra nhận xét về mối liên hệ giữa đặc điểm lâm sàng và biến đổi di truyền. Trên 7 bệnh nhân đã được chẩn đoán mắc PWS do mUPD hoặc ID bằng kỹ thuật MS-PCR, thực hiện kỹ thuật MS-MLPA với mục đích phát hiện các trường hợp bệnh nhân PWS do mất đoạn IC, cần tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho những gia đình này do có nguy cơ cao sinh con mắc PWS ở những lần sinh sau.

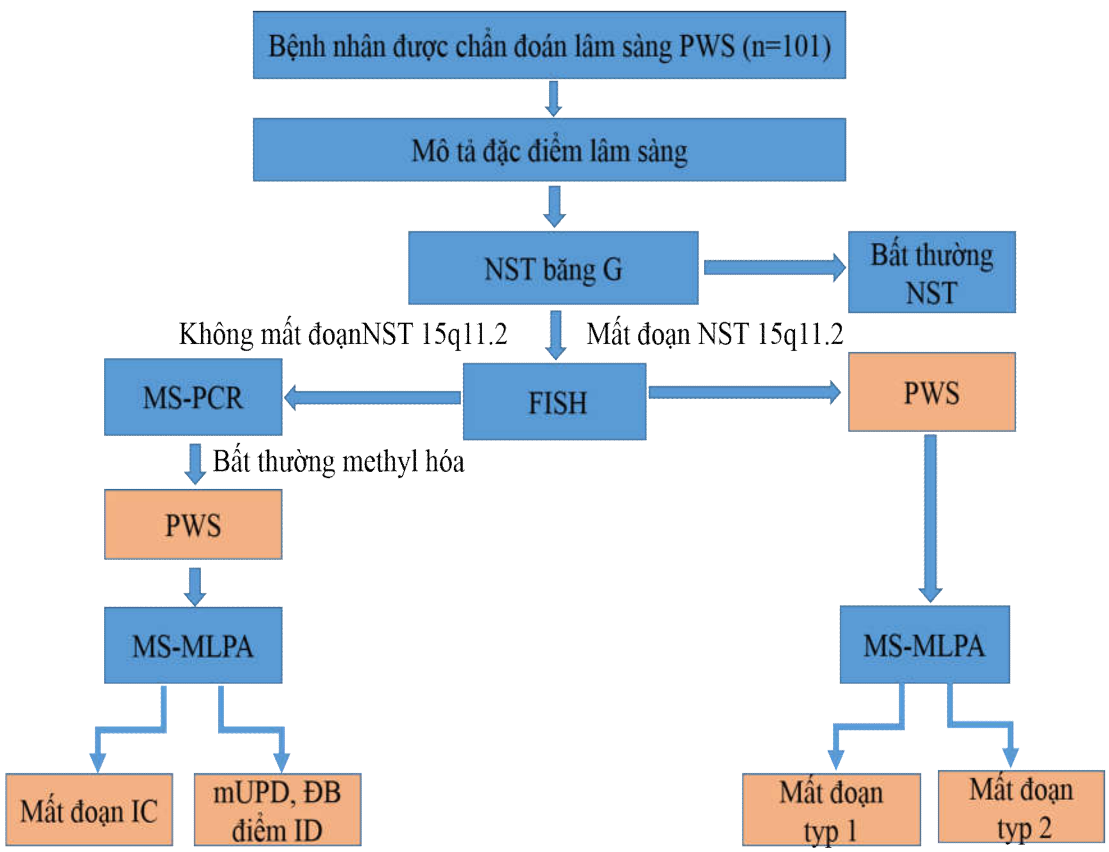
Kỹ thuật MS-MLPA không phân biệt được nhóm bệnh nhân PWS do nhận 2 alen nguồn gốc mẹ (mUPD) và nhóm PWS do đột biến điểm vùng trung tâm dấu ấn di truyền. Trên hình ảnh kết quả MS-MLPA đều thể hiện tình trạng bất thường methyl hóa và không mất đoạn NST 15q11-q13.

Phân tích kết quả MS-MLPA cần thực hiện bởi 3 người độc lập: người thực hiện kỹ thuật và nhận định kết quả, người kiểm tra lại kết quả, người phê duyệt kết quả, nếu cần thiết chỉ định các xét nghiệm khác để kiểm chứng.

2.4. Đạo đức trong nghiên cứu

- Có cam kết, thỏa thuận với cha mẹ hoặc người giám hộ của bệnh nhân.
- Đối tượng nghiên cứu và cha mẹ, người giám hộ của bệnh nhân được thông báo rõ về mục đích nghiên cứu.
- Đối tượng nghiên cứu sẽ được giữ kín bí mật khi cung cấp thông tin.
- Đối tượng nghiên cứu được thông báo phản hồi khi có các kết quả xét nghiệm.
- Khám, tư vấn cho đối tượng nghiên cứu.

2.5. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu

Bệnh nhân nghi ngờ mắc PWS được khám lâm sàng, phân tích đánh giá các triệu chứng lâm sàng theo tiêu chuẩn Holm, đủ điểm chẩn đoán lâm sàng mắc PWS sẽ được đưa vào nghiên cứu. Các bệnh nhân được chỉ định phân tích NST đồ để phát hiện các trường hợp có bất thường NST, trong đó có chuyển đoạn giữa NST 15 và NST khác gây mất đoạn NST 15q11-q13.

Kỹ thuật FISH được chỉ định song song với xét nghiệm NST để xác định các trường hợp mất đoạn trên NST 15q11-q13.

Các bệnh nhân có kết quả FISH không có mất đoạn NST 15q11.2 được chỉ định làm xét nghiệm MS-PCR để xác định bất thường của tình trạng methyl hóa, chẩn đoán xác định các trường hợp PWS còn lại: mUPD, khiếm khuyết dấu ấn di truyền ID.

Kỹ thuật MS-MLPA chỉ định trên 7 bệnh nhân thuộc nhóm bệnh nhân PWS đã được chẩn đoán mất đoạn NST 15q11-q13 bằng kỹ thuật FISH với mục đích phân loại mất đoạn typ 1 hay typ 2, có ý nghĩa trong việc tiên lượng bệnh.

Kỹ thuật MS-MLPA chỉ định trên 7 bệnh nhân thuộc nhóm bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định PWS do bất thường methyl hóa thuộc nhóm mUPD, ID bằng kỹ thuật MS-PCR với mục đích xác định các trường hợp PWS do mất đoạn không điển hình kích thước nhỏ hoặc mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC. Với những trường hợp có mất đoạn IC cần được tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho những lần sinh sau do những gia đình này có nguy cơ sinh con mắc PWS là 50% trong một lần sinh.

Chương 3
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, 101 bệnh nhân được chẩn đoán mắc PWS. Các bệnh nhân được thăm khám lâm sàng và làm các xét nghiệm di truyền tế bào và phân tử để xác định các biến đổi di truyền trong PWS.

3.1.1. Phân bố theo giới tính

Bảng 3.1. Phân bố theo giới tính

Giới tính	n	Tỷ lệ (%)
Nữ	35	34,7
Nam	66	65,3
Tổng	101	100

Nhận xét: tỷ lệ bệnh nhân nam / nữ là 1,88.

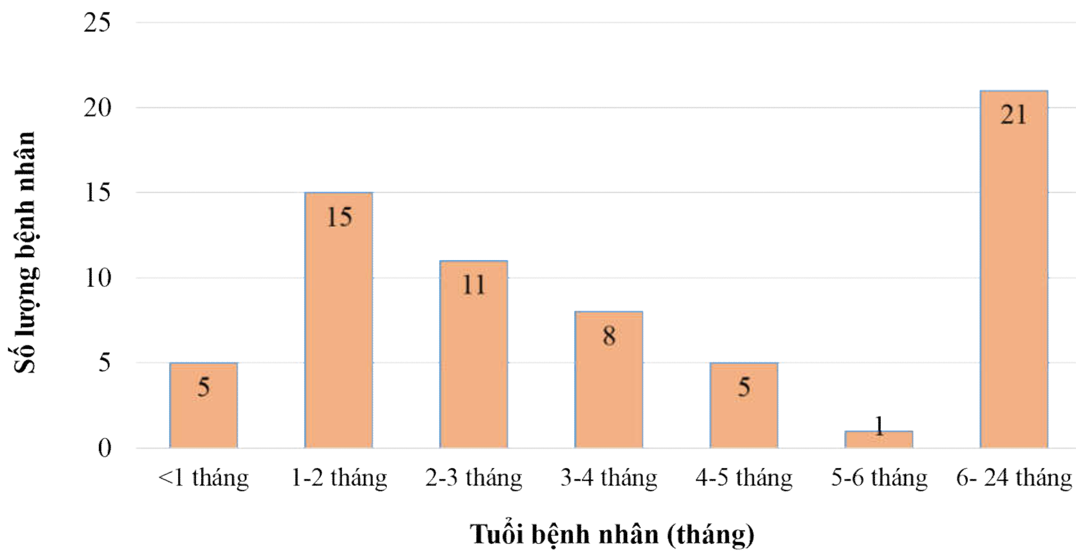
3.1.2. Tuổi bệnh nhân lúc chẩn đoán

Tuổi chẩn đoán trung bình: 30,18 ± 0,39 tháng, sớm nhất 7 ngày tuổi, muộn nhất 11 tuổi.

Bảng 3.2. Tuổi bệnh nhân lúc chẩn đoán

Nhóm tuổi chẩn đoán	Giới tính		Tổng
	Nữ	Nam	
< 2 tuổi	**21 (60%)**	**45 (68,2%)**	**66 (65,3%)**
2 – 6 tuổi	7 (20%)	16 (24,2%)	23 (22,8%)
6 – 12 tuổi	7 (20%)	5 (7,6%)	12 (11,9%)
≥ 12 tuổi	0	0	0
Tổng	35 (100%)	66 (100%)	101 (100%)

Nhận xét: số bệnh nhân được chẩn đoán trước 2 tuổi là 66 chiếm tỷ lệ cao nhất (65,3%), không có bệnh nhân nào bị chẩn đoán muộn trên 12 tuổi.



Biểu đồ 3.1. Số lượng bệnh nhân chẩn đoán trước 2 tuổi

Nhận xét: trong nhóm 66 bệnh nhân được chẩn đoán trước 2 tuổi có 45 bệnh nhân được chẩn đoán trước 6 tháng, có 5 bệnh nhân được chẩn đoán trong vòng 1 tháng sau sinh. Việc chẩn đoán sớm có ý nghĩa quan trọng trong can thiệp điều trị.

3.1.3. Tiền sử sản khoa

Bảng 3.3. Cách thức đẻ

Cách thức đẻ	**n**	**Tỷ lệ (%)**
Đẻ thường	33	32,7
Đẻ mổ	68	67,3
Tổng	101	100

Nhận xét: số lượng bệnh nhân đẻ mổ gấp đôi số lượng bệnh nhân đẻ thường, nguyên nhân chủ yếu do ngôi ngược, hậu quả của việc giảm cử động thai do giảm trương lực cơ.

Bảng 3.4. Tuổi thai trung bình

Tuổi thai	**n**	**Tỷ lệ (%)**
Non tháng: <37 tuần	18	17,8
Đủ tháng: 37-42 tuần	83	82,2
Già tháng: >42 tuần	0	0
Tổng	101	100

Nhận xét: có 17,6% bệnh nhân đẻ non, tuổi thai non nhất là 30 tuần, tuổi thai trung bình 38,78 ± 2,6 tuần.

Bảng 3.5. Cân nặng lúc sinh

Tuổi thai	**n**	**Tỷ lệ (%)**
<2500g: cân nặng thấp	19	18,8
≥ 2500g: bình thường	82	81,2
Tổng	101	100

Nhận xét: có 19 bệnh nhân có cân nặng thấp lúc sinh, cân nặng thấp nhất 1600g, cân nặng cao nhất 3700g, cân nặng trung bình 2778,20 ± 426,52g.

3.1.4. Tuổi bố mẹ lúc chẩn đoán

Tuổi mẹ thấp nhất 20 tuổi, cao nhất 38 tuổi, trung bình 28,73 ± 3,99.

Tuổi bố thấp nhất 21 tuổi, cao nhất 54 tuổi, trung bình 31,50 ± 5,18.

3.2. Đặc điểm lâm sàng

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

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

(PTTTVĐ: phát triển tâm thần vận động; CQSD: cơ quan sinh dục)

Nhận xét: các triệu chứng nặng gợi ý bệnh nhân mắc PWS đồng thời cũng là nguyên nhân vào viện của bệnh nhân gồm: bộ mặt bất thường, thiểu sản sinh dục, giảm trương lực cơ, cần hỗ trợ ăn uống trong giai đoạn trẻ nhỏ, ham ăn uống trong giai đoạn trẻ lớn, chậm PTTTVĐ.

Triệu chứng giảm trương lực cơ: 93/101 bệnh nhân, đánh giá tại thời điểm chẩn đoán bệnh và qua khai thác tiền sử.

Triệu chứng hỗ trợ ăn uống: 93/101 bệnh nhân, hỗ trợ ăn uống do bệnh nhân bị giảm trương lực cơ, các trẻ không tự bú được, cần hỗ trợ ăn sonde hoặc đổ thìa. Triệu chứng đánh giá tại thời điểm chẩn đoán và qua khai thác tiền sử, cần hỗ trợ ăn uống chủ yếu ở giai đoạn sơ sinh, giảm dần theo tuổi.

Triệu chứng ham ăn uống chỉ đánh giá trên 63 bệnh nhân bắt đầu có ăn dặm tại thời điểm chẩn đoán. Triệu chứng chậm PTTTVĐ chỉ đánh giá trên 46 bệnh nhân.

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

Nhóm tuổi	**Bộ mặt bất thường**	**Thiểu sản CQSD ngoài**	**Giảm trương lực cơ**	**Thừa cân, béo phì**	**Tổng**
< 2 tuổi	66 (100%)	65 (98,5%)	66 (100%)	0	66
2 – 6 tuổi	23 (100%)	20 (87%)	4 (17,4%)	12 (52,2%)	23
6 – 12 tuổi	9 (75%)	10 (83,3%)	1 (8,3%)	10 (83,3%)	12

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

Nhóm bệnh nhân < 2 tuổi tất cả đều có bộ mặt bất thường đặc trưng cho PWS, 100% có giảm trương lực cơ, không có bệnh nhân nào thừa cân, tỷ lệ thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài 98,5%.

Nhóm bệnh nhân từ 2 - 6 tuổi: tỷ lệ bệnh nhân có giảm trương lực cơ thấp 17,4%, tỷ lệ bệnh nhân có thừa cân béo phì 52,2%. 100% bệnh nhân đều có bộ mặt bất thường, 87% bệnh nhân có thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài.

Nhóm bệnh nhân từ 6 - 12 tuổi: tỷ lệ bệnh nhân có thừa cân béo phì cao 83,3%, tỷ lệ bệnh nhân còn triệu chứng giảm trương lực cơ thấp 8,3%. 75% bệnh nhân có bộ mặt bất thường, 83,3% bệnh nhân có thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài.

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

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

Nhận xét: khai thác tiền sử sản khoa thấy triệu chứng giảm cử động thai có ở tất cả các bệnh nhân. Dấu hiệu bàn tay, bàn chân nhỏ, giảm sắc tố da, chậm nói xuất hiện với tần suất cao. Triệu chứng chậm nói và rối loạn hành vi chỉ được đánh giá trên 35 bệnh nhân lớn hơn 2 tuổi qua hai dấu hiệu chủ quan theo khai thác từ bố mẹ hoặc người giám hộ của bệnh nhân là các đặc tính ương bướng, khó nghe lời của trẻ.

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

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

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

Nhóm bệnh nhân < 2 tuổi: tỷ lệ bệnh nhân rối loạn giấc ngủ chiếm tỷ lệ cao 89,4%, 10,6% bệnh nhân có tầm vóc thấp hơn so với tuổi.

Nhóm bệnh nhân từ 2 - 6 tuổi: tỷ lệ bệnh nhân rối loạn giấc ngủ giảm xuống còn 21%; tỷ lệ bệnh nhân có tầm vóc thấp tăng so với nhóm trẻ < 2 tuổi, chiếm 34,7%.

Nhóm bệnh nhân từ 6 - 12 tuổi: tỷ lệ bệnh nhân có rối loạn giấc ngủ giảm thấp 8,3%, tỷ lệ bệnh nhân có tầm vóc thấp tăng cao 83,3%.

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

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

Tỷ lệ bệnh nhân viêm đường hô hấp cần nhập viện sau sinh: 62/101 (61,4%), trong đó có 8 bệnh nhân phải vào khoa điều trị tích cực, các bệnh nhân này đều cần hô hấp hỗ trợ, đặt ống nội khí quản hoặc thở áp lực dương liên tục.

Dị tật bẩm sinh kèm theo: 1 bệnh nhân có kèm theo các đặc điểm lâm sàng của hội chứng Pierre Robin: thiểu sản xương hàm dưới, cằm tụt ra sau, phải phẫu thuật ngay trong tháng đầu, 1 bệnh nhân có sứt môi, khe hở hàm không hoàn toàn, 1 bệnh nhân có bàn chân khoèo.

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

Bảng 3.10. Chỉ số khối cơ thể lúc chẩn đoán (n=101)

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

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

Bảng 3.11. Phân loại triệu chứng thừa cân béo phì theo nhóm tuổi tại thời điểm chẩn đoán (n=101)

Béo phì, thừa cân	**≥ 3 tuổi**	**< 3 tuổi**	**OR (95% CI)**	**p**
Có	21 (63,6%)	1 (1,5%)	117,25	***< 0,001***
Không	12 (36,4%)	67 (98,5%)	(14,39 - 955,63)	
Tổng	33 (100%)	68 (100%)		

Nhận xét: tại thời điểm chẩn đoán tỷ lệ béo phì của nhóm bệnh nhân ≥ 3 tuổi là 63,6% trong khi ở nhóm bệnh nhân < 3 tuổi tỷ lệ này là 1,5%, OR = 117,25 (95% CI: 14.39 - 955.63). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,001).

3.2.3. Chậm phát triển tâm thần vận động (chậm PTTTVĐ)

Tuổi biết đi trung bình của các bệnh nhân 23,31 ± 13,27 tháng.

Đánh giá phát triển tâm thần vận động của bệnh nhân theo tuổi: nhóm dưới 6 tuổi sử dụng chỉ số DQ, nhóm trên 6 tuổi sử dụng chỉ số IQ.

Bảng 3.12. Phân loại mức độ phát triển tâm thần vận động theo chỉ số DQ của nhóm bệnh nhân dưới 6 tuổi (n = 34)

Phân loại PTTTVĐ	**Chỉ số DQ**	**Số lượng**	**Tỷ lệ %**
Nặng	DQ ≤ 50%	6	17,6
Trung bình	50% < DQ ≤ 66,7%	**11**	**32,4**
Nhẹ	66,7% < DQ < 75%	**9**	**26,5**
Không chậm PTTTVĐ	DQ ≥ 75%	8	23,5
Tổng		34	100

Nhận xét: trong 89 bệnh nhân dưới 6 tuổi có 34 bệnh nhân được đánh giá mức độ phát triển tâm thần vận động, các bệnh nhân chủ yếu thuộc nhóm chậm PTTTVĐ mức độ trung bình và nhẹ chiếm 58,9% (32,4% và 26,5%).

Bảng 3.13. Phân loại mức độ phát triển tâm thần vận động theo chỉ số IQ của nhóm bệnh nhân trên 6 tuổi (n = 12)

Phân loại PTTTVĐ	**Chỉ sô IQ**	**Số lượng**	**Tỷ lệ %**
Nặng	IQ < 35	0	0
Trung bình	35 ≤ IQ < 50	**4**	**33,3**
Nhẹ	50 ≤ IQ <70	**6**	**50**
Không chậm PTTTVĐ	IQ ≥ 70	2	16,7
Tổng		12	100

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

Bảng 3.14. So sánh trung bình của chỉ số IQ, DQ theo giới tính (n = 46)

	Tổng số bệnh nhân (n=46)	**Nam (n=32)**	**Nữ (n=14)**	**p (t – test) khác nhau giữa nhóm giới tính**
IQ trung bình	53 ± 10,81	51,43± 10,29	53,85± 11,39	0,646
Khoảng IQ	40-75	40-70	40-75	
DQ trung bình	64,16 ± 10,14	65,26 ± 12,19	63,61 ± 9,07	0,565
Khoảng DQ	40-80	40-80	40-77	

Nhận xét: không có sự khác biệt về mức độ phát triển tâm thần vận động theo giới tính.

3.2.4. Thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài

3.2.4.1. Ẩn tinh hoàn ở bệnh nhân nam

Bảng 3.15. Tỷ lệ ẩn tinh hoàn

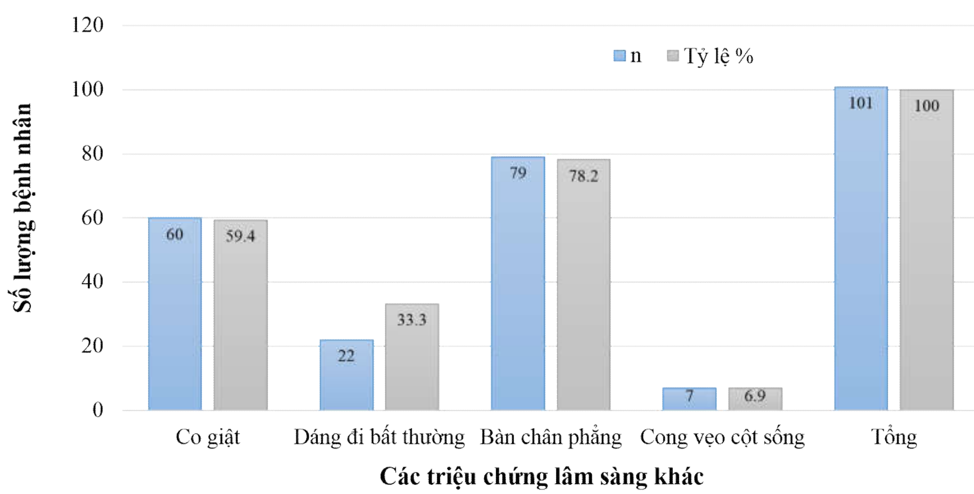
Biến số	**n**	**Tỷ lệ (%)**
Ẩn tinh hoàn 1 bên	11	16,7
Ẩn tinh hoàn 2 bên	51	77,3
Không ẩn tinh hoàn	4	6,1
Tổng	66	100

Nhận xét: trong 66 bệnh nhân nam chỉ có 4 bệnh nhân không bị ẩn tinh hoàn, tỷ lệ trẻ nam bị ẩn tinh hoàn 2 bên cao chiếm 77,3%. 1 bệnh nhân nam có biểu hiện dậy thì sớm lúc 10 tuổi.

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

Trong 35 bệnh nhân nữ, có 29/35 (82,9%) bệnh nhân thiểu sản âm vật, môi lớn, môi bé. Có 3 bệnh nhân hiện tại trên 13 tuổi chưa có kinh nguyệt.

3.2.5. Các đặc điểm lâm sàng khác



Biểu đồ 3.2. Các đặc điểm lâm sàng khác

Triệu chứng co giật không xếp vào nhóm triệu chứng nặng theo tiêu chuẩn của Holm, nhưng là một triệu chứng cần can thiệp điều trị nội trú tại bệnh viện, tỷ lệ phát hiện 60/101 bệnh nhân (59,4%). Dấu hiệu dáng đi bất thường chỉ đánh giá trên 66 bệnh nhân đã biết đi.

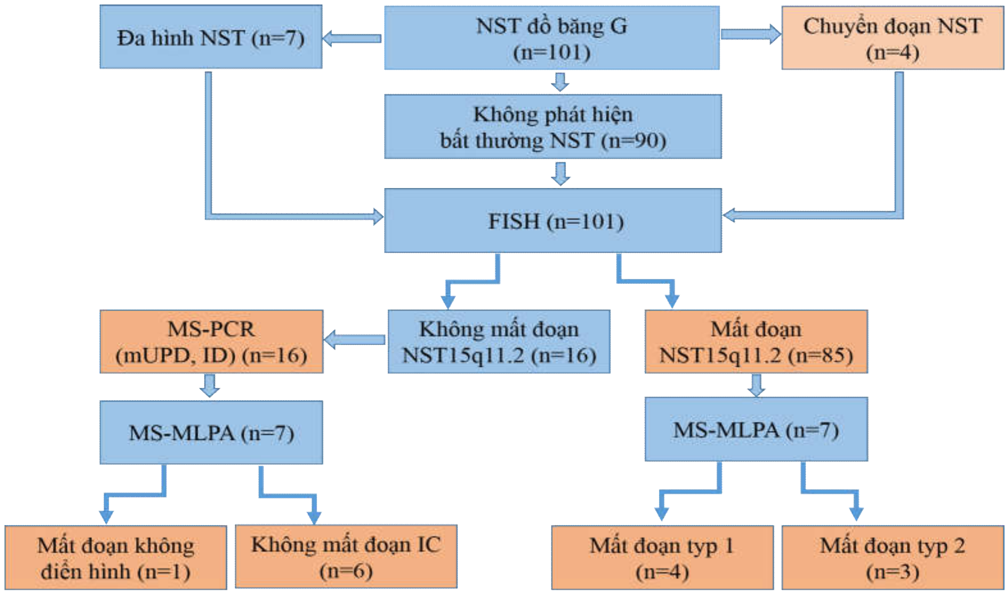
3.2.6. Tỷ lệ tử vong

Bảng 3.16. Bệnh nhân tử vong

Bệnh nhân (STT)	**Tuổi chẩn đoán (tháng)**	**Tuổi tử vong (tháng)**	**Nguyên nhân tử vong**
1	41	58	VPQP
2	2	10	VPQP
3	4	6	VPQP
4	4	5	VPQP
5	30	48	VPQP
6	4	10	VPQP
7	36	84	VPQP, suy tim/Béo phì
8	60	72	VPQP/Béo phì
9	81	156	Suy đa tạng/Béo phì
10	11	13	Tiêu chảy kéo dài

Nhận xét: trong 9 năm từ 2009 đến 2018, có 10 bệnh nhân trong nghiên cứu bị tử vong chiếm tỷ lệ 9,9%. 8/10 bệnh nhân tử vong do nguyên nhân chủ yếu do viêm đường hô hấp kéo dài trong đó 4 bệnh nhân tử vong trong năm đầu tiên sau đẻ. 3 bệnh nhân trên 6 tuổi đều có tình trạng béo phì, trong đó 1 bệnh nhân tử vong trong bệnh cảnh suy đa tạng, đái tháo đường, béo phì với chỉ số BMI 35,5. 1 bệnh nhân viêm phế quản phổi kết hợp tiêu chảy kéo dài do nhiễm khuẩn bệnh viện. Về phân loại nguyên nhân di truyền có 9 bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13, 1 bệnh nhân do mUPD hoặc ID.

3.3. Các biến đổi di truyền



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

Nhận xét: phân tích NST đồ với kỹ thuật băng G phát hiện được 4/101 trường hợp có bất thường NST dạng chuyển đoạn giữa NST 15 và NST khác. Kỹ thuật FISH phát hiện 85/101 trường hợp có mất đoạn NST 15q11.2. Kỹ thuật MS-PCR phát hiện 16 trường hợp có bất thường methyl hóa. Kỹ thuật MS-MLPA thực hiện trên 7 bệnh nhân đã xác định mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH, phát hiện 4 trường hợp mất đoạn typ 1, 3 trường hợp mất đoạn typ 2. Thực hiện kỹ thuật MS-MLPA trên 7 bệnh nhân đã xác định bất thường methyl hóa bằng kỹ thuật MS-PCR, phát hiện 1 trường hợp có mất đoạn dạng không điển hình, không phát hiện trường hợp nào có mất đoạn IC.

3.3.1. Kết quả phân tích nhiễm sắc thể đồ

Tất cả 101 bệnh nhân được chỉ định làm xét nghiệm NST đồ. Bệnh phẩm là máu tĩnh mạch ngoại vi được chống đông bằng heparin, nuôi cấy tế bào theo quy trình nuôi cấy tế bào, phân tích NST với kỹ thuật nhuộm băng G giúp phát hiện các bất thường NST trong đó có chuyển đoạn giữa NST 15 và NST khác gây mất đoạn NST 15q11-q13, là một trong các nhóm nguyên nhân có nguy cơ sinh con mắc PWS ở những lần sinh sau nếu chuyển đoạn NST được di truyền từ bố.

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

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

Nhận xét: phân tích NST đồ với kỹ thuật băng G phát hiện 4 bệnh nhân mang chuyển đoạn giữa NST số 15 và 1 NST khác, chiếm tỷ lệ 3,96%.

8 bệnh nhân có đa hình NST, bao gồm: 1qh+ (hai bệnh nhân), 9qh+, 16qh+, inv(9)(p12q13), 14pstk+, 15pstk+, 22pstk+. Trong đó có 1 bệnh nhân mang chuyển đoạn t(15;22), có đa hình NST số 1 kèm theo.

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

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

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

Nhận xét: trong 4 bệnh nhân chẩn đoán lâm sàng PWS nghi ngờ do mất đoạn NST 15q11-q13 với hình ảnh chuyển đoạn giữa NST 15 với một NST khác, có 1 bệnh nhân mã số 117PWS nhận bất thường NST từ bố, gia đình bệnh nhân này có nguy cơ sinh con mắc PWS ở lần sinh sau do vậy cần được tư vấn di truyền và chỉ định làm chẩn đoán trước sinh. 3 bệnh nhân mang các chuyển đoạn NST không có nguồn gốc từ bố mẹ, thuộc dạng đột biến mới.

Trong bốn bệnh nhân này, đều có mang đầy đủ các đặc điểm lâm sàng điển hình của bệnh nhân mắc PWS. Tuy nhiên mỗi bệnh nhân có các đặc điểm lâm sàng khác biệt, cụ thể như sau:

Trường hợp 1: bệnh nhân mã số 45PWS là con đầu, bố 30 tuổi, mẹ 20 tuổi, không có quan hệ huyết thống. Mẹ mổ đẻ do thai 40 tuần không có chuyển dạ, cân nặng lúc đẻ 2300g. Sau sinh trẻ có biểu hiện giảm trương lực cơ, không bú mẹ được, hỗ trợ ăn bằng đút thìa.

Tuổi chẩn đoán: 12 tháng tuổi.

Đặc điểm lâm sàng lúc chẩn đoán: bộ mặt bất thường điển hình PWS, da tóc nhạt màu, bàn tay bàn chân nhỏ, giảm trương lực cơ, thiểu sản cơ quan sinh dục.

Bệnh nhân bắt đầu điều trị GH lúc 48 tháng tuổi, điều trị được 15 tháng thì dừng. Hiện tại bệnh nhân 7 tuổi, cân nặng 44 kg, chiều cao 110cm, BMI 36,36. Chậm phát triển tâm thần mức độ trung bình, chỉ số IQ 40, chưa nói được câu dài, chưa đi học. Bệnh nhân biết đi lúc 36 tháng, dáng đi bình thường.

Con thứ 2 của gia đình (em của bệnh nhân), 2 tháng tuổi, khỏe mạnh.

Trường hợp 2: bệnh nhân mã số 126PWS: là con thứ 3 trong gia đình, bố 36 tuổi, mẹ 33 tuổi. Bố mẹ không có quan hệ huyết thống. Mẹ mổ đẻ do thai 41 tuần không có dấu hiệu chuyển dạ, có dấu hiệu suy thai, cân nặng lúc đẻ 3200g. Trẻ đẻ ra không bú mẹ được, hỗ trợ ăn sonde, giảm trương lực cơ toàn thân.

Tuổi chẩn đoán: giai đoạn sơ sinh.

Đặc điểm lâm sàng lúc chẩn đoán: bộ mặt bất thường điển hình của PWS, da tóc nhạt màu, ẩn tinh hoàn 2 bên, thiểu sản dương vật, giảm trương lực cơ toàn thân. Bệnh nhân được điều trị GH lúc 10 tháng tuổi, hiện bệnh nhân 13 tháng cân nặng 8 kg, chiều cao 70 cm, không có chậm phát triển tâm thần, chỉ số DQ 77%.

Hai con đầu sinh năm 2007, 2009 đều khỏe mạnh.

Trường hợp 3: bệnh nhân mã số 117PWS: con thứ 2, bố 31 tuổi, mẹ 30 tuổi, bố mẹ không có quan hệ huyết thống. Trẻ đẻ thường, cân nặng lúc đẻ 3200g, chiều dài 49cm, giảm trương lực cơ toàn thân, không bú mẹ được, phải hỗ trợ ăn qua sonde.

Tuổi chẩn đoán: sơ sinh.

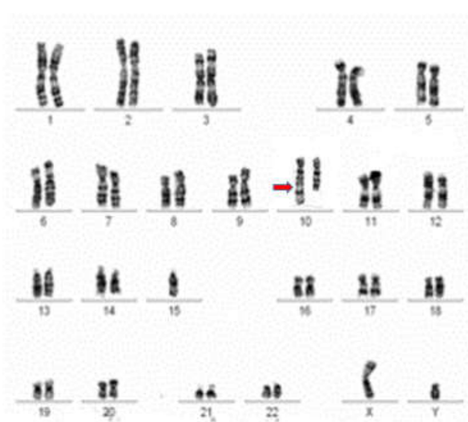
Đặc điểm lâm sàng lúc chẩn đoán: bộ mặt bất thường đặc trưng cho PWS, giảm trương lực cơ toàn thân, nhiễm trùng đường hô hấp nặng tái phát nhiều lần, co giật. Chậm phát triển tâm thần vận động.

Con đầu 4 tuổi, khỏe mạnh.

Trường hợp 4: bệnh nhân mã số 146PWS: con đầu, bố 28 tuổi, mẹ 27 tuổi, không có quan hệ huyết thống, trẻ đẻ mổ do thai hơn 40 tuần không có chuyển dạ, có dấu hiệu suy thai, cân nặng lúc đẻ 2300g.

Tuổi chẩn đoán: sơ sinh

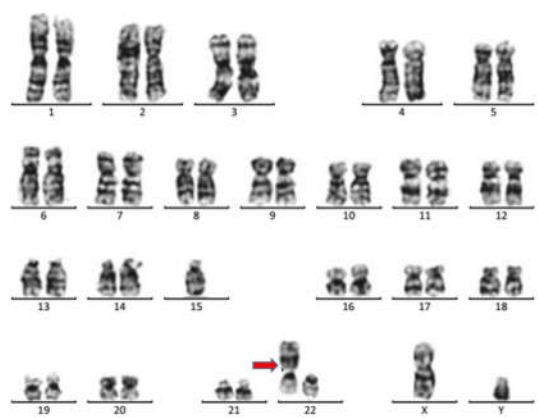
Đặc điểm lâm sàng lúc chẩn đoán: bộ mặt bất thường đặc trưng cho PWS, thiểu sản xương hàm dưới, cằm tụt ra sau. Da tóc nhạt màu. Giảm trương lực cơ toàn thân, không bú mẹ được, hỗ trợ cho ăn qua sonde. Siêu âm tim có thông liên thất đường kính nhỏ. Bệnh nhân đã được phẫu thuật chỉnh hình xương hàm dưới.



Hình 3.2. NST đồ bệnh nhân mã số 45PWS

45,XY,der(10)t(10;15)(q26;q12)

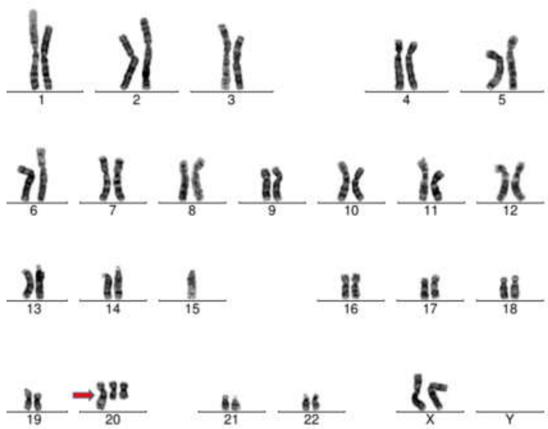
(10pter→10q26::15q12→15qter)-15



Hình 3.3. NST đồ bệnh nhân mã số 126PWS

45,XY,der(22)t(15;22)(q12;p13)

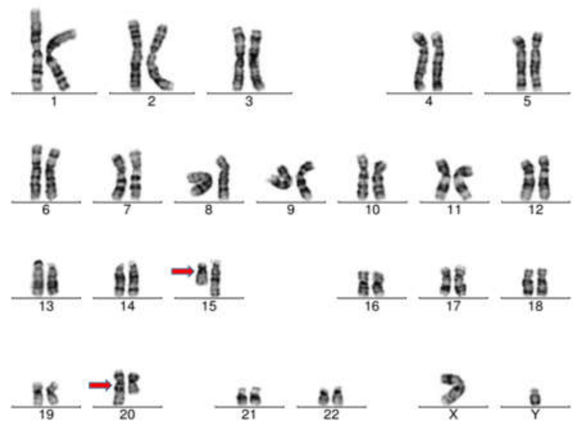
(15qter→15q12::22p13→22qter),1qh+,-15



Hình 3.4. NST đồ bệnh nhân mã số 117PWS

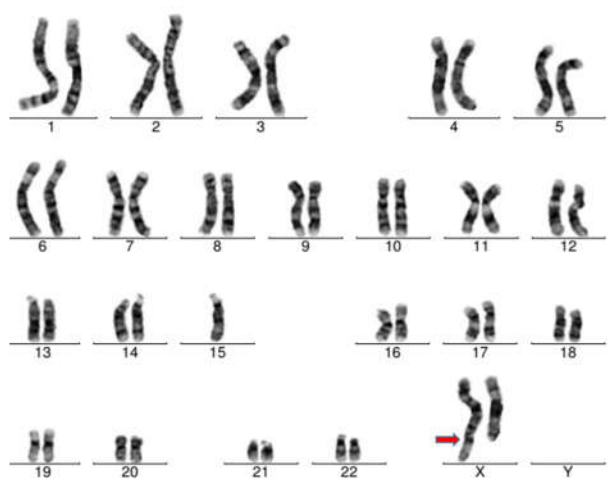
46,XX,der(20)t(15;20)(q12;q12)

(15qter→15q12::20q12→20pter)pat



Hình 3.5. NST đồ bố bệnh nhân mã số 117PWS

46,XY,t(15;20)(q12;q12)



Hình 3.6. NST đồ bệnh nhân mã số 146PWS

45,X,der(X)t(X;15)(q28;q12)(15qter→15q12::Xq28→Xpter),-15

Nhận xét: bệnh nhân 117PWS hình 3.4 ngoài mất đoạn NST 15pter-q12 còn có bất thường cấu trúc NST 20 dạng trisomy một phần nhánh ngắn NST 20 (20pter→20q12).

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

Áp dụng kỹ thuật FISH trong chẩn đoán PWS sử dụng bộ kít với các đầu dò: *SNRPN*, họ gen *snoRNA, UBE3a*; *PML* và vùng tâm, chi tiết như sau:

- Đầu dò đánh dấu vào các gen *SNRPN*, họ gen *snoRNA* và gen *UBE3A* tại vị trí 15q11.2 kích thước 125kb, tín hiệu lai màu đỏ (red - R).

- Đầu dò *PML* tại vị trí NST 15q24, tín hiệu lai màu xanh (green - G).

- Đầu dò vùng tâm (centromere), tín hiệu lai màu aqua (aqua - A).

Thực hiện kỹ thuật FISH trên tất cả 101 bệnh nhân, phát hiện 85 bệnh nhân có mất đoạn NST 15q11.2 trong đó có 4 bệnh nhân mang chuyển đoạn NST 15 với NST khác, 16 bệnh nhân không phát hiện mất đoạn NST 15q11.2.

Bảng 3.19. Kết quả phân tích kỹ thuật FISH

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

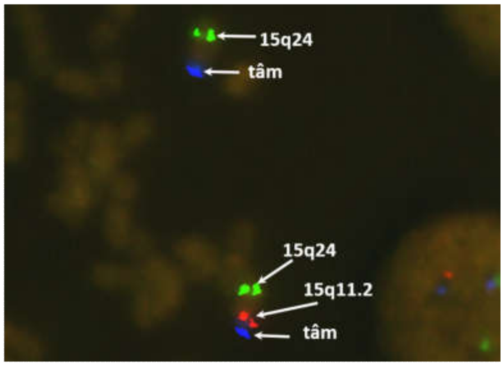
1R2G2A (1 tín hiệu đỏ, 2 tín hiệu xanh lá cây, 2 tín hiệu aqua)

1R2G1A (1 tín hiệu đỏ, 2 tín hiệu xanh lá cây, 1 tín hiệu aqua)

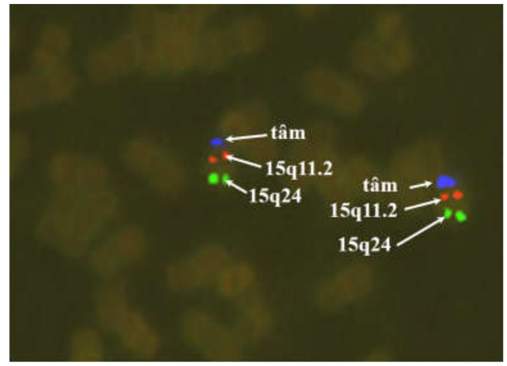
2R2G2A (2 tín hiệu đỏ, 2 tín hiệu xanh lá cây, 2 tín hiệu aqua)

Nhận xét: tỷ lệ bệnh nhân mắc PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 chiếm tỷ lệ cao 84,16%. Hình ảnh minh họa của kết quả phân tích kỹ thuật FISH của các bệnh nhân có mất đoạn và không mất đoạn NST 15q11.2.

a)



b)



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

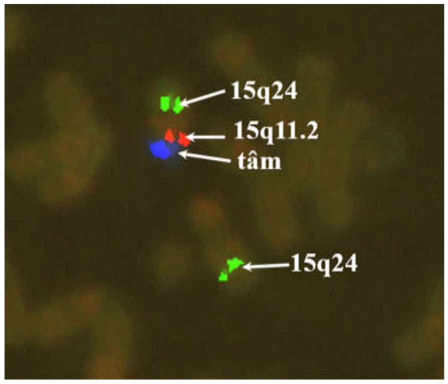
Hình 3.8. Bệnh nhân mã số 23PWS
Kết quả không mất đoạn NST 15q11.2

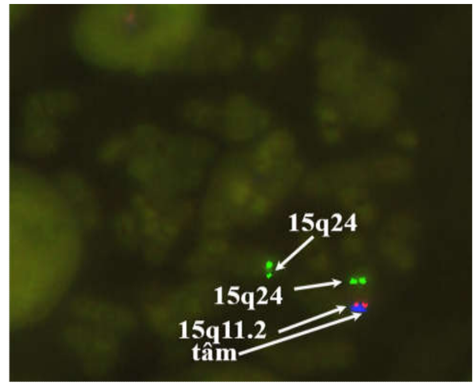
Nhận xét:

a) Bệnh nhân mã số 103PWS hình 3.7, trên kết quả phân tích FISH là 1R2G2A: 1 tín hiệu màu đỏ (1R) vùng 15q11.2, 2 tín hiệu màu xanh lá cây (2G) vùng 15q24, 2 tín hiệu màu aqua (2A) vùng tâm: bệnh nhân được kết luận mắc PWS do mất đoạn NST 15q11-q13. Có 81/101 bệnh nhân có mang hình ảnh kết quả FISH giống bệnh nhân mã số 103PWS.

b) Bệnh nhân mã số 23PWS hình 3.8, trên kết quả phân tích FISH là 2R2G2A: 2 tín hiệu đỏ (2R) vùng 15q11.2, 2 tín hiệu màu xanh lá cây (2G) vùng 15q24, 2 tín hiệu aqua (2A) vùng tâm, bệnh nhân được kết luận không mất đoạn 15q11.2. Có 16/101 bệnh nhân mang hình ảnh kết quả FISH giống bệnh nhân mã số 23PWS.

Thực hiện kỹ thuật FISH trên các bệnh nhân mang chuyển đoạn NST giữa NST số 15 và 1 NST khác, kết quả như sau:

a) 

b) 

Hình 3.9. Bệnh nhân mã số 126PWS mang t(15;22) có hình ảnh mất đoạn NST 15q11.2 và vùng tâm

Hình 3.10. Bệnh nhân mã số 146PWS mang t(X;15) có hình ảnh mất đoạn NST 15q11.2 và vùng tâm

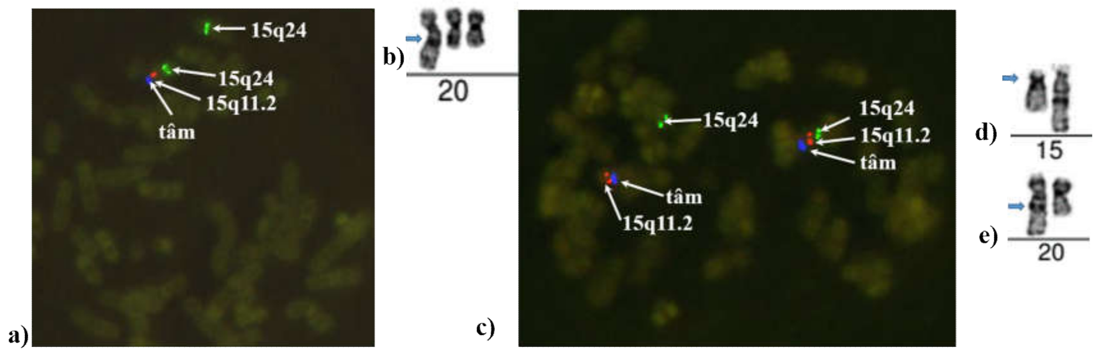
Nhận xét:

a) Bệnh nhân mã số 126PWS hình 3.9 mang NST 22 chuyển đoạn der(22)t(15;22)(q12;p13), kết quả phân tích FISH là 1R2G1A. Trên NST 15 bình thường có hình ành 1R1G1A, mang đầy đủ 3 tín hiệu đỏ, xanh lá cây; trên NST 22 chuyển đoạn der(22)t(15;22)(q12;p13) chỉ có 1 tín hiệu xanh lá cây (1G) thể hiện phần cuối nhánh dài NST 15 chuyển sang phần đầu nhánh ngắn NST 22, kết quả mất đoạn NST 15q11.2 và vùng tâm.

b) Bệnh nhân mã số 146PWS hình 3.10 mang NST X chuyển đoạn der(X)t(X;15)(q28:q12), kết quả phân tích FISH là 1R2G1A. Trên NST 15 bình thường có hình ảnh 1R1G1A, mang đầy đủ 3 tín hiệu đỏ, xanh lá cây, aqua; trên NST X chuyển đoạn der(X)t(X;15)(q28;q12) chỉ có 1 tín hiệu xanh lá cây (1G) thể hiện phần cuối nhánh dài NST 15 chuyển sang phần cuối nhánh dài NST X, kết quả mất đoạn NST 15q11.2 và vùng tâm.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, cả 4 bệnh nhân mang chuyển đoạn giữa NST 15 và NST khác đều có hình ảnh kết quả FISH 1R2G1A giống hai bệnh nhân trên.

Thực hiện kỹ thuật FISH cho hai bố con bệnh nhân mã số 117PWS là bệnh nhân có mang chuyển đoạn NST t(15;20) có nguồn gốc từ bố, hình ảnh như sau:



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

Nhận xét:

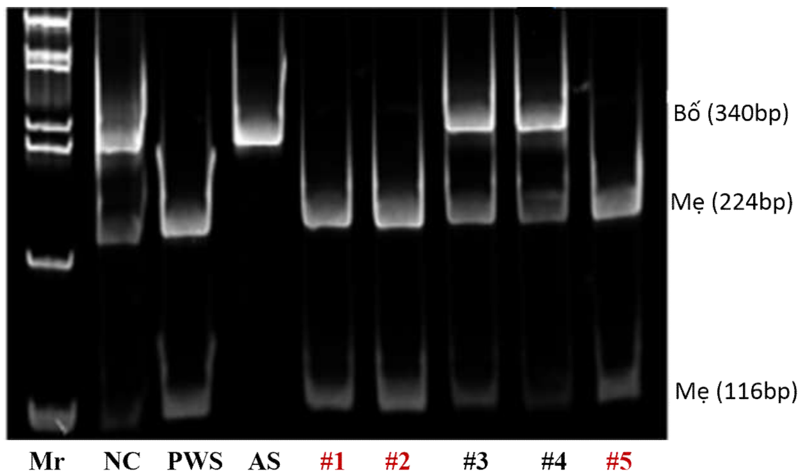
a), b) Hình ảnh FISH và NST đột biến tương ứng của bệnh nhân mã số 117PWS: mang NST 20 chuyển đoạn der(20)t(15;20)(q12;q12), kết quả phân tích FISH là 1R2G1A. Trên NST 15 bình thường mang đầy đủ 3 tín hiệu đỏ, xanh lá cây, aqua 1R1G1A; trên NST 20 chuyển đoạn der(20)t(15;20)(q12;q12) nhận từ bố chỉ có 1 tín hiệu xanh lá cây (1G), thể hiện phần cuối nhánh dài NST 15 chuyển sang phần cuối nhánh dài NST 20 tại vị trí 20q12 đã mất đoạn NST 15q11.2 và vùng tâm.

c), d), e) Hình ảnh FISH và NST đột biến tương ứng của bố bệnh nhân mã số 117PWS: kết quả phân tích FISH là 2R2G2A. Trên NST 15 bình thường có đầy đủ 3 tín hiệu đỏ, xanh lá cây và aqua 1R1G1A; trên NSTder(15)t(15;20)(q12;q12) mang 1 tín hiệu màu đỏ vùng 15q11.2 và 1 tín hiệu màu aqua của vùng tâm (1R1A); trên NSTder(20)t(15;20)(q12;q12) mang 1 tín hiệu màu xanh lá cây vùng 15q24 (1G).

Như vậy bằng kỹ thuật FISH đã xác định được 4 bệnh nhân mang chuyển đoạn NST 15 với NST khác có mất đoạn NST15q11-q13, chẩn đoán xác định bệnh nhân mắc PWS.

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

16 bệnh nhân có kết quả xét nghiệm FISH không mất đoạn NST 15q11.2, được chỉ định làm kỹ thuật MS-PCR để xác định tình trạng methyl hóa, đều có kết quả bất thường methyl hóa, kết luận bệnh nhân mắc PWS.



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

Mr: marker 100bp.

NC: hình ảnh điện di sản phẩm MS-PCR của người bình thường, mang sản phẩm PCR của alen methyl hóa có nguồn gốc mẹ (224bp, 116bp) và alen không methyl hóa có nguồn gốc bố 340bp.

PWS: mẫu chứng bệnh nhân PWS chỉ mang sản phẩm PCR của alen methyl hóa có nguồn gốc mẹ, kích thước 224bp và 116bp.

AS: mẫu chứng bệnh nhân Angelman chỉ mang sản phẩm PCR của alen không methyl hóa có nguồn gốc bố, kích thước 340bp.

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

3, 4: hình ảnh điện di của người bình thường.

Trong nghiên cứu, 16 bệnh nhân không phát hiện mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH đều có hình ảnh sản phẩm điện di giống hình ảnh của các bệnh nhân 1, 2, 5. Các bệnh nhân này được chẩn đoán xác định mắc PWS.

Với kỹ thuật MS-PCR, bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13, do hai NST 15 cùng nguồn gốc từ mẹ (mUPD) hay do khiếm khuyết di truyền (ID) đều cho kết quả hình ảnh điện di sản phẩm PCR như nhau: chỉ xuất hiện băng sản phẩm methyl hóa, do vậy không phân biệt được các nhóm bệnh nhân này với nhau.

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

Kỹ thuật MS-MLPA sử dụng bộ đầu dò MEO28-C1 là kỹ thuật mới được triển khai tại Bệnh viện nhi trung ương, hiện nay kỹ thuật này được xem là kỹ thuật ưu việt nhất trong chẩn đoán PWS. Kỹ thuật MS-MLPA chẩn đoán xác định được hơn 99% các trường hợp bệnh nhân mắc PWS do mất đoạn NST 15q11-q13, do hai NST 15 cùng nguồn mẹ mUPD, do khiếm khuyết dấu ấn di truyền.

Kỹ thuật MS-MLPA xác định được nhóm bệnh nhân mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1, mất đoạn NST 15q11-q13 typ 2, mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình kích thước rất nhỏ; xác định được nhóm bệnh nhân khiếm khuyết dấu ấn di truyền do đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC.

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

Kỹ thuật phân tích NST băng G và kỹ thuật FISH xác định được những trường hợp bệnh nhân PWS do mang chuyển đoạn NST15 và NST khác gây mất đoạn NST 15q11-q13 có nguồn gốc gia đình. Kỹ thuật MS-MLPA phát hiện những trường hợp bệnh nhân PWS do đột biến mất đoạn IC. Thực hiện thành công các kỹ thuật này, chúng tôi hoàn thiện phương pháp chẩn đoán cho nhóm bệnh nhân PWS do di truyền, có nguy cơ sinh con mắc PWS ở những lần sinh sau. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh, kiểm soát vấn đề sinh con mắc PWS trong những lần sinh sau của các gia đình này.

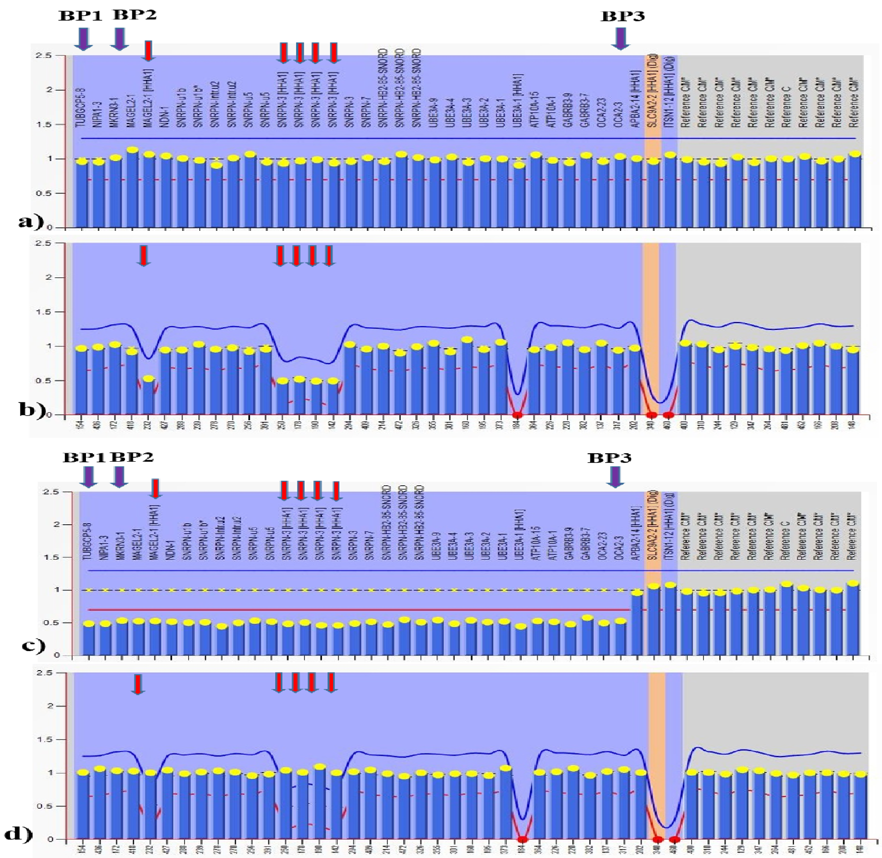
Kỹ thuật MS-MLPA mới được triển khai tại Bệnh viện Nhi Trung ương, giá thành xét nghiệm cao và chưa được bảo hiểm y tế chi trả. Trong nghiên cứu này, 14 bệnh nhân tự nguyện thực hiện kỹ thuật MS-MLPA cụ thể như sau:

7/85 bệnh nhân đã được chẩn đoán PWS do mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH. Trong 7 bệnh nhân này có 3 bệnh nhân mang chuyển đoạn NST 15 với NST khác đã được xác định bằng kỹ thuật phân tích NST băng G, mục đích phân loại mất đoạn typ1, typ2 từ đó có tiên lượng trên lâm sàng.

7/16 bệnh nhân đã được chẩn đoán PWS bằng kỹ thuật MS-PCR, mục đích xác định các trường hợp mang đột biến mất đoạn IC, có nguy cơ sinh con mắc PWS ở những lần sinh sau.

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

Đối với 7 bệnh nhân đã được chẩn đoán mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH được chỉ định tiếp kỹ thuật MS-MLPA với mục đích xác định loại mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1 hay typ 2 để tiên lượng bệnh trên lâm sàng.



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

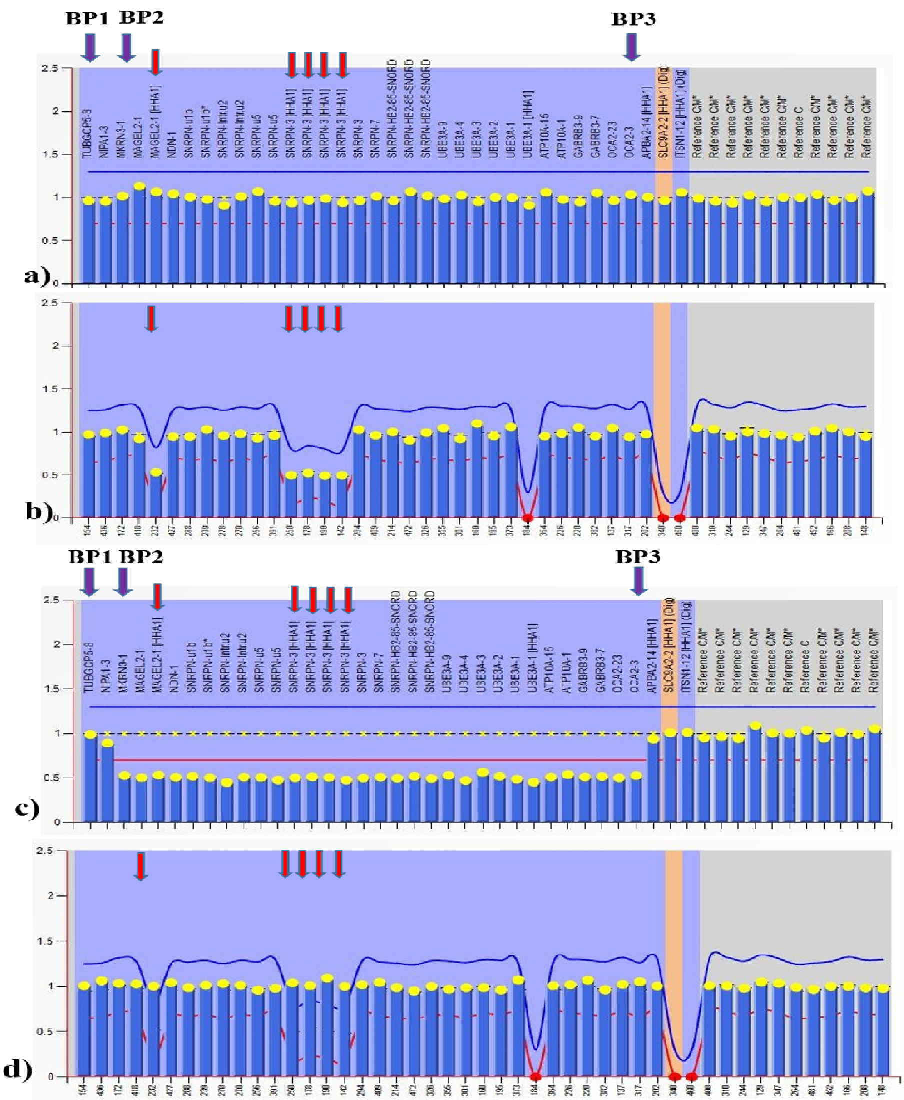
Nhận xét: **Hình a, b** là hình ảnh MS-MLPA của người bình thường.

Hình c, d là hình ảnh MS-MLPA của bệnh nhân.

a) Đỉnh tín hiệu các gen vùng NST 15q11-q13 ở ngưỡng 1; **b)** Tại các vị trí đầu dò gắn enzym HhaI (mũi tên màu đỏ), đỉnh tín hiệu ở ngưỡng 0,5, thể hiện hình ảnh methyl hóa của NST 15 nguồn gốc mẹ.

c) Hình ảnh mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1 (BP1-BP3), đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 0,5; **d)** Hình ảnh bất thường methyl hóa, tại các vị trí mũi tên màu đỏ đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 1.

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



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

Nhận xét: **Hình a, b** là hình ảnh MS-MLPA của người bình thường.

Hình c, d là hình ảnh MS-MLPA của bệnh nhân.

a) Đỉnh tín hiệu các gen vùng NST 15q11-q13 ở ngưỡng 1; **b)** Tại các vị trí đầu dò gắn enzym HhaI (mũi tên màu đỏ), đỉnh tín hiệu ở ngưỡng 0,5 thể hiện hình ảnh methyl hóa của NST 15 nguồn gốc mẹ.

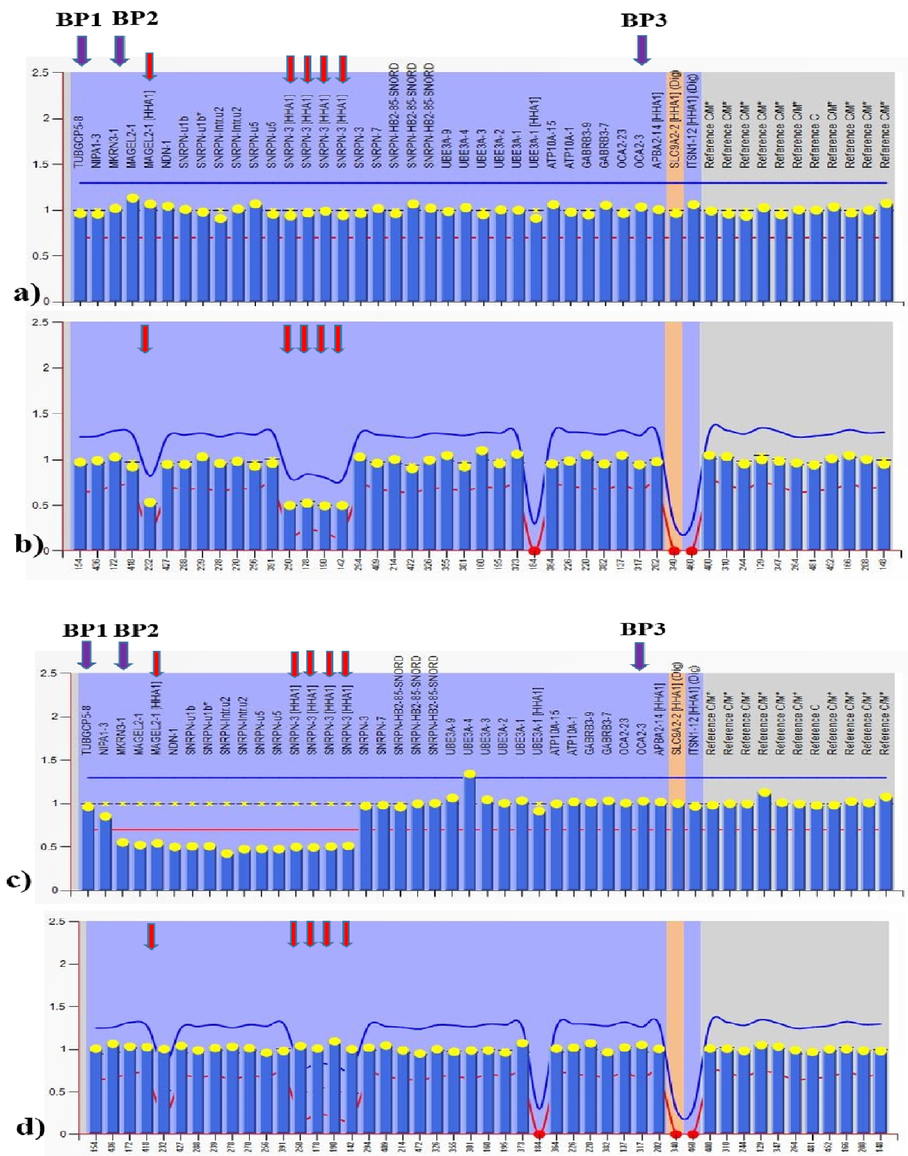
c) Hình ảnh mất đoạn NST 15q11-q13 typ 2 (BP2-BP3), đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 0,5; **d)** Hình ảnh bất thường methyl hóa, tại các vị trí mũi tên màu đỏ đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 1.

Trong 7 bệnh nhân được chẩn đoán mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH, có 3 bệnh nhân có hình ảnh MS-MLPA giống bệnh nhân mã số 141PWS, các bệnh nhân được kết luận mất đoạn NST 15q11-q13 typ 2.

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

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

Bệnh nhân mã số 133PWS có kết quả xét nghiệm FISH kết luận không mất đoạn NST 15q11.2, kết quả xét nghiệm MS-PCR có bất thường methyl hóa. Áp dụng kỹ thuật MS-MLPA cho bệnh nhân này, kết quả có hình ảnh của mất đoạn NST 15q11.2 không điển hình, thể hiện ở hình 3.15.



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

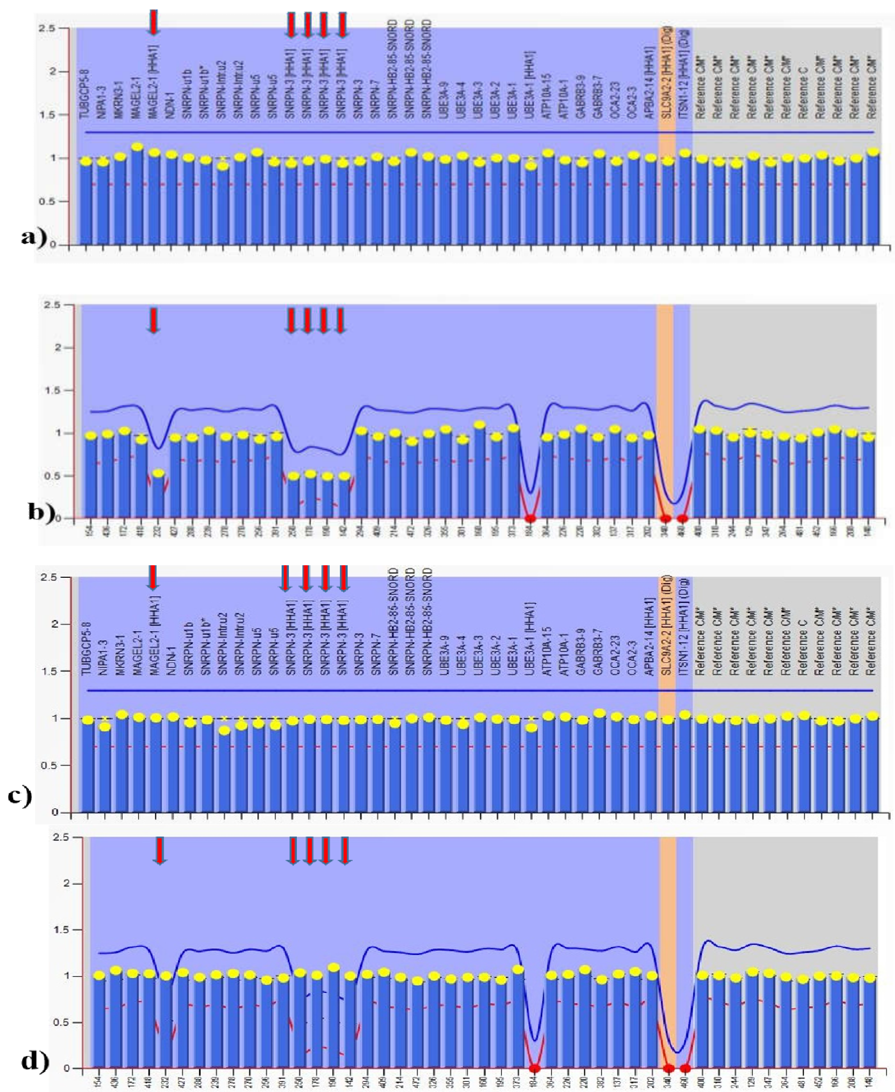
Nhận xét: **Hình a, b** là hình ảnh MS-MLPA của người bình thường.

Hình c, d là hình ảnh MS-MLPA của bệnh nhân.

a) Đỉnh tín hiệu các gen vùng NST 15q11-q13 ở ngưỡng 1; **b)** Tại các vị trí đầu dò gắn enzym HhaI (mũi tên màu đỏ), đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 0,5 thể hiện hình ảnh methyl hóa của NST 15 nguồn gốc mẹ.

c) Hình ảnh mất đoạn NST 15q11-q13, đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 0,5 bao gồm các gen: *MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN* tại vùng upstream (vùng trung tâm dấu ấn di truyền IC), intron 2, intron 5 và exon 3. Những vị trí mất của gen *SNRPN* nằm ngoài vùng đánh dấu của đầu dò sử dụng trong kỹ thuật FISH, do vậy khi thực hiện kỹ thuật FISH không phát hiện được mất đoạn ở trường hợp này; **d)** Hình ảnh bất thường methyl hóa, tại các vị trí mũi tên màu đỏ đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 1.

6 bệnh nhân còn lại có hình ảnh MS-MLPA như sau:



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

Nhận xét: **Hình a, b** là hình ảnh MS-MLPA của người bình thường,

Hình c, d là hình ảnh MS-MLPA của bệnh nhân.

a) Đỉnh tín hiệu các gen vùng NST 15q11-q13 ở ngưỡng 1; **b)** Tại các vị trí đầu dò gắn enzym HhaI (mũi tên màu đỏ), đỉnh các tín hiệu ở ngưỡng 0,5 thể hiện hình ảnh methyl hóa của NST 15 nguồn gốc mẹ. **c)** Hình ảnh không có mất đoạn NST 15q11-q13, giống hình a; **d)** Hình ảnh bất thường methyl hóa, đỉnh các tín hiệu ở các vị trí gắn mũi tên màu đỏ đều ở ngưỡng 1.

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

Khi thực hiện kỹ thuật MS-MLPA cho 7/16 bệnh nhân có bất thường methyl hóa xác định mắc PWS bằng kỹ thuật MS-PCR, đã phát hiện 1 trường hợp bệnh nhân PWS thuộc nhóm mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình, kích thước đoạn mất rất nhỏ. Trong 15 bệnh nhân do mUPD, ID còn 9 bệnh nhân chưa khẳng định chắc chắn có phải do mất đoạn rất nhỏ không điển hình hay không. Tuy nhiên những trường hợp bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 kích thước nhỏ với kỹ thuật FISH không phát hiện được rất hiếm gặp, do vậy 15 bệnh nhân này chúng tôi tạm xếp vào nhóm bệnh nhân PWS do mUPD và ID để bước đầu so sánh sự biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng ở 2 nhóm triệu chứng nặng, nhẹ với nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13, kết quả như sau:

Bảng 3.20. So sánh biểu hiện lâm sàng theo biến đổi di truyền

Triệu chứng	**Mất đoạn (n=86)** Số lượng (%)	**mUPD và ID (n=15)** Số lượng (%)
Triệu chứng nặng		
Giảm trương lực cơ	80(93%)	13 (86,7%)
Hỗ trợ ăn uống	80 (93%)	13 (86,7%)
Thừa cân, béo phì	**20 (23,3%)**	**2 (13,3%)***
Thiểu sản CQSD ngoài	81 (94,2%)	14 (93,3%)
Chậm PTTTVĐ	35/44 (79,5%)	8/10 (80%)
Ham ăn uống	41/50 (82%)	10/13 (76,9%)
Bộ mặt bất thường	86 (100%)	12 (80%)
Triệu chứng nhẹ		
Giảm cử động thai	86 (100%)	15 (100%)
Bất thường giấc ngủ	57 (66,3%)	9 (60%)
Giảm sắc tố da, tóc nhạt màu	**83 (96,5%)**	**6 (40%)***
Bàn tay, bàn chân nhỏ	80 (93%)	13 (86,7%)
Lác mắt	13 (15,1%)	2 (13,3%)
Cong vẹo cột sống	7 (8,2%)	0

*p < 0,05

Nhận xét: sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê ở 2 triệu chứng: thừa cân béo phì, giảm sắc tố da, tóc nhạt màu.

Bảng 3.21. Sự khác nhau về mức độ phát triển tâm thần vận động theo biến đổi di truyền

Chỉ số đánh giá	**Tổng số bệnh nhân (n = 46)**	**Mất đoạn (n = 34)**	**mUPD và ID (n = 12)**	**p (t - test) khác nhau giữa 2 nhóm DT**
IQ trung bình	53 ± 10,81	49,17 ± 10,62	58,75 ± 8,76	0,049*
Khoảng IQ	40-75	40-75	50-70	
DQ trung bình	64,16 ± 10,14	63,91 ± 10,27	67,5 ± 8,66	0,499
Khoảng DQ	40-80	40-77	60-80	

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

Bảng 3.22. Sự khác nhau về tuổi chẩn đoán theo biến đổi di truyền

Chỉ số đánh giá	**Tổng số bệnh nhân (n = 101)**	**Mất đoạn (n = 86)**	**mUPD và ID (n = 15)**	**p (t - test) khác nhau giữa 2 nhóm DT**
Tuổi trung bình (tháng)	26,4 ± 32,74	23,14 ± 30,33	45,1 ± 40,38	0,016*
Khoảng tuổi (tháng)	0,2-132	0,2-132	0,3-132	

Nhận xét: tuổi trung bình lúc chẩn đoán của nhóm bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13 thấp hơn so với nhóm do mUPD, ID, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), điều này chứng tỏ các bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13 cần can thiệp y tế sớm hơn so với nhóm bệnh nhân do mUPD, ID.

Tuổi mẹ lúc chẩn đoán bệnh theo phân nhóm biến đổi di truyền được trình bày ở bảng 3.23.

Bảng 3.23. Mối liên hệ giữa trung bình tuổi mẹ và biến đổi di truyền ở con PWS

Biến đổi di truyền	**Tuổi trung bình**	**Khác biệt tuổi trung bình**	**95% CI**	**t- test**	**p**
Mất đoạn	28,23	-3,64	(-5,69; - 1,58)	3,51	0,001
mUPD và ID	31,87				

Nhận xét: trung bình tuổi mẹ ở nhóm mUPD và ID cao hơn 3,64 tuổi so với trung bình tuổi mẹ ở nhóm do mất đoạn 15q11-q13, kết quả này có ý nghĩ thống kê với $t_{100} = -3,51$; $p < 0,05$.

Bảng 3.24. Mối liên hệ giữa nhóm tuổi mẹ và biến đổi di truyền ở con PWS

Nhóm tuổi mẹ	**Biến đổi di truyền**		**p**
	Mất đoạn	**mUPD và ID**	
< 35 tuổi	83 (88,3%)	11 (11,7%)	***0,009***
≥ 35 tuổi	3 (42,9%)	4 (57,1%)	

Nhận xét: ở nhóm tuổi mẹ < 35 tuổi có tỷ lệ sinh con mắc PWS do mất đoạn 15q11-q13 cao hơn so với nhóm tuổi mẹ ≥ 35 tuổi là 10,06 lần. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Hình 3.17. Bộ mặt điển hình của bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi

Nhận xét: Trong 60 trường hợp có chụp ảnh chân dung bệnh nhân, phân tích các đặc điểm lâm sàng kết hợp sử dụng phần mềm Face to Gene https://www.face2gene.com/ thấy hầu hết các bệnh nhân đều mang các đặc điểm điển hình của khuôn mặt bệnh nhân Prader-Willi.

Hình 3.18. Bộ mặt không điển hình của bệnh nhân mắc PWS

Nhận xét: Phân tích các đặc điểm khuôn mặt kết hợp sử dụng phần mềm Face to Gene https://www.face2gene.com/ để phân tích các đặc điểm về khuôn mặt bệnh nhân, phát hiện có 3 trường hợp bệnh nhân có đặc điểm khuôn mặt phù hợp với chẩn đoán di truyền mắc PWS ở mức độ thấp.

Hình 3.19. Hình ảnh giảm trương lực cơ giai đoạn sơ sinh

Nhận xét: 100% các bệnh nhân đều có giảm trương lực cơ giai đoạn sơ sinh.

Hình 3.20. Giảm sắc tố da, tóc nhạt màu

Hình 3.21. Béo phì tập trung vùng thân mình

Hình 3.22. Thiểu sản CQSD ngoài.
nữ (hình trên); nam (hình dưới)

Chương 4
BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

4.1.1. Giới tính

Trong 101 bệnh nhân nghiên cứu có 66 bệnh nhân nam, 35 bệnh nhân nữ, tỷ lệ nam/nữ là 1,88. Theo các nghiên cứu trên trên thế giới, tỷ lệ bệnh nhân nam/nữ khá đa dạng. Trong nghiên cứu trên 186 bệnh nhân ở Hoa Kỳ năm 2012 có 108 bệnh nhân nam, 78 bệnh nhân nữ [104], ở Pháp năm 2017 trên 61 bệnh nhân PWS có 28 bệnh nhân nam, 33 bệnh nhân nữ [86]. Tại Anh, nghiên cứu năm 2018 trên 90 bệnh nhân sơ sinh có 54 bệnh nhân nam, 36 bệnh nhân nữ [87]. Tuy nhiên trong 1 nghiên cứu tại Đức trên số lượng lớn 315 bệnh nhân là thì tỷ lệ nam/nữ là 208/109 (1,90) [105]. Trong các nghiên cứu ở quần thể người châu Á tại Trung Quốc, Hàn Quốc hay Nhật Bản không có sự khác nhau giữa tỷ lệ bệnh nhân nam và nữ [106], [82], [81].

Tại Việt Nam, hầu hết các bệnh nhân nam có triệu chứng ẩn tinh hoàn nên các em bé trai được đến các bệnh viện khám sớm, các bệnh viện có khả năng điều trị ẩn tinh hoàn là các bệnh viện tuyến tỉnh, trung ương nên tỷ lệ phát hiện bệnh nhân nam cao hơn. Theo cơ chế di truyền của PWS, bệnh lý này không liên quan giới tính, vì vậy có thể còn nhiều bệnh nhân nữ trong cộng đồng chưa được phát hiện.

4.1.2. Tuổi chẩn đoán

Tuổi chẩn đoán trung bình của bệnh nhân trong nghiên cứu là 30,18±0,39 tháng. So với các nghiên cứu khác độ tuổi chẩn đoán này muộn hơn khá nhiều. Theo nghiên cứu của Cesline Bar tại Pháp trên 58 bệnh nhân, tuổi chẩn đoán trung bình là 18 ngày tuổi [86]. Tại Hàn Quốc tuổi chẩn đoán trung bình là 13,7 tháng [82].

Việc chẩn đoán sớm liên quan đến quản lý và điều trị bệnh nhân. Trong nghiên cứu này có 66 bệnh nhân được chẩn đoán trước 2 tuổi, trong đó 46 bệnh nhân được chẩn đoán trước 6 tháng. Chẩn đoán sớm trước 6 tháng có vai trò quan trọng trong chỉ định điều trị GH, theo khuyến cáo của hiệp hội Prader-Willi Hoa Kỳ thời điểm điều trị GH bắt đầu từ 6 tháng và tốt nhất trước 2 tuổi [107]. Một số trung tâm điều trị sớm lúc bệnh nhân được 3 tháng tuổi, tuy nhiên chưa có nghiên cứu về hiệu quả khác biệt.

Chỉ có 5 bệnh nhân trong nghiên cứu này được chẩn đoán trong vòng 1 tháng sau sinh vào năm 2017, 2018.

4.1.3. Tiền sử sản khoa

Tuổi mẹ trung bình khi sinh con PWS trong nghiên cứu này là 28,73 ± 3,99; tuổi bố trung bình 31,50 ± 5,18, thấp hơn so với nghiên cứu của Hàn Quốc tuổi mẹ trung bình là 30,7 ± 3,2; tuổi bố trung bình là 33,5 ± 4,1 [82].

Về phương thức đẻ, tình trạng cử động thai và tỷ lệ sinh non tháng so sánh với các nghiên cứu khác, kết quả như sau:

Bảng 4.1. So sánh tiền sử sản khoa với các nghiên cứu khác

Tác giả (n), năm	Đẻ thường	Đẻ mổ	Non tháng	Giảm cử động thai
ATLan (Việt Nam) (n=101), 2018	32,7%	68%	17,8%	80,6%
Cesline Bar (Pháp) (n= 61), 2017 [86]	33%	67%	20%	27%
CizmeciogluFM (Đức) (n=90), 2018 [87]	53%	47%	26,3%	80,4%

So sánh nghiên cứu này với các nghiên cứu khác thấy tỷ lệ đẻ thường, đẻ mổ, đẻ non tháng tương tự nghiên cứu của Cesline Bar và Cizmecioglu. Tuy nhiên tỷ lệ giảm cử động thai theo nghiên cứu của Celine Bar tại Pháp lại có tỷ lệ rất thấp là 27%.

Tỷ lệ trẻ cân nặng thấp < 2500g trong nghiên cứu là 18,8% tương ứng với tỷ lệ trẻ đẻ non 17,8%. Theo thống kê của tổ chức y tế thế giới WHO, tỷ lệ trẻ đẻ non ở các nước châu Á là 15%, như vậy so với tỷ lệ đẻ non trung bình trong quần thể, tỷ lệ đẻ non trong nhóm bệnh nhân PWS trong nghiên cứu này cao hơn [108].

Cân nặng trung bình lúc sinh bệnh nhân trong nghiên cứu là 2778,2g; so với các trẻ mắc PWS tại Hàn Quốc là 2700g và ở Thổ Nhĩ Kỳ là 2665g không có sự khác biệt [82], [87].

4.2. Đặc điểm lâm sàng

4.2.1. Các đặc điểm lâm sàng giai đoạn sơ sinh

Giảm trương lực cơ là một triệu chứng nặng của bệnh, giảm trương lực cơ trung ương và liên quan đến chức năng của gen *MAGEL2* nằm trong PWCR tại NST 15q11-q13 [109], [110], [111].

Triệu chứng giảm trương lực cơ liên quan đến việc phải hỗ trợ ăn uống, bệnh nhân phải nằm viện, tình trạng nhiễm khuẩn đường hô hấp trong giai đoạn sơ sinh và tình trạng cong vẹo cột sống sau này của bệnh nhân PWS [86], [112]. Giảm trương lực cơ cũng liên quan đến tình trạng giảm cử động thai khi khai thác tiền sử sản khoa của mẹ.

Giảm trương lực cơ kết hợp với các đặc điểm điển hình về khuôn mặt bệnh nhân PWS là các dấu hiệu quan trọng giúp chẩn đoán sớm PWS. Các dấu hiệu này xuất hiện ngay tuần đầu tiên sau đẻ [86]. Theo nghiên cứu của Vincent trên 144 bệnh nhân sơ sinh tại Pháp có giảm trương lực cơ, có 98 bệnh nhân giảm trương lực cơ trung ương, trong số đó 4 bệnh nhân được chẩn đoán PWS, tỷ lệ 4,08% [113]. Tỷ lệ này trong nghiên cứu trên 244 bệnh nhân sơ sinh Trung Quốc là 24,2% [109].

Bảng 4.2. So sánh triệu chứng giảm trương lực cơ và hỗ trợ cho ăn giai đoạn sơ sinh

Tác giả (n), năm	Giảm trương lực cơ	Hỗ trợ cho ăn
ATLan (Việt Nam), (n=101), 2018	92,1%	92,1%
Yea Ji Kim (Hàn Quốc), (n=30), 2014 [82]	66,7%	73,3%
Wei Lu (Trung Quốc), (n=31), 2014 [81]	100%	100%
Dudley O (Hoa Kỳ), (n= 86), 2007 [88]	95,4%	82,6%

Tỷ lệ giảm trương lực cơ trong nghiên cứu tương đương các nghiên cứu của Wei Lu và Dudley, nghiên cứu của Kim có tỷ lệ thấp hơn. Phương pháp hỗ trợ cho ăn của các bệnh nhân Việt Nam chủ yếu đổ thìa, trong khi các quốc gia khác hầu hết sử dụng sonde dạ dày. Không có bệnh nhân nào phải yêu cầu mở thông dạ dày.

Tỷ lệ bệnh nhân phải vào viện ngay sau sinh trong nghiên cứu này là 62/101 (61,4%), trong đó có 8 bệnh nhân phải nằm tại khoa điều trị tích cực cần hỗ trợ hô hấp. So với nghiên cứu trên 61 bệnh nhân sơ sinh mắc PWS tại Pháp, tỷ lệ nhập viện ngay sau sinh là 75%, 6 bệnh nhân cần đặt nội khí quản [86]. Nguyên nhân vào viện ngay sau đẻ đều do viêm đường hô hấp.

4.2.2. Tình trạng thừa cân, béo phì và tăng cảm giác thèm ăn

Tại thời điểm chẩn đoán, tỷ lệ bệnh nhân bị thừa cân 9,8%; béo phì là 11,8%, các bệnh nhân này đều thuộc nhóm bệnh nhân trên 2 tuổi. So với nghiên cứu của Kim tại Hàn Quốc trên 30 bệnh nhân, tuổi từ 2 - 47 tháng, tuổi trung bình bệnh nhân là 13,7 tháng, tỷ lệ bệnh nhân béo phì là 16,7% [82]. Nghiên cứu Diene trên 142 bệnh nhân PWS tại Pháp, tuổi từ 0,2 - 18,8 tuổi, tuổi trung bình 7,1 tuổi, tỷ lệ bệnh nhân béo phì là 40% [114].

Tỷ lệ béo phì tăng theo tuổi của bệnh nhân PWS, liên quan đến lượng thức ăn đưa vào. Cơ chế béo phì của PWS do rối loạn chuyển hóa, hậu quả của rối loạn việc bài tiết nhiều loại hormon, điển hình tăng Gherlin, giảm peptide YY, giảm insulin, giảm hormon tuyến giáp. Sự bất thường bài xuất các loại hormon này dẫn đến bệnh nhân mất cảm giác no, tăng tiêu hao năng lượng [115]. Đặc điểm của béo phì trên bệnh nhân PWS là do tăng khối lượng mỡ, giảm khối lượng cơ, do vậy khối lượng cơ của bệnh nhân PWS có thể thấp hơn so với người bình thường cùng cân nặng, giảm khối cơ dùng để tiêu hao năng lượng lúc nghỉ, hậu quả càng gây tăng cân nhiều [116].

Béo phì là một triệu chứng nặng của bệnh, tăng theo tuổi. Theo nghiên cứu tại Pháp và Hà Lan, tỷ lệ người trưởng thành mắc PWS bị béo phì chiếm từ 82% đến 98% [117], [118].

Béo phì là nguyên nhân chính gây bệnh tật và tử vong sớm ở PWS. Nhiều y văn trên thế giới thông báo các trường hợp bệnh nhân PWS chết vì ngạt thở do ăn quá no, vỡ dạ dày [119]. Bên cạnh đó, béo phì làm gia tăng các bệnh lý mạn tính, nặng nề kéo dài như các bệnh lý đường hô hấp (bệnh phổi tắc nghẽn, suy hô hấp), tăng áp động mạch phổi, suy tim phải, tăng huyết áp, tăng mỡ máu, gan nhiễm mỡ, sỏi mật, huyết khối tĩnh mạch. Tỷ lệ bệnh nhân PWS tử vong do các bệnh lý hô hấp và tim mạch là 38% và 16% [120]. Béo phì làm tăng tỷ lệ rối loạn chuyển hóa đường (24,4%), bao gồm cả đái tháo đường typ 2, gây những hậu quả nặng nề như suy đa tạng, cũng là nguyên nhân gây tử vong cao của bệnh nhân PWS [121].

Trong nghiên cứu này có 3 bệnh nhân tử vong do các biến chứng của béo phì. Các bệnh nhân đều có béo phì độ 3, không được quản lý, chết trong tình trạng viêm đường hô hấp kéo dài, đái tháo đường, suy đa tạng. Tỷ lệ bệnh nhân béo phì trong nhóm bệnh nhân lớn hơn 3 tuổi cao hơn nhóm bệnh nhân nhỏ hơn 3 tuổi, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trẻ thừa cân béo phì liên quan đến tăng cảm giác thèm ăn, xuất hiện khi trẻ được 2 - 3 tuổi [116].

Việc quản lý điều trị các bệnh nhân thừa cân béo phì có vai trò quyết định trong việc hạn chế biến chứng, giảm tác động của các triệu chứng nặng và nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân.

Điều trị chứng béo phì bao gồm: tư vấn thực hiện chế độ ăn, luyện tập thể dục, dùng thuốc và can thiệp ngoại khoa [116].

Tất cả các bệnh nhân trong nghiên cứu này đều được tư vấn thực hiện chế độ ăn hạn chế năng lượng và cân bằng với 30% chất béo, 45% carbohydrate, 25% protein, trong đó ít nhất 20g chất xơ mỗi ngày, chế độ ăn này làm giảm cân và giảm khối lượng mô mỡ [122]. Chia nhỏ bữa ăn, tăng cường rau xanh và các loại quả ít đường, kết hợp tập luyện và giáo dục thay đổi hành vi của trẻ, của bố mẹ và người chăm sóc trẻ.

Lựa chọn điều trị béo phì bằng thuốc ở bệnh nhân PWS rất hạn chế, cho đến nay không có loại thuốc nào cho thấy có hiệu quả lâu dài trong kiểm soát sự thèm ăn của bệnh nhân [123], [124]. Các thuốc chủ yếu tác động vào quá trình tiêu hóa và hấp thu chất béo, chuyển hóa carbohydrate, tăng tiêu hao năng lượng và kiểm soát hành vi tìm kiếm thức ăn. Không có bệnh nhân nào trong nghiên cứu sử dụng các loại thuốc này.

Can thiệp phẫu thuật bariatric cắt bỏ một phần dạ dày để điều trị béo phì được áp dụng trong các trường hợp PWS có chỉ số BMI ≥ 35 có kèm theo các bệnh lý nặng nghiêm trọng như bệnh phổi tắc nghẽn, cơn ngừng thở ngắn khi ngủ, đái tháo đường typ 2, hoặc những bệnh nhân có BMI ≥ 40 [125]. Không có bệnh nhân nào trong nghiên cứu thực hiện phương pháp này.

4.2.3. Chậm phát triển tâm thần vận động

Các bệnh nhân PWS hầu hết có chậm phát triển tâm thần vận động, các mốc phát triển vận động chỉ bằng một nửa so với trẻ bình thường. Trung bình, bệnh nhân PWS biết đi từ 20 - 24 tháng, biết nói lúc 24 tháng [24]. Trong nghiên cứu này tuổi biết đi trung bình là 23,31 ± 13,27 tháng, tương tự với các nghiên cứu khác.

Chỉ số IQ trung bình của các bệnh nhân PWS từ 60 - 70, 40% số bệnh nhân ở mức độ ranh giới giữa bình thường và chậm phát triển tâm thần vận động, 20% có chậm phát triển tâm thần vận động mức độ trung bình [15]. Tuy nhiên ở những trẻ có chỉ số IQ bình thường bệnh nhân PWS vẫn có biểu hiện học tập kém tập trung, khó khăn trong giao tiếp, suy giảm trí nhớ ngắn hạn và dài hạn [89].

Đánh giá phát triển tâm thần vận động của các bệnh nhân theo tuổi, nhóm dưới 6 tuổi đánh giá bằng chỉ số DQ, 76,5% bệnh nhân có chậm PTTTVĐ trong đó 58,9% có chậm mức độ trung bình và nặng. Trong nhóm bệnh nhân trên 6 tuổi đánh giá bằng chỉ số IQ, không có bệnh nhân chậm PTTTVĐ mức độ nặng, tỷ lệ chậm PTTTVĐ mức độ trung bình và nhẹ là 83,3%. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ bệnh nhân có chậm phát triển tâm thần vận động là 78,3% tương đương với tỷ lệ bệnh nhân chậm PTTTVĐ trong nghiên cứu của Wei Lu tại Trung Quốc 77,4%, so sánh với nghiên cứu của Kim tại Hàn Quốc, tỷ lệ bệnh nhân có chậm PTTTVĐ của nghiên cứu này thấp hơn (78,3% so với 93,3%) [82], [81].

So sánh chỉ số IQ trung bình của bệnh nhân nam và bệnh nhân nữ, trong nghiên cứu này thấy không có sự khác biệt. Khi so sánh chỉ số IQ trung bình trong nghiên cứu này với 1 nghiên cứu khác của Nhật Bản, kết quả như sau:

Bảng 4.3. So sánh chỉ số IQ trung bình với nghiên cứu khác

Tác giả (n), năm	**IQ trung bình**	**IQ trung bình bệnh nhân nam**	**IQ trung bình bệnh nhân nữ**
ATLan (Việt Nam), (n = 12), 2018	53 ± 10,8	51,4 ± 10,3	53,9 ± 11,4
M. Gito (Nhật Bản), (n = 82), 2015 [106]	49,3 ± 9,6	49,9 ± 9,3	48,2 ± 9,8

Như vậy so với điểm quy chuẩn của quần thể người bình thường với chỉ số IQ 100 thì những bệnh nhân PWS có suy giảm trí tuệ đáng kể. Can thiệp điều trị tình trạng chậm phát triển tâm thần vận động cho bệnh nhân PWS bao gồm phục hồi chức năng vận động và ngôn ngữ, điều trị GH có bằng chứng cải thiện về phát triển vận động tinh và vận động thô, không cải thiện về ngôn ngữ và thay đổi hành vi [82].

4.2.4. Thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài

Là một triệu chứng nặng của bệnh, xuất hiện ngay sau đẻ cả ở bệnh nhân nam và bệnh nhân nữ, biểu hiện thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài ở nữ là thiểu sản âm vật, môi lớn, môi bé, ở nam có ẩn tinh hoàn 1 hoặc 2 bên, bìu nhạt màu. Giai đoạn trẻ lớn thường biểu hiện dậy thì muộn hoặc một số rất ít các trường hợp dậy thì sớm. Các bệnh nhân PWS thường vô sinh, theo y văn có hai trường hợp bệnh nhân nữ mắc PWS đã sinh con, một bệnh nhân sinh con bình thường, một bệnh nhân sinh con mắc hội chứng Angelman [126]. Thiểu năng sinh dục ở bệnh nhân PWS có nguồn gốc trung ương liên quan chức năng của tuyến yên và vùng dưới đồi [127], [128].

Theo tiêu chuẩn của tổ chức y tế thế giới WHO, chẩn đoán dậy thì sớm khi có 1 trong các đặc điểm sinh dục phụ phát triển ở trẻ gái trước 8 tuổi, trẻ trai trước 10 tuổi. Chẩn đoán dậy thì muộn ở trẻ gái trên 13 tuổi chưa có tuyến vú phát triển hoặc trên 15 tuổi chưa có kinh nguyệt, trẻ trai trên 14 tuổi chưa có tinh hoàn phát triển [129]. Trong nghiên cứu tại thời điểm hiện tại có 3 bệnh nhân nữ trên 13 tuổi và 3 bệnh nhân nam trên 14 tuổi, tất cả các bệnh nhân này đều chưa có biểu hiện dậy thì, 3 bệnh nhân nữ có tuyến vú phát triển nhưng chưa có kinh nguyệt. Trong các bệnh nhân nam dưới 10 tuổi có 1 bệnh nhân có biểu hiện dậy thì sớm.

Để nghiên cứu chức năng hệ thống sinh dục của bệnh nhân PWS cần nghiên cứu trên quần thể bệnh nhân trưởng thành, trong nghiên cứu này bệnh nhân hầu hết ở nhóm dưới 12 tuổi nên hạn chế trong việc nhận định triệu chứng thiểu năng sinh dục.

Trong nhóm 35 bệnh nhân nữ, 29 bệnh nhân có thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài, chiếm 82,9%.

Trong nhóm 66 bệnh nhân nam, tỷ lệ ẩn tinh hoàn là 84% trong đó 77,3% là ẩn tinh hoàn cả hai bên, kết quả này tương tự kết quả nghiên cứu trên 65 bệnh nhân nam của Diene [114], trong nghiên cứu của Crino tỷ lệ này là 86% [25].

4.2.5. Các đặc điểm lâm sàng khác

4.2.5.1. Đặc điểm bộ mặt bất thường

Bộ mặt điển hình ở các bệnh nhân PWS là mặt dài, hẹp, mắt hình quả hạnh, môi trên mỏng, môi dưới trễ. Trong nghiên cứu 98 /101 (97%) bệnh nhân có mang đặc điểm bộ mặt điển hình của PWS. Nghiên cứu của Kim tại Hàn Quốc, 100% bệnh nhân có đặc điểm mắt hình quả hạnh [82]. Nghiên cứu của Wei Lu chỉ có 54,8% bệnh nhân có bộ mặt bất thường đặc trưng PWS [81].

4.2.5.2. Giảm sắc tố da, tóc nhạt màu

Tính trạng giảm sắc tố da và tóc nhạt màu do gen *OCA2* quy định, gen này không hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền, chức năng tổng hợp protein P tại các tế bào sản sinh melanin, do vậy những trường hợp mất đoạn NST 15q11-q13 bao gồm cả gen này, sẽ gây tình trạng thiếu hụt melanin tại da, tóc, mắt. Tuy nhiên những trường hợp bệnh nhân PWS nhận 2 NST15 vùng q11-q13 từ mẹ, vẫn có bệnh nhân mang đặc điểm này nhưng với tỷ lệ thấp hơn [1], như vậy để giải thích cơ chế giảm sắc tố da và tóc nhạt màu, ngoài việc phụ thuộc vào chức năng của gen *OCA2* có thể còn có đóng góp chức năng của các gen khác. Trong nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 có 96,5% bệnh nhân giảm sắc tố da và tóc, trong đó số bệnh nhân do mUPD, ID có triệu chứng này là 40%, tỷ lệ này tương đương trong nghiên cứu của Wei Lu [81], trong nghiên cứu của Kim tỷ lệ này là 100% ở cả hai nhóm nguyên nhân di truyền [82].

4.5.2.3. Bàn tay, bàn chân nhỏ

Dấu hiệu bàn tay, bàn chân nhỏ có ở hầu hết các bệnh nhân trong nghiên cứu 89/101 (88,1%) bệnh nhân. So với nghiên cứu của tác giả Kim tại Hàn Quốc thông báo thấy 26,7% các bệnh nhân có dấu hiệu này [82], trong nghiên cứu của Wei Lu tại Trung Quốc nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 có tỷ lệ bàn tay, bàn chân nhỏ là 73%, tỷ lệ này trong nhóm bệnh nhân do mUPD, ID là 20% [81].

4.2.5.4. Cong vẹo cột sống

Cong vẹo cột sống là triệu chứng không thuộc tiêu chuẩn Holm, nhưng có ảnh hưởng lớn đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân. Tỷ lệ bệnh nhân mắc cong vẹo cột sống trong các nghiên cứu rất thay đổi, từ 15% đến 86% [130], tuy nhiên đều thống nhất rằng tỷ lệ mắc cong vẹo cột sống tăng theo tuổi, dưới 30% ở trẻ dưới 10 tuổi, tăng lên 80% ở trẻ trên 10 tuổi, liên quan đến tiền sử giảm trương lực cơ và tình trạng thừa cân hiện tại, điều trị GH không làm cải thiện triệu chứng này [130], [90]. Có hai loại cong vẹo cột sống là cong vẹo cột sống hình chữ C (long C-curve type scoliosis - LCS) thường do các bệnh lý liên quan đến thần kinh cơ và loại cong vẹo cột sống vô căn (idiopathic scoliosis - IS) thường liên quan đến tư thế, hành vi trong sinh hoạt hàng ngày [90].

Trong nghiên cứu này tỷ lệ cong vẹo cột sống trong nhóm trẻ từ 2 - 6 tuổi là 17,4%, trong nhóm trẻ từ 6 - 12 tuổi là 25%, so với nghiên cứu của Wijngaarden các tỷ lệ này tương ứng là 29% và 80%, như vậy có sự khác biệt tương đối nhiều [112]. Theo tác giả này, tỷ lệ cong vẹo cột sống của nhóm bệnh nhân từ 0 - 3 tuổi là 30% trong khi nghiên cứu này không phát hiện trường hợp nào trong nhóm trẻ nhỏ. Tỷ lệ bệnh nhân cong vẹo cột sống trong nghiên cứu này cũng thấp hơn so với nghiên cứu của Nagai, trên 72 bệnh nhân tuổi từ 1 đến 49 có tỷ lệ cong vẹo cột sống là 45,8% [90]. Nguyên nhân có thể do các bệnh nhân có dấu hiệu nhẹ bị bỏ sót chỉ định chụp phim XQ để chẩn đoán triệu chứng này. Do vậy trong thực hành lâm sàng cần khuyến cáo khảo sát tình trạng cong vẹo cột sống để can thiệp kịp thời. So với tỷ lệ bệnh nhân cong vẹo cột sống trong quần thể người bình thường 2,7% thì tỷ lệ bệnh trong nhóm bệnh nhân PWS là rất đáng kể [131].

4.2.6. Tỷ lệ tử vong

Tỷ lệ tử vong trong PWS là 1 - 4% [132]. Nguyên nhân tử vong liên quan đến độ tuổi của bệnh nhân, giới tính, tình trạng điều trị của bệnh nhân. Các nguyên nhân phổ biến nhất là: bệnh lý đường hô hấp như nhiễm khuẩn đường hô hấp kéo dài, lặp lại nhiều lần, nghẽn mạch phổi, huyết khối phổi; suy tim; các biến chứng liên quan đến tình trạng béo phì; suy thận. Nguyên nhân gây tử vong đột ngột: cơn suy thượng thận cấp, vỡ dạ dày do ăn quá nhiều, hạ đường huyết, ngừng thở đột ngột không rõ nguyên nhân [133].

Butler nghiên cứu trên một số lượng lớn bệnh nhân PWS tử vong trong 42 năm từ 1973 đến 2015 bao gồm 486 bệnh nhân, tỷ lệ bệnh nhân tử vong ở giai đoạn trưởng thành chiếm đa số 70%, bệnh nhân dưới 18 tuổi chiếm 20%. Tuổi tử vong trung bình của nam thấp hơn nữ: 28 ± 16 tuổi so với 32 ± 15 tuổi. Trong nhóm bệnh nhân trẻ tuổi, tỷ lệ tử vong của bệnh nhân nam cao hơn số bệnh nhân nữ [120].

Nghiên cứu này thống kê hồi cứu và tiến cứu bệnh nhân trong 9 năm, số bệnh nhân tử vong là 10/101 chiếm tỷ lệ 9,9%, có 4 bệnh nhân tử vong ngay trong năm đầu do viêm đường hô hấp, 3 bệnh nhân tử vong có tình trạng béo phì. Các nguyên nhân gây tử vong tương tự các nghiên cứu khác, là các bệnh lý đường hô hấp do nhiễm khuẩn kéo dài và các biến chứng của tình trạng béo phì.

Nghiên cứu tỷ lệ tử vong góp phần dự đoán tuổi thọ của bệnh nhân PWS, năm 2012 một nghiên cứu tại Australia trên 163 bệnh nhân PWS từ 3 tuần đến 60 tuổi, 15 bệnh nhân đã tử vong tương ứng với tỷ lệ sống sót trên 35 tuổi là 87% [134]. Năm 2008, một nghiên cứu khác tại Italia trên 64 bệnh nhân PWS cho thấy tỷ lệ bệnh nhân PWS sống trên 40 tuổi là 80% [135].

4.2.7. Ý nghĩa của việc mô tả đặc điểm lâm sàng trong chẩn đoán hội chứng Prader- Willi

Việc mô tả các đặc điểm lâm sàng có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán PWS, đặc biệt xác định chẩn đoán sớm ngay sau sinh, giúp các nhà lâm sàng đưa ra được kế hoạch quản lý điều trị bệnh nhân, hạn chế triệu chứng nặng, giảm biến chứng và nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân PWS.

Với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, mô tả đặc điểm lâm sàng trên 101 bệnh nhân PWS tại Việt Nam, hướng tới chẩn đoán PWS những bệnh nhân mang các đặc điểm lâm sàng theo từng giai đoạn như sau:

- Giai đoạn trẻ < 2 tuổi:

+ Giảm trương lực cơ, biểu hiện tiền sử giảm cử động thai, tăng tỷ lệ đẻ mổ, cân nặng lúc sinh thấp. Trẻ phải hỗ trợ cho ăn ngay sau đẻ do không tự bú được. Tỷ lệ cao trẻ phải vào viện do viêm đường hô hấp kéo dài, tái phát nhiều lần.

+ Rối loạn giấc ngủ, cơn ngừng thở khi ngủ.

+ Bộ mặt bất thường với các nét đặc trưng của PWS như môi trên mỏng, môi dưới trễ, mắt hình quả hạnh, có thể có giảm sắc tố da, tóc nhạt màu.

+ Thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài, thể hiện trẻ trai có ẩn tinh hoàn một bên hoặc hai bên, trẻ gái có thiểu sản âm vật, môi lớn, môi bé.

- Giai đoạn trẻ từ 2 đến 6 tuổi:

Ngoài các triệu chứng như bộ mặt bất thường đặc trưng cho PWS, thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài, tiền sử có giảm trương lực cơ giai đoạn sơ sinh, các triệu chứng cần chú ý ở giai đoạn này là:

+ Chậm phát triển tâm thần vận động mức độ nhẹ hoặc trung bình.

+ Bắt đầu có dấu hiệu ham muốn ăn uống, thừa cân béo phì.

+ Rối loạn hành vi với các đặc điểm tính cách ngang bướng, khó bảo.

+ Bàn tay, bàn chân nhỏ rõ rệt so với trẻ cùng tuổi.

+ Tỷ lệ trẻ có rối loạn giấc ngủ giảm.

- Giai đoạn trẻ > 6 tuổi:

Ngoài các triệu chứng có ở giai đoạn trẻ từ 2 - 6 tuổi, các lưu ý ở giai đoạn này là:

+ Chậm PTTTVĐ thể hiện rõ, biểu hiện kém tập trung, khó khăn trong giao tiếp, giảm trí nhớ ngắn hạn và dài hạn, tính cách ngang bướng, khó bảo.

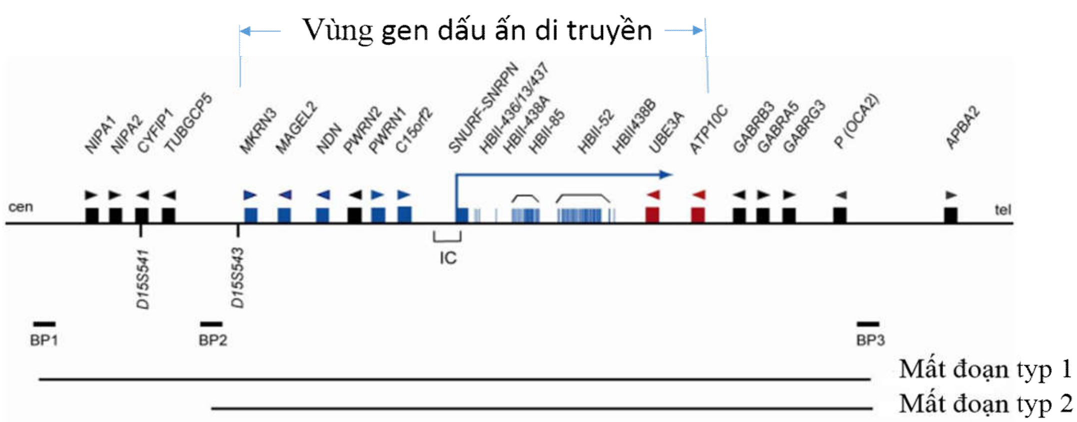
+ Béo phì trung tâm, tầm vóc thấp.

+ Đa số các trẻ có dậy thì muộn.

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

4.3.1. Mất đoạn nhiễm sắc thể 15q11-q13

Theo y văn tỷ lệ bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15 nguồn gốc bố vị trí q11-q13 chiếm 70% - 75%, tuy nhiên nhiều nghiên cứu hiện nay thông báo tỷ lệ PWS do mất đoạn 15q11-q13 khác nhau tùy vào quần thể nghiên cứu thuộc châu lục nào, chúng tôi sẽ bàn luận yếu tố này ở phần sau. Theo nghiên cứu của Merlin trên số lượng lớn 510 bệnh nhân PWS nhằm phân loại về các biến đổi di truyền của bệnh nhân PWS, tỷ lệ mất đoạn NST 15q11-q13 là 60% [83]. 101 bệnh nhân PWS trong nghiên cứu phát hiện 86 bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13, tỷ lệ 85,1%. Trong 86 bệnh nhân này, 85 bệnh nhân được xác định mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH, 1 bệnh nhân có mất đoạn NST 15 kích thước rất nhỏ, dạng không điển hình phát hiện bằng kỹ thuật MS-MLPA.



Hình 4.1. Phân loại mất đoạn 15q11-q13 [136]

Mất đoạn NST 15q11-q13 chia hai typ: typ 1 và typ 2, kích thước đoạn gen mất trong typ 1 là 6Mb, từ điểm đứt gãy PB1 đến PB3, kích thước đoạn gen mất trong typ 2 là 5.5Mb, từ điểm đứt gãy BP2 đến BP3. Các điểm đứt gãy BP (breakpoints) là những điểm có mật độ lặp lại các bản sao thấp (low copy repeat - LCR). Mất đoạn typ 1 và typ 2 thường là các đột biến mới *de novo*. Trong vùng BP1 đến BP2 có 4 gen không hoạt động theo cơ chế dấu ấn di truyền gồm: *NIPA1, NIPA2, CYFIP1* và *GCP5*, vai trò của những gen này chưa được sáng tỏ, có thể liên quan đến phát triển bất thường về thần kinh và phát triển tâm thần vận động [137], [138]. Trong nghiên cứu của Burnside, những bệnh nhân không mắc PWS, có mất đoạn vùng BP1-BP2 có kiểu hình rất đa dạng, có những bệnh nhân có biểu hiện chậm phát triển tâm thần vận động, tự kỷ, tuy nhiên bố hoặc mẹ những bệnh nhân này cũng mang mất đoạn BP1-BP2 nhưng hoàn toàn bình thường [139]. Theo nghiên cứu của Bittel và Merlin, trên 12 bệnh nhân mất đoạn typ 1 và 14 bệnh nhân mất đoạn typ 2 thấy những bệnh nhân thuộc typ 1 thường có những biểu hiện bất thường hành vi nặng nề hơn, tự gây hại cho bản thân, nhận thức kém [137], [140], [141]. Trái ngược lại Dykens và Roof nghiên cứu trên 26 bệnh nhân typ 1 và 29 bệnh nhân typ 2 [142], hay Milner nghiên cứu trên 14 bệnh nhân typ 1 và 32 bệnh nhân typ 2 [143], hai nhóm tác giả này không nhận thấy sự khác biệt về kiểu hình giữa hai nhóm mất đoạn typ 1 và typ 2.

Một số nghiên cứu thông báo những trường hợp bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 dạng không điển hình, là những trường hợp hiếm gặp, kích thước đoạn mất có thể lớn hơn hoặc nhỏ hơn mất đoạn typ 1 hoặc typ 2 [84], [144].

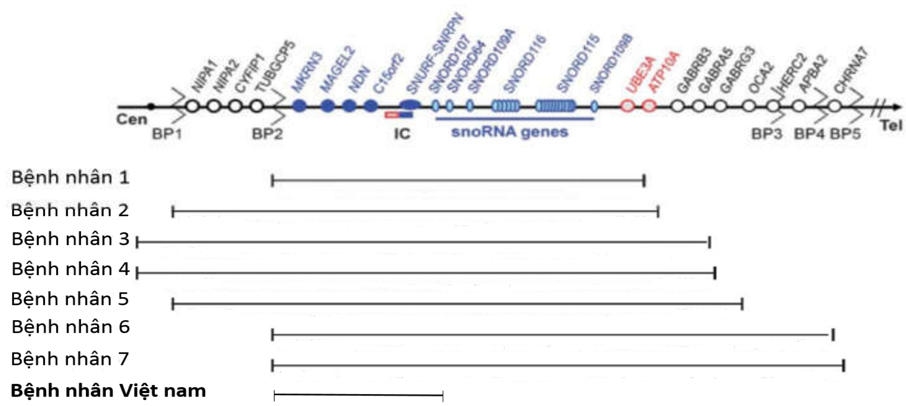
Kỹ thuật di truyền FISH lai giữa tế bào và phân tử là kỹ thuật kinh điển, chẩn đoán xác định được những trường hợp PWS do mất đoạn NST 15q11-q13. Áp dụng kỹ thuật phân tích NST với độ phân giải cao bằng phương pháp lai so sánh bộ gen (array comparative genome hybridization - aCGH) hoặc kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò đặc hiệu methyl hóa (MS-MLPA) để phân biệt mất đoạn typ 1 và typ 2, kỹ thuật aCGH không xác định được chính xác vị trí điểm đứt BP, tuy nhiên xác định được chính xác kích thước đoạn mất. Ngược lại kỹ thuật MS-MLPA có thể xác định được chính xác điểm đứt gẫy do các điểm này chính là các đầu dò đặc hiệu, tuy nhiên không xác định được chính xác kích thước đoạn mất mà chỉ tính được tổng số kích thước các đầu dò bị mất.

Trong nghiên cứu này, trên 7 bệnh nhân có mất đoạn NST 15q11.2 đã xác định bằng kỹ thuật FISH được tiến hành thực hiện kỹ thuật MS-MLPA, kết quả 4 bệnh nhân mất đoạn typ 1 và 3 bệnh nhân mất đoạn typ 2. Có 1 bệnh nhân mã số 133PWS với kỹ thuật FISH trả lời không mất đoạn 15q11.2, làm kỹ thuật MS-PCR thấy có bất thường methyl hóa, bệnh nhân này được làm kỹ thuật MS-MLPA, kết quả phát hiện mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình, đoạn mất rất nhỏ từ vị trí gen *MKRN3* đến exon 3 của gen *SNRPN*. Như vậy MS-MLPA có ưu việt hơn kỹ thuật FISH trong trường hợp chẩn đoán bệnh nhân PWS do mất đoạn kích thước nhỏ, lý do vì kit MS-MLPA bao gồm số lượng đầu dò nhiều hơn, phát hiện được cả những mất đoạn rất nhỏ.

Do số lượng bệnh nhân được thực hiện kỹ thuật MS-MLPA ít nên nghiên cứu này chưa đưa ra được kết luận xác đáng về mối liên hệ giữa kiểu gen và kiểu hình các bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1 và typ 2.

Đối với trường hợp bệnh nhân mã số 133PWS mất đoạn không điển hình: bệnh nhân nam 6 tuổi, tiền sử giảm trương lực cơ sau sinh, cần hỗ trợ cho ăn đổ thìa, mốc phát triển vận động bình thường, ẩn tinh hoàn hai bên, sau điều trị tinh hoàn đã xuống bìu. Bệnh nhân có chậm phát triển tâm thần mức độ nhẹ DQ = 70 điểm, bộ mặt điển hình PWS, bàn tay, bàn chân nhỏ, bệnh nhân không có biểu hiện thừa cân, không giảm sắc tố da, tóc không nhạt màu, không có rối loạn hành vi, ngôn ngữ tốt, dáng đi bình thường, không cong vẹo cột sống, không có biểu hiện tự hại bản thân. Bệnh nhân không điều trị GH, BMI hiện trong giới hạn bình thường.

So sánh với các bệnh nhân mất đoạn không điển hình trong nghiên cứu của Soo-Jeong Kim trên 88 bệnh nhân PWS đa chủng tộc tại Hoa Kỳ do mất đoạn 15q11-q13, kết quả 32 bệnh nhân thuộc typ 1 (36,4%), 49 bệnh nhân thuộc typ 2 (55,7%), có 7 bệnh nhân có mất đoạn không điển hình (8%) với kích thước đoạn mất có thể nhiều hơn hoặc ít hơn typ 1, typ 2; các đoạn mất này đều chứa gen SNRPN [84]. Kích thước các đoạn mất thể hiện ở hình 4.2.



Hình 4.2. So sánh với các bệnh nhân mất đoạn 15q11-q13 không điển hình [84]

Đặc điểm của 7 bệnh nhân này như sau:

Bệnh nhân 1: mất đoạn từ *MKRN3* đến intron 2 của gen *ATP10A*, kích thước đoạn mất 2,46Mb, có các đặc điểm không điển hình của PWS: não to (marcrocephaly), tay chân to, chiều cao bình thường, không giảm sắc tố da, ngưỡng đau thấp hơn trung bình, cân nặng lúc sinh cao.

Bệnh nhân 2: kích thước đoạn mất 3,6Mb từ BP1 đến *GABRB3*, tuy nhiên không đánh giá được lâm sàng bệnh nhân này do bệnh nhân tử vong.

Bệnh nhân 3: chuyển đoạn NST 45,XY,der(6)t(6;15)(p25;q12),-15. Mất đoạn từ *NIPA1* đến *OCA2*, kích thước đoạn mất 5,09Mb, phân tích aCGH không mất đoạn NST 6p. Các đặc điểm không điển hình của PWS: não bé, không giảm sắc tố da, không tự làm tổn thương da, tính cách ôn hòa không ngang bướng.

Bệnh nhân 4: chuyển đoạn NST 45,XX,der(14)t(14;15)(p11;q13),-15. MS-MLPA thấy mất đoạn tương tự bệnh nhân 3, kết quả aCGH: kích thước đoạn mất 5,58Mb, không mất đoạn NST 14q. Lâm sàng: não bé, cân nặng lúc sinh thấp, bộ mặt không điển hình PWS, khởi phát béo phì muộn.

Bệnh nhân 5: mất đoạn BP1 đến hết gen *OCA2*, bệnh nhân có cân nặng lúc sinh thấp hơn trung bình.

Bệnh nhân 6 và bệnh nhân 7: MS-MLPA chỉ ra mất đoạn từ *MKRN3* đến *CHRNA7*, mất đoạn lớn, kết quả aCGH bệnh nhân 6 mất 9,06Mb, bệnh nhân 7 mất 9,31Mb. Tuy nhiên đặc điểm lâm sàng hai bệnh nhân này khá đối ngược. Bệnh nhân 6: tiền sử giảm trương lực cơ giai đoạn sơ sinh rất nhẹ, không cần hỗ trợ ăn uống, tay chân to, không có chậm phát triển trí tuệ. Ngược lại bệnh nhân 7: cân nặng lúc sinh thấp, chậm phát triển trí tuệ mức độ nặng, chậm phát triển thể chất kéo dài, tăng trương lực cơ, não bé, bộ mặt không điển hình.

Bệnh nhân trong nghiên cứu này: kết quả MS-MLPA mất đoạn từ gen *MKRN3* đến exon 3 của gen *SNRPN*, các đặc điểm lâm sàng không điển hình PWS: không thừa cân, không rối loạn hành vi, da tóc không nhạt màu, không có biểu hiện tự hại bản thân.

Vùng 15q11-q13 là vùng dễ bị tổn thương như nhân đoạn, mất đoạn, chuyển đoạn do có chứa những điểm dễ đứt gãy BP (là các điểm có lượng bản sao lặp lại thấp - low copy repeats LCRs) [145]. Nghiên cứu mối liên hệ giữa kiểu gen và kiểu hình các bệnh nhân mang mất đoạn không điển hình có thể xác định vai trò của các gen trong PWS. Bệnh nhân 1, 3, 4 và bệnh nhân trong nghiên cứu đều không mất gen *OCA2*, các bệnh nhân này đều không giảm sắc tố da, tóc, phù hợp với những nghiên cứu trước đó về vai trò gây giảm sắc tố của gen *OCA2* [23].

Bệnh nhân số 1 và bệnh nhân của chúng tôi có đoạn mất kích thước nhỏ, đoạn mất nằm ngoài vùng *GABA- OCA2*, cả hai bệnh nhân đều có những biểu hiện nhẹ về tình trạng tăng cân, rối loạn hành vi, tình trạng tự hại bản thân, không tăng ngưỡng đau. Điều này phù hợp với những nghiên cứu trước đó về vai trò của gen *GABA* trong việc kiểm soát đau, kiểm soát hành vi như ngang bướng, dễ tức giận của các bệnh nhân PWS [146]. Bệnh nhân số 6 và 7 là những bệnh nhân mang mất đoạn lớn, từ BP2 đến tận cùng vùng telomere, bao gồm cả các gen *APBA2* và *CHRNA7*, trong đó vai trò của gen *CHRNA7* trong mã hóa tiểu đơn vị alpha 7 của thụ thể acetylcholin trên tế bào thần kinh đã được chứng minh [147]. Gần đây một số nghiên cứu chỉ ra mối liên quan giữa chức năng của gen *CHRNA7* với các đặc điểm khuôn mặt, bất thường trong phát triển ngôn ngữ và các bệnh lý thần kinh khác như tâm thần phân liệt, tự kỷ, động kinh hay chậm phát triển tâm thần vận động [148], [149]. Như vậy vai trò trong nghiên cứu phân loại ngày càng chi tiết hơn về các biến đổi di truyền có vai trò quan trọng trong việc tiên lượng, quản lý và điều trị cho bệnh nhân PWS, đồng thời làm sáng tỏ hơn vai trò của các gen vùng PWCR trong việc biểu hiện các đặc điểm lâm sàng.

4.3.2. Chuyển đoạn giữa NST 15 và 1 NST khác gây mất đoạn 15q11-q13

Nghiên cứu về đặc điểm biến đổi di truyền của bệnh nhân PWS nhận thấy có 3%-5% các trường hợp bệnh nhân PWS bị mất đoạn NST vùng 15q11-q13 do hậu quả của chuyển đoạn giữa NST 15 và 1 NST khác [150]. Trong các trường hợp này, cần chỉ định phân tích NST bố mẹ bệnh nhân để tìm nguồn gốc bất thường, là cơ sở cho tư vấn di truyền và xác định nguy cơ sinh con mắc PWS cho những lần sinh sau [151]. Bên cạnh đó cần khảo sát các hội chứng liên quan đến NST chuyển đoạn với NST 15 bằng các kỹ thuật di truyền như FISH, aCGH, từ đó xác định kích thước đoạn mất vùng 15q11-q13, góp phần tiên lượng bệnh cho bệnh nhân.

Trong nghiên cứu 86 bệnh nhân thuộc nhóm mất đoạn 15q11-q113, có 4 trường hợp do chuyển đoạn NST 15 như sau:

Bệnh nhân mã số 46PWS: 45,XY,der(10)t(10;15)(q26;q12),-15

Bệnh nhân mã số 126PWS: 45,XY,der(22)t(15;22)(q12;p13),1qh+,-15

Bệnh nhân mã số 117PWS: 46,XX,der(20)t(15;20)(q12;q12)pat

Bệnh nhân mã số 146PWS: 45,X,der(X)t(X;15)(q28;q12),-15

Tất cả các bệnh nhân này đều được làm xét nghiệm FISH, kết quả mất đoạn NST 15q11.2 và vùng tâm. Thực hiện kỹ thuật MS-MLPA cho bệnh nhân mã số 126PWS, 117PWS và 146PWS kết quả các bệnh nhân thuộc nhóm mất đoạn typ 1. Trong nghiên cứu chưa triển khai kỹ thuật aCGH, do vậy không khảo sát được kích thước đoạn mất trên NST 15q11-q13 và các NST khác. Các bệnh nhân đều mang các đặc điểm điển hình của PWS, tuy nhiên bệnh nhân mã số 146PWS có thêm các triệu chứng của hội chứng Piere Robins: thiểu sản xương hàm dưới, cằm tụt ra sau.

Bệnh nhân mã số 117PWS: 46,XX,der(20)t(15;20)(q12;q12)pat, ngoài mất đoạn NST15pter→15q12 còn mang trisomy một phần nhánh ngắn NST 20: (20pter→20q12). NST der(20)t(15;20)(q12;q12) di truyền từ bố. Gia đình đã được tư vấn di truyền về các nguy cơ sinh con mắc PWS và bất thường NST 20 cho những lần sinh sau.

Hội chứng trisomy một phần nhánh ngắn NST 20 rất hiếm gặp, Valter báo cáo một trường hợp bệnh nhân mang NST der(20)t(14;20)(q11.2;q13.1) nguồn gốc từ mẹ, bệnh nhân có mất đoạn NST 14pter-14q11.2 và trisomy một phần nhánh ngắn NST 20 (20pter→20q12) [152]. Trẻ là con thứ hai của cặp vợ chồng bố 25 tuổi, mẹ 23 tuổi, tiền sử sảy thai lần 1. Trẻ đẻ già tháng, mổ đẻ, cân nặng lúc sinh 2450g, chiều dài 44,5cm (<-2SD), đa dị tật bao gồm: giảm trương lực cơ, bộ mặt bất thường, cổ ngắn, dị tật bàn tay, bàn chân, thoát vị rốn. Bệnh nhân chậm phát triển tâm thần vận động, 6 tuổi chưa đứng được, không nói được, chiều cao 92,5cm (<-3SD).

Trong nghiên cứu này, phân tích NST đồ với kỹ thuật băng G cho tất cả 101 bệnh nhân, phát hiện 8 trường hợp có đa hình NST bao gồm: 1qh+ (2 trường hợp), 9qh+, 16qh+, inv(9)(p12q13), 14pstk+, 15pstk+, 22pstk+.

Các đa hình NST chủ yếu đề cập đến vùng dị nhiễm sắc (heterochromatin), có thể tăng hoặc giảm vùng dị nhiễm sắc ở nhánh dài hoặc nhánh ngắn các NST 1, 9, 16, Y, biểu hiện: qh+, ph+, qh-, ph-; đảo đoạn quanh tâm NST số 9 inv(9)(p12q13). Các trường hợp còn lại là kéo dài hoặc mất vùng vệ tinh (satellites - ps) hoặc vùng cuống của vệ tinh (stalks satellites - pstk) trên các NST tâm đầu 13, 14, 15, 21, 22, biểu hiện ps+, ps-, pstk+, pstk- [153]. Đối với vùng dị nhiễm sắc, vệ tinh và cuống của vệ tinh được hình thành bằng các chuỗi DNA không mã hóa protein, do vậy các dạng đa hình này được xem là bình thường, không ảnh hưởng tới biểu hiện kiểu hình [154]. Ngày càng nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng đa hình NST có thể gây ra một số ảnh hưởng lâm sàng nhất định như vô sinh, sảy thai tự nhiên [153], [155], [156]. Tuy nhiên chưa thấy nghiên cứu nào đề cập đến ảnh hưởng của các đa hình NST đến kiểu hình của bệnh nhân PWS.

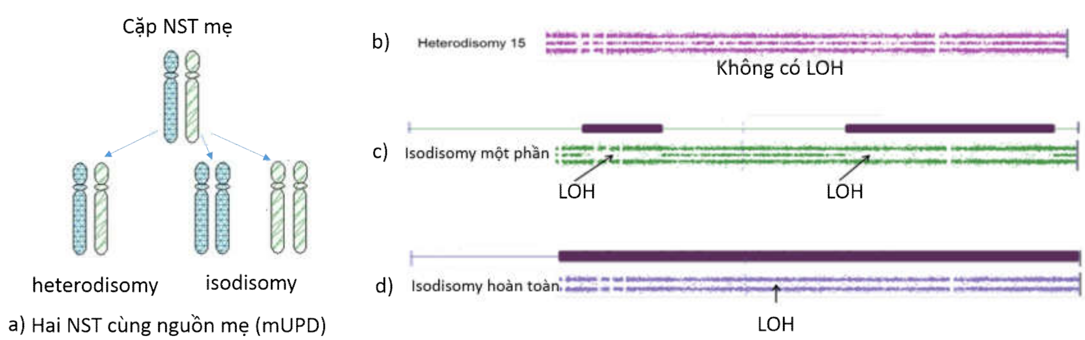
Tuy nhiên trong bệnh cảnh lâm sàng của hội chứng Prader-Willi khó đánh giá các biểu hiện kiểu hình của các đa hình NST trên bệnh nhân. Chúng tôi ghi nhận các trường hợp này, theo dõi thêm trong quá trình quản lý bệnh nhân. Các trường hợp này cũng được tư vấn cho gia đình làm xét nghiệm phân tích NST đồ của bố, mẹ bệnh nhân để tìm nguồn gốc các đa hình NTS.

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

Việc chẩn đoán xác định các bệnh nhân PWS do mUPD có ý nghĩa tiên lượng về biểu hiện lâm sàng và xác định nguy cơ sinh con tái mắc ở những lần sinh sau.

Cho đến nay, bằng nhiều kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại, người ta đã xác định chi tiết hơn tình trạng mUPD bao gồm: maternal heterodisomy, isodisomy một phần (segmental isodisomy) và isodisomy hoàn toàn (total isodisomy) bằng cách xác định sự biểu hiện của tình trạng mất dị hợp tử (loss of heterozygosity- LOH) cả về vị trí và kích thước.

Hầu hết các tế bào trong cơ thể lưỡng bội đều mang mỗi gen gồm hai bản sao, một có nguồn gốc từ bố một có nguồn gốc từ mẹ, tuy nhiên có một số vị trí chỉ mang một bản sao của bố hoặc mẹ, các khu vực này gọi là đa hình đơn nucleotide (SNPs), ở trạng thái dị hợp tử [157]. Do vậy khảo sát tình trạng có hay không có 1 phần hay hoàn toàn tình trạng dị hợp tử SNPs này (LOH) có thể xác định được NST đó hay đoạn NST đó có nguồn gốc từ bố hay mẹ. Trên các bệnh nhân không có mất đoạn NST 15q11-q13, áp dụng kỹ thuật aCGH độ phân giải cao để khảo sát các SNPs. Isodisomy một phần khi xuất hiện 1 hoặc một vài vị trí LOH trên nhánh dài NST15, isodisomy hoàn toàn khi mất toàn bộ LOH trên NST 15, kích thước khoảng 80 Mb [158]. Nếu không có LOH, bệnh nhân sẽ được chỉ định khảo sát đa hình DNA, nếu bệnh nhân nhận 2 NST từ mẹ, phân nhóm di truyền của bệnh nhân là heterodisomy 15, nếu bệnh nhân nhận hai 2 NST từ bố mẹ thì nguyên nhân gây PWS do khiếm khuyết vùng dấu ấn di truyền.



Hình 4.3. Áp dụng kỹ thuật microarray khảo sát LOH xác định dưới nhóm mUPD [159]

a) cơ chế mUPD, b) không có LOH thuộc nhóm heterodisomy, c) isodisomy một phần: LOH xuất hiện từng phần trên nhánh dài NST 15, d) isodisomy hoàn toàn: LOH xuất hiện hoàn toàn trên NST 15.

Ý nghĩa của việc phân tích dưới nhóm mUPD còn chưa thực sự sáng tỏ, còn ít công trình nghiên cứu công bố về kết quả này, kết quả nghiên cứu của Merlin trên 510 bệnh nhân PWS, 185 bệnh nhân thuộc nhóm mUPD, tiến hành định dưới nhóm mUPD cho 104 bệnh nhân thấy 12,5% bệnh nhân thuộc nhóm isodisomy hoàn toàn, 57,7% isodisomy một phần và 29,8% heterodisomy [159]. Nghiên cứu mối liên hệ giữa kiểu gen và kiểu hình có ý nghĩa trong điều trị, hơn nữa trong trường hợp isodisomy hoàn toàn hoặc một phần có nguy cơ sinh con mắc PWS nếu mẹ là người mang dị hợp tử gen lặn này, hoặc do tính thấm thấp của dị hợp tử gen trội của mẹ [160]. Tìm hiểu sâu sắc hơn về các biến đổi di truyền của PWS sẽ mở ra những hướng nghiên cứu sâu hơn về PWS trong tương lai.

Nguy cơ mắc PWS do mUPD có thể liên quan đến yếu tố tuổi của mẹ, theo nghiên cứu của Merlin, trung bình tuổi mẹ của 145 mẹ của bệnh nhân PWS do mUPD là 32,5 tuổi cao hơn có ý nghĩa so với tuổi mẹ trung bình của 200 mẹ bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 là 27,7 tuổi [160], theo nghiên cứu của Wei Lu, trung bình tuổi mẹ của hai nhóm tương ứng là 32,8 ± 5,1 tuổi và 27,1 ± 3,2 tuổi [81]. Trong nghiên cứu này trung bình tuổi mẹ của nhóm bệnh nhân PWS do mUPD, ID là 31,9 tuổi; cao hơn của nhóm bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 là 28,2 tuổi, tương tự như nhận xét của các nghiên cứu trên.

Tỷ lệ bệnh nhân mắc PWS do mUPD và ID trên một số nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt đáng kể, cụ thể như sau:

Bảng 4.4. So sánh tỷ lệ bệnh nhân do mUPD và ID giữa các nghiên cứu

Tác giả	**Quốc gia**	**Năm**	**n**	**Mất đoạn (%)**	**mUPD và ID (%)**
Gillessen- Kaesbach [65]	Đức	1995	167	116 (69,5%)	51 (30,5%)
Merlin và cs [159]	Hoa Kỳ	2018	510	303 (60%)	207 (40%)
Celine Bar và cs [86]	Pháp	2017	61	34 (56%)	27 (44%)
Tess Lionti và cs [161]	Úc	2015	160	88 (55%)	72 (45%)
Whittington [162]	UK	2007	36	15 (44%)	19 (56%)
De Lind van Wijngaarden [112]	Hà Lan	2008	96	39 (47%)	43 (53%)
Kim HJ và cs [163]	Hàn Quốc	2004	51	41 (80,4%)	10 (19,6%)
Kim YJvà cs [82]	Hàn Quốc	2014	30	28 (93,3%)	2 (6,7%)
Hsiang- Yu Lin [164]	Đài Loan	2007	67	56 (83,6%)	11 (16,4%)
Wei Lu và cs [81]	Trung Quốc	2011	31	26 (83,9%)	5 (16,1%)
ATLan và cs	Việt Nam	2018	101	86 (85,1%)	15 (14,9%)

Tỷ lệ bệnh nhân PWS do mUPD trong các nghiên cứu ở Châu Âu và Hoa Kỳ cao hơn rõ rệt so với các nghiên cứu ở châu Á. Tỷ lệ bệnh nhân do mUPD trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự các nghiên cứu ở Hàn Quốc, Đài Loan, Trung Quốc và Hàn Quốc. Về giải thích cơ chế hình thành mUPD là do giải cứu tình trạng tam nhiễm (trisomy resue), giải cứu tình trạng đơn nhiễm (monosomy rescue), lỗi xảy ra sau thụ tinh do tái tổ hợp tế bào sinh dưỡng hoặc chuyển gen, hay hiếm gặp hơn do mẹ mang chuyển đoạn hòa hợp tâm (robertsonian). Nguyên nhân có thể do các yếu tố môi trường, hoặc tăng tỷ lệ không phân ly NST trong phân bào giảm nhiễm ở các phụ nữ cao tuổi [64], [65], [162]. Trong nghiên cứu này, tuổi mẹ trung bình của nhóm bệnh nhân mUPD cũng cao hơn có ý nghĩa so với tuổi mẹ trung bình của nhóm bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q113, cũng tương tự nghiên cứu của Wei Lu và Celine, như vậy tình trạng tăng tỷ lệ mUPD liên quan chủ yếu với yếu tố tuổi mẹ, không có tác động của yếu tố chủng tộc. Tuy nhiên để minh chứng rõ ràng hơn, cần những nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn trên các quần thể chủng tộc khác nhau.

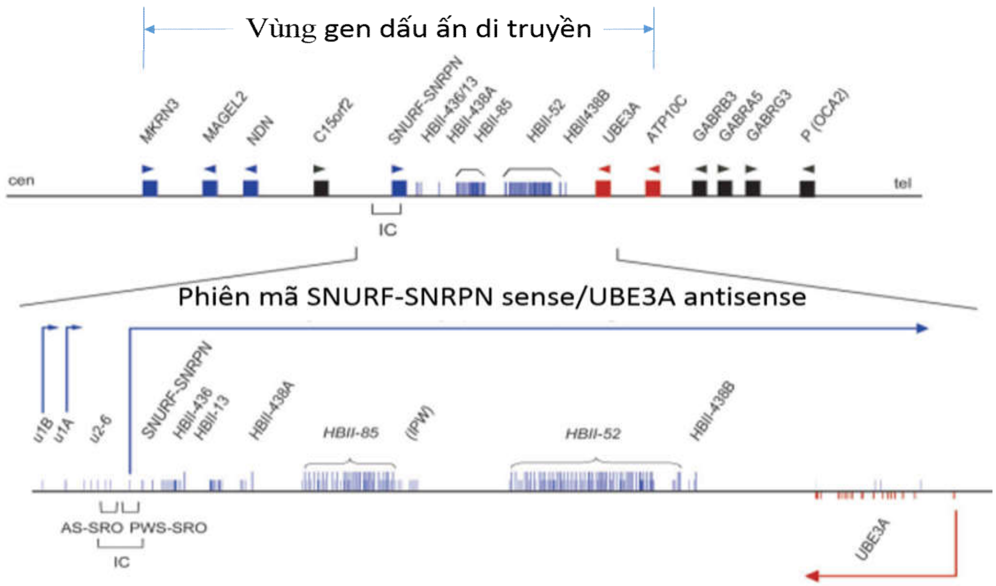
Việc hiểu biết sâu sắc về tỷ lệ các nhóm nguyên nhân, giúp các nhà lâm sàng có chiến lược tiếp cận chẩn đoán bằng các xét nghiệm di truyền phù hợp để tiết kiệm chi phí và thời gian.

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

Khiếm khuyết dấu ấn di truyền là nguyên nhân của 1%-3% các trường hợp mắc PWS, trong đó 15% - 20% là do đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC (imprinting center), 80% - 85% các trường hợp còn lại do các đột biến điểm hoặc ngoại đột biến (epimutation) [1]. Khiếm khuyết dấu ấn di truyền có thể xảy ra mặc dù không có sự thay đổi trình tự các DNA (ngoại đột biến tiên phát- primary epimutation) hoặc là kết quả của các đột biến trong các yếu tố điều hòa cấu hình cis (cis-regular elements) hoặc các yếu tố hoạt động cấu hình trans (trans acting factors) (ngoại đột biến thứ phát- secondary epimutations). Hậu quả của khiếm khuyết dấu ấn di truyền là lỗi trong xóa dấu ấn, hình thành dấu ấn hay duy trì dấu ấn. Việc phát hiện ra tình trạng mất đoạn nhỏ trong các bệnh nhân có khiếm khuyết dấu ấn di truyền đã dẫn đến định nghĩa về trung tâm dấu ấn di truyền (IC), IC điều hòa việc sắp đặt lại dấu ấn di truyền tại cấu hình cis và duy trì tình trạng dấu ấn di truyền trong cả vùng gen Prader Willi (PWCR) tại NST 15q11-q13 [165].

Đa số các trường hợp đột biến mất đoạn IC là các đột biến di truyền từ bố, một số ít còn lại là các đột biến mới (*de novo).* Các trường hợp bệnh nhân mang đột biến mất đoạn IC có nguồn gốc bố, nguy cơ sinh con mắc PWS trong gia đình đó là 50%, trường hợp là đột biến mới có tỷ lệ sinh con tiếp theo mắc PWS không tăng khi đột biến này xảy ra sau thụ tinh, nguy cơ sinh con PWS có thể cao lên tới 50% nếu người bố mang thể khảm dòng tế bào mầm [165].

Vùng IC của vùng 15q11-13 bao gồm hai vùng: PWS-SRO (the shortest of deletion overlap - PWS-SRO) và AS-SRO điều khiển quá trình phiên mã của *SNURF-SNRPN* sense hoặc *UEB3A* antisense. Kích thước PWS-SRO là 4,1 kb, kích thước của AS-SRO là 880bp [166].



Hình 4.4. Sơ đồ vùng gen 15q11-q13 trong cơ chế dấu ấn di truyền [165]

Đột biến mất đoạn IC chiếm một tỷ lệ rất nhỏ trong các bệnh nhân PWS, có thể xảy ra trong quá trình xóa dấu ấn di truyền trên các tế bào mầm nguyên thủy, hoặc trong quá trình hình thành dấu ấn di truyền của giao tử hoặc trong quá trình duy trì dấu ấn di truyền sau khi thụ tinh. Nếu đột biến xảy ra ở dòng tế bào mầm, tất cả các tế bào của bệnh nhân đều bị tác động, nếu xảy ra sau thụ tinh, dẫn đến tình trạng khảm tế bào sinh dưỡng [43].

Để khảo sát nguồn gốc từ bất thường của quá trình dấu ấn di truyền trên NST, Buiting và cs thực hiện phân tích microsatellite hoặc dùng phối hợp kỹ thuật methyl hóa/RFLP cho locus *SNURF-SNRPN* [43]. Trên 19 bệnh nhân PWS do ngoại đột biến tiên phát thấy rằng NST có nguồn gốc bố mang bất thường dấu ấn di truyền là nhận được từ mẹ của ông ta, và gợi ý rằng sự bất thường của dấu ấn di truyền trên bệnh nhân là kết quả của sự thất bại trong việc xóa dòng mầm dấu ấn nguồn bố của bà nội (thừa kế ngoại di truyền). Điều này làm tăng bằng chứng giả thuyết dấu vết ngoại di truyền là xóa không hoàn toàn từ thế hệ trước cho thế hệ sau.

Tình trạng khảm tế bào sinh dưỡng trong PWS vô cùng hiếm, một vài báo cáo đơn lẻ về tình trạng khảm của bệnh nhân PWS do mUPD [167], hay khảm dòng tế bào mất đoạn NST 15q11-q13 [168]. Trong 44 bệnh nhân PWS do khiếm khuyết dấu ấn di truyền ngẫu nhiên trong quần thể, có 2 bệnh nhân có xuất hiện băng methyl hóa nguồn gốc bố khi điện di sản phẩm PCR, gợi ý tình trạng khảm dòng tế bào [43].

Trong nghiên cứu này, việc áp dụng kỹ thuật MS-MLPA với phiên bản nâng cấp số lượng các đầu dò được đánh dấu, trong đó có đầu dò U1B và U1B* tại vùng IC, do vậy phát hiện được các trường hợp bệnh nhân PWS do đột biến mất đoạn IC [77]. Như đã bàn luận ở trên, người bố có con PWS do mang đột biến mất đoạn IC có nguy cơ sinh con mắc PWS là 50%. Như vậy áp dụng kỹ thuật MS-MLPA rất có ý nghĩa trong thực hành lâm sàng, có thể chỉ ra các trường hợp có nguy cơ cần thực hiện chẩn đoán trước sinh trong những lần sinh sau.

Trong nghiên cứu, áp dụng kỹ thuật MS-MLPA cho 7 bệnh nhân PWS do mUPD, ID, kết quả không phát hiện trường hợp nào có mất đoạn IC. Điều này không loại trừ được hết các trường hợp PWS do khiếm khuyết dấu ấn di truyền loại đột biến điểm, nhưng loại trừ được những trường hợp do đột biến mất đoạn IC có nguy cơ mắc PWS cho lần sinh sau.

4.3.5. Ý nghĩa của việc xác định các biến đổi di truyền của hội chứng Prader - Willi trong thực hành lâm sàng

Việc xác định các biến đổi di truyền của PWS có ý nghĩa rất quan trọng trong thực hành lâm sàng, giúp cho việc lựa chọn các kỹ thuật xét nghiệm di truyền chính xác, tiết kiệm, phù hợp với từng mục đích cụ thể để chẩn đoán xác định bệnh. Phân tích mối liên hệ giữa biến đổi di truyền và các đặc điểm lâm sàng giúp tiên lượng bệnh, xác định các trường hợp có nguy cơ sinh con mắc PWS ở những lần sinh sau yêu cầu phải tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh.

Với kết quả nghiên cứu về biến đổi di truyền trên 101 bệnh nhân PWS, chúng tôi khuyến cáo con đường tiếp cận chẩn đoán PWS tại bệnh viện Nhi Trung ương bằng các xét nghiệm di truyền như sau:

- Áp dụng kỹ thuật FISH để chẩn đoán PWS do mất đoạn NST 15q11.2, do tỷ lệ nhóm bệnh nhân này chiếm tỷ lệ cao trên 80%.

- Áp dụng kỹ thuật MS-MLPA đối với các bệnh nhân không thấy mất đoạn NST 15q11.2 bằng kỹ thuật FISH, xác định chẩn đoán bệnh nhân PWS do mUPD, ID, từ đó xác định các trường hợp mất đoạn IC là những trường hợp cần tư vấn di truyền.

- Trong trường hợp gia đình bệnh nhân có nguyện vọng sinh con tiếp, chỉ định xét nghiệm phân tích NST với kỹ thuật băng G, phát hiện những trường hợp có chuyển đoạn NST 15 với các NST khác, từ đó chỉ định phân tích NST bố mẹ bệnh nhân, xác định những trường hợp có nguy cơ sinh con mắc PWS để tư vấn di truyền.

- Đối với các bệnh nhân nghi ngờ mắc PWS với một số đặc điểm lâm sàng không rõ ràng, nên chỉ định xét nghiệm MS-MLPA để xác định các trường hợp mắc PWS do mất đoạn NST 15q11-q13 không điển hình, đoạn mất rất nhỏ không xác định được bằng kỹ thuật FISH.

Bảng 4.5. Giá trị các xét nghiệm di truyền trong chẩn đoán PWS tại bệnh viện Nhi Trung ương

Kỹ thuật	**Phân loại biến đổi di truyền PWS**	**Giá trị chẩn đoán xác định bệnh**	**Giá trị trong thực hành trên lâm sàng**
Phân tích NST băng G	Chuyển đoạn NST 15 với NST khác	Cần kết hợp các kỹ thuật khác	- Tư vấn di truyền trước sinh. - Thực hiện được ở các labo xét nghiệm di truyền tế bào.
FISH	Mất đoạn NST 15q11.2	PWS do mất đoạn NST 15q11.2 (75%-80%)	- Chẩn đoán xác định PWS do mất đoạn NST 15q11-q13; thời gian trả kết quả nhanh, giá thành xét nghiệm thấp. - Không chẩn đoán được các bệnh nhân PWS do mUPD, ID.
MS-MLPA	- Mất đoạn NST 15q11-q13: typ 1, typ 2, mất đoạn không điển hình. - Đột biến mất đoạn IC. - mUPD và đột biến điểm IC.	PWS do tất cả các nhóm nguyên nhân (>99%)	- Chẩn đoán xác định bệnh. - Tư vấn di truyền trước sinh. - Không phân biệt được nhóm nguyên nhân mUPD và ID do đột biến điểm; giá thành xét nghiệm cao.

4.4. Mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng và biến đổi di truyền

Nghiên cứu về mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng và các biến đổi di truyền trong PWS sẽ đề cập đến hai khía cạnh chính: mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng trên các bệnh nhân mất đoạn NST 15q11-q13 typ 1 và typ 2; mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng trong nhóm bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13 và nhóm bệnh nhân do mUPD, ID.

Như đã bàn luận tại phần 4.3.1., do hạn chế trong nghiên cứu chúng tôi chưa đưa ra được số lượng bệnh nhân đầy đủ trong phân loại dưới nhóm mất đoạn NST 15q11-q13, do vậy chưa khảo sát được mối liên hệ giữa đặc điểm lâm sàng của hai nhóm bệnh nhân này.

Về mối liên hệ giữa đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân do mất đoạn NST 15q11-q13 và nhóm bệnh nhân do mUPD, ID, khảo sát 7 triệu chứng nặng bao gồm: giảm trương lực cơ, hỗ trợ ăn uống, thừa cân béo phì, thiểu sản sinh dục, chậm phát triển tâm thần vận động, ham ăn uống, bộ mặt bất thường; 6 triệu chứng nhẹ bao gồm: giảm cử động thai, bất thường giấc ngủ, da tóc nhạt màu, tay chân nhỏ, lác mắt, cong vẹo cột sống. Kết quả sự khác biệt có ý nghĩa ở hai nhóm xuất hiện ở triệu chứng thừa cân, béo phì và giảm sắc tố da, tóc nhạt màu. Nghiên cứu của Gabriele trên 167 bệnh nhân, trong đó 116 bệnh nhân thuộc nhóm mất đoạn NST 15q11-q13 và 51 bệnh nhân thuộc nhóm không mất đoạn, nhận thấy có sự khác nhau về chỉ số trung bình cân nặng lúc sinh và giảm sắc tố da, tóc [65]. Trong nghiên cứu của Wei Lu kết luận có sự khác biệt về kích thước tay chân nhỏ; tình trạng thừa cân; khả năng phát âm giữa hai nhóm [81]. Tuy nhiên theo Classidy SB, một nhà nghiên cứu nhiều về PWS kết luận không có sự khác nhau về đặc điểm lâm sàng giữa hai nhóm này [64].

Trong nghiên cứu này có đánh giá phát triển tâm thần vận động thông qua hai chỉ số DQ, IQ, trong đó chỉ số IQ áp dụng cho bệnh nhân từ 6 tuổi trở lên, chỉ số DQ áp dụng cho các bệnh nhân dưới 6 tuổi. So sánh chỉ số IQ và DQ của hai nhóm bệnh nhân mất đoạn NST 15q11-q13 và nhóm mUPD, ID chúng tôi thấy sự khác biệt có ý nghĩa ở chỉ số IQ. Kết quả này tương tự nghiên cứu tại Nhật Bản trên 82 bệnh nhân PWS, các bệnh nhân thuộc nhóm mất đoạn NST 15q11-q13 thường có chậm phát triển tâm thần vận động nặng nề hơn nhóm mUPD, ID [106].

Việc nghiên cứu mối liên hệ giữa các đặc điểm lâm sàng và biến đổi di truyền có vai trò tiên lượng bệnh, từ đó đặt ra chiến lược điều trị và quản lý bệnh nhân. Tuy nhiên trên thực tế số nghiên cứu về khía cạnh này chưa nhiều và sự khác biệt giữa hai nhóm bệnh nhân không nhiều ý nghĩa, sẽ là một hướng mở trong những nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

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

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

- Trong tổng số 101 bệnh nhân có 66 nam, 35 nữ, tỷ lệ nam/nữ = 1,88.
- Tuổi chẩn đoán trung bình 30,18 ± 0,39 tháng, 45,5% trước 6 tháng.
- Tất cả các bệnh nhân đều có giảm trương lực cơ giai đoạn sơ sinh với tiền sử giảm cử động thai (100%).
- Hầu hết các bệnh nhân đều có bộ mặt bất thường (97%), thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài (94,1%).
- 61,4% phải nhập viện ngay sau sinh chủ yếu do viêm đường hô hấp.
- Tỷ lệ tử vong 9,9%.

Một số đặc điểm lâm sàng thay đổi theo từng giai đoạn cụ thể như sau:

- Nhóm bệnh nhân < 2 tuổi: 100% có giảm trương lực cơ, 89,4% có rối loạn giấc ngủ, không có bệnh nhân nào có triệu chứng thừa cân béo phì.
- Nhóm bệnh nhân từ 2 - 6 tuổi: tất cả bệnh nhân có rối loạn hành vi, tăng tỷ lệ bệnh nhân có tầm vóc thấp, tỷ thừa cân béo phì cao (52,2%), tỷ lệ bệnh nhân có giảm trương lực cơ và rối loạn giấc ngủ thấp. 17,4% có cong vẹo cột sống.
- Nhóm bệnh nhân từ 6 - 12 tuổi: tất cả các bệnh nhân đều có rối loạn hành vi, rất ít bệnh nhân có giảm trương lực cơ và rối loạn giấc ngủ, hầu hết bệnh nhân có tầm vóc thấp và thừa cân béo phì (83,3%). 25% có cong vẹo cột sống.

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

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

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

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

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

101 bệnh nhân được chẩn đoán xác định PWS bằng các kỹ thuật di truyền tế bào và phân tử: phân tích NST băng G, FISH, MS-PCR, MS-MLPA, phát hiện các biến đổi di truyền như sau:

- 86/101 (85,1%) thuộc nhóm mất đoạn NST 15q11-q13.

- 15/101 (14,9%) thuộc nhóm mUPD, ID.

KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

1. Kiến nghị

❖ **Lâm sàng:** hướng cho các bác sĩ lâm sàng chẩn đoán bệnh nhân mắc PWS khi bệnh nhân có các đặc điểm lâm sàng đặc trưng cho từng giai đoạn.

❖ **Chỉ định xét nghiệm di truyền chẩn đoán xác định PWS**:

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

Cách 2:

- Bước 1: chỉ định kỹ thuật FISH, xác định được hơn 80% các bệnh nhân PWS do mất đoạn NST 15q11.2.
- Bước 2: chỉ định kỹ thuật MS-MLPA xác định những trường hợp PWS do mUPD, ID, mất đoạn nhỏ không điển hình.

❖ **Tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh:** với những gia đình đã có con bị PWS có nguyện vọng sinh con lần tiếp theo, cần tư vấn di truyền và chỉ định chẩn đoán trước sinh những trường con bị PWS do:

- Mất đoạn NST 15q11-q13 do chuyển đoạn NST 15 với NST khác di truyền từ bố.
- Đột biến mất đoạn trung tâm dấu ấn di truyền IC.

2. Hướng nghiên cứu tiếp theo

- Phân loại các trường hợp mất đoạn typ 1, typ 2, mất đoạn không điển hình bằng kỹ thuật MS-MLPA.
- Triển khai kỹ thuật chẩn đoán xác định mUPD.
- Nghiên cứu mối liên hệ giữa biểu hiện lâm sàng và biến đổi di truyền: mất đoạn typ 1, typ 2, mất đoạn không điển hình; mUPD và ID.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

1. An Thùy Lan, Bùi Phương Thảo, Vũ Chí Dũng, Ngô Diễm Ngọc, Đinh Thị Hồng Nhung, Lê Thị Liễu, Phan Thị Hoan (2015). Đặc điểm lâm sàng và chẩn đoán mất đoạn nhiễm sắc thể 15q11-q13 ở các bệnh nhi mắc hội chứng Prader-Willi. *Tạp chí nghiên cứu y học*,96 (4),51-59.
2. An Thùy Lan, Bùi Phương Thảo, Vũ Chí Dũng, Lê Thị Liễu, Phan Thị Hoan (2015). Biến đổi di truyền ở bệnh nhân mắc hội chứng Prader-Willi tại Bệnh viện Nhi Trung ương. *Tạp chí nhi khoa*,8(6),63-66.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Angulo M.A, Butler M.G and Cataletto M.E (2015). Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest*.
2. Merlin G.B and Travis Thompson (2000). Prader-Willi Syndrome Clinical and Genetic Findings. *Endocrinologist*, 10(4 Suppl 1), 3-16.
3. Rocha C.F and Paiva C.L (2014). Prader-Willi-like phenotypes: a systematic review of their chromosomal abnormalities. *Genet Mol Res*, 13(1), 2290-2298.
4. Butler M.G (1990). Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am J Med Genet*, 35(3), 319-332.
5. Burd L., Vesely B., Martsolf J. et al (1990). Prevalence study of Prader-Willi syndrome in North Dakota. *Am J Med Genet*, 37(1), 97-99.
6. Akefeldt A., Gillberg C. and Larsson C. (1991). Prader-Willi syndrome in a Swedish rural county: epidemiological aspects. *Dev Med Child Neurol*, 33(8), 715-721.
7. Whittington J.E, Holland A.J, Webb T. et al (2001). Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people. *J Med Genet*, 38(11), 792-798.
8. Oranges C.M, Christ-Crain M. and Schaefer D.J (2017). "La Monstrua Desnuda": an artistic textbook representation of Prader-Willi syndrome in a painting of Juan Carreno de Miranda (1680). *J Endocrinol Invest*, 40(6), 691-692.
9. Langdon-Down (1887). Down J.L. Affections of Childhood and Youth, Churchill Publisher, London. *Churchill Publisher, london*, 172.

10. Ledbetter D.H, Riccardi V.M and Airhart S.D (1981). Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med*, 304(6), 325-329.
11. Nicholls R.D, Knoll J.H, Butler M.G et al (1989). Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature*, 342(6247), 281-285.
12. Holm V.A, Cassidy S.B, Butler M.G et al (1993). Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics*, 91(2), 398-402.
13. Butler M.G, Sturich J., Myers S.E et al (2009). Is gestation in Prader-Willi syndrome affected by the genetic subtype? *J Assist Reprod Genet*, 26(8), 461-466.
14. Kamaludin A.A, Smolarchuk C., Bischof J.M et al (2016). Muscle dysfunction caused by loss of Magel2 in a mouse model of Prader-Willi and Schaaf-Yang syndromes. *Hum Mol Genet*, 25(17), 3798-3809.
15. Whittington J., Holland A., Webb T. et al (2004). Academic underachievement by people with Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res*, 48(Pt 2), 188-200.
16. Dykens E.M, Cassidy S.B and King B.H (1999). Maladaptive behavior differences in Prader-Willi syndrome due to paternal deletion versus maternal uniparental disomy. *Am J Ment Retard*, 104(1), 67-77.
17. Dykens E.M, Lee E. and Roof E. (2011). Prader-Willi syndrome and autism spectrum disorders: an evolving story. *J Neurodev Disord*, 3(3), 225-237.
18. Schroer R.J, Phelan M.C, Michaelis R.C et al (1998). Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. *Am J Med Genet*, 76(4), 327-336.

19. Miller J.L, Lynn C.H, Driscoll D.C et al (2011). Nutritional phases in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*, 155A(5), 1040-1049.
20. Goldstone A.P, Thomas E.L, Brynes A.E et al (2004). Elevated fasting plasma ghrelin in prader-willi syndrome adults is not solely explained by their reduced visceral adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(4), 1718-1726.
21. DelParigi A., Tschop M., Heiman M.L et al (2002). High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(12), 5461-5464.
22. Bittel D.C, Kibiryeva N. and Talebizadeh Z. (2003). Microarray analysis of gene/transcript expression in Prader-Willi syndrome: deletion versus UPD. *J Med Genet* 40, 568-574.
23. Spritz R.A, Bailin T., Nicholls R.D et al (1997). Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele. *Am J Med Genet*, 71(1), 57-62.
24. Cassidy S.B, Schwartz S., Miller J.L et al (2012). Prader-Willi syndrome. *Genet Med*, 14(1), 10-26.
25. Crino A., Schiaffini R., Ciampalini P. et al (2003). Hypogonadism and pubertal development in Prader-Willi syndrome. *Eur J Pediatr*, 162(5), 327-333.
26. Grugni G., Giardino D., Crino A. et al (2011). Growth hormone secretion among adult patients with Prader-Willi syndrome due to different genetic subtypes. *J Endocrinol Invest*, 34(7), 493-497.
27. de Lind van Wijngaarden R.F, Otten B.J, Festen D.A et al (2008). High prevalence of central adrenal insufficiency in patients with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(5), 1649-1654.

28. Scaroni C., Ceccato F., Rizzati S. et al (2008). Concomitant therapies (glucocorticoids and sex hormones) in adult patients with growth hormone deficiency. *J Endocrinol Invest*, 31(9 Suppl), 61-65.
29. Diene G., Mimoun E., Feigerlova E. et al (2010). Endocrine disorders in children with Prader-Willi syndrome--data from 142 children of the French database. *Horm Res Paediatr*, 74(2), 121-128.
30. Butler J.V, Whittington J.E, Holland A.J et al (2002). Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with Prader-Willi syndrome: a population-based study. *Dev Med Child Neurol*, 44(4), 248-255.
31. Oto Y., Obata K., Matsubara K. et al (2012). Growth hormone secretion and its effect on height in pediatric patients withdifferent genotypes of Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*, 158A(6), 1477-1480.
32. Carrel A.L, Myers S.E, Whitman B.Y et al (2002). Benefits of long-term GH therapy in Prader-Willi syndrome: a 4-year study. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(4), 1581-1585.
33. Haqq A.M, Stadler D.D, Jackson R.H et al (2003). Effects of growth hormone on pulmonary function, sleep quality, behavior, cognition, growth velocity, body composition, and resting energy expenditure in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(5), 2206-2212.
34. Festen D.A, Wevers M., Lindgren A.C et al (2008). Mental and motor development before and during growth hormone treatment in infants and toddlers with Prader-Willi syndrome. *Clin Endocrinol*, 68(6), 919-925.
35. Sode-Carlsen R., Farholt S., Rabben K.F et al (2012). Growth hormone treatment in adults with Prader-Willi syndrome: the Scandinavian study. *Endocrine*, 41(2), 191-199.

36. Fillion M., Deal C. and Van Vliet G. (2009). Retrospective study of the potential benefits and adverse events during growth hormone treatment in children with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr* 2009 (154), 230-231.
37. Williams K., Scheimann A., Sutton V. et al (2008). Sleepiness and Sleep Disordered Breathing in Prader Willi Syndrome Relationship to Genotype, Growth Hormone Therapy, and Body Composition. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 4(2).
38. Reus L., van Vlimmeren L.A, Staal J.B et al (2012). The effect of growth hormone treatment or physical training on motor performance in Prader-Willi syndrome: a systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, 36(8), 1817-1838.
39. Deal C.L, Tony M., Hoybye C. et al (2013). GrowthHormone Research Society workshop summary: consensus guidelines for recombinant human growth hormone therapy in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(6), 2012-3888.
40. Elbrich P.C and Siemensma (2012). Prader-Willi syndrome Adrenarche, gonadal function, cognition, psychosocial aspects and effects of growth hormone treatment in children.
41. Elena G., Bruna C., Benedetta M. et al (2012). Prader-willi syndrome: clinical aspects. *J Obes*, 2012, 1-13.
42. Chen C., Peng Y., Xia Y. et al (2014). Phenotype-genotype correlation analysis of 12 cases with Angelman/Prader-Willi syndrome. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 31(6), 708-712.
43. Buiting K., Gross S., Lich C. et al (2003). Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet*, 72(3), 571-577.

44. Whittington J.E, Holland A.J, Webb T. et al (2001). Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi syndrome in one UK health region. *J Med Genet*, 38, 792-798.
45. Runte M., Huttenhofer A., Gross S. et al (2001). The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet*, 10(23), 2687-2700.
46. Glenn C.C, Deng G., Michaelis R.C et al (2000). DNA methylation analysis with respect to prenatal diagnosis of the Angelman and Prader-Willi syndromes and imprinting. *Prenat Diagn*, 20(4), 300-306.
47. Gray T.A, Saitoh S. and Nicholls R.D (1999). An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(10), 5616-5621.
48. Maina E.N, Webb T., Soni S. et al (2007). Analysis of candidate imprinted genes in PWS subjects with atypical genetics: a possible inactivating mutation in the SNURF/SNRPN minimal promoter. *J Hum Genet*, 52(4), 297-307.
49. Back E.J, Hüttenhofer A., Nothwang H.G, and et al (2001). A Translocation Breakpoint Cluster Disrupts the Newly Defined 3' End of the SNURF-SNRPN Transcription Unit on Chromosome 15. *Hum Mol Genet* 10 (3), 201-210.
50. Gallagher R.C, Pils B., Albalwi M. et al (2002). Evidence for the role of PWCR1/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet*, 71(3), 669-678.
51. Duker A.L, Ballif B.C, Bawle E.V et al (2010). Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet*, 18(11), 1196-1201.

52. Sahoo T., del Gaudio D., German J.R et al (2008). Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet*, 40(6), 719-721.
53. Bieth E., Eddiry S., Gaston V. et al (2015). Highly restricted deletion of the SNORD1.16 region is implicated in Prader-Willi Syndrome. *Eur J Hum Genet*, 23(2), 252-255.
54. Tennese A.A and Wevrick R. (2011). Impaired hypothalamic regulation of endocrine function and delayed counterregulatory response to hypoglycemia in Magel2-null mice. *Endocrinology*, 152(3), 967-78.
55. Schaaf C.P, Gonzalez-Garay M.L, Xia F. et al (2013). Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet*, 45(11), 1405-1408.
56. Taniguchi N., Taniura H., Niinobe M. et al (2000). The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. *J Biol Chem*, 275(41), 31674-31681.
57. Macedo D.B, Abreu A.P, Reis A.C et al (2014). Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(6), 1097-1103.
58. Kanber D., Giltay J., Wieczorek D. et al (2009). A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet*, 17(5), 582-590.
59. Stelzer Y., Sagi I., Yanuka O. et al (2014). The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1-DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet*, 46(6), 551-557.

60. Christopher C.G, Shinji Saitoh, Michelle C.J et al (1996). Gene Structure, DNA Methylation, and Imprinted Expression of the human SNRPN gene.
61. Rodriguez-Jato S., Nicholls R.D and Driscoll D.J (2005). Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human SNURF-SNRPN locus. *Nucleic Acids Res*, 33(15), 4740-4753.
62. Eggermann T., Perez de Nanclares G. and Maher E.R (2015). Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics*, 7, 123.
63. Sheth F., Liehr T., Shah K. et al (2015). Prader-Willi syndrome - type 1 deletion, a consequence of an unbalanced translocation of chromosomes 13 and 15, easily to be mixed up with a Robertsonian translocation. *Mol Cytogenet*, 8, 52.
64. Cassidy S.B, Forsythe M., Heeger S. et al (1997). Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am J Med Genet*, 68(4), 433-440.
65. Gillessen-Kaesbach G., Robinson W., Lohmann D. et al (1995). -Genotype-phenotype correlation in a series of 167 deletion and non-deletion. *Hum Genet*, 96(6), 638-643.
66. Suzanne B., Cassidy, Li-Wen Lai et al (1992). Trisomy 15 with Loss of the Paternal 15 as a Cause of Prader-Willi. *Am. J. Hum. Genet.* , 51, 701-708.
67. Cheon C.K (2016). Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 21(3), 126-135.
68. Kotzot D. (2002). Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. *Am J Med Genet*, 111(4), 366-375.

69. University of Washington (2019). GeneReviews. University of Washington, USA.
70. Gowan-Jordan Mc, Ottawa J., Simons et al (2016). An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN).
71. Sethakulvichai W., Manitpornsut S., Wiboonrat M. et al (2012). Estimation of band level resolutions of human chromosome images. 276-282.
72. Luke S. and Shepelsky M. (1998). FISH: recent advances and diagnostic aspects. *Cell Vis*, 5(1), 49-53.
73. Speicher M.R and Carter N.P (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, 6(10)-782-792.
74. Glenn C.C, Saitoh S., Jong M.T et al (1996). Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *Am J Hum Genet.*
75. Knuutila S., Bjorkqvist A.M and Autio K. (1998). DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol*, 152(5), 1107-1123.
76. Herman J.G, Graff J.R, Myöhänen S. et al (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), 9821-9826.
77. Product description ME028-C1 PWS-AS (2018). *Product Description version C1-02.*
78. 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.
79. Knoll J.H, Glatt K.A, Nicholls R.D et al (1991). Chromosome 15 uniparental disomy is not frequent in Angelman syndrome.

80. McEntagart M.E, Webb T., Hardy C. et al (2000). Familial Prader-Willi syndrome: case report and a literature review. *Clin Genet*, 58(3), 216-223.

81. Lu W., Qi Y., Cui B. et al (2014). Clinical and genetic features of Prader-Willi syndrome in China. *Eur J Pediatr*, 173(1), 81-86.

82. Kim Y.J and Heon C.K (2014). Prader-Willi syndrome: a single center's experience in Korea. *Korean J Pediatr*, 57(7), 310-316.

83. Butler M.G, Hartin S.N, Hossain W.A et al (2018). Molecular genetic classification in Prader-Willi syndrome: a multisite cohort study. *J Med Genet*, 56(3), 149-153.

84. Kim S.J, Miller J.L, Kuipers P.J et al (2012). Unique and atypical deletions in Prader-Willi syndrome reveal distinct phenotypes. *Eur J Hum Genet*, 20(3), 283-290.

85. Matsumura M., Kubota T., Hidaka E. et al (2002). 'Severe' Prader–Willi syndrome with a large deletion of chromosome 15 due to an unbalanced t(15,22)(q14;q11.2) translocation. *Clin Genet*, 63(1), 79-81.

86. Bar C., Diene G., Molinas C. et al (2017). Early diagnosis and care is achieved but should be improved in infants with Prader-Willi syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 12(1), 118.

87. Çizmecioğlu F.M, Jones J.H, Paterson W.F et al (2018). Neonatal Features of the Prader-Willi Syndrome; The Case for Making the Diagnosis During the First Week of Life. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 10(3), 264-273.

88. Dudley O. and Muscatelli F. (2007). Clinical evidence of intrauterine disturbance in Prader-Willi syndrome, a genetically imprinted neurodevelopmental disorder. *Early Hum Dev*, 83(7), 471-478.

89. Lewis, Barbara A., Freebairn et al (2002). Speech and language skills of individuals with Prader Willi syndrome. *American Journal of Speech - Language Pathology*, 11(3), 285.

90. Nagai T., Obata K., Ogata T. et al (2006). Growth hormone therapy and scoliosis in patients with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*, 140(15), 1623-1627.

91. Nguyễn Thị Mai (2012). *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của hội chứng Prader-Willi*. Luận văn tốt nghiệp bác sỹ nội trú, Đại Học Y, Hà Nội.

92. Thao B.P, Dung V.C, Khanh N.N et al (2013). Clinical and laboratory characteristics of Prader-Willi syndrome. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2013(S1).

93. Thao B.T, Dung V.C, Khanh N.N et al (2015). Clinical and laboratory characteristics of Prader-Willi syndrome. *Annals of Translational Medicine*, 3(suppl 2).

94. Titi Sularyo, Bernie Endyarni, Tri Lestari H. et al (2012). Role of Denver II and Development Quotients in the management of several pediatric developmental and behavioral disorders. *Paediatrica Indonesiana*, 52(1), 51-56.

95. Tổ chức Y tế Thế giới (1999). *Phân loại bệnh quốc tế lần thứ 10 về các rối loạn tâm thần và hành vi. Mô tả lâm sàng và nguyên tắc chỉ đạo chẩn đoán*, Trần Viết Nghị và cs biên dịch, Nhà xuất bản Y học, Hà nội.

96. Tổ chức Y tế Thế giới (2003). *Cơ sở của lâm sàng tâm thần học*, Trần Viết Nghị và cs biên dịch, Nhà xuất bản Y học, Hà nội.

97. Tổ chức Y tế Thế giới (2005). *Hướng dẫn chẩn đoán và quản lý các rối loạn tâm thần trong chăm sóc sức khỏe ban đầu*, Trần Viết Nghị và cs biên dịch, Nhà xuất bản Y học, Hà nội.

98. Tổ chức Y tế Thế giới (2005). *ICD-10 Phân loại rối loạn tâm thần và hành vi. Tiêu chuẩn chẩn đoán dành cho nghiên cứu*, Trần Viết Nghị và cs biên dịch, Nhà xuất bản Y học, Hà nội.
99. DMS - IV - TR (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, American Psychiatric Association.
100. Bộ y tế (2003). *Các giá trị sinh học người Việt Nam bình thường thập kỷ 90 - thế kỷ XX*. Nhà xuất bản y học, Hà nội.
101. Gilsanz V. and Ratib O. (2005). *Hand Bone Age. A Digital Atlas of Skeletal Maturity*. Springer, Germany.
102. Kosaki K., McGinniss M.J, Veraksa A.N et al (1997). Prader-Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *Am J Med Genet*, 73(3), 308-313.
103. Nygren A.O, Ameziane N., Duarte H.M et al (2005). Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*, 33(14), e128.
104. Butler M.G, Sturich J., Lee J. et al (2011). Growth standards of infants with Prader-Willi syndrome. *Pediatrics*, 127(4), 687-695.
105. Wollmann H.A, Schultz U., Grauer M.L et al (1998). Reference values for height and weight in Prader-Willi syndrome based on 315 patients. *Eur J Pediatr*, 157(8), 634-642.
106. Gito M., Ihara H., Ogata H. et al (2015). Gender Differences in the Behavioral Symptom Severity of Prader-Willi Syndrome. *Behav Neurol*, 2015, 294127.
107. Festen D.A, Wevers M., Lindgren A.C et al (2008). Mental and motor development before and during growth hormone treatment in infants and toddlers with Prader-willi syndrome. *Clin Endocrinol*, 68(6), 919-925.

108. Tielsch J.M (2015). Global Incidence of Preterm Birth. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 81, 9-15.

109. Wang Y., Peng W., Guo H.Y et al (2016). Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of neonatal hypotonia in Chinese Population. *Sci Rep*, 6, 29088.

110. Mercer R.E and Wevrick R. (2009). Loss of magel2, a candidate gene for features of Prader-Willi syndrome, impairs reproductive function in mice. *PLoS One*, 4(1), e4291.

111. Devos J., Weselake S.V and Wevrick R. (2011). Magel2, a Prader-Willi syndrome candidate gene, modulates the activities of circadian rhythm proteins in cultured cells. *J Circadian Rhythms*, 9(1), 12.

112. de Lind van Wijngaarden R.F, de Klerk L.W, Festen D.A et al (2008). Scoliosis in Prader-Willi syndrome: prevalence, effects of age, gender, body mass index, lean body mass and genotype. *Arch Dis Child*, 93(12), 1012-1016.

113. Laugel V., Cossee M. and Matis J. (2008). Diagnostic approach to neonatal hypotonia retrospective study on 144 neonates. *Eur J Pediatr* 517-523.

114. Diene G., Mimoun E., Feigerlova E. et al (2010). Endocrine disorders in children with Prader-Willi syndrome--data from 142 children of the French database. *Horm Res Paediatr*, 74(2), 121-128.

115. Khan M.J, Gerasimidis K., Edwards C.A et al (2018). Mechanisms of obesity in Prader-Willi syndrome. *Pediatr Obes*, 13(1), 3-13.

116. Crino A., Fintini D., Bocchini S. et al (2018). Obesity management in Prader-Willi syndrome: current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 11, 579-593.

117. Grugni G., Crino A., Bosio L. et al (2008). The Italian National Survey for Prader-Willi syndrome: an epidemiologic study. *Am J Med Genet A*, 1(7), 861-872.

118. Sinnema M., Maaskant M.A, van Schrojenstein Lantman-de Valk H.M et al. (2011). Physical health problems in adults with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*, 9, (24).

119. Stevenson D.A, Heinemann J., Angulo M. et al (2007). Deaths due to choking in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*, 143A(5), 484-487.

120. Butler M.G, Manzardo A.M, Heinemann J. et al (2017). Causes of death in Prader Willi syndrome PWS. *Genetics in meDicine* 19(6).

121. Fintini D., Grugni G., Bocchini S. et al (2016). Disorders of glucose metabolism in Prader-Willi syndrome: Results of a multicenter Italian cohort study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 26(9), 842-847.

122. Miller J.L, Lynn C.H, Shuster J. et al (2013). A reduced-energy intake, well-balanced diet improves weight control in children with Prader-Willi syndrome. *J Hum Nutr Diet*, 26(1), 2-9.

123. Griggs J.L, Sinnayah P. and Mathai M.L (2015). Prader-Willi syndrome: From genetics to behaviour, with special focus on appetite treatments. *Neurosci Biobehav Rev*, 59, 155-172.

124. Salehi P., Leavitt A., Beck A.E et al (2015). Obesity management in Prader-Willi syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev*, 12(3), 297-307.

125. Nobili V., Vajro P., Dezsofi A. et al (2015). Indications and limitations of bariatric intervention in severely obese children and aldolescents with and without nonalcoholic steatohepatitis: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 60(4), 550-561.

126. Schulze A., Mogensen H., Hamborg-Petersen B. et al (2001). Fertility in Prader-Willi syndrome: a case report with Angelman syndrome in the offspring. *Acta Paediatr*, 90(4), 455-459.

127. McCandless S.E (2011). Clinical report-health supervision for children with Prader-Willi syndrome. *Pediatrics*, 127(1), 195-204.

128. Cassidy S.B and Driscoll D.J (2009). Prader–Willi syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 17, 3-13.

129. Nadine G., Haddad, Erica A. et al (2016). Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition), 2142-2154.

130. West L.A and Ballock R.T (2004). High incidence of hip dysplasia but not slipped capital femoral epiphysis in patients with Prader-Willi Syndrome. *J Pediatr Orthop*, 24(5), 565-567.

131. Diepstraten A., Van Linge B. and Swierstra B. (2001). Afwijkingen van de wervelkolom. In: Kinderorthopedie. . *Maarssen: Elseviers gezondheidszorg*, 43-47.

132. Butler J.V, Whittington J.E, Holland A.J et al (2002). Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with Prader-Willi syndrome: a population-based study. *Dev Med Child Neurol*, 44(4), 248-255.

133. Butler M.G, Lee D.K, Whitman B.Y et al (2006). *Management of Prader-Willi Syndrome*. Springer, New York.

134. Lionti T., Reid S.M and Rowell M.M (2012). Prader-Willi syndrome in Victoria: mortality and causes of death. *J Paediatr Child Health*, 48(6), 506-511.

135. Tauber M., Diene G., Molinas C. et al (2008). Review of 64 cases of death in children with Prader–Willi syndrome (PWS)†. *https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32131*.

136. Beygo J., Buiting K. and Ramsden S.C (2019). Update of the EMQN/ACGS best practice guidelines for molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Eur J Hum Genet*.

137. Bittel D.C, Kibiryeva N. and Butler M.G (2006). Expression of 4 genes between chromosome 15 breakpoints 1 and 2 and behavioral outcomes in Prader-Willi syndrome. *Pediatrics*, 118(4), 1276-1283.

138. Butler M.G (2017). Clinical and genetic aspects of the 15q11.2 BP1-BP2 microdeletion disorder. *J Intellect Disabil Res*, 61(6), 568-579.

139. Burnside R.D, Pasion R., Mikhail F.M et al (2011). Microdeletion/ microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet*, 130(4), 517-528.

140. Merlin G., Butler J., Douglas C. et al (2004). Behavioral Differences Among Subjects With Prader-Willi Syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *PEDIATRICS* 113(3).

141. Zarcone J., Napolitano D., Peterson C. et al (2007). The relationship between compulsive behaviour and academic achievement across the three genetic subtypes of Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res*, 51(Pt. 6), 478-487.

142. Dykens E.M and Roof E. (2008). Behavior in Prader-Willi syndrome: relationship to genetic subtypes and age. *J Child Psychol Psychiatry*, 49(9), 1001-1008.

143. Milner K.M, Craig E.E, Thompson R.J et al (2005). Prader-Willi syndrome: intellectual abilities and behavioural features by genetic subtype. *J Child Psychol Psychiatry*, 46(10), 1089-1096.

144. Henkhaus R.S, Kim S.J, Kimonis V.E et al (2012). Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification and identification of deletion genetic subtypes in Prader-Willi syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers*, 16(3), 178-186.

145. Christian S.L, Fantes J.A, Mewborn S.K et al (1999). Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet*, 8(6), 1025-1037.

146. Enna S.J and McCarson K.E (2006). The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol*, 54, 1-27.

147. Agulhon C., Abitbol M., Bertrand D. et al (1999). Localization of mRNA for CHRNA7 in human fetal brain. *Neuroreport* 10(11), 2223-2227.

148. Ben-Shachar S., Lanpher B., German J.R et al (2009). Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. *J Med Genet*, 46(6), 382-388.

149. Helbig I., Mefford H.C, Sharp A.J et al (2009). 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet*, 41(2), 160-162.

150. Knoll J.H, Wagstaff J. and Lalande M. (1993). Cytogenetic and molecular studies in the Prader-Willi and Angelman syndromes: an overview. *Am J Med Genet*, 46(1), 2-6.

151. Clayton-Smith J., Driscoll D.J, Waters M.F et al (1993). Difference in methylation patterns within the D15S9 region of chromosome 15q11-13 n first cousins with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet*, 47(5), 683-686.

152. Valter A.D and Angela M.V (2000). Partial duplication of chromosome 20(pter→q12). *Genetics and Molecular Biology*, 23(3), 545-547.

153. Madon P.F, Athalye A.S and Parikh F.R (2005). Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online*, 11(6), 726-732.

154. Bhasin M.K (2005). Human Population Cytogenetics: A Review*. *Int J Hum Genet*, 5(2), 83-152.

155. Yuce H., Tekedereli I. and Elyas H. (2007). Cytogenetic results of recurrent spontaneous abortions in Turkey. *Med Sci Monit*, 13(6), 286-289.

156. Sahin F.I, Yilmaz Z. and Yuregir O.O (2008). Chromosome heteromorphisms: an impact on infertility. *J Assist Reprod Genet*, 25(5), 191-195.

157. Joseph C.G, Darrah E., Shah A.A et al (2014). Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science*, 343(6167), 152-157.

158. Papenhausen P., Schwartz S., Risheg H. et al (2011). UPD detection using homozygosity profiling with a SNP genotyping microarray. *Am J Med Genet A*, 4, 757-768.

159. Butler M.G, Hartin S.N, Hossain W.A et al (2018). Molecular genetic classification in Prader-Willi syndrome: a multisite cohort study. *J Med Genet*.

160. Butler M.G (2017). Benefits and Limitations of Prenatal Screening for Prader-Willi Syndrome. *Prenat Diagn*, 37(1), 81-94.

161. Lionti T., Reid S.M, White S.M et al (2015). A population-based profile of 160 Australians with Prader-Willi syndrome: trends in diagnosis, birth prevalence and birth characteristics. *Am J Med Genet A*, 167A(2), 371-378.

162. Whittington J.E, Butler J.V and Holland A.J (2007). Changing rates of genetic subtypes of Prader-Willi syndrome in the UK. *Eur J Hum Genet*, 15(1), 127-130.

163. Kim H.J, Cho H.J, Jin D.K et al (2004). Genetic basis of Prader-Willi syndrome in Korea: less uniparental disomy than has been recognized? *Clin Genet*, 66(4), 368-372.

164. Lin H.Y, Lin S.P, Chuang C.K et al (2007). Genotype and phenotype in patients with Prader-Willi syndrome in Taiwan. *Acta Paediatr*, 96(6), 902-905.

165. Horsthemke B. and Buiting K. (2006). Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res*, 113(1-4), 292-299.

166. Ohta T., Gray A., Rogan P.K et al. (1999). Imprinting-Mutation Mechanisms in Prader-Willi Syndrome.

167. Horsthemke B., Nazlican H., Husing J. et al (2003). Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi. *Hum Mol Genet*, 12(20), 2723-2732.

168. Mowery-Rushton P.A, Hanchett J.M, Zipf W.B et al (1996). Identification of mosaicism in Prader-Willi syndrome using fluorescent in situ hybridization. *Am J Med Genet*, 66(4), 403-412.

PHỤ LỤC: MẪU BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU VÀ TEST ĐÁNH GIÁ PHÁT TRIỂN TÂM THẦN VẬN ĐỘNG

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Mã số:………..

HÀNH CHÍNH

Họ và tên bệnh nhân …….. Giới…

Ngày tháng năm sinh………………………………………………………

Địa chỉ: ……………………………………………………………………..

Điện thoại liên hệ: ………………………………………………………….

Tuổi mẹ: ……………………………………………………………………….

Tuổi bố **……………………………………………………………………..**

BỆNH SỬ

PHẢ HỆ

THĂM KHÁM

1. Đánh giá triệu chứng lâm sàng theo tiêu chuẩn Holm, dựa vào bảng kiểm sau:

Bảng kiểm đánh giá triệu chứng lâm sàng theo tiêu chuẩn Holm

STT	**Triệu chứng nặng**	**Có**	**Không**
1	Hiện có hoặc tiền sử có giảm trương lực cơ		
2	Hiện có hoặc tiền sử phải hỗ trợ ăn uống		
3	Tăng cân nhanh giai đoạn 2 - 6 tuổi		
4	Đặc điểm bộ mặt điển hình của PWS		
5	Thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài		
6	Chậm phát triển tâm thần vận động		
7	Chứng ăn không kiểm soát		

STT	Triệu chứng nhẹ	Có	Không
1	Giảm vận động thời kỳ bào thai, khóc yếu		
2	Rối loạn phát triển tính cách		
3	Rối loạn giấc ngủ		
4	Tầm vóc thấp		
5	Giảm sắc tố da		
6	Bàn tay, bàn chân nhỏ		
7	Bất thường mắt: lác trong, cận thị		
8	Giảm tiết nước bọt		
9	Bất thường phát triển ngôn ngữ		

Cách đánh giá: khám lâm sàng và sử dụng các câu hỏi cho bố mẹ hoặc người giám hộ của bệnh nhân**.**

Triệu chứng nặng:

- Khám trương lực cơ: đánh giá độ chắc của cơ, độ ve vẩy của cơ và độ gấp duỗi của cơ. Bệnh nhân có giảm trương lực cơ khi giảm độ chắc của cơ, tăng độ ve vẩy và tăng độ gấp duỗi cơ.

  Khai thác tiền sử giảm trương lực cơ: xem lại sổ khám, sử dụng các câu hỏi như lúc mới sinh cháu có nhấc được chân, tay lên khỏi mặt giường không?, Mấy tháng cháu biết lẫy, biết ngồi, biết đi?
- Hỗ trợ ăn uống: các phương pháp đang sử dụng hoặc sử dụng trước đó: đút thìa, sonde dạ dày…
- Tăng cân, béo phì: đo chiều cao, cân nặng, tính chỉ số BMI.
- Đặc điểm bộ mặt điển hình của PWS: thái dương hẹp, mắt hình quả hạnh, môi trên mỏng, môi dưới trễ, cằm nhỏ, sống mũi hẹp.

- Thiểu sản cơ quan sinh dục ngoài: trẻ trai có ẩn tinh hoàn không, đo thể tích tinh hoàn bằng thước đo Prader, đo chiều dài dương vật, bìu có thiểu sản và nhạt màu không. Trẻ gái: thiểu sản âm vật, môi lớn, môi bé.
- Chậm phát triển trí tuệ: đo chỉ số IQ cho trẻ trên 6 tuổi và DQ cho trẻ dưới 6 tuổi, thực hiện bởi các bác sỹ hoặc chuyên viên tâm bệnh.
- Chứng ăn không kiểm soát: hỏi thói quen ăn uống của trẻ (trẻ lớn hơn 2 tuổi), trẻ có các biểu hiện luôn thèm ăn, đòi đồ ăn, tìm kiếm đồ ăn liên tục trong ngày.

Triệu chứng nhẹ:

- Giảm vận động thời kỳ bào thai, khóc yếu: hỏi bố mẹ hoặc người giám hộ.
- Các đặc điểm tính cách: sử dụng các câu hỏi như cháu có tham gia được các trò chơi với các bạn hoặc anh chị em không, có hay giật đòi đồ chơi, có hay cáu gắt vô cớ không? Cháu có các cơn xung động la hét không?...
- Rối loạn giấc ngủ: trẻ có các cơn ngừng thở khi ngủ không, có thức dậy nhiều lần trong khi ngủ mặc dù không có yếu tố tác động như tiếng ồn, trẻ bị đái dầm….
- Tầm vóc thấp: đo chiều cao, so sánh với chỉ số bình thường của trẻ cùng độ tuổi.
- Nhạt sắc tố da: quan sát màu da của trẻ, so sánh với các anh chị em trong gia đình.
- Bất thường mắt: trẻ có lác trong, cận thị không? Những trẻ có biểu hiện bất thường mắt được gửi khám bác sỹ chuyên khoa mắt.
- Giảm tiết nước bọt: sử dụng các câu hỏi như các ăn các thức ăn khô như bánh quy có biểu hiện khó nuốt không, có chậm tiêu hóa thức ăn thường xuyên không?... Quan sát trẻ có bị sâu răng không?

- Bất thường ngôn ngữ: sử dụng các câu hỏi như: cháu bắt đầu biết nói thời điểm nào, cháu có hiểu và sử dụng ngôn ngữ trong giao tiếp hàng ngày được không, mức độ: chậm, hạn chế hay không có khả năng?

Tính điểm:

- Triệu chứng nặng: ….. điểm
- Triệu chứng nhẹ: ….. điểm

Chẩn đoán lâm sàng: đủ điểm chẩn đoán PWS.

2. Kết quả khám chuyên khoa: nội tiết, mắt, thần kinh, tâm bệnh, cột sống….
3. Kết quả các xét nghiệm chuyên khoa có liên quan:

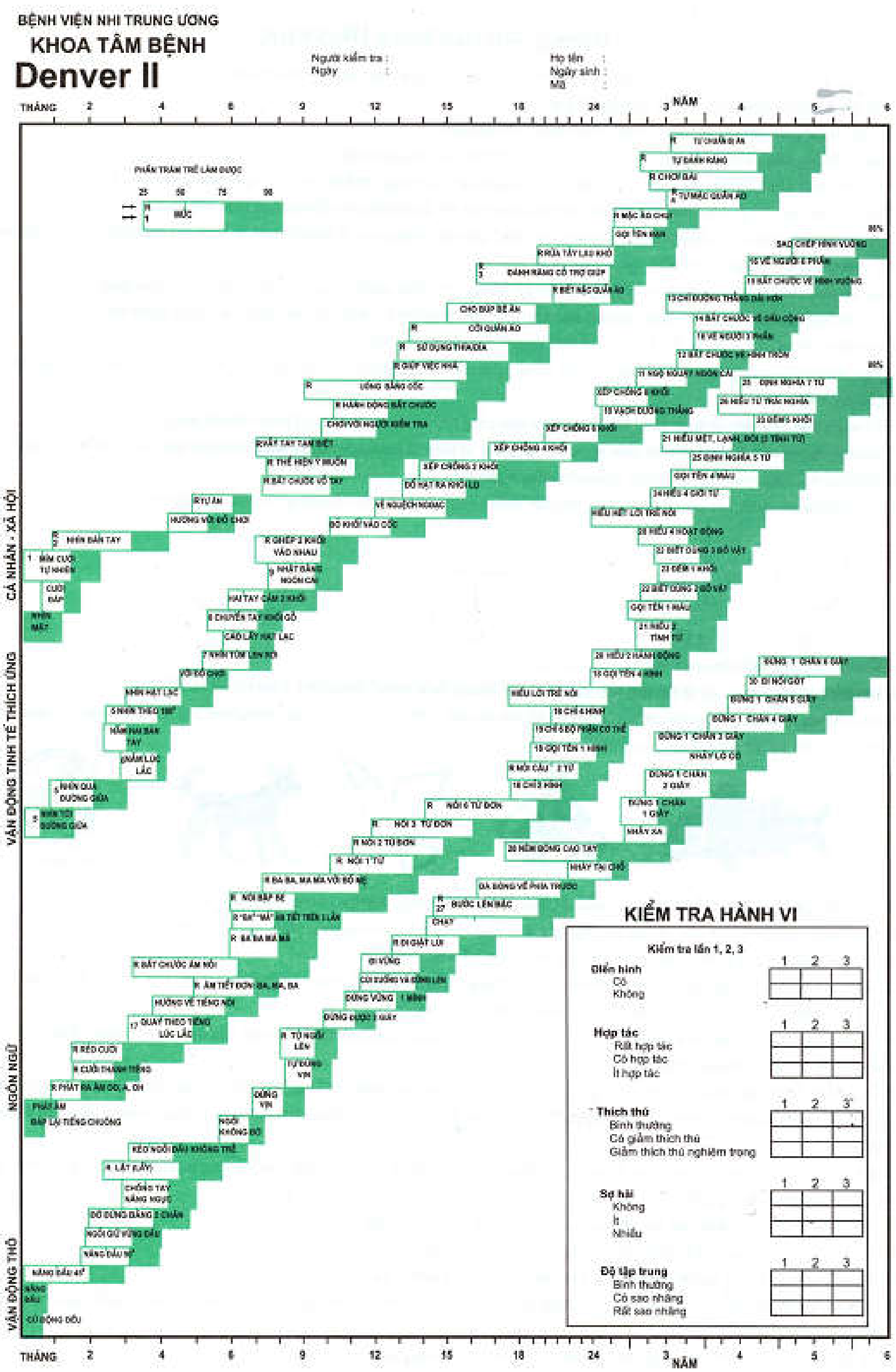
- Chẩn đoán hình ảnh: XQ tuổi xương, siêu âm ổ bụng tìm tử cung buồng trứng, tinh hoàn…., XQ cột sống, MRI sọ não…
- Xét nghiệm máu: định lượng đường máu, GH, IGF1…

KẾT LUẬN:

Ngày tháng năm

Bác sĩ khám ký tên

PHIẾU ĐÁNH GIÁ DQ BẰNG TEST DENVER II



KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ IQ BẰNG TEST RAVEN

Họ và tên bệnh nhân ………………………………….Giới: ……………

Ngày sinh: ………………………………..Ngày đánh giá: ……………..

I. TEST RAVEN MÀU

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12

AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12

B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12

II. TEST RAVEN ĐEN TRẮNG

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12

B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12

D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12

E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12

III.KẾT QUẢ: …………………… Người đánh giá (ký tên)……………..