

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là bệnh lý di truyền thần kinh cơ hay gặp với tần suất 1/3600 trẻ trai. Đây là bệnh di truyền gen lặn kiên kết với NST giới tính X, không có alen tương ứng trên NST Y. Người mẹ là người lành mang gen bệnh có khả năng truyền gen bệnh và gây biểu hiện bệnh ở con trai với tỉ lệ 50%. Bệnh đặc trưng bởi sự yếu cơ tiến triển, người bệnh phụ thuộc xe lăn ở lứa tuổi 11-12 và thường tử vong ở lứa tuổi 20 do các biến chứng tim mạch và hô hấp. Hiện nay bệnh vẫn chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu, vì vậy sàng lọc người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh vẫn đóng một vai trò quan trọng giúp giảm tỉ lệ sinh con mắc bệnh. Do Dystrophin là một gen có kích thước lớn, một số trường hợp không xác định được đột biến chỉ điểm ở người bệnh hay thai phụ, một số gia đình không có điều kiện kinh tế để làm các xét nghiệm chẩn đoán đột biến nên việc chẩn đoán trước sinh bằng các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp hiện còn gặp khó khăn. Kỹ thuật Microsatellite ra đời đã hứa hẹn mang đến hiệu quả cao trong chẩn đoán trước sinh DMD khi có thể được ứng dụng cho tất cả các dạng đột biến gen Dystrophin với thời gian trả lời kết quả nhanh (sau 48 -72 giờ) và chi phí thấp. Đề tài: “**Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite**” với hai mục tiêu:

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

2. Tính thời sự của luận án

Luận án được tiến hành khi bệnh DMD hiện nay vẫn là bệnh lý di truyền có tần suất cao trong nhóm bệnh lý thần kinh cơ và chưa có

phương pháp điều trị khỏi bệnh. Các kỹ thuật chẩn đoán trước sinh bệnh DMD hiện mới chỉ được thực hiện ở một số cơ sở y tế lớn tại Việt Nam và việc xác định đột biến gen Dystrophin còn gặp khó khăn do kích thước gen lớn, chi phí cho các xét nghiệm di truyền phân tử hiện nay còn cao. Kỹ thuật Microsatellite là một kỹ thuật xác định đột biến gián tiếp, có khả năng chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi khi người mẹ mang đột biến xoá đoạn, lặp đoạn hay đột biến điểm. Đặc biệt kỹ thuật này là kỹ thuật duy nhất có thể ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh với những trường hợp không xác định được đột biến chỉ điểm ở thai phụ. Microsatellite là một kỹ thuật đơn giản, có giá thành thấp hơn các kỹ thuật MLPA hay giải trình tự gen. Do đó việc xác định người lành mang gen bệnh và ứng dụng kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD là cần thiết.

3. Những đóng góp khoa học trong luận án

- Đây là nghiên cứu khoa học đầu tiên tại Việt Nam về chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng kỹ thuật Microsatellite.

- Nghiên cứu đã chỉ ra việc xác định người lành mang gen bệnh và tư vấn di truyền cho tất cả các thành viên nữ trong phả hệ gia đình bệnh nhân DMD là hết sức cần thiết. Thông qua việc xác định được các trường hợp đột biến thể khảm, nghiên cứu đã cho thấy vẫn cần tư vấn di truyền cho những thành viên nữ trong phả hệ cho dù không tìm thấy đột biến từ mẫu máu. Nghiên cứu đã tiến hành xác định người lành mang gen bệnh cho 85 thành viên nữ và kết quả có 52 người mang gen đột biến dị hợp tử (61%) và 33 người không mang gen đột biến (39%).

- Nghiên cứu đã ứng dụng thành công kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD, cho kết quả tương đồng với các kỹ thuật chẩn đoán đột biến trực tiếp; và cho thấy Microsatellite là một kỹ thuật với nhiều ưu điểm trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.

4. Bố cục của luận án

Luận án gồm 136 trang, gồm: Đặt vấn đề và mục tiêu nghiên cứu (2 trang), tổng quan (34 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (15 trang), kết quả nghiên cứu (52 trang), bản luận (31 trang), kết luận (1 trang) và khuyến nghị (1 trang). Luận án có 14 bảng và 61 mục hình ảnh. Luận án có 125 tài liệu tham khảo bao gồm 6 tài liệu tiếng Việt và 119 tài liệu tiếng Anh, có 77 tài liệu trong 10 năm gần đây.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) lần đầu được mô tả năm 1852 bởi Edward Meryon. Năm 1861, Guillaume Duchenne đã ứng dụng dòng điện để kích thích cơ trong điều trị cho người bệnh mắc loạn dưỡng cơ. Năm 1879, Gowers mô tả bệnh DMD ở 220 người bệnh. Năm 1981, Zatz đã phát hiện gen Dystrophin nằm ở vị trí Xp21. Năm 1993, cấu trúc gen Dystrophin được mô tả đầy đủ. Năm 1989, glucocorticoid lần đầu được đưa vào điều trị DMD. Năm 1990, liệu pháp gen điều trị bệnh DMD được tiến hành trên chuột mdx. Năm 1999, liệu pháp tế bào gốc được nghiên cứu. Năm 2003, nghiên cứu liệu pháp gen điều trị DMD sử dụng chuỗi nucleotide ngắn không mã hóa và năm 2008, liệu pháp này được áp dụng điều trị trên người bệnh.

1.2. Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, điều trị bệnh DMD

1.2.1. Triệu chứng lâm sàng

Triệu chứng về vận động: Bệnh đặc trưng bởi sự yếu cơ tiến triển có xu hướng từ gần đến xa. Triệu chứng yếu cơ xuất hiện rõ khi trẻ ở giai đoạn tập đi. Người bệnh mất khả năng đi lại ở lứa tuổi 12 và tử vong ở độ tuổi 20 do các bệnh lý tim mạch và hô hấp.

Triệu chứng tại các cơ quan khác: Chậm phát triển trí tuệ nhẹ, các bệnh lý tim mạch.

1.2.2. Xét nghiệm cận lâm sàng

Nồng độ Creatine Kinase (CK): Trong bệnh DMD, nồng độ CK tăng cao ít nhất 40 lần ngay sau sinh, trước khi có triệu chứng lâm sàng.

Sinh thiết cơ: Sinh thiết cơ thấy hình ảnh các tế bào cơ thoái hóa, teo nhỏ, tổ chức liên kết quanh sợi cơ tăng sinh. Phản ứng miễn dịch huỳnh quang không thấy protein Dystrophin trên bề mặt tế bào cơ.

Thăm dò điện sinh lý cơ: không đặc hiệu cho bệnh DMD.

Xét nghiệm di truyền phát hiện đột biến gen Dystrophin: Kỹ thuật PCR phát hiện đột biến xóa đoạn. Kỹ thuật MLPA phát hiện các đột biến xóa đoạn, lặp đoạn. Kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm.

Các xét nghiệm khác: Xét nghiệm đánh giá chức năng tim mạch, X-quang tim phổi,... đánh giá tình trạng chung của người bệnh.

1.2.3. Điều trị và dự phòng

Hiện nay chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu, hiện nay chỉ điều trị các biến chứng của bệnh và cải thiện chất lượng cuộc sống người bệnh.

* Điều trị nội khoa

Corticosteroids: Glucocorticoid giúp làm giảm tình trạng hoại tử cơ, cải thiện sức mạnh và chức năng của cơ.

Kiểm soát các biến chứng tim mạch và hô hấp

** Vật lý trị liệu và phục hồi chức năng:* Các liệu pháp vật lý trị liệu giúp giảm nhẹ tình trạng co cứng cơ, giúp tăng cường sức mạnh cơ.

** Chế độ dinh dưỡng:* Đảm bảo chế độ dinh dưỡng tốt và kiểm soát cân nặng của trẻ nhằm tránh tình trạng béo phì.

** Liệu pháp gen:* Sử dụng các vector đưa vào cơ các đoạn nucleotid ngắn không mã hóa để bỏ qua một số exon trong quá trình dịch mã nhằm khôi phục lại khung đọc mở trong gen Dystrophin bị đột biến.

**Liệu pháp tế bào*: chuyển ghép nguyên bào cơ nuôi cấy trong phòng thí nghiệm từ cơ trưởng thành của người thân không mắc bệnh để thay thế các tế bào cơ bệnh lý.

**Dự phòng*: Phát hiện người lành mang gen bệnh, tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh, chẩn đoán tiền làm tổ DMD.

1.3. Cơ chế di truyền bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

1.3.1. Cơ chế di truyền: Di truyền gen lặn liên kết NST X, không có alen tương ứng trên NST Y. Mẹ là người lành mang gen bệnh sẽ truyền gen bệnh cho con và gây biểu hiện bệnh ở con trai với tỷ lệ 50%.

1.3.2. Cấu trúc gen Dystrophin: Gen Dystrophin nằm trên NST X, thuộc nhánh ngắn, vùng 2, băng 1, băng phụ 2, dài hơn 2000kb gồm 79 exon.

1.3.3. Cấu trúc, chức năng Protein Dystrophin

Cấu trúc protein Dystrophin: gồm 3685 acid amin, hình que gồm bốn phần: vùng giàu cystein, C-tận, N-tận, trung tâm rod.

Chức năng Protein Dystrophin: bảo vệ tính ổn định của màng tế bào cơ. Khi thiếu Dystrophin dẫn đến hoại tử tế bào cơ.

1.3.4. Các dạng đột biến gen Dystrophin

* *Đột biến xóa đoạn*: 60-65% các đột biến, tập trung chủ yếu ở hai vùng “hot spot” là vùng trung tâm và vùng tận cùng 5’ của gen.

* *Đột biến lặp đoạn*: chiếm 5 -10% các trường hợp đột biến.

* *Đột biến điểm*: 25%-30%, xuất hiện rải rác ở tất cả các vị trí của gen.

1.4. Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

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

* *Chọc hút nước ối*: tiến hành qua thành bụng dưới hướng dẫn của siêu âm. Các tai biến bao gồm sảy thai: 0,1-1%; rỉ ối: 1-2%; nhiễm trùng,...

* *Sinh thiết gai rau*: thực hiện ở tuần thứ 10 - 13, qua cổ tử cung hoặc qua thành bụng. Tai biến bao gồm sảy thai, rỉ ối và nhiễm trùng (>1%).

* *Lấy máu cuống rốn, sinh thiết mô thai*

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

1.4.2.1. Các kỹ thuật phát hiện đột biến trực tiếp

* Kỹ thuật giải trình tự gen bằng máy tự động: Sử dụng 4 màu huỳnh quang để đánh dấu 4 loại ddNTP, sử dụng hệ thống điện di mao quản.

* Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới NGS

* Kỹ thuật Southern Blotting: Phân tử DNA được cắt thành các đoạn nhỏ, điện di trên thạch agarose rồi lai với các oligonucleotid đặc hiệu có gắn chất đánh dấu phóng xạ hay huỳnh quang.

* Kỹ thuật PCR: Kỹ thuật PCR áp dụng trong phát hiện đột biến gen Dystrophin: PCR đơn môi, PCR đa môi, PCR lồng, PCR sao chép ngược.

* Kỹ thuật FISH: Sử dụng DNA dò có đánh dấu đồng vị phóng xạ hoặc hóa học để dò tìm DNA đích trên NST của tế bào ở gian kỳ hoặc ở kỳ giữa, phát hiện đột biến gen bằng kính hiển vi huỳnh quang.

* Kỹ thuật MLPA: Trong chẩn đoán bệnh DMD, kỹ thuật MLPA có thể khảo sát toàn bộ 79 exon, được ưu tiên chọn lựa trong chẩn đoán đột biến gen Dystrophin và phát hiện người lành mang gen bệnh.

1.4.2.2. Kỹ thuật phát hiện đột biến gián tiếp: Kỹ thuật Microsatellite Microsatellite được phát triển dựa trên kỹ thuật PCR tiêu chuẩn, sử dụng môi gắn huỳnh quang và máy giải trình tự gen để xác định các sản phẩm PCR. Kỹ thuật dựa trên các thông tin đa hình của các đoạn trình tự lặp ngắn (STR). Kỹ thuật có độ nhạy cảm rất cao, gấp 1000 lần so với phân tích gel thông thường cho phép phát

hiện được những tín hiệu rất yếu. Microsatellite trong chẩn đoán trước sinh DMD sử dụng trình tự lặp ngắn trong gen Dystrophin gắn huỳnh quang.

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

Chẩn đoán tiền làm tổ giúp xác định những phôi mang đột biến và chuyển vào buồng tử cung những phôi không mang đột biến.

1.5. Tình hình nghiên cứu bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne

1.5.1. Trên thế giới

Bệnh DMD đã được nghiên cứu từ nhiều năm nay trên thế giới. Tác giả

Thomas W. Prio năm 2005 đã xây dựng bản đồ đột biến gen dựa trên 361 người bệnh DMD. Năm 2006, tác giả Lai K.K đã ứng dụng kỹ thuật MLPA phát hiện đột biến ở người bệnh DMD/BMD và người nữ mang gen bệnh. Năm 2009, tác giả Li đã kết hợp kỹ thuật MLPA và Multiplex PCR chẩn đoán trước sinh bệnh DMD. Năm 2011, tác giả Giliberto đã chẩn đoán trước sinh bệnh DMD qua kết hợp kỹ thuật Multiplex PCR và phân tích STR (Microsatellite). Năm 2013, tác giả Li đã ứng dụng kỹ thuật MLPA trong chẩn đoán trước sinh DMD.

1.5.2. Tại Việt Nam

Bệnh DMD lần đầu được thống kê tại Việt Nam năm 1991 bởi tác giả Nguyễn Thu Nhận với 131 người bệnh trong 107 gia đình. Năm 2004, tác giả Trần Văn Khánh đã xác định đột biến gen Dystrophin ở 85 người bệnh mắc bệnh DMD và BMD ở Việt Nam bằng phương pháp PCR. Năm 2009, Nguyễn Khắc Hân Hoan đã sử dụng kỹ thuật MLPA phát hiện đột biến gen Dystrophin ở 11 người bệnh mắc bệnh DMD.

Năm 2016, Trần Văn Khánh đã ứng dụng kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán tiền làm tổ bệnh DMD cho 3 gia đình.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Cỡ mẫu: lấy mẫu chủ đích

- Mục tiêu 1: cỡ mẫu dự kiến là 50 thành viên nữ.
- Mục tiêu 2: cỡ mẫu dự kiến là 30 thai phụ.

2.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu

- Mục tiêu 1: Các thành viên nữ trong phá hệ gia đình bệnh nhân DMD gồm: bà ngoại, mẹ, bác gái, dì, chị/em gái ruột, chị/em gái họ (con bác gái, dì), cháu gái (con của chị/em gái) của người bệnh DMD.

- Mục tiêu 2: Thai phụ mang thai 17-25 tuần, được xác định là người lành mang gen bệnh hoặc có tiền sử sinh con mắc DMD và có nguyện vọng được chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi.

2.2. Phương tiện nghiên cứu

2.2.1. Dụng cụ

Bộ dụng cụ thực hiện thủ thuật chọc ối, hệ thống giải trình tự gen Beckman CEQ-8000, máy quang phổ kế Thermo Electron Corporation của hãng Biomate, máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm để bàn Eppendorf, lò vi sóng, tủ ẩm, pipet, đầu côn, ống Falcol, công đo sạch.

2.2.2. Hóa chất

Hoá chất tách chiết DNA, hoá chất chạy phản ứng MLPA, hoá chất chạy phản ứng giải trình tự gen, hoá chất chạy phản ứng Microsatellite.

Bảng 2.1. Các marker STR ứng dụng trong nghiên cứu

STR	Vị trí	Mỗi xuôi	Mỗi ngược
DXS8090	Intron 1	GGGTGAAATTCATCAAAA	ACAAATGCAGATGTACAAAAAATA
DXS9907	Intron 45	CTGTGGTGAAGGTTTCGCTT	TAGACTTGACCTCATGGGCT
STR49	Intron 49	CGTTTACCAGCTCAAATCTCAAC	CATATGATACGATTCGTGTTTTGC
DXS1067	Intron 50	TATGTCCTCAGACTATTAGATGCC	CCTCCAGTAACAGATTTGGGTG
STR50	Intron 50	AAGGTTCCCTCCAGTAACAGATTTGG	TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC
DXS1036	Intron 51	TGCAGTTTATTATGTTTCCACG	GCCATTGATAAGTGCCAGAT

2.3. Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.3.1. Nội dung nghiên cứu

2.3.1.1. Phát hiện người lành mang gen bệnh

- Phân tích phả hệ gia đình người bệnh DMD:
 - Phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng khi có ít nhất 2 thành viên nam mắc DMD.
 - Phả hệ gia đình có tiền sử bệnh không rõ ràng khi chỉ có một thành viên nam mắc DMD.
- Tách chiết DNA từ mẫu máu của các thành viên nữ.
- Xác định người lành mang gen đột biến dị hợp tử bằng kỹ thuật MLPA, giải trình tự gen.
- Tư vấn di truyền đối với các thành viên nữ sau khi có kết quả.

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

* *Xác định các marker STR dị hợp tử*

Xác định các marker STR có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất từ 6 marker.

* *Chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Microsatellite DNA:* Các thai phụ được chọc hút nước ối chẩn đoán trước sinh DMD bằng kỹ thuật Microsatellite và được đối chiếu kết quả bằng một kỹ thuật di truyền phân tử khác. Nuôi cấy tế bào ối được thực hiện để chẩn đoán các trường hợp bất thường NST kèm theo.

2.3.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội, bệnh viện Phụ sản Hà Nội.
- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 1/2015 – 12/2018

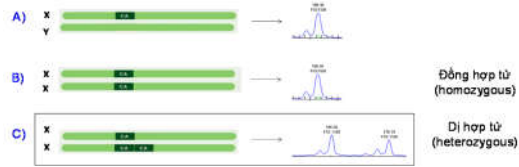
2.3.3. Quy trình kỹ thuật

2.3.3.1. Quy trình phát hiện người lành mang gen bệnh

- a. *Quy trình lấy mẫu:* 5 ml máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA.
- b. *Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi:* Máu chống đông EDTA cần tách trong 24 giờ, ly tâm, thu cặn, rửa DNA và kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm.
- c. *Phương pháp đo quang phổ:* Máy quang phổ kế Thermo Electron Corporation
- d. *Quy trình kỹ thuật MLPA:* 4 giai đoạn bao gồm biến tính DNA, phản ứng lai, phản ứng nối, phản ứng khuếch đại gen PCR. Kết quả được phân tích trên máy CEQ8000- Beckman Coulter
- e. *Quy trình kỹ thuật giải trình tự gen:* Sản phẩm PCR sau khi được khuếch đại bằng các cặp mồi đặc hiệu sẽ được làm nguyên liệu cho kỹ thuật giải trình tự gen. Điện di sản phẩm PCR giải trình tự gen Dystrophin bằng hệ thống giải trình tự ABI Prism 3100.

2.3.3.2. Quy trình chẩn đoán trước sinh bệnh DMD

- a. *Quy trình chọc ối:* tiến hành khi thai 17 – 25 tuần, qua thành bụng dưới sự hướng dẫn của siêu âm. Sử dụng kim chọc ối Gauge 27.
 - b. *Quy trình kỹ thuật Microsatellite DNA:* tiến hành trên mẫu DNA thai nhi, thai phụ và người bệnh DMD tương ứng trong từng gia đình.
- * *Tách chiết DNA của tế bào ối, tế bào máu thai phụ và người bệnh:* sử dụng phương pháp phenol-chloroform để tách chiết DNA
- * *Xác định giới tính:* marker Amel và marker SRY
- * *Xác định marker STR dị hợp tử*



Hình 2.1. Xác định marker STR dị hợp tử

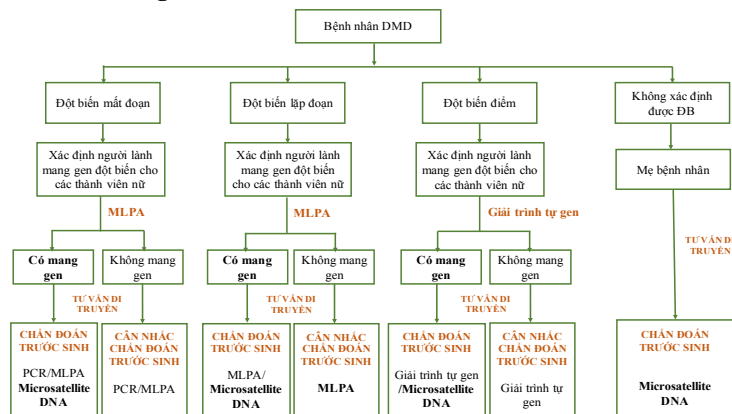
- Nam: sản phẩm điện di mao quản sẽ chỉ cho 1 đỉnh (A)
- Nữ: sản phẩm điện di mao quản cho 1 đỉnh nếu là vùng STR đồng hợp tử (B) và cho 2 đỉnh nếu là vùng STR dị hợp tử (C)
- Marker STR dị hợp tử sẽ được lựa chọn trong chẩn đoán trước sinh.

* *Xác định alen bệnh lý:* Các cặp mồi được thiết kế trên NST X. Ở mỗi vùng STR, người mẹ (XX) có 2 đỉnh tương ứng với 2 alen, người con trai (XY) có 1 đỉnh tương ứng với 1 alen. So sánh kết quả của từng marker giữa người mẹ và người con trai bị DMD sẽ xác định được alen bệnh khi alen đó xuất hiện ở cả người mẹ và người con trai bị bệnh.

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

Nuôi cấy theo phương pháp hở tử âm, nhuộm băng G.

2.3.5. Sơ đồ nghiên cứu



2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

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

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh DMD

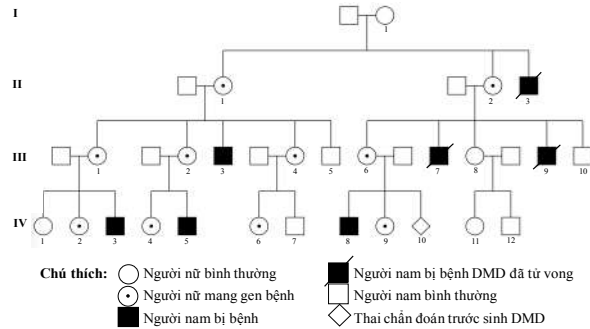
Xác định người lành mang gen cho 85 thành viên gia đình nữ của 35 người bệnh DMD.

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

Kỹ thuật MLPA được áp dụng để xác định người lành mang gen bệnh trên 66 thành viên nữ của 25 gia đình người bệnh DMD có đột biến xoá đoạn và lặp đoạn gen. Kết quả xác định 40 (60,6%) người có mang gen đột biến dị hợp tử và 26 (39,4%) người không mang gen đột biến.

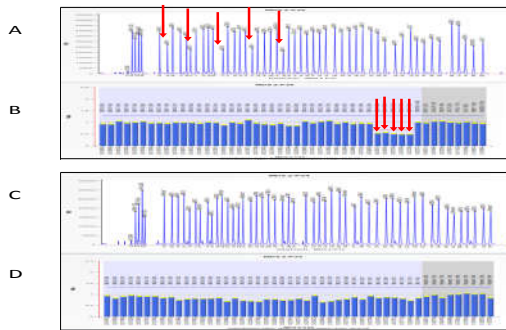
Có 22 dạng đột biến xoá đoạn và lặp đoạn xác định được ở 40 thành viên nữ là người lành mang gen. 20/22 dạng đột biến là xoá đoạn (90,9%); 2/22 dạng đột biến là lặp đoạn (lệ 9,1%). Các đột biến xảy ra ở một hay nhiều exon, tập trung ở vùng 5' tận và vùng trung tâm, có một số đột biến lớn kéo dài từ vùng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

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



Hình 3.1. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.10

Phả hệ gia đình người bệnh D.10 là phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng với 7 thành viên nam bị DMD. Tiến hành xác định người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong phả hệ bằng kỹ thuật MLPA.



Hình 3.2. Kết quả MLPA của thành viên nữ II₁ (A-B) và IV₁ (C-D)

Thành viên nữ II₁ (Hình A-B): các exon 11-15 (hình A) có chiều cao đỉnh thấp hơn mẫu bình thường. Tỷ lệ RPA tại exon 11-15 (Hình B) so với chứng < 0,5 trong khi các exon khác dao động quanh 1. Xác định II₁ là người mang gen đột biến dị hợp tử xóa đoạn exon 11-15. Thành viên nữ IV₁ (Hình C-D): các exon 11-15 (hình C) có

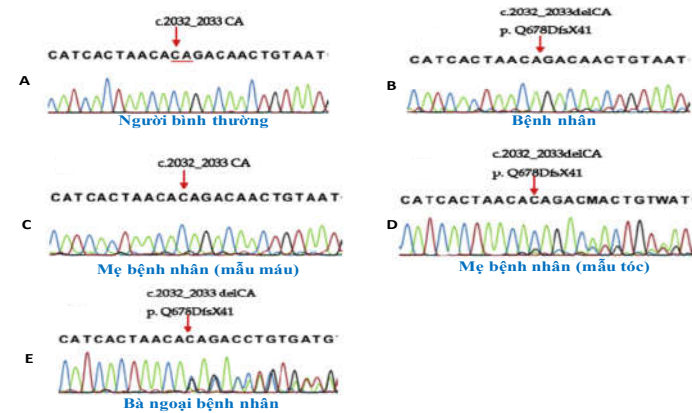
chiều cao đỉnh bằng mẫu người bình thường. Tỷ lệ RPA tại các exon 11-15 (Hình D) dao động quanh 1. Xác định IV₁ là người không mang gen đột biến.

Phân tích tương tự với các thành viên nữ còn lại xác định 4 người mang gen đột biến dị hợp tử và 10 người không mang gen đột biến.

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

Giải trình tự gen xác định người lành mang gen bệnh cho 19 thành viên nữ trong 10 gia đình người bệnh DMD có đột biến điểm. Kết quả 12 người mang gen bệnh (63,2%); 7 người không mang gen bệnh (36,8%). Có 9 dạng đột biến điểm xác định được ở 12 thành viên nữ, đa số tập trung ở exon. Đa số đột biến tạo mã kết thúc sớm (6/9 dạng đột biến); 3/9 dạng đột biến mất nucleotid gây lệch khung dịch mã.

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



Hình 3.4. Hình ảnh giải trình tự gen gia đình người bệnh D.81

Gia đình người bệnh D.81 có 2 thành viên nam mắc DMD mang đột biến điểm mất 2 nucleotide CA ở vị trí 2032_2033 trên

exon 17 gen Dystrophin gây biến đổi bộ ba CAG mã hoá acid amin Glutamine thành bộ ba GAC mã hoá acid amin Aspartate, gây lệch khung dịch mã tạo mã kết thúc sớm. Thành viên nữ II₂ được xác định là người mang đột biến dị hợp tử bắt buộc qua phân tích phả hệ, tuy nhiên kết quả giải trình tự gen từ DNA mẫu máu không phát hiện đột biến (hình C). Giải trình tự gen DNA mẫu tóc thấy đột biến (hình D). Do không phát hiện được đột biến từ DNA mẫu máu nhưng lại tìm thấy đột biến từ DNA mẫu tóc nên xác định thành viên nữ II₂ là người mang gen đột biến dị hợp tử ở trạng thái khảm. Bà ngoại người bệnh DMD (I₁) được xác định là người lành mang đột biến do kết quả giải trình tự xuất hiện các đỉnh chồng lên nhau từ điểm đột biến c.2032_2033 (hình E).

3.1.3. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh

Nghiên cứu tiến hành xác định người lành mang gen bệnh cho 85 thành viên nữ, xác định 52/85 người mang gen bệnh (61%), 33/85 người không mang gen bệnh (39%). Trong 85 thành viên nữ có 45 bà mẹ có tiền sử sinh con mắc DMD, 40 người không sinh con mắc DMD hoặc chưa sinh con. Trong 45 bà mẹ có con DMD, xác định 41 người mang gen bệnh (91,2%) trong đó có 1 người mang gen bệnh ở trạng thái khảm; 4 người không mang gen bệnh (8,9%). Trong 40 thành viên nữ không có tiền sử sinh con DMD có 11 người được chẩn đoán là người lành mang bệnh (27,5%) và 29 người được chẩn đoán không mang gen bệnh (72,5%). Trong 45 bà mẹ có tiền sử sinh con DMD, 17 người có thuộc các phả hệ gia đình có tiền sử bệnh rõ ràng đều được xác định là người lành mang gen bệnh; 28 người thuộc các phả hệ gia đình có tiền sử bệnh không rõ ràng xác định có 24 người mang gen bệnh (85,7%) và 4 người không mang gen bệnh (14,3%). Trong 31 dạng đột biến xác định được ở các thành

viên nữ có 20 dạng đột biến xoá đoạn (64,5%); 9 dạng đột biến điểm (29%); 2 dạng đột biến lặp đoạn (6,5%).

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

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

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

*** Xác định marker STR dị hợp tử và đồng hợp tử**

65 thành viên nữ thuộc 65 gia đình khác nhau được tiến hành xác định tình trạng dị hợp tử của 6 marker STR. Kết quả tỷ lệ dị hợp tử của các marker STR từ cao xuống thấp lần lượt là: DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907, DXS1036. Phân tích 6 marker STR, xác định có 38 alen với kích thước dao động từ 144bp đến 258bp. Tần suất dao động của các alen từ 0,00823 đến 0,49524. Marker DSTR49 có số alen nhiều nhất (14 alen). Marker DXS1036 có số alen thấp nhất (4 alen). 5 marker có số alen nhiều nhất cũng là 5 marker có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất: DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907. Khi khuếch đại 5 marker STR này ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh, tỷ lệ xuất hiện ít nhất 2/5 marker dị hợp tử là 97,76%.

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

Chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 51 thai nhi của 45 thai phụ (6 thai phụ mang thai 2 lần), xác định 10 thai nam mắc DMD (19,6%); 35 thai nam bình thường (68,6%), 2 thai nữ mang gen đột biến dị hợp tử (5,9%); 2 thai nữ bình thường (5,9%). Trong 10 thai

nam mắc DMD có 6 trường hợp đột biến xoá đoạn (60%), 2 trường hợp đột biến lặp đoạn (20%), 2 trường hợp đột biến điểm (20%). 9/10 thai phụ dính chỉ thai nghén (90%), 1 trường hợp quyết định giữ thai (10%).

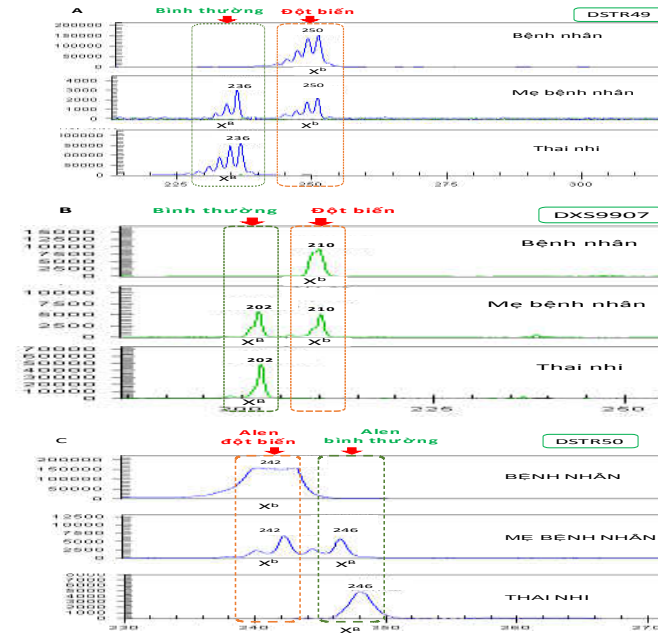
Không phát hiện trường hợp nào mắc các bất thường NST kèm theo. Không ghi nhận tai biến sảy thai sau thủ thuật chọc ối.

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

Chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho 44 thai nhi của 38 bà mẹ là người lành mang gen bệnh (6 thai phụ mang thai 2 lần). Các thai nhi được chẩn đoán giới tính từ DNA dịch ối, xác định có 3 thai nữ và 41 thai nam. 3 thai nữ của 3 thai phụ được xét nghiệm xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA, phát hiện 1 thai nữ mang gen đột biến dị hợp tử và 2 thai nữ bình thường. 41 thai nam của 35 thai phụ được xét nghiệm chẩn đoán bệnh DMD, kết quả xác định 10 thai nam bị DMD, 31 thai nam bình thường.

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

Thai phụ DMD.31 có hai con trai bị DMD, được xác định là người lành mang gen bệnh qua phân tích phả hệ nhưng lại không phát hiện được đột biến ở thai phụ và con trai mắc bệnh bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen. Thai phụ mang thai lần 3, do không xác định được đột biến ở người bệnh DMD và thai phụ nên thai nhi chỉ có thể được chẩn đoán trước sinh DMD bằng kỹ thuật Microsatellite DNA. Khuếch đại 5 marker STR có tỷ lệ dị hợp cao nhất đã tìm được qua nghiên cứu, xác định 3 marker dị hợp tử ở thai phụ là DXS9907, DSTR50, DSTR49.



Hình 3.4. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ DMD.31 bằng kỹ thuật Microsatellite DNA

Phân tích hình ảnh STR của marker DSTR49 (hình A), người bệnh DMD chỉ xuất hiện 1 đỉnh kích thước 250bp tương ứng 1 alen trên NST X (X^bY). Thai phụ xuất hiện 2 đỉnh kích thước 250bp và 236bp tương ứng 2 alen trên 2 NST X (X^BX^b). Đỉnh alen kích thước 250bp của thai phụ trùng khớp với đỉnh alen của con trai bị DMD, do đó alen 250bp là alen bệnh, alen 236bp là alen bình thường. Phân tích tương tự với marker DXS9907 (hình B), xác định alen 210bp là alen bệnh, alen 202bp là alen bình thường. Với marker DSTR50 (hình C), alen 242bp là alen bệnh, alen 246bp alen bình thường. Phân tích mẫu ối cho thấy thai nhi nhận các alen bình thường từ mẹ ở cả 3 marker, chẩn đoán thai nhi không mắc DMD.

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

7 thai phụ có tiền sử sinh 1 con trai mắc DMD nhưng xét nghiệm chẩn đoán người mang gen (MLPA, giải trình tự gen) không tìm thấy đột biến từ DNA mẫu máu, do đó thai phụ có thể mang gen đột biến thể khảm hoặc con trai thai phụ mang đột biến mới. Kết quả chẩn đoán trước sinh xác định 4 thai nam đều không mắc DMD (57,1%), 3 thai nữ trong đó có 2 thai nữ mang gen đột biến dị hợp tử (28,6%) và 1 thai nữ bình thường (14,3%). 7 trường hợp đều được tư vấn giữ thai.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

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

Xác định được 52 người lành mang gen bệnh có ý nghĩa lớn trong tư vấn di truyền. Tại Việt Nam, nhiều gia đình vẫn còn chưa hiểu rõ về cơ chế di truyền của bệnh DMD. Trong các phả hệ gia đình đã có người mắc DMD, 1 số thành viên nữ sau khi sinh được một con trai khoẻ mạnh lại thường không xét nghiệm tình trạng mang gen đột biến cho mình dẫn đến không biết mình là người lành mang gen và sinh con mắc DMD ở những lần sinh sau. Chính vì vậy, việc xác định người lành mang gen là hết sức quan trọng và cần được tiến hành đối với tất cả các thành viên nữ trong phả hệ gia đình có người bệnh DMD. 17 bà mẹ được xác định là người lành mang gen bệnh bằng phân tích phả hệ trong nghiên cứu đều được xác định là người mang gen đột biến dị hợp tử. Từ đó cho thấy phương pháp phân tích phả hệ là một phương pháp có thể được sử dụng ở những nơi chưa có điều kiện thực hiện các kỹ thuật di truyền hay khi gia đình người bệnh không có điều kiện kinh tế, tuy nhiên chỉ có thể sử dụng trong các phả hệ có tiền sử bệnh rõ ràng mà không thể áp dụng được với tất cả các thành viên nữ trong phả hệ. Nghiên cứu xác định được 31

dạng đột biến trong 52 người lành mang gen bệnh, trong đó đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất (64,4%); đột biến điểm chiếm tỷ lệ 29% và đột biến lặp đoạn chiếm tỷ lệ 6,5%. Tỷ lệ các dạng đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với các nghiên cứu khác trên thế giới như nghiên cứu của tác giả Zimowski, tác giả Wang, tác giả Cho A,...

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

Theo tác giả Lai, tác giả Hwa thì chiều cao đỉnh tín hiệu ở người nữ giảm 35-50% thì được xác định là mang gen bị đột biến dị hợp tử xoá đoạn exon tương ứng. Trong nghiên cứu chúng tôi cũng nhận thấy chiều cao đỉnh tín hiệu tại các exon đột biến xoá đoạn giảm > 35% so với mẫu chứng. Đây là một phả hệ gia đình lớn với 7 người bệnh DMD ở 3 thế hệ, cho thấy mặc dù gia đình đã có con trai bị DMD nhưng các thành viên nữ trong gia đình chưa được tư vấn cũng như chưa hiểu rõ về khả năng di truyền của bệnh dẫn đến vẫn sinh con mắc DMD ở thế hệ thứ 2, thậm chí là thứ 3. Trong 13 thành viên nữ được xét nghiệm gen xác định 10 người mang gen đột biến dị hợp tử (76,9%). Sự lan truyền gen bệnh cho thế hệ sau trong phả hệ là khá cao. Nếu không phát hiện người lành mang gen bệnh, tư vấn chẩn đoán trước sinh thì số người bệnh DMD trong phả hệ sẽ tăng lên nhanh chóng.

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

Thành viên nữ D.81 là người lành mang gen bệnh ở thể khảm. Hiện nay nếu không xác định được đột biến ở mẹ người bệnh thì đột biến ở người bệnh DMD được kết luận là đột biến mới. Tuy nhiên một số nghiên cứu đã chỉ ra hiện tượng khảm dẫn đến thay đổi trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh cũng như trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD. Chẩn đoán trước sinh DMD cần được tư vấn không chỉ với các bà mẹ là người lành mang gen bệnh mà cần được tư vấn ở tất cả các bà mẹ đã có tiền sử sinh con DMD.

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

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

Hiện nay ở Việt Nam có 13 marker STR được sử dụng trong chẩn đoán trước sinh DMD bao gồm 12 marker của gen Dystrophin và 1 marker xác định giới tính. Mỗi thai phụ cần được lựa chọn ít nhất 2 marker dị hợp tử trong 12 marker do nếu xảy ra tình trạng khuếch đại thất bại 1 marker thì có thể phân tích kết quả của các marker còn lại. Qua nghiên cứu chúng tôi nhận thấy 5 marker STR có tỷ lệ dị hợp tử cao nhất bao gồm: DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907. Tỷ lệ khuếch đại được ít nhất 2/5 marker STR dị hợp tử là 97,76%. Như vậy sử dụng 5 marker STR này thay vì 12 marker STR như hiện nay sẽ giúp giảm chi phí và thời gian xét nghiệm. Kết quả này còn có ý nghĩa lớn ứng dụng trong chẩn đoán tiền lâm tổ bệnh DMD.

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

Hiện nay, hai phương pháp lấy mẫu bệnh phẩm là sinh thiết gai rau và chọc ối thường được thực hiện để chẩn đoán trước. Sinh thiết gai rau được khuyến cáo thực hiện ở tuổi thai sớm hơn chọc hút nước ối (10 tuần-12 tuần 6 ngày), tuy nhiên theo nhiều nghiên cứu mặc dù sinh thiết gai rau có thể giúp chẩn đoán bệnh cho thai nhi ở tuổi thai nhỏ nhưng tỷ lệ sảy thai và tỷ lệ nuôi cấy thất bại lại cao hơn chọc ối. Trong nghiên cứu, chúng tôi không ghi nhận trường hợp nào sảy thai sau chọc ối. Theo nhiều nghiên cứu công bố, phần lớn kim chọc ối được sử dụng là kim chọc dò tủy sống 20-G hoặc 22-G. Tuy nhiên một số tác giả trên thế giới đã công bố kết quả chọc ối với kích thước kim nhỏ hơn và kết luận sử dụng kim kích thước nhỏ sẽ làm giảm tai biến sau thủ thuật. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng kim chọc ối kích thước 27-G. Việc sử dụng kim nhỏ sẽ làm giảm nguy cơ

tai biến, tuy nhiên để kết luận vẫn cần những nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn.

Trong các đột biến ở 10 thai nam DMD, đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất với 6 trường hợp. Kết quả nghiên cứu tương đồng với kết quả của tác giả Li (2009), Giliberto (2011), Wang (2017), khi xác định đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất.

Trong kết quả ở mục tiêu 1, chúng tôi xác định 1 trường hợp mẹ người bệnh DMD có đột biến ở thể khảm. Mặc dù hiện tượng khảm xảy ra với tỷ lệ rất thấp, tuy nhiên vẫn cần được lưu ý trong tư vấn chẩn đoán trước sinh. Chẩn đoán trước sinh DMD cần được tư vấn ở cả các thai phụ có tiền sử sinh con DMD cho dù không xác định thấy đột biến từ DNA mẫu máu. Trong nghiên cứu, chúng tôi ứng dụng thành công kỹ thuật chẩn đoán đột biến gián tiếp Microsatellite dựa vào xác định alen đột biến để chẩn đoán trước sinh DMD cho tất cả các dạng đột biến bao gồm đột biến xoá đoạn, lặp đoạn và đột biến điểm. Ngoài ra, trong nghiên cứu có một trường hợp không xác định được đột biến chỉ điểm ở thai phụ và người bệnh DMD và kỹ thuật Microsatellite DNA là kỹ thuật duy nhất có thể được ứng dụng để chẩn đoán trước sinh với trường hợp này. Hơn nữa với giá thành thấp, kỹ thuật Microsatellite DNA giúp giảm gánh nặng kinh tế cho người bệnh và thời gian trả kết quả nhanh hơn đã đáp ứng được yêu cầu về thời gian của chẩn đoán trước sinh. Kỹ thuật Microsatellite DNA có thể phát hiện được tình trạng lẫn tế bào máu mẹ trong dịch ối, một trong các vấn đề gây ảnh hưởng tới kết quả chẩn đoán của các kỹ thuật di truyền phân tử khác hiện nay. Dystrophin là một trong những gen lớn nhất cơ thể, vì vậy việc xác định đột biến gặp nhiều khó khăn do nhiều trường hợp không thể xác định được đột biến ở người bệnh DMD hay mẹ người bệnh. Đây là một thách thức với chẩn đoán trước sinh khi xác định đột biến chỉ điểm là bước đầu tiên của quá trình chẩn đoán trước sinh. Trong nghiên cứu chúng tôi cũng ghi nhận một trường hợp tương tự là thai

phụ DMD.31 khi thai phụ có 2 con trai được chẩn đoán mắc DMD tuy nhiên không xác định được đột biến ở người bệnh cũng như thai phụ. Trong trường hợp này, Microsatellite DNA là lựa chọn duy nhất để chẩn đoán trước sinh DMD cho thai nhi. Hơn nữa, trong điều kiện tại Việt Nam còn nhiều gia đình người bệnh không có điều kiện kinh tế để chi trả cho các xét nghiệm chẩn đoán gen, đặc biệt kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm. Trong trường hợp này, chẩn đoán trước sinh bằng Microsatellite có thể được thực hiện mà không cần xác định trước đột biến ở thai phụ cũng như con trai mắc DMD dựa vào các trình tự lặp lại ngắn STR có tính đa hình cao, thông qua việc xác định alen đột biến và sự di truyền của các alen này từ thai phụ cho thai nhi. Tỷ lệ tiếp tục sinh con mắc DMD ở các bà mẹ không mang gen bệnh đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu mà nguyên nhân có thể do tình trạng khảm. Vì vậy các bà mẹ có con mắc DMD luôn cần được tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho thai nhi cho dù thai phụ có hay không mang gen đột biến dị hợp tử.

KẾT LUẬN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KHUYẾN NGHỊ

Qua nghiên cứu này chúng tôi xin khuyến nghị:

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

THE THESIS INTRODUCTION

1. Background

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common neuromuscular disease with a frequency of 1/3600 male infants caused by X-linked mutations in the dystrophin gene. The carriers are capable of transmitting mutation genes and causing DMD in sons with a rate of 50%. The patients suffer from proximal-to-distal and progressive muscular weakness and degeneration, pseudo-hypertrophy (i.e., enlarged calve muscles), and cognitive impairment. While newborn patients rarely exhibit any symptom, they quickly develop muscle weakness at the age of learning to walk, face difficulties in running and climbing stairs, and become wheelchair-dependent at the age of 12. DMD patients have short life expectancy (i.e., about 20 years) due to further complications such as respiratory failure and cardiac disease. Since reliable treatments for DMD are not yet available, prenatal testing is the primary tool to reduce the disease incidence. Because Dystrophin is a large size gene, in some cases, it is impossible to identify point mutations in patients or pregnant women, some families do not have financial conditions to do diagnostic tests for mutations. Prenatal diagnosis by direct mutation diagnosis techniques is still difficult. Microsatellite technique has promised to bring high efficiency in DMD prenatal diagnosis when it can be applied to all types of Dystrophin gene mutations with fast response time (after 48 -72 hours) and low cost. For this reason, the study: "**Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by Microsatellite technique**" was conducted with two aims:

1. *Detecting carriers of Duchenne muscular dystrophy gene by MLPA technique.*
2. *Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy for fetus of carriers by Microsatellite DNA technique.*

2. The topicality of the thesis

The thesis was carried out when DMD disease is still a genetic disease with high frequency in neuromuscular disease group and there is no treatment. DMD prenatal diagnosis techniques are currently only implemented in some large medical facilities in Vietnam and the identification of Dystrophin gene mutations remains difficult due to large gene size and high cost of current molecular genes test. Microsatellite technique is a technique to identify indirect mutations, capable of diagnosing DMD for the fetus when the mother has deletion, duplication or point mutation. Particularly, this technique is the only one that can be applied in prenatal diagnosis whether the mother cannot be identified mutation. Microsatellite is a simple technique with lower cost than others. Therefore, it is necessary to identify carriers and apply Microsatellite technique in the DMD prenatal diagnosis.

3. Scientific contributions of the thesis

- This is the first scientific study in Vietnam on prenatal diagnosis of DMD by Microsatellite technique.
- The research has shown that identifying carriers and genetic counseling for all female members of DMD patient pedigree is essential. Through the identification of cases of mosaic mutations,

the study has shown that genetic counseling is still needed for female members in pedigree even if no mutations are found from the blood sample. The study identified carriers for 85 female members, and 52 people had mutated heterozygous mutations (61%) and 33 did not carry mutant genes (39%).

- The research has successfully applied Microsatellite technique in prenatal diagnosis of DMD, giving similar results to direct mutation diagnosis techniques; and showed that Microsatellite is a technique with many advantages in prenatal diagnosis of DMD.

4. Thesis structure

The thesis has 136 pages, including: background and research objectives (2 pages), literature review (34 pages), subjects and study methods (15 pages), results (52 pages), discussions (31 pages), conclusions (1 page) and recommendations (1 page). The thesis has 14 tables, 61 image entries. The thesis has 125 references including 6 Vietnamese references and 119 English references, 77 documents in the last 10 years.

CHAPTER 1: LITERATURE REVIEW

1.1. History of Duchenne muscular dystrophy

Duchenne muscular dystrophy (DMD) was first described in 1852 by Edward Meryon. In 1861, Guillaume Duchenne applied electric current to stimulate muscles in the treatment of muscular dystrophy. In 1879, Gowers described DMD disease in 220 patients. In 1981, Zatz discovered Dystrophin gene located in Xp21 position. In 1993, the Dystrophin gene structure was fully described. In 1989,

glucocorticoids were first introduced into DMD treatment. In 1990, DMD treatment gene therapy was performed on mdx mice. In 1999, stem cell therapy was studied. In 2003, research on DMD gene therapy used a short non-coding nucleotide sequence and in 2008, this therapy was applied to patients.

1.2. Clinical, para-clinical manifestations and treatment of DMD

1.2.1. Clinical symptoms

Movement symptoms: progressive muscle weakness from near to far.

The symptoms of muscle weakness appear obviously when the child start learning to walk. The patient loses the ability to walk at the age of 12 and dies at the age of 20 due to cardiovascular and respiratory diseases.

Symptoms in other organs: Mild Delayed intellectual development, cardiovascular diseases.

1.2.2. Laboratory testing

Creatine Kinase (CK): CK levels increase at least 40 times immediately after birth, before clinical symptoms appear.

Muscle biopsy: Muscle biopsy shows images of muscle cells degenerating or atrophy, and hypertrophy of connective tissue around the muscle tissue. The fluorescent immune response does not see Dystrophin protein on the surface of muscle cells.

Electro-myo-physiological exploration: not specific for DMD.

Genetic testing for Dystrophin gene mutation: PCR for detection of deletions. MLPA technique detects deletion, duplication. Sequencing to identify point mutations.

Other tests: Evaluation of cardiovascular function, pulmonary X-rays, ... assessing the general condition of patients.

1.2.3. Treatment and prevention

Currently, there is no specific treatment, only treating the complications and improving the patient quality of life.

** Medical treatment*

Corticosteroids: help reduce muscle necrosis, improve muscle strength and function.

Control of cardiovascular and respiratory complications

** Physiotherapy and rehabilitation:* help reduce the muscle spasticity, strengthen muscle strength.

** Nutrition:* Ensure good nutrition and weight control, avoid obesity.

** Gene therapy:* Use the vectors to insert short segments of non-coding nucleotides to bypass some exons during translation to restore the open reading frame in the mutated Dystrophin gene.

** Cell therapy:* transplant of muscle cells which are cultured in the laboratory from mature muscles of healthy relatives to replace pathological muscle cells.

** Prevention:* Detecting carriers, genetic counseling, prenatal diagnosis, preimplantation genetic diagnosis of DMD.

1.3. Genetic mechanism of Duchenne muscular dystrophy

1.3.1. Genetic mechanism: caused by X-linked mutations in the dystrophin gene. Carrier will transmit the mutation gene to her baby and cause the disease to 50% of her son.

1.3.2. Dystrophin gene structure: Dystrophin gene located on X chromosome, short branch, region 2, band 1, secondary band 2, longer than 2000kb including 79 exons.

1.3.3. Dystrophin protein structure and function

Dystrophin protein structure: including 3685 amino acids, rod shape consists of four parts: the cysteine area, C-take, N-take, center rod.

Dystrophin Protein function: protects membrane stability of muscle cells. Dystrophin deficiency leads to muscle cell necrosis.

1.3.4. Dystrophin gene mutations

** Deletion:* 60-65% of mutations, mainly concentrated in the two regions "hot spot" which are the central region and the 5' end region of the gene.

** Duplication:* 5-10% of mutations.

* *Point mutation*: 25% -30%, appears scattered at all length of the gene.

1.4. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy

1.4.1. Invasive procedures

* *Amniocentesis*: proceed through the abdomen under the guidance of ultrasound. Complications include miscarriage: 0.1-1%; amniotic fluid leakage: 1-2%; infection,...

* *Chorionic villus sampling*: done at 10-13 weeks, through the cervix or through the abdomen. Complications include miscarriage, amniotic fluid leakage and infection (> 1%).

* *Umbilical cord blood sampling, fetal tissue biopsy*

1.4.2. Genetic techniques used in prenatal diagnosis of DMD

1.4.2.1. Direct mutation detection techniques

* *Sequencing*: Use 4 fluorescent colors to mark 4 types of ddNTP, using capillary electrophoresis system.

* New Generation Sequencing

* *Southern Blotting*: DNA molecule is cut into small sections, electrophoresis on agarose agar and hybridize with specific oligonucleotides with radioactive or fluorescent markers.

* *PCR*: PCR single primer, multi-primer PCR, PCR cage, PCR reverse-copy.

* *FISH*: Use DNA detector with radioisotope or chemical isotope to detect target DNA on cell chromosomes in interstitial period or in the middle period, gene mutations detected by fluorescence microscopy.

* *MLPA*: investigate all 79 exons, preferably selected in the diagnosis of Dystrophin gene mutation and detect carriers.

1.4.2.2. Indirect mutation detection techniques: Microsatellite technique

Microsatellite was developed based on standard PCR techniques, using fluorescent primers and gene sequencing machines to identify PCR products. Techniques based on polymorphic information of short target repeats (STR). The technique has a very high sensitivity, 1000 times higher than conventional gel analysis, allowing very weak signals to be detected.

1.4.3. Preimplantation genetic diagnosis of Duchenne muscular dystrophy

Preimplantation genetic diagnosis helps identify embryos that don't carry mutations and transfer into the uterus.

1.5. Research of Duchenne muscular dystrophy

1.5.1. In the world

DMD disease has been studied for many years in the world. In 2005 Thomas W.Prio developed a genetic mutation map based on 361 DMD patients. In 2006, Lai KK applied MLPA technique to detect

mutations in DMD / BMD patients and women with disease genes. In 2009, Li combined MLPA and Multiplex PCR techniques to diagnose DMD. In 2011, Giliberto diagnosed DMD disease by combining Multiplex PCR and STR analysis (Microsatellite). In 2013, Li applied MLPA technique in prenatal diagnosis of DMD.

1.5.2. In Viet Nam

DMD disease was first reported in Vietnam in 1991 by Nguyen Thu Nhan with 131 patients in 107 families. In 2004, Tran Van Khanh identified Dystrophin gene mutations in 85 patients with DMD and BMD in Vietnam by PCR. In 2009, Nguyen Khac Han Hoan used MLPA technique to detect mutation of Dystrophin gene in 11 patients with DMD disease. In 2016, Tran Van Khanh applied Microsatellite technique in preimplantation genetic diagnosis of DMD for 3 families.

CHAPTER 2: SUBJECTS - RESEARCH METHODS

2.1. Research subjects

2.1.1. Sample size: target sampling

- Objective 1: expected sample size of 50 female members.
- Objective 2: expected sample size of 30 pregnant women.

2.1.2. Sample selection criteria

- Objective 1: Female members in DMD pedigree. These include: grandmother, mother, aunt, sister, cousins (daughter of aunt), niece (sister's daughter) of DMD patients.
- Objective 2: Pregnant women 17-25 weeks of gestation, identified as carriers or have DMD sons and would like to have a DMD prenatal diagnosed

2.2. Research facilities

2.2.1. Tool

Amniocentesis procedure tools, Beckman CEQ-8000 sequencing system, Thermo Electron Corporation spectrometer of Biomate, Beckman (USA) centrifuge, Eppendorf desktop centrifuge, incubators, pipettes, taper heads, Falcol tubes, clean gauges.

2.2.2. Chemistry

Chemical extracted DNA, chemicals for MLPA reaction, chemical for the sequence of genes and chemical for Microsatellite reaction.

Table 2.1. Markers STR used in research

STR	Vị trí	Mỗi xuôi	Mỗi người
DXS8090	Intron 1	GGGTGAAATTCATCAAAA	ACAAATGCAGATGTACAAAAAATA
DXS9907	Intron 45	CTGTGGTGTAAAGTTCGCTT	TAGACTTGACCTCATGGGCT
STR49	Intron 49	CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC	CATATGATACGATTCTGTTTTGC
DXS1067	Intron 50	TATGTCCTCAGACTATTCAGATGCC	CCTCCAGTAACAGATTGGGTG
STR50	Intron 50	AAGGTTCTCCAGTAACAGATTGG	TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC
DXS1036	Intron 51	TGCAGTTTATTATGTTCCACG	GCCATTGATAAGTCCAGAT

2.3. Research method: Descriptive cross-sectional study.

2.3.1. Research contents

2.3.1.1. Detecting carriers

- Analysis family pedigree of DMD patients:
 - Family pedigree has a clear history when there are at least 2 DMD patients.
 - Family pedigree have an unclear medical history when there is only one DMD patients.
- Extract DNA from blood samples of female members.
- Identify carriers by MLPA, sequencing technique.
- Genetic counseling for female members after results are available.

2.3.1.2. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by Microsatellite DNA technique

** Identify heterozygous STR markers*

Identify STR markers with the highest rate of heterozygotes from 6 markers.

**Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by Microsatellite DNA technique:* Pregnant women are sampled the amniotic fluid via amniocentesis for prenatal diagnosis of DMD by Microsatellite technique and collated with the results of another molecular genetic technique. Karyotyping is performed to diagnose the associated chromosomal abnormalities.

2.3.2. Location, time of study

- Research location: Gen-Protein Research Center, Hanoi Medical University, Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital.
- Research period: from January 2015 to December 2018

2.3.3. Technical process

2.3.3.1. The process of detecting carriers

- a. Sampling procedure:* 5ml of venous blood anticoagulant by EDTA.
- b. DNA extraction procedure:* EDTA blood-clotting blood needs to be separated in 24 hours, centrifuged, collected residue, DNA precipitated and checked for purity by optical density measurement method at wavelength of 260/280 nm.
- c. Spectrophotometer method:* Thermo Electron Corporation

d. *MLPA technical process*: 4 stages including denaturation of DNA

hybrids reactions, linking reactions, PCR amplification reactions. Results were analyzed on CEQ8000- Beckman Coulter

e. *Sequencing process*: PCR products after being amplified by specific primers will be used as materials for gene sequencing. Electrophoresis of PCR products solves the Dystrophin gene sequence using the ABI Prism 3100 sequencing system.

2.3.3.2. Prenatal diagnosis of DMD process

a. *Amniocentesis procedure*: carried out at 17-25 weeks of gestation, through the abdominal wall under the guidance of ultrasound. Using Needle Amplitude Gauge 27.

b. *Technical process for Microsatellite DNA*: carried out on DNA samples of fetus (from amniotic fluid), pregnant women and DMD patients respectively.

* *DNA extraction of amniotic cells, pregnant women's blood cells and DMD patients*: Use phenol-chloroform method.

* *Sex determination*: Amel marker and SRY marker

* *Identify STR heterozygous marker*

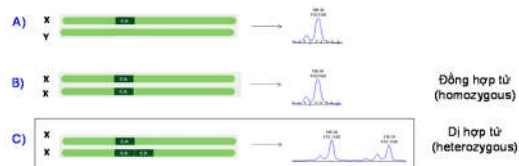


Figure 2.1. Identify STR heterozygous marker

- Male: capillary electrophoresis product will only give one peak (A)

- Female: capillary electrophoresis for 1 peak if the copper STR area zygote (B) and for 2 peaks if the STR heterozygous region (C)

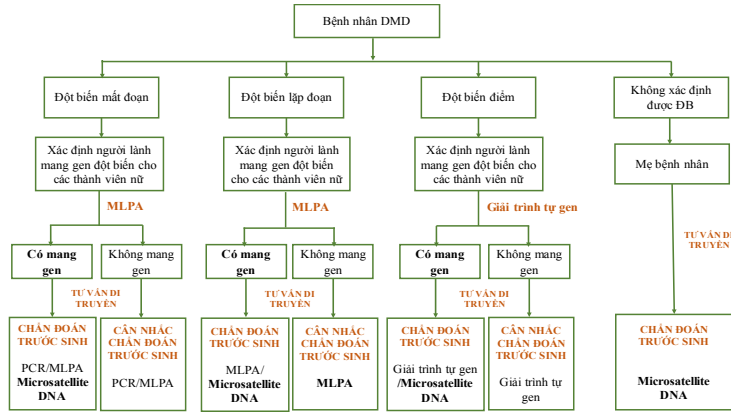
- Heterozygous STR marker will be selected in prenatal diagnosis.

* *Determining pathological alleles*: Primers are designed on X chromosomes. In each STR region, the mother (XX) has 2 peaks corresponding to 2 alleles, the son (XY) has 1 peak corresponding to 1 allele. Comparing the results of each marker between mother and DMD son will determine the disease allele when the allele appears in both the mother and the affected son.

2.3.4. The process of karyotyping

Cultivation by open method of incubator warm, staining G.

2.3.5. Research diagram



2.4. Ethical issues in research

Families with DMD male members were included in the study when agreeing to voluntarily participate. Patients and family members will be consulted and explained in detail about the purpose, research process, the right to freedom to withdraw from the study, to ensure personal secrets and research results. Information of the patient, family members and the diagnosis is completely confidential.

CHAPTER 3: RESEARCH RESULTS

3.1. Results of detection of carriers

Identify carrier for 85 female family members of 35 DMD patients.

3.1.1. Detection of DMD gene carriers by MLPA technique

MLPA technique is used to identify carriers for 66 female members of 25 families of DMD patients who have deletion and duplication mutations. The results identified 40 (60.6%) people with mutated heterozygous and 26 (39.4%) who did not carry the mutant gene.

There are 22 deletion and duplications in 40 female members who are carriers. 20/22 mutations are deletions (90.9%); 2/22 mutations are duplications (9.1%). Mutations occur in one or more exons, concentrated in the 5' region and the central region, with some large mutations extending from the 5' region to the central region.

The results of carriers in DMD patients have a deletion mutation in the 5' area

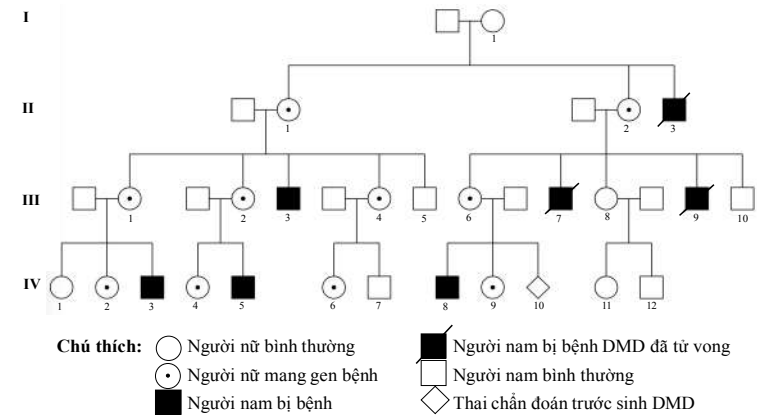


Figure 3.1. Family tree of patients D.10

This is a pedigree with a clear history with 7 DMD patients. Identify gene mutation for female members in the pedigree by MLPA.

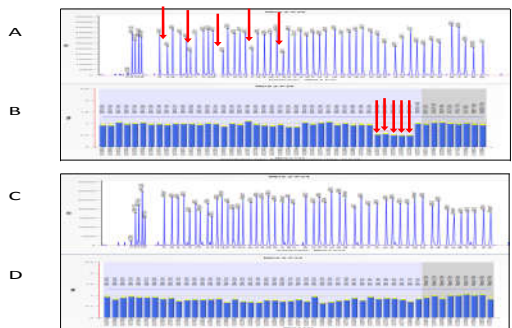


Figure 3.2. MLPA results of female member II₁ (AB) and IV₁ (CD)

Female member II₁ (Figure A-B): 11-15 exons (Figure A) have lower peak heights than normal samples. Ratio of RPA of exon 11-15 (Figure B) <0.5 while other exons fluctuate around 1. Identified II₁ carries a heterozygous mutation gene. Female member IV₁ (Figure CD): The RPA ratio in 11-15 exons (Figure D) fluctuates around 1. Identified IV₁ does not carry a mutant gene. The same analysis identified 4 people with mutant heterozygous genes and 10 people do not carry the mutant gene.

3.1.2. The results of identifying gene carriers by gene sequencing technique

The sequencing identified gene carriers for 19 female members in 10 families of DMD patients with point mutations. There are 12 carriers (63.2%); 7 people do not carry mutant genes (36.8%). There are 9 types of point mutations identified in 12 female members, most of them concentrated in exon. The majority of mutations are

stop codon (6/9 mutations); 3/9 forms of mutations are frameshift mutation.

*** The results of identifying gene carriers in families of DMD with point mutations deleted 2 nucleotides**

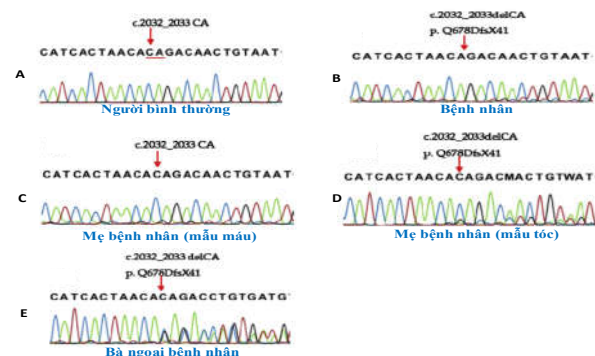


Figure 3.4. Sequencing result of the family D.81

Family of patients D.81 has 2 DMD patients with a point mutation that deleted 2 nucleotides CA at the position 2032_2033 on exon 17 Dystrophin genes, change the CAG codon encoded Glutamine to GAC codon encoded Aspartate, causing deviation of the code translation frame creates the stop codon. Female member II₂ was identified as the obligated carrier by pedigree analysis, but the sequencing results from the DNA sample did not detect the mutation (Figure C). The Sequencing detected mutation from DNA hair samples (Figure D). Because no mutations were detected from blood samples but detected from hair sample, so it was determined that female II₂ were mosaicism. The grandmother of a DMD patient

(I₁) was identified as a carrier because the sequencing results appeared overlapping peaks from point mutation c.2032_2033 (Figure E).

3.1.3. The results of determining carriers

The study identified carriers for 85 female members: 52/85 carriers (61%), 33/85 people did not carry the mutant genes (39%). Among 85 female members, 45 mothers had DMD son, 40 did not have DMD son or have not gave birth. In 45 mothers who have DMD son, 41 carried the mutant gene (91.2%), of which 1 was mosaicism; 4 people did not carry the mutant gene (8.9%). Among 40 female members didn't have DMD son, 11 were diagnosed as carriers (27.5%) and 29 were diagnosed with no mutant gene carriers (72.5%). Among 45 mothers have DMD son, 17 people belonging to pedigrees with a clear medical history were identified as carriers; 28 people from pedigrees with an unspecified history in which were identified 24 carriers (85.7 %) and 4 who did not carry the mutant gene (14.3 %). In 31 mutant forms identified in female members, there were 20 deletions (64.5%); 9 point mutations (29%); 2 duplications (6.5%).

3.2. Results of prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by Microsatellite DNA technique

3.2.1. The results confirmed heterozygous STR markers for Dystrophin gene by Microsatellite DNA technique

6 STR markers (DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907, DXS1036) of the Dystrophin gene were analyzed to determine

heterozygous status, thereby finding STR markers with high heterozygosity, applications in prenatal diagnosis of DMD.

*** Identify STR markers that are heterozygous and homozygous**

65 female members of 65 different families were identified the heterozygosity of 6 STR markers. The results of heterozygosity of STR markers from high to low are: DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907, DXS1036. Analyzing 6 STR markers, identified 38 alleles with dimensions ranging from 144bp to 258bp. The frequency of alleles varies from 0.00823 to 0.49524. The DSTR49 marker has the most allele number (14 alleles). Marker DXS1036 has the lowest allele number (4 alleles). 5 markers with the highest number of alleles are also 5 markers with the highest rate of heterozygosity: DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907. Amplifying 5 STR markers and used in prenatal diagnosis, the rate of at least 2/5 heterozygous markers is 97.76%.

3.2.2. Results of prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by Microsatellite DNA technique

Prenatal diagnosis of DMD for 51 fetuses of 45 pregnant women (6 women were pregnant 2 times), identified 10 DMD male fetuses (19.6%); 35 normal male fetuses (68.6%), 2 female fetuses carried heterozygous mutation genes (5.9%); 2 normal female fetuses (5.9%). In 10 male fetuses with DMD, there were 6 cases of deletion (60%), 2 cases of duplications (20%), and 2 cases of point mutation (20%). 9/10 pregnant women decided pregnancy determination (90%), 1 case decided to continue pregnancy (10%).

No cases of associated chromosomal abnormalities were detected.

No miscarriage occurred after amniocentesis.

3.2.2.1. Results of prenatal diagnosis of DMD for pregnant carriers

Prenatal diagnosis of DMD for 44 fetuses of 38 mothers who are carriers. The sexuality of fetus is diagnosed from amniotic fluid, identified 3 female and 41 male fetuses. 3 female fetuses were diagnosis for carriers by MLPA technique, identified 1 female fetus with mutant heterozygous and 2 normal female fetuses. 41 male fetuses of 35 pregnant women were diagnosis for DMD, and determined 10 DMD male fetuses, 31 normal male fetuses.

The results of prenatal diagnosis of DMD for carriers who are unable to be identified mutations

Pregnant woman DMD.31 has two sons with DMD, identified as a obligated carrier through pedigree analysis but was failed to detect mutations in her and her DMD boys by MLPA and sequencing technique. She's pregnant for the third time, due to unidentified DMD mutations, her fetus can only be diagnosed by Microsatellite DNA technique. Amplification 5 STR markers with the highest rate of heterozygosity were found in the study, identified 3 heterozygous markers in this pregnant woman: DXS9907, DSTR50, DSTR49.

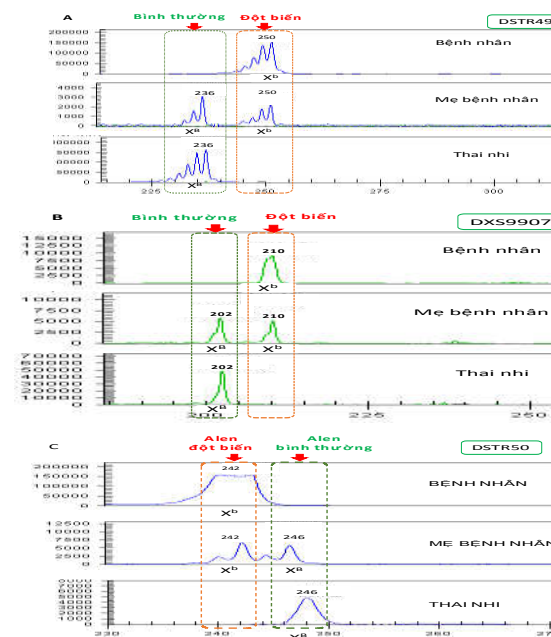


Figure 3.5. Results of DMD prenatal diagnosis of pregnant women DMD.31 by Microsatellite DNA

STR analysis of DSTR49 marker (Figure A), DMD patients appear only one peak of 250bp corresponding to one allele on X chromosome (X^bY). The pregnant women appear two peak of 250bp and 236bp respectively corresponding to 2 alleles on two X chromosome ($X^B X^b$). The allele peak 250bp of the pregnant women coincides with the allele peaks of her DMD son, so the 250bp allele is the mutant allele, 236bp allele is a normal allele. Similar analysis with DXS9907 marker (Figure B), determining the 210bp allele as the mutant allele, allele 202bp is the normal allele. With the marker

DSTR50 (figure C), the 242bp allele is mutant allele, the 246bp allele is normal allele. Analysis amniotic fluid showed that the fetus received normal alleles from the mother of all three markers, the fetus was diagnosed as normal.

3.2.2.2. Result of prenatal diagnosis of DMD for pregnant women who do not carry mutant genes

7 pregnant women had a DMD son but were not found mutations from DNA blood samples, these woman could carry the mosaic mutation or her son had new mutations. The results of prenatal diagnosis determined that 4 male fetuses did not have DMD (57.1%), 3 female fetuses, 2 of which were heterozygous (28.6%) and 1 normal female fetus (14.3%). 7 cases were advised to continue pregnancy.

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.1. Detection carriers of Duchenne muscular dystrophy

Identifying 52 carriers contribute a great significance in genetic counseling. In Vietnam, many families still do not understand the genetic mechanism of DMD disease. Therefore, identifying these carriers is very important and needs to be done for all woman of the DMD patient family. 17 mothers identified as carriers by pedigree analysis in the study were also identified as carriers by genetic molecular techniques. Since then, the pedigree analysis method can be used in places where genetic molecular technique is not yet available. But this method only can be used in pedigree with a clear history, it cannot be applied for all female member of the

pedigree. The study identified 31 mutations in 52 carriers, in which deletion mutations accounted for the highest proportion (64.4%); point mutations accounted for 29% and duplications accounted for 6.5%. The proportion of mutations in our study is similar to other studies in the world, such as the study of Zimowski, Wang, Cho A, ...

Carriers status result of the pedigree D.10

According to Lai and Hwa, if the peak height in women decreased by 35-50%, it would be determined that the woman carry the heterozygous deletion mutation to the corresponding exon. In the study, we also found that the peak height of the exon deletion was decreased more than 35% compared to the control sample. This is a large family with 7 DMD patients in 3 generations, indicating that although the family has a son with DMD but the female members of the family have not been consulted nor understand the genetic possibility of the disease and still had a baby with DMD in the 2nd, even 3rd generation. Among 13 female members are done genetic tests, 10 people we carried the mutant gene (76.9%). The spread of mutant genes to the next generation in the pedigree is quite high. Without detecting carriers, counseling on prenatal diagnosis, the number of people with DMD in pedigree will increase rapidly.

Carriers status result of the pedigree D.81

Female member D.81 is a mosaic carrier. Currently, if cannot identify the mutation of the DMD mother, mutations in DMD patients are concluded as new mutations. However, some studies have shown the mosaicism leads to changes in the diagnosis of carriers as well as

in prenatal diagnosis of DMD. Prenatal diagnosis of DMD should be consulted not only to carriers but also need to be consulted to every woman who have a DMD son.

4.2. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by Microsatellite DNA technique

4.2.1. Identify heterozygous STR markers of Dystrophin gene by Microsatellite DNA technique

Currently in Vietnam, there are 13 STR markers be used in prenatal diagnosis of DMD including 12 markers of Dystrophin gene and 1 marker of sex chromosome. Each pregnant woman need to be found at least 2 heterozygous markers in 12 STR markers in case one markers fails, other can be analyzed to get the result. We found that 5 STR markers with the highest rate of heterozygosity including: DSTR49, DXS890, DTSR50, DXS1067, DXS9907. The proportion of amplification at least 2/5 heterozygous marker STR is 97.76%. Thus, using these 5 STR markers instead of 12 STR markers will help to reduce the cost and time of technique. This result also has a great significance for implication of preimplantation genetic diagnosis of DMD.

4.2.2. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by Microsatellite DNA technique

Currently, two methods of sampling chorionic villus sampling and amniocentesis are performed for prenatal diagnosis. Chorionic villus sampling is recommended to be performed at an earlier gestational age (10 weeks-12 weeks 6 days), however in many studies, this

technique have a higher rate of miscarriage than amniocentesis. In the study, we did not record any cases of miscarriage after amniocentesis. According to many published studies, needles be used in amniocentesis are 20-G or 22-G. However, some authors in the world has announced the results of amniocentesis with smaller needle and concluded using smaller size would reduce the complications. Our study used a needle size 27-G. The use of small needles reduces the risk of complications, but still need further studies with a larger sample for this statement.

In mutations identified in 10 DMD male fetuses, deletion mutation accounted for the highest rate with 6 cases. Research results are similar to other study: Li (2009), Giliberto (2011), Wang (2017), when determining the deletion is the highest rate mutation.

In the results of objective one, we identified one mother of DMD patients have a mosaic mutation. Although the phenomenon of mosaic occurs at a very low rate, it still needs to be considered in prenatal diagnosis counseling. DMD prenatal diagnosis should be consulted in all pregnant women who had DMD son, even no mutations are found from DNA blood samples. In the study, we successfully applied indirect mutation diagnostic techniques Microsatellite based on identifying mutant alleles for prenatal diagnosis of DMD for all types of mutations including deletion, duplication and point mutations. In addition, in the study, there was a case of unidentified pinpointed mutations in pregnant women and DMD patients. Microsatellite DNA technique was the only technique that could be used for prenatal diagnosis in this case. Moreover,

with low cost, Microsatellite DNA techniques reduce the economic burden for patients and faster time for result reports has met the time requirements of prenatal diagnosis. Microsatellite DNA can detect the maternal blood cells in amniotic fluid, one of the problems affecting the diagnostic results of other molecular genetic techniques. Dystrophin is one of the largest gene, so identifying mutations is difficult. This is a real challenge when identifying pinpointed mutations is as the first step in prenatal diagnosis process. In the study, we also recorded a similar case of the pregnant woman DMD.31 when she has 2 sons were diagnosed with DMD but could not identify mutations in patients as well as the mother. In this case, Microsatellite DNA is the only option for prenatal diagnosis of DMD for the fetus. Moreover, in Vietnam, there are many families of patients with no financial conditions to pay for genetic diagnostic tests, especially gene sequencing technique. In this case, prenatal diagnosis by Microsatellite technique can be performed without a predetermined mutation in pregnant women as well as her child, based on short repeat sequences, high polymorphic of STR, through the identification of mutant alleles and the inheritance of these alleles from pregnant women to the fetus. Continued childbirth rates of DMD in mothers without the disease gene have been reported in many studies that may be due to the mosaic state. Woman who had a DMD son always need the advice and assistance of genetic prenatal diagnosis for fetus whether or not they carry gene mutations heterozygotes.

CONCLUSIONS

1. Detection of gene carriers of Duchenne muscular dystrophy

- Identify gene carriers for 85 female members of 35 DMD family pedigree, with 52 carriers (61%) and 33 people without mutated genes (39%).
- 66/85 female members were analyzed by MLPA technique, identifying 40 carriers with deletion and duplications (60.6%); 26 people did not carry mutated genes (39.4%). The mutations are concentrated in two "hot spot" regions of the Dystrophin gene, the 5-region region and the central region.
- 19/85 female members were analyzed by gene sequencing techniques, identified 7 female members without mutant genes (36.8%) and 12 female members with point mutation genes (63.2%), in which there is 1 case of mosaicism.

2. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by Microsatellite technique

- Amniocentesis to prenatal diagnosis for 51 fetuses at high risk of DMD from 45 mothers. 100% cases of successful sampling.
- Prenatal diagnosis for 51 fetuses including 6 female fetuses and 45 male fetuses in which 3 female fetuses with mutant heterozygous genes accounted for 5.9%, 3 normal female fetuses accounted for 5.9%, 35 normal male fetuses accounted for 68.6%, 10 male fetuses accounted for 19.6%. 9/10 cases of male fetus have been interrupted from pregnancy, 01 case of pregnancy holding.

- All cases of prenatal diagnosis by Microsatellite technique results in similarities with PCR and MLPA techniques and gene sequencing.
- No cases of associated chromosome abnormalities were detected by karyotyping.

RECOMMENDATIONS

Through this study, we recommend:

1. It is necessary to identify healthy gene carrier for all female members of the family of DMD to have genetic management, monitoring and counseling plans.
2. Prenatal diagnosis of DMD should be consulted and implemented for all fetuses of pregnant carriers.
3. Female members who do not carry disease genes in a family pedigree of DMD needs genetic counseling on possible mosaic phenomenon, thereby considering the decision to prenatal diagnosis of DMD for the fetus during pregnancy.
4. Application of microsatellite DNA techniques in addition to other techniques for direct mutation detection in prenatal diagnosis of DMD lead to the best diagnostic results.
5. It is necessary to build up the protocol of prenatal diagnosis for DMD.