

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS, Congenital Adrenal Hyperplasia - CAH) là một trong những bệnh nội tiết di truyền. Bệnh do đột biến các gen nằm trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể (NST) số 6, mã hóa tổng hợp các enzym xúc tác quá trình chuyển hóa để tạo ra cortisol và aldosteron từ cholesterol của vỏ thượng thận [1]. Trong đó, thể thiếu enzym 21-hydroxylase (21-OH) hay gặp, với tỷ lệ hơn 90%. Enzym 21-OH được mã hóa tổng hợp bởi gen *CYP21A2* (Cytochrome P450). Khi gen *CYP21A2* bị đột biến, enzym 21-OH không được tổng hợp gây rối loạn quá trình tổng hợp cortisol, aldosteron và testosterone làm cho nồng độ cortisol, aldosteron giảm và testosterone tăng. Các rối loạn này dẫn đến bệnh cảnh lâm sàng đặc trưng của bệnh: rối loạn điện giải, mất muối, mất nước và nam hóa ở trẻ gái và dậy thì sớm giả ở trẻ trai. Thể mất muối chiếm đa số nên bệnh nhân rất dễ bị trụy tim mạch, sốc, nguy hiểm đến tính mạng, bệnh xuất hiện sớm ngay sau sinh. Trẻ sẽ tử vong nếu không được phát hiện và cấp cứu kịp thời. Thể nam hóa đơn thuần gây bất thường cơ quan sinh dục; khi không được điều trị trẻ sẽ bị tàn tật ảnh hưởng đến cuộc sống bình thường của trẻ [2],[3],[4].

Hiện nay, bệnh được điều trị bằng liệu pháp hormon thay thế suốt đời. Một số nước đã áp dụng điều trị bổ sung enzym thiếu hụt và liệu pháp gen cũng đã được nghiên cứu nhưng chưa được ứng dụng [5],[6].

Tỷ lệ mắc bệnh TSTTBS do thiếu enzym 21-OH trên thế giới là 1/14.000-1/20.000 trẻ được sinh ra [4], [7]. Một nghiên cứu ở các nước châu Á đưa ra tỷ lệ mắc bệnh TSTTBS ở Nhật Bản là: 1/21.000 và Đài Loan là: 1/28.000 [7]. Ở Việt Nam, chưa có đề tài nghiên cứu về tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ người lành mang gen bệnh. Tuy nhiên tại Khoa Nội tiết -Chuyển hóa -Di truyền Bệnh viện Nhi Trung ương, trung bình mỗi năm có 40 - 70 trẻ mới mắc được chẩn đoán và điều trị; tính tới nay khoa đang quản lý hơn 700 hồ sơ

bệnh nhân.

Từ những năm 1970, nhờ sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử mà người ta đã phát hiện hơn 100 loại đột biến khác nhau trên gen *CYP21A2* [1], [4]. Bệnh mang đặc tính di truyền đơn gen lặn, nhiễm sắc thể thường, tuân theo quy luật của Mendel. Trong phả hệ của người bị bệnh, người mang gen dị hợp tử có kiểu hình bình thường nhưng nguy cơ truyền gen bệnh cho con. Nếu hai người mang gen dị hợp kết hôn với nhau, khả năng 25% con sinh ra sẽ bị bệnh. Trong quần thể, tỷ lệ mắc bệnh là 1/14.000, nhưng tỷ lệ người mang gen gây bệnh lại rất cao 1/60-1/83 [8],[9],[10]. Do vậy, nguy hiểm của bệnh di truyền đơn gen lặn là bệnh sẽ được di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác, nếu chúng ta không có biện pháp can thiệp phòng bệnh tích cực thì tỷ lệ bệnh trong quần thể sẽ tăng cao. Hiện nay, phương pháp phòng bệnh có hiệu quả nhất là tư vấn di truyền. Việc phát hiện người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh, giúp chẩn đoán bệnh sớm cho thai nhi. Nếu thai nhi bị bệnh là con gái, sẽ tiến hành điều trị ngay từ trong thai và tiếp tục điều trị ngay sau sinh, giúp ức chế tình trạng nam hóa có thể tránh được phẫu thuật chỉnh hình sau sinh cho trẻ. Nếu thai nhi bị bệnh là con trai tiến hành điều trị ngay sau sinh, để tránh con suy thượng thận cấp và đem lại sự phát triển bình thường về sau cho trẻ [1],[11],[12].

Nghiên cứu về bệnh TSTTBS đã được công bố nhiều ở Việt Nam, nhưng các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào phân tích về đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm, đặc điểm di truyền, điều trị, đột biến gen *CYP21A2*, nghiên cứu người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh TSTTBS còn rất ít.

Hiện nay, nhiều kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện đột biến gen đã được sử dụng, trong đó hai kỹ thuật hiện cho kết quả nhanh và chính xác là giải trình tự gen để phát hiện đột biến điểm và MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) để phát hiện xóa đoạn, lặp đoạn và chuyển đoạn gen ở bệnh TSTTBS [11]. Việc phát hiện đột biến gen trên bệnh nhân và

phát hiện người lành mang gen bệnh sẽ giúp: 1) Khẳng định chẩn đoán và cho phép điều trị sớm, phòng tránh được con suy thượng thận cấp trong các trường hợp xét nghiệm về hormon không rõ ràng. 2) Tư vấn tiền hôn nhân nhằm giảm trẻ sinh ra bị mắc bệnh. 3) Chẩn đoán và điều trị trước sinh cho thai nhi gái mắc bệnh để phòng và làm giảm bất thường bộ phận sinh dục gây mơ hồ giới tính sau sinh. Xuất phát từ ý nghĩa thực tiễn trên đề tài: “*Phát hiện người lành mang gen đột biến CYP21A2 và chẩn đoán trước sinh bệnh tăng sản thượng bả sinh thể thiếu enzym 21-hydroxylase*” được thực hiện với hai mục tiêu:

1. Phát hiện người lành mang gen bệnh cho các thành viên gia đình bệnh nhân bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-hydroxylase.

2. Chẩn đoán trước sinh cho một số thai phụ mang gen đột biến gây bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-hydroxylase và tư vấn di truyền cho gia đình bệnh nhân.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. BỆNH TĂNG SẢN THƯỢNG THẬN BẨM SINH

1.1.1. Định nghĩa

Tăng sản thượng thận bẩm sinh là một bệnh nội tiết di truyền do đột biến gen lặn NST thường, gây ra do giảm hoặc mất hoàn toàn một trong năm enzym tham gia vào quá trình tổng hợp cortisol, aldosteron và testosterone dẫn đến rối loạn quá trình tổng hợp hormon vỏ thượng thận. Trong đó, thể thiếu enzym 21-OH là thể bệnh hay gặp nhất chiếm tỷ lệ 90-95%, thứ hai là thể 11 β -hydroxylase chiếm 5-9%; còn các thiếu hụt enzym khác gây các thể bệnh: 3 β -HSD, 17 α -hydroxylase và 20, 22-desmolase ít gặp hơn [12].

Tùy theo từng loại đột biến dẫn đến mức độ thiếu hụt enzym 21-OH một phần hay hoàn toàn mà gây ra các thể lâm sàng: mất muối, nam hóa đơn thuần, không cổ điển hay thể khởi phát muộn [1],[7],[13].

1.1.2. Tần suất

Những kết quả nghiên cứu về tỷ lệ mới mắc của TSTTBS do thiếu enzym 21-OH từ 6,5 triệu trẻ sơ sinh được sàng lọc tại nhiều nước trên thế giới cho thấy tỷ lệ mới mắc với thể cổ điển là 1/13.000 – 1/15.000 trẻ đẻ sống [4],[14].

Tần suất mắc bệnh trên thế giới là 1/10.000 – 1/15.000. Tỷ lệ mắc bệnh cao nhất ở hai quần thể người Eskimo Yupik (Alaska) và Pháp tần suất mắc bệnh là 1/282 và 1/2141 trong khi tỷ lệ mắc bệnh ở châu Âu là 1/14.000 [1], [15]. Nghiên cứu của Concolino và CS (2010) tỷ lệ mắc bệnh là 1/15.000 trẻ sinh ra ở thể mất muối và nam hóa đơn thuần, thể không điển hình: 1/1000 [16]. Năm 2011, nghiên cứu của Wichel và CS nhận thấy ở các nước châu Á có tỷ lệ mắc bệnh: 1/44.000 [17].

Bảng 1.1. Tần suất mắc bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH

STT	Tên nước	Tần suất
1	Thụy Điển [1]	1/ 9.800
2	Hoa Kỳ (Bang Wisconsin) [1]	1/11.000
3	Pháp (thành phố Lille) [1]	1/13.000
4	Nhật Bản [14]	1/21.000
5	Đài Loan [14]	1/28.000

Tại Việt Nam, TSTTBS chiếm tỷ lệ 60,7% bệnh lý của tuyến thượng thận và chiếm 2% các bệnh di truyền điều trị tại khoa Nội tiết - Chuyển hóa- Di truyền Bệnh viện Nhi Trung ương [18].

1.1.3. Lịch sử nghiên cứu

Năm 1672, Reinier de Graf là người đầu tiên mô tả lâm sàng của bệnh TSTTBS ở 1 bé sơ sinh có bộ phận sinh dục ngoài bất thường không phân biệt được là nam hay nữ [14].

Năm 1865, De Crecchio mô tả lâm sàng bệnh nhân TSTTBS và nhận thấy có kèm theo hiện tượng tăng sản của tuyến thượng thận. Trong đầu thế kỷ XX nhiều tác giả tiếp tục mô tả bệnh và gọi tên bệnh theo biểu hiện lâm sàng của bệnh là “Hội chứng sinh dục thượng thận” vì bệnh tổn thương ở tuyến thượng thận nhưng biểu hiện bên ngoài là triệu chứng của cơ quan sinh dục [1].

Năm 1963, Bongiovani và Root mô tả các thể lâm sàng của bệnh TSTTBS do nguyên nhân thiếu hụt các enzym chuyển hóa vỏ thượng thận [14].

Năm 1951, quy luật di truyền của bệnh TSTTBS được xác định là do di truyền đơn gen lặn, nằm trên NST thường [1],[19].

Nhưng phải đến ba thập kỷ sau, năm 1984, bệnh TSTTBS đã được xác định bởi gen *CYP21A2* và giả gen *CYP21A1P* có kích thước 3,4kb; nằm trên

nhánh ngắn NST số 6 [15], [19]. Năm 1986, Higashi và CS đã phân tích trình tự nucleotid toàn bộ gen *CYP21A2* và giả gen *CYP21A1P*. Các đột biến đặc hiệu của gen *CYP21A2* đã được tìm thấy là nguyên nhân chính gây thiếu hụt enzym 21-OH [20], [21].

Năm 1965, Jeffcoate và CS đã chẩn đoán trước sinh thành công đầu tiên bệnh TSTTBS bằng việc đo nồng độ các hormon 17-ketosteroid và pregnanetriol, 17-OHP trong dịch ối [21], [22].

Năm 1970, cùng với sự phát triển của kỹ thuật di truyền phân tử, nguyên nhân gây bệnh TSTTBS do các đột biến trên gen *CYP21A2* ngày càng được sáng tỏ. Hiện nay việc chẩn đoán trước sinh bằng đo nồng độ các hormon trong dịch ối đã được thay thế bằng các kỹ thuật di truyền phân tử, phân tích trực tiếp đột biến gen *CYP21A2* từ các tế bào gai rau hoặc tế bào ối của thai nhi [11], [23].

Năm 1978, một nghiên cứu được tiến hành từ năm 1978 đến năm 2001 tại một bệnh viện của Trường Đại học Y thuộc Đại học Tổng hợp New York, đã chẩn đoán trước sinh cho 624 thai phụ có nguy cơ cao sinh con bị bệnh TSTTBS. Bắt đầu từ năm 1986, phác đồ điều trị trước sinh cho bệnh TSTTBS mới được áp dụng cho một số thai phụ, trong đó 532 thai phụ được chẩn đoán trước sinh bằng phương pháp chọc ối và sinh thiết gai rau, sau đó DNA của thai nhi được sử dụng bằng phương pháp tìm dấu ấn HLA hoặc giải trình tự gen [22].

Chẩn đoán trước sinh cho bệnh TSTTBS đã được áp dụng ở một số nước như tại Nhật Bản (1988), sau đó đến Pháp (1989) và Đức (1991) [1],[14],[23]. Hiện nay, điều trị và chẩn đoán trước sinh bệnh TSTTBS đã được triển khai ở nhiều quốc gia trên thế giới [7],[11],[14],[24].

1.1.4. Cơ chế bệnh sinh

Quá trình tổng hợp hormon của vỏ thượng thận

- Quá trình chuyển hóa từ cholesterol tạo thành aldosteron, cortisol và testosterone, trong đó enzym 21-OH xúc tác cho sự chuyển hóa progesteron thành deoxycorticosteron và 17-hydroxyprogesteron thành 11- desoxycortisol và cuối cùng là tổng hợp cortisol và aldosteron. Khi thiếu hụt enzym 21-OH sẽ dẫn đến giảm nồng độ của hai hormon này trong cơ thể.

- Nồng độ cortisol giảm sẽ kích thích tuyến yên tăng sản xuất ACTH (cơ chế điều hoà ngược âm tính) và làm tiền chất steroid tăng cao hàng trăm lần so với bình thường. Một trong số các chất đó là 17- hydroxyprogesteron (17-OHP) và progesteron.

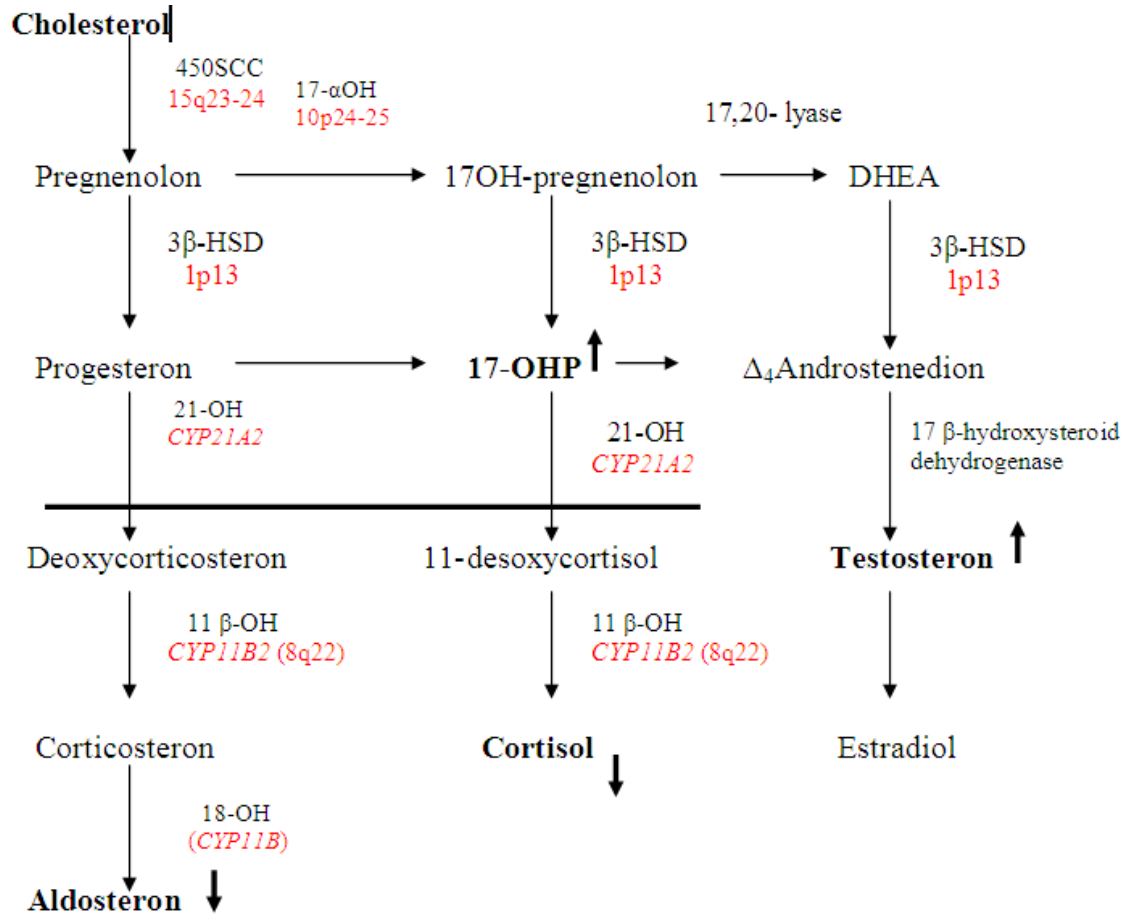
- Nồng độ 17-OHP tăng sẽ dẫn đến tăng tổng hợp androgen, đầu tiên làm tăng androstenedion, sau đó chất này được chuyển thành testosterone (sản xuất hormon theo con đường không tắc) làm cho nồng độ chất này tăng cao hơn rất nhiều so với trẻ bình thường. Chính sự dư thừa androgen dẫn đến các biểu hiện của dậy thì sớm giả như tăng tốc độ phát triển cơ thể, trưởng thành của xương, lông mu, lông nách, tăng phát triển dương vật.... Hơn nữa, androgen tăng cao sẽ ức chế sự phát triển của buồng trứng gây nam hóa như phì âm vật và kém phát triển tuyến vú, rối loạn kinh nguyệt ở trẻ gái. Ngoài ra cũng có giả thuyết cho rằng dư thừa androgen ức chế trực tiếp hoặc gián tiếp lên sự rụng trứng và làm giảm khả năng sinh con sau này [25],[26].

- Tác dụng sinh học của hormon testosterone của vỏ thượng thận

- Làm xuất hiện và bảo tồn đặc tính sinh dục thứ phát kể từ tuổi dậy thì như phát triển dương vật, tuyến tiền liệt, túi tinh, đường dẫn tinh, mọc lông mu, lông nách, râu, trứng cá, giọng trầm do thanh quản mở rộng.

- Hệ xương: Tăng tạo khung xương, phát triển và cốt hoá sụn liên hợp ở đầu xương dài, tăng sức mạnh của khung xương, tăng lắng đọng muối canxi photphat trong xương, hẹp đường kính khung chậu.

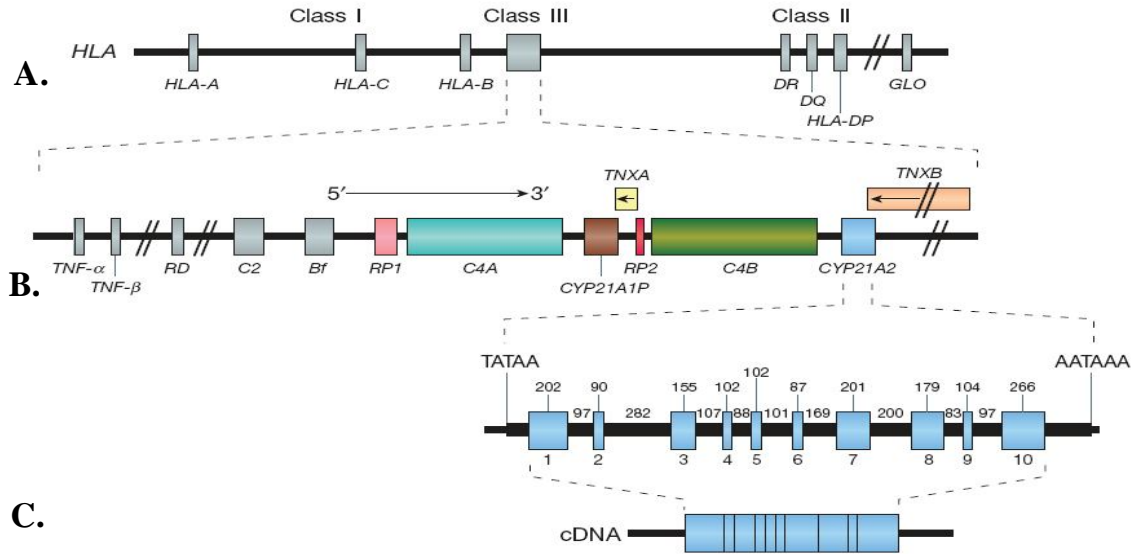
- Chuyển hoá protein và cấu tạo cơ: Tăng đồng hoá protein, phát triển mạnh khối cơ [15],[17],[27],[28].



Sơ đồ 1.1. Rối loạn tổng hợp hormon do thiếu enzym 21-OH [13]

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

Bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH là do đột biến trên gen *CYP21A2*.



Hình 1.1. Vị trí và cấu trúc của gen *CYP21A2* trên NST số 6 [16]

A) Vị trí của vùng RCCX nhánh ngắn của NST số 6. B) Vị trí của các gen thuộc vùng RCCX. C) Cấu trúc của gen *CYP21A2*: Các số ở phía trên mỗi exon hay intron chỉ kích thước của các exon và các intron.

Tăng sản thượng thận bẩm sinh là bệnh di truyền đơn gen lặn NST thường. Gen *CYP21A2* là gen duy nhất mã hóa để tổng hợp enzym 21-OH của hormon tuyến thượng thận. Các gen của hệ thống HLA nằm trên nhánh ngắn của NST số 6 (6p21.3), bao gồm các gen của lớp I, lớp II và lớp III. Trong đó, gen *CYP21A2* và gen không chức năng *CYP21A1* (nonfunctional pseudogene), nằm trong lớp III của hệ thống HLA, trong vùng phức hợp hòa hợp mô chủ yếu (major histocompatibility complex-MHC), xen kẽ với hai gen mã hóa cho bộ thể *C4A* và *C4B*. Gen *CYP21A2* là thành viên của nhóm P450 mà đặc hiệu bởi C21 trong tiền chất steroid vỏ thượng thận. Mỗi gen *CYP21A2* và *CYP21A1P* bao gồm 10 exon, có kích thước 30kb. Trình tự các nucleotide của hai gen này tương đồng 98% trong các exon và khoảng gần 96% trong các intron do vậy trong quá trình phân bào giảm nhiễm, do sự thay đổi của trình tự nucleotid hoặc do sự đột biến mất đoạn giữa hai alen hoặc nhân đoạn,

chuyển đoạn một cách hoàn toàn dẫn đến thay đổi cấu trúc của gen *CYP21A2* bị thay thế bằng một đoạn của gen *CYP21A1P*. Các thay đổi cấu trúc bất thường của gen *CYP21A2* gây nên không tổng hợp được enzym 21-OH, hoặc enzym 21-OH được tổng hợp không có hoạt tính dẫn đến bệnh lý trên lâm sàng [4],[24],[29].

Các dạng đột biến của gen *CYP21A2*

Hầu hết các đột biến gen trên gen *CYP21A2* là hậu quả của một trong hai kiểu tái tổ hợp giữa 2 gen *CYP21A2* và *CYP21A1P*. Trên thế giới đã tìm thấy hơn 100 kiểu đột biến khác nhau gây bệnh TSTTBS do thiếu hụt enzym 21-OH. Các dạng đột biến tìm thấy hay gặp là đột biến điểm, mất đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn làm thay đổi cấu trúc của gen. Đột biến điểm được tìm thấy trên gen *CYP21A2* có tỷ lệ từ 80- 90%, trong đó hay gặp nhất là đột biến mất 8bp ở exon 3, c.656A/C>G ở intron 2, đột biến vô nghĩa ở exon 6 [1], [13],[30].

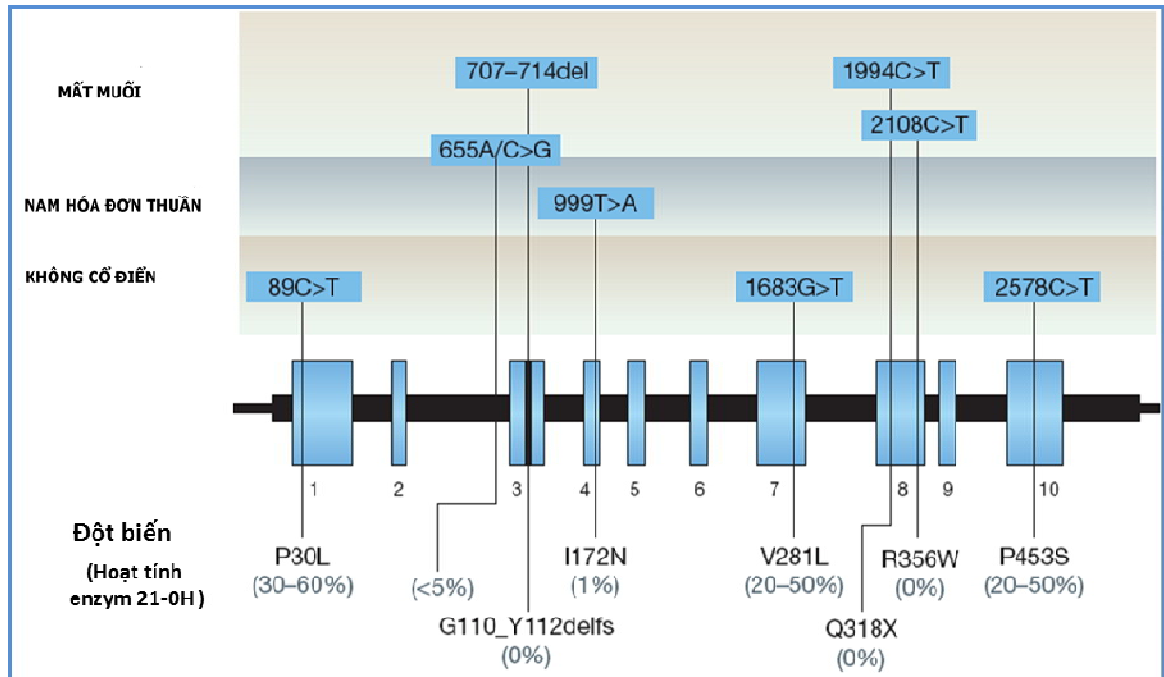
Bảng 1.2. Tỷ lệ đột biến hay gặp trên gen *CYP21A2* do thiếu enzym 21-OH

Tên nước	Tổng số alen	Mất đoạn	Chuyển đoạn lớn	I2g	Δ 8nt	I172N	V281L	Q318X	R356W
Hoa Kỳ	394	26	5	31	3	10	9	4	4
Pháp	258	19	4	21	3	9	17	4	
Nhật bản	102		18	29	0	13	1	0	13
Trung Quốc	40		20	25		28		8	10
Thụy Điển	102	34	6	12		29	3	2	

Mất đoạn và chuyển đoạn gen *CYP21A2*

Trong quá trình giảm phân, sự trao đổi chéo không tương xứng đã gây nên sự mất đoạn gen có chiều dài khoảng 30kb gồm đầu 3' của gen *CYP21A1P*, gen *C4B* và đầu 5' của gen *CYP21A2* hoặc gây chuyển đoạn gen khiến các đột biến từ giả gen *CYP21A1P* chuyển sang *CYP21A2* hoặc lặp đoạn một cách

không hoàn toàn của gen *CYP21A2* gây nên các alen không có chức năng. Sự thay đổi cấu trúc của gen *CYP21A2* dẫn đến sự sao mã để tổng hợp mRNA bị sai lệch gây rối loạn quá trình tổng hợp enzym 21-OH, gây nên bệnh lý trên lâm sàng. Những xóa đoạn lớn gồm *C4B* và các vị trí exon trên gen *CYP21A2* chiếm khoảng 20-30% ở bệnh nhân TSTTBS thể mất muối trên lâm sàng. Nhưng ở Mỹ Latin, tỷ lệ tìm thấy các đột biến xóa đoạn lớn thấp (<1%). Các dạng đột biến xóa đoạn đều có kiểu hình ở thể mất muối [4],[8],[31].



Hình 1.2. Những đột biến hay gặp trên gen *CYP21A2* [17]

Đột biến ở vị trí Intron - I2g (656A/C>G)

Nucleotid ở vị trí 13 base trước điểm cuối của intron 2 là A hoặc C. Đột biến A → G hay C → G là dạng đột biến ở vị trí cắt nối (splicing), tạo nên alen đơn lẻ, thường gặp nhất gây thiếu enzym 21-hydroxylase. Đột biến này được ký hiệu là I2g, sự bất thường trong quá trình cắt nối intron 2 ở đột biến I2g đã giữ lại 19 nucleotid mà bình thường phải tách khỏi mRNA, kết quả làm

cho dịch khung đọc dịch mã và ngăn cản tổng hợp protein có hoạt tính. Hầu như tất cả các mRNA bị cắt nối bất thường nhưng ở các tế bào nuôi cấy một số lượng nhỏ mRNA cắt nối bình thường được phát hiện. Do vậy, nếu chỉ có đột biến I2g thì vẫn có một lượng nhỏ enzym 21-OH được tổng hợp bình thường, do vậy đột biến gây biểu hiện cả hai thể bệnh trên lâm sàng: thể mất muối và thể nam hóa đơn thuần [4],[32],[33],[34].

Đột biến vô nghĩa (nonsense)

Đột biến ở trên gen *CYP21A2* tại vị trí Gln318Stop ở exon 8 hoặc mất đoạn 8bp ở exon 3 gây ngăn cản hoàn toàn sự tổng hợp enzym 21-OH. Trên exon 8, đột biến xảy ra ở vị trí nucleotid 1994, T bị thay đổi thành C, làm xuất hiện mã kết thúc sớm do vậy trên lâm sàng không đo được hoạt động của enzym. Bệnh nhân mang hai dạng đột biến Gln318Stop ở exon 8 hoặc mất đoạn 8bp (8 basepair) ở exon 3, kiểu đồng hợp tử luôn biểu hiện kiểu hình là mất muối [1],[24].

Đột biến sai nghĩa (missense)

- Ba dạng đột biến Ile236Asn, Val237Glu, Met239Lys ở trên giả gen *CYP21A1P*, trong quá trình chuyển đoạn hoặc trao đổi chéo không tương xứng, ba đột biến sẽ xuất hiện ở exon 6 trên gen *CYP21A2* gây phá hủy hoàn toàn hoạt tính của enzym 21-OH. Sự thay thế T bởi A vị trí nucleotid 1380 sẽ dẫn đến thay đổi Isoleusin ở vị trí 236 thành Asparagine: thay thế T thành A ở vị trí nucleotid 1383 dẫn đến thay đổi Valin ở vị trí 237 thành Glutamic acid và thay thế T thành A ở vị trí nucleotide 1389 sẽ dẫn đến thay đổi Methionine ở vị trí 239 thành Lysin. Theo báo cáo của Speiser.P.W tỷ lệ gặp dạng đột biến này khoảng 10% trên các alen đột biến [1].

- Đột biến Ile172Asn trên exon 4 của gen *CYP21A2* có tỷ lệ dao động từ 14% - 19,8%. Đây là một trong những đột biến có 2 biểu hiện kiểu hình: thể nam hóa đơn thuần tạo nên enzym 21-OH có hoạt tính khoảng 1% hoặc thể mất muối với hoạt độ enzym rất thấp [35]. Năm 1988, Amor và CS đã phân

tích gen *CYP21A2* bằng giải trình tự gen nhận thấy có sự biến đổi ở vị trí 172 từ bộ ba nucleotide ATC mã hóa Isoleucine thành AAC mã hóa Asparagine. Đột biến này bình thường tồn tại ở gen *CYP21A1P* có thể chuyển sang *CYP21A2* bởi chuyển đoạn gen [36].

- Đột biến Val281Leu, năm 1988, Speiser và CS đã tìm thấy trên exon 7, đột biến đổi mã 281 từ GTG mã hóa valine thành TTG mã hóa leucine ở bệnh nhân thiếu enzym 21-OH thể không cổ điển liên kết với typ HLA-B14, DR1 [1]. Đột biến Val281 Leu trên gen *CYP21A2* nhưng vẫn tổng hợp được enzym 21-OH, nồng độ enzym đo được khoảng hơn 50% hoạt tính bình thường gây bệnh cảnh lâm sàng ở thể không cổ điển. Ở một số quần thể như người Do thái gốc Đông Âu thì đây là tính đa hình gen rất phổ biến với tỷ lệ >10%. Tuy nhiên, đối với một số chủng tộc như Yugoslavia và Nhật Bản tỷ lệ đột biến Val281Leu ít gặp hơn [1],[20].

- Đột biến Arg356Trp, ở exon 8, đột biến do thay thế CGG thành TGG dẫn đến hậu quả Arginine thay thế thành Tryptophan, gây nên phá hủy hoàn toàn hoạt tính của enzym 21-OH. Người ta cho rằng đột biến gây ảnh hưởng đến sự tương tác với enzym khử cytochrome P450. Bệnh nhân mang đột biến kiểu này thường có kiểu hình thể mất muối. Tuy nhiên đột biến Arg356Trp cũng đã được phát hiện ở bệnh nhân thể nam hóa đơn thuần [1],[37].

- Đột biến Pro30Leu ở exon 1 trên gen *CYP21A2*, là dạng đột biến hay gặp với tỷ lệ 5-15% [39]. Năm 1991, Tusie- Luna và CS đã phân tích gen *CYP21A2* và nhận thấy đột biến Pro30Leu trên gen *CYP21A2* nhưng cơ thể vẫn tạo ra được enzym 21-OH với hoạt tính đo được 30- 60% bình thường trong môi trường nuôi cấy tế bào, nhưng các enzym này dễ bị phân giải không bền vững do vậy ở thể này thường có hội chứng thừa androgen trong thể không cổ điển [1],[38].

Các đột biến khác

Các đột biến điểm khác là những đột biến không phải do chuyển đoạn

gen từ giả gen *CYP21A1P* sang gen *CYP21A2*. Tỷ lệ gặp dạng đột biến này là 5-10% trên các alen gây bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH ở hầu hết các quần thể. Trong đó kiểu đột biến p.P453S hay gặp nhất. Nhờ kỹ thuật giải trình tự gen mà trong những năm gần đây các đột biến mới ngày càng được phát hiện nhiều. Một số đột biến khác hay gặp: p.V280L....

Mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới. Năm 2013, một nghiên cứu của New. M. I và CS về mối liên quan kiểu gen và kiểu hình cho 1.507 gia đình có con bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH nhận thấy kiểu gen và kiểu hình của mỗi bệnh nhân phụ thuộc vào mỗi chủng tộc và quốc gia. Có 21/45 kiểu gen đã xác định có liên quan với kiểu hình. Các dạng đột biến p.P30L, I2g, p.I172N thường cho kiểu hình rất khác nhau trên lâm sàng. Mối quan hệ giữa kiểu gen và kiểu hình trên bệnh nhân TSTTBS có ý nghĩa quan trọng cho các bác sĩ lâm sàng có thể phân loại và tiên lượng được các mức độ nặng của bệnh giúp cho tư vấn di truyền và can thiệp điều trị sớm ngay sau sinh cho bệnh nhân [33].

**Bảng 1.3. Mối liên quan kiểu gen và kiểu hình bệnh
TSTTBS thể thiếu 21-OH**

Đột biến	Vị trí nucleotide	Exon/Intron	Tỷ lệ%	Kiểu hình
Mất đoạn gen			25-30	Mất muối
p.P30L	c.89C→T	Exon 1	5-10	Không cổ điển
I2g	c.656A/C→G	Intron 2	20-25	Mất muối/Nam hóa đơn thuần
Mất 8bp	c.Δ708-715	Exon 3	5-10	Mất muối

p.I172N	c.1001T→A	Exon 4	5-10	Nam hóa đơn thuần
p.I236A, p.V237G, p.M239L	c.1382T→A, c.1385T→A, c.1391T→A	Exon 6	5-10	Mất muối
p.V281L	c.1685G→T	Exon 7	5-10	Không cổ điển
p.P306+T	c.1759+T	Exon 7	<5	Mất muối
p.G318S	c.1996C→T	Exon 8	5-10	Mất muối
p.A356T	c.2110C→T	Exon 8	10	Mất muối

Đột biến mới phát sinh (*De novo mutation*)

Tăng sản thượng thận bẩm sinh không phải là một bệnh lý có tỷ lệ cao các alen bị đột biến mới phát sinh, mà bệnh xuất hiện chủ yếu là do bố mẹ mang gen dị hợp tử di truyền bệnh cho con. Đột biến mất đoạn mới và chuyển đoạn gen mới đã được nói đến, trong đó chuyển đoạn gen mới thường liên quan đến đột biến ở intron 2 với tỷ lệ khoảng 1% các alen gây thiếu enzym 21-OH, bệnh nhân mang gen đột biến hoàn toàn không do di truyền từ bố mẹ. Tỷ lệ các alen gây thiếu enzym 21-OH trong quần thể khoảng 2%, nên tỷ lệ alen mang chuyển đoạn gen mới tại intron 2 trong quần thể xấp xỉ: $1/(2 \times 10^4)$ [1], [39].

Tái tổ hợp mới liên quan đến gen *CYP21A2* đã được chứng minh bằng phản ứng PCR với DNA tách từ tinh trùng và bạch cầu. Trao đổi chéo không tương xứng gây mất đoạn gen chỉ được phát hiện ở DNA tinh trùng ($1/10^5$ - 10^6 trên hệ gen (genomes)). Chuyển đoạn gen xảy ra với tần số tương tự ($1/10^3$ - 10^5 trên hệ gen) ở DNA các tế bào tinh trùng và bạch cầu. Điều này chứng tỏ rằng mất đoạn gen chỉ xảy ra ở trong quá trình giảm phân, trong khi chuyển đoạn gen xảy ra cả trong quá trình giảm phân và nguyên phân. Tần số

chuyển đoạn gen theo cách thức này ($1/10^4$) phù hợp với tỷ suất chuyển đoạn gen mới ở bệnh nhân thiếu enzym 21-OH [1],[4],[24]. Trong bệnh TSTTBS, do hai gen *CYP21A2* và giả gen *CYP21A1P* có cấu trúc tương đồng khá cao, nên đột biến thường gặp là do sự chuyển đoạn gen, một đoạn gen từ giả gen *CYP21A1P* sẽ chuyển sang gen *CYP21A2*, sự chuyển đoạn này hay gặp ở vị trí intron 2 và exon 8, ít gặp ở exon 10, do vậy có thể có 2 vị trí cùng bị đột biến trên 1 alen hoặc một vị trí đột biến trên 1 alen [40].

1.1.5. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng

Do giảm hormon cortisol, aldosteron và tăng hormon testosterone nên triệu chứng lâm sàng đặc trưng của bệnh gồm hai nhóm triệu chứng:

- Suy thượng thận cấp: mất nước, rối loạn điện giải, trong trường hợp nặng dẫn đến sốc.



Hình 1.3 Bệnh nhân bị bệnh TSTTBS thể mất muối

Bệnh nhân nữ 3 tuần tuổi vào viện vì cơn suy thượng thận cấp. Nôn nhiều sau sinh, mất nước mạn tính, xạm da, rối loạn điện giải.

- Bất thường bộ phận sinh dục: dậy thì sớm giả ở trẻ trai: mọc lông mu, rậm lông, mọc trứng cá, xạm da sớm trước tuổi, dương vật to và dài hơn so với tuổi, nhưng thể tích tinh hoàn vẫn tương đương so với tuổi. Nam hóa ở trẻ gái: âm vật phì đại theo 5 tốp của Prader, xạm da, ngoại hình nam, nói giọng ồm, thiếu năng sinh dục nữ. Ở trẻ trai và gái đều tăng phát triển cơ thể: lớn nhanh, cốt hóa sớm các đầu xương dài nên về sau trẻ bị lùn.



Hình 1.4 Bệnh nhân nữ bị bất thường bộ phận sinh dục trong bệnh TSTTBS

Âm vật phì đại tít 5 theo Prader. NST46,XX. Da khô, mất nước mạn tính.



Hình 1.5 Bệnh nhân TSTTBS thể nam đơn thuần

Bệnh nhân nam 4 tuổi, dậy thì sớm giả, dương vật phát triển tương ứng trẻ 12-13 tuổi, thể tích tinh hoàn tương đương với tuổi thực, chiều cao > 2SD, tuổi xương tương đương 8 tuổi.

Cận lâm sàng: cortisol và aldosteron máu giảm, testosterone máu tăng, 17-OHP máu tăng, progesteron tăng. Rối loạn điện giải đồ: đặc trưng Natri máu và Clo máu giảm, Kali máu tăng. Xét nghiệm sinh học phân tử phát hiện đột biến gen *CYP21A2* [2],[12],[41],[42].

1.1.6. Điều trị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH

Điều trị trước sinh

Trong bệnh TSTTBS liệu pháp thay thế hormon glucocorticoid ngoại

sinh với mục đích đưa cortisol trong cơ thể về bình thường, để không làm tăng ACTH, dẫn đến ngăn ngừa tăng sản xuất androgen. Việc phát hiện ra cortisol từ năm 1950, hiệu quả đầu tiên trong liệu pháp điều trị thay thế corticosteroid đã cải thiện cuộc sống sau khi sinh của bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH [43],[44].

Cho đến năm 1984 việc điều trị trước sinh bằng dexamethasone mới được ghi nhận. Dexamethasone với một lượng thấp (uống 20 μ g/kg/ngày) sau khi vào cơ thể mẹ sẽ gắn kết với một protein mang trong máu mẹ đi qua hàng rào rau thai vào cơ thể thai nhi để ngăn chặn sự tăng androgen bào thai ức chế sự nam hóa cơ quan sinh dục nữ. Do vậy, điều trị từ trong thời kỳ bào thai phải được bắt đầu càng sớm càng tốt ngay sau khi có thai cho thai nhi nữ. Sự hình thành và biệt hóa cơ quan sinh dục nữ của thai nhi diễn ra rất sớm, ngay từ tuần thai thứ 5 – 6 của thai kỳ và sự phát triển cơ quan sinh dục ngoài gần như hoàn tất vào thời điểm thai khoảng 10 tuần tuổi. Để điều trị đạt hiệu quả người mẹ mang thai phải được dùng thuốc dexamethasone trước tuần thai thứ 9 của thai kỳ [23],[44],[45].

Hiện nay, hiệu quả của phương pháp điều trị trước sinh đã được áp dụng ở một số nước. Một số nghiên cứu đã và đang tìm hiểu ảnh hưởng lâu dài của glucocorticoid trên bào thai và những ảnh hưởng của thuốc đối với thai nhi như thế nào? [19],[36]. Khi so sánh những chị em cùng mắc bệnh trong một gia đình, sự nam hóa bộ phận sinh dục ở những trẻ điều trị bằng dexamethasone trước khi sinh có giảm theo tít phân loại của Prader. Hiệu quả của dexamethasone trong điều trị trước sinh bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH đã được nhiều tác giả công bố nhưng hiện nay vẫn còn một số tranh cãi về vấn đề tác dụng của thuốc lên thai nhi, cần phải được nghiên cứu và theo dõi trong thời gian dài [19],[46],[47].

Điều trị sau sinh

Mục đích: điều trị bệnh là bù đủ lượng hormon cortisol, aldosteron thiếu

hụt, hạn chế tối đa lượng testosterone thượng thận thừa do tăng sản xuất để ngăn ngừa tình trạng nam hóa [42],[48].

Nguyên tắc điều trị: Sử dụng liệu pháp hormon thay thế suốt đời.

Thuốc được sử dụng chính là hydrocortison. Trong thể mất muối suy thượng thận cấp cần tiêm Hydrocortisol (Solucortef), kết hợp với uống thuốc Florinef, ngoài ra khăn trương bù nước và điều chỉnh điện giải tăng natri máu, hạ kali máu và chống nhiễm toan. Đối với trẻ gái bị nam hóa sau điều trị ổn định tiến hành phẫu thuật chỉnh hình bộ phận sinh dục.

Trong 50 năm qua, từ khi phát hiện ra cortison điều trị bệnh TSTTBS có nhiều tiến bộ. Mặc dù, quản lý lâm sàng bệnh nhân TSTTBS thường phức tạp bởi các tác dụng phụ của thuốc như hội chứng Cushing, không tuân thủ điều trị, cường androgen và vô sinh. Hiện nay, tiếp cận phác đồ điều trị cho bệnh nhân TSTTBS thể cổ điển có một số giải pháp mới được đưa ra [5],[49]:

✚ Phối hợp thuốc.

Tại viện Quốc gia Y tế Mỹ, một nghiên cứu về hiệu quả của một phác đồ mới trong điều trị là kết hợp hydrocortison với một kháng androgen và một chất ức chế enzym aromatase. Ức chế sự hoạt động của nội tiết tố androgen cũng có hiệu quả trong điều trị ở phụ nữ bị TSTTBS với hội chứng buồng trứng đa nang [5].

Một phương thức mới kết hợp 4 thuốc điều trị TSTTBS gồm flutamide (ức chế thụ thể androgen), testolacton (ức chế enzym aromatase), liều thấp hydrocortison và fludrocortison, đã cho thấy kết quả hứa hẹn: như bình thường hóa tốc độ tăng trưởng và tuổi xương sau 2 năm điều trị [5],[50].

White and Speier (2003) đề xuất phương pháp điều trị hormon tăng trưởng cho trẻ em bị TSTTBS với chất tương tự GnRH để cải thiện chiều cao cuối của bệnh nhân. Phương pháp sử dụng hormon tăng trưởng GnRH làm cải thiện chiều cao cuối, tuổi xương tương ứng với tuổi thực và trọng lượng xương [5].

Theo nghiên cứu của Madeleine (2011) 31 bệnh nhân được điều trị GH so với nhóm chứng nhận thấy thời gian điều trị LHRHa với con gái (n=15) trung bình là 4, 5 năm có chiều cao cuối trung bình: 162,1cm, trong khi chiều cao dự đoán ban đầu: 153,0cm; con trai (n=16) thời gian điều trị là 4.9 năm, chiều cao cuối trung bình là 172,4cm, so với chiều cao dự đoán ban đầu là 166,3cm. Tác giả nhận thấy, hiệu quả của liệu pháp điều trị GH cho bệnh nhân TSTTBS có thể cải thiện được chiều cao cuối [51].

Điều trị gen

Năm 2002, Merkel và CS đã ứng dụng một phương pháp điều trị mới và thử nghiệm bao gồm điều trị bằng Corticotrophin hormon đối kháng và liệu pháp gen [52]. Theo tác giả New I. M đã đặt ra câu hỏi: TSTTBS thể thiếu 21-OH là bệnh lý do rối loạn chuyển hóa, do vậy liệu pháp gen có hiệu quả không? Một nghiên cứu trên chuột gây bệnh thiếu hụt enzym 21-OH, sau đó chuột bị bệnh đã được điều trị bằng phương pháp chuyển gen *CYP21A2*, hiệu quả, chuột bị bệnh sống bình thường. Mục tiêu khó khăn nhất của gen trị liệu là đạt được sự ức chế tốt androgen thượng thận, do đó số lượng gen phải đủ lớn để cho phép sinh tổng hợp cortisol ở mức gần như sinh lý cơ thể trong điều kiện bình thường và khi căng thẳng [52].

Tuy nhiên, liệu pháp gen đang còn trong giai đoạn thực nghiệm. Hiện tại, phương pháp nội khoa là chủ yếu, do tính chất của bệnh mạn tính, bệnh nhân phải điều trị suốt đời do vậy ảnh hưởng của các tác dụng phụ của thuốc còn chưa được kiểm soát tốt nhưng thuốc dễ mua, rất có hiệu quả và chi phí không cao. Mục đích của điều trị thuốc là đưa nồng độ hormon cortisol, aldosteron về mức bình thường theo sinh lý, nhưng thực tế để điều chỉnh được hormon theo nhịp sinh học, theo nhịp sinh lý của cơ thể con người còn gặp khó khăn [3],[52].

Điều trị bằng thuốc thay thế hormon thiếu hụt theo phác đồ của khoa Nội tiết –Chuyển hóa – Di truyền Bệnh viện Nhi Trung ương (phụ lục 2).

Điều trị phẫu thuật tạo hình cho trẻ gái

Mục đích: phẫu thuật để làm âm vật trở về kích thước bình thường, tách rời các môi âm vật bị dính vào nhau và mở rộng cửa âm đạo.

Phẫu thuật tạo hình cho trẻ gái, sau điều trị bệnh ổn định 3 tháng. Mô sớm giúp giảm gánh nặng tâm lý cho bệnh nhân và gia đình và cải thiện được chức năng sinh dục sinh sản cho bệnh nhân sau này [53],[54].

1.1.7. Phòng bệnh

Tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-OH là một bệnh lý di truyền đơn gen lặn, bệnh tuân theo quy luật di truyền của Menden. Nguy hiểm của bệnh gây lan truyền các gen lặn trong quần thể với tỷ lệ cao (theo nghiên cứu về tỷ lệ người lành mang gen ở Trung quốc công bố: 1/83) [55]. Do vậy, Tổ chức Y tế thế giới đã đề ra các biện pháp để phòng và giảm tỷ lệ mắc bệnh từ những năm 1980 gồm các biện pháp; phát hiện người lành mang gen bệnh để tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh và giáo dục y tế [4]. Biện pháp phòng bệnh hiệu quả này đã được áp dụng cho các bệnh lý di truyền nói chung và cho bệnh TSTTBS nói riêng đã cho hiệu quả cao và được áp dụng trong các nước phát triển trên thế giới: Anh, Pháp, Mỹ...

Ở Việt Nam, những năm gần đây, nhờ sự phát triển của kỹ thuật di truyền phân tử, các đột biến trên gen *CYP21A2* đã được phát hiện với độ chính xác cao là tiền đề cho các bác sĩ tiến hành chẩn đoán người lành mang gen bệnh trong gia đình để tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho các thai phụ có nguy cơ sinh con bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH. Khi phát hiện thai nhi có mang gen đột biến gây bệnh, các bác sĩ sẽ thông báo cho gia đình để gia đình tự lựa chọn phương pháp điều trị. Hiệu quả của chẩn đoán trước sinh sẽ giúp giảm tỷ lệ mắc bệnh trong các gia đình có nguy cơ, giảm tỷ lệ mắc bệnh cho các dòng họ có mang gen bệnh và trong cộng đồng [2],[4],[54].

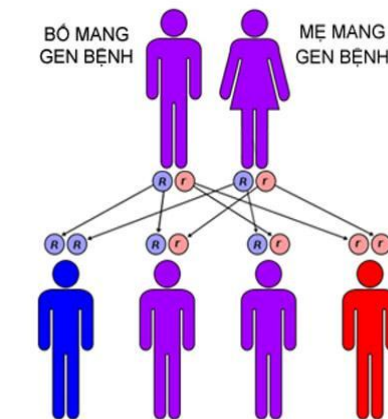
Phòng bệnh TSTTBS bằng sàng lọc người mang gen được tiến hành ở các gia đình, dòng họ có bệnh nhân bị bệnh TSTTBS hoặc trong quần thể có

tỷ lệ mắc bệnh cao để quản lý người mang gen và người bệnh. Qua việc sàng lọc, bác sĩ sẽ đưa lời khuyên di truyền phù hợp nhằm tránh khả năng kết hôn cận huyết, tránh kết hôn cùng những người mang gen bệnh hoặc giữa người mang gen bệnh và người bị bệnh, nhưng nếu kết hôn phải quản lý thai nghén để chẩn đoán và điều trị trước sinh [3].

1.2. PHÁT HIỆN NGƯỜI LÀNH MANG GEN BỆNH

1.2.1. Đặc điểm di truyền của bệnh

Bệnh chỉ xảy ra ở người mang đồng hợp tử gen lặn (minh họa là: rr). Nếu một người mang 1 gen bình thường (minh họa là: R) và 1 gen đột biến (r) gọi là dị hợp tử. Trong mỗi cá thể đều được di truyền 1 alen từ bố và 1 alen từ mẹ, do vậy ở cá thể mang gen gây bệnh dạng đồng hợp tử (rr) thì bố mẹ là hai dị hợp tử (Rr) bắt buộc. Trường hợp đột biến mới xảy ra rất hiếm gặp.



Hình 1.6. Sơ đồ quy luật di truyền gen lặn nằm trên NST thường

Đặc điểm của bệnh di truyền theo qui luật lặn là bệnh xảy ra không liên tục qua các thế hệ. Thường gặp bệnh xuất hiện trong cùng một thế hệ. Tỷ lệ nam và nữ bị bệnh là như nhau.

+ Nếu cha mẹ là hai dị hợp tử (Rr x Rr) khả năng sinh con bị bệnh (rr) là 25%, con dị hợp tử (Rr) mang gen lặn là 50%, con bình thường hoàn toàn (RR) là 25%. Trong quần thể trường hợp này hay gặp nhất.

+ Nếu cha (hoặc mẹ) là người bình thường (RR) kết hôn với người mang gen dị hợp tử (Rr) thì khả năng sinh ra con bình thường (RR) là 50%, con bị dị hợp tử (Rr) là 50%.

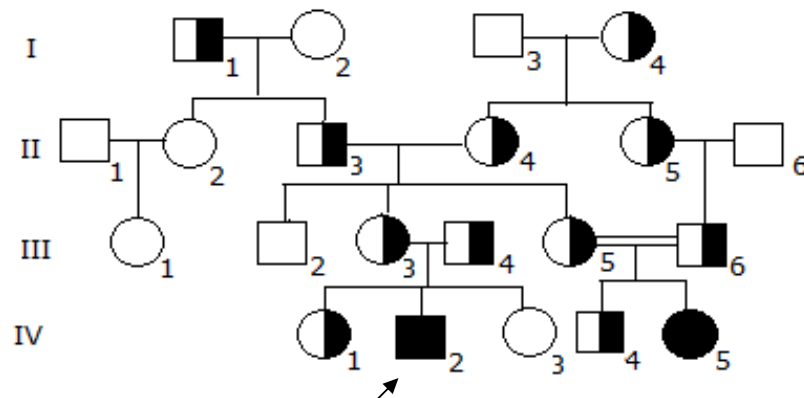
+ Nếu cha (hoặc mẹ) là người bình thường kết hôn với người bị bệnh (rr) thì khả năng sinh con mang gen dị hợp tử (Rr) là 100%.

Rất nhiều đột biến di truyền lặn được mô tả từ xưa đến nay liên quan đến cấu trúc và hoạt động của enzym, trong đó cơ thể dị hợp tử với 1 alen bình thường và 1 alen đột biến cho biểu hiện các enzym hoạt động bình thường. Bệnh chỉ biểu hiện với cơ thể mang 2 alen đột biến lặn và các biểu hiện kiểu hình phụ thuộc vào sự hoạt động của enzym [22],[52],[56].

1.2.2 Phả hệ gia đình

Trong bệnh lý di truyền đơn gen lặn, bố mẹ phải là người mang gen dị hợp tử gây bệnh, khi sinh con sẽ truyền gen gây bệnh cho con. Khi xây dựng phả hệ của gia đình, đầu tiên phải xác định cá thể bị bệnh (proband hoặc index case), sau đó là những người mang gen có liên quan đến người bệnh trong gia đình, dòng họ, ít nhất là 2 hoặc 3 thế hệ [56].

Các ký hiệu sử dụng để vẽ sơ đồ phả hệ (phụ lục 3).



Hình 1.7. Phả hệ gia đình mang gen lặn trên nhiễm sắc thể thường.

Thế hệ I, II, III không có người bị bệnh, thế hệ IV có người bị bệnh IV2 bệnh nhân nghiên

cứu (proban), biểu hiện bệnh di truyền. Bệnh nhân có 1 chị gái (IV1) là người lành mang gen bệnh và 1 em gái ruột (IV3) không mang gen bệnh. Bố mẹ bệnh nhân là người mang gen dị hợp tử. Ở thế hệ thứ 3 có hai chị em họ kết hôn cận huyết là III5 và III6, họ có 2 người con, trong đó có 2 người IV4 mang gen bệnh và IV5 biểu hiện bệnh [56].

1.2.3. Nguy cơ truyền bệnh di truyền lặn trong quần thể

Bệnh di truyền lặn NST thường là khi người lành mang gen bệnh, bề ngoài là người hoàn toàn bình thường, khỏe mạnh nhưng xây dựng gia đình với nhau, nếu sinh con thì truyền bệnh cho con theo tỷ lệ phân ly gen bệnh của qui luật Mendel. Bệnh truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác.

Trong các quần thể mà việc kết hôn cùng huyết thống hoặc kết hôn trong các quần thể cô lập sẽ làm tăng khả năng sinh con bị bệnh và tăng tỷ lệ người mắc bệnh trong quần thể vì các gen lặn di truyền tiềm ẩn trong dòng họ hoặc trong các quần thể cô lập dễ có cơ hội để tổ hợp với nhau [1],[56].

Tần suất người lành mang gen bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH là 1/60 tùy thuộc vào chủng tộc. Tần số đột biến tự nhiên mới phát sinh cần có cả hai đột biến trên cùng một gen ở cả hai bên bố mẹ nên xác suất xảy ra vô cùng nhỏ, do vậy sự kết hôn trong dòng họ hoặc trong quần thể cô lập là rất nguy hiểm [11],[56],[57],[58].

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

Có một số phương pháp phát hiện người lành mang gen bệnh thường được sử dụng như sau:

- Sử dụng phân tích sơ đồ phả hệ của gia đình để tìm ra dị hợp tử bắt buộc, ví dụ: con bị bệnh TSTTBS trên sơ đồ phả hệ thì bố mẹ phải là người mang gen dị hợp tử bắt buộc theo quy luật Mendel [59].

- Phương pháp xét nghiệm sinh hóa cho thành viên gia đình.

Các cá thể mang gen dị hợp tử gây bệnh TSTTBS có thể có các triệu chứng của thừa androgen hơn những người không mang gen nhưng các nghiên cứu bệnh chứng chưa đồng nhất về quan điểm trên. Khi làm nghiệm

pháp kích thích ACTH người mang gen dị hợp tử gây bệnh TSTTBS có kết quả tăng nhẹ nồng độ 17-OHP, cortisol sau khi kích thích thượng thận hơn những người không mang gen [59],[60],[61].

Nghiên cứu của Lee và CS năm 2000, nhận thấy có thể phát hiện người mang gen dị hợp tử bằng phương pháp sinh hóa. Nhóm nghiên cứu định lượng 17-OHP cho những người thành viên của gia đình người bệnh và đưa nhận xét rằng, sau nghiệm pháp kích thích corticotropin giá trị 17-OHP <300 ng/ml là bình thường và giá trị 17-OHP >300 – 1499 ng/ml là người mang gen dị hợp tử [58]. Do đột biến gen gây thiếu hụt enzym 21-OH có liên quan đến typ HLA, nên có thể gián tiếp xác định đột biến gen *CYP21A2* hoặc phát hiện người lành mang gen đột biến bằng cách phân loại typ huyết thanh HLA. Nhờ kết quả typ huyết thanh HLA bệnh nhân so với HLA của tế bào ối thai nhi hoặc đối tượng có nguy cơ cao. Nếu kết quả typ HLA giống nhau thì có thể chẩn đoán thai nhi bị bệnh TSTTBS thể thiếu hụt enzym 21-OH hoặc người lành mang gen với độ tin cậy cao [22],[62].

- Xét nghiệm sinh học phân tử tìm gen đột biến cho các thành viên của gia đình người bệnh khi đã xác định được gen đột biến của bệnh nhân.

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

Tư vấn di truyền là một biện pháp hết sức quan trọng trong việc phòng bệnh lý di truyền nói chung, cũng như bệnh lý của bệnh TSTTBS. Hồ sơ bệnh lý của bệnh nhân và các thành viên trong gia đình, dòng họ sẽ được quản lý tại phòng tư vấn di truyền. Các thông tin của mỗi bệnh nhân và gia đình giúp cho các bác sĩ có cơ sở khoa học để tư vấn tiền hôn nhân, tránh kết hôn cận huyết, tránh kết hôn với người bị bệnh hoặc mang gen dị hợp tử. Nếu hai người mang gen dị hợp tử kết hôn với nhau cần phải được quản lý thai nghén và tư vấn di truyền trước khi kết hôn và cần thiết phải chẩn đoán trước sinh để

tránh sinh ra con bị bệnh [28],[63],[64].

1.3. CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH

1.3.1. Định nghĩa

Chẩn đoán trước sinh là sử dụng các phương pháp xét nghiệm phát hiện bệnh lý, dị tật khi thai còn trong tử cung trước khi đưa trẻ được sinh ra. Các phương pháp thường dùng cho chẩn đoán trước sinh là nuôi cấy tế bào ối hoặc tế bào gai rau, sử dụng phương pháp di truyền tế bào, di truyền phân tử để tìm đột biến của nhiễm sắc thể hoặc đột biến gen, chẩn đoán bệnh cho thai nhi [65],[66].

Áp dụng cho chẩn đoán trước sinh bệnh TSTTBS là sử dụng các phương pháp xét nghiệm di truyền phân tử để xác định xem thai nhi có bị đột biến gen *CYP21A2* gây bệnh hay không, khi thai còn trong tử cung bằng phương pháp sinh thiết gai rau hoặc phương pháp chọc ối [67],[68].

1.3.2. Chỉ định chẩn đoán trước sinh cho bệnh TSTTBS

Mục đích chẩn đoán trước sinh bệnh TSTTBS không phải phát hiện bệnh để đình sản mà phát hiện bệnh sớm để điều trị vì đây là một bệnh di truyền điều trị được bằng phương pháp thay thế hormon suốt đời [5], [69].

Đối tượng cần chẩn đoán trước sinh:

+ Những cặp vợ chồng đã được xác định là dị hợp tử mang gen *CYP21A2*. Khi có thai bắt buộc chẩn đoán trước sinh.

+ Một trong hai vợ chồng bị bệnh TSTTBS, còn người kia là dị hợp tử khi có thai bắt buộc chẩn đoán trước sinh.

+ Các thai phụ đã một lần sinh con bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH những lần có thai tiếp theo cần thiết chẩn đoán trước sinh.

Hiệu quả của chẩn đoán trước sinh sẽ giúp giảm tỷ lệ mắc bệnh trong các gia đình có nguy cơ, để giảm tỷ lệ mắc bệnh cho các dòng họ có mang gen bệnh và trong cộng đồng [5],[24].

1.3.3. Các phương pháp chẩn đoán trước sinh

Sử dụng các phương pháp chẩn đoán trước sinh, cần phải lấy được chất liệu di truyền của thai nhi từ các tế bào nước ối, tua rau, máu hoặc da... của thai nhi sau đó phải dựa vào các xét nghiệm di truyền. Các xét nghiệm di truyền có thể phân tích ở mức độ tế bào (phân tích NST), ở mức độ phân tử (phân tích DNA, RNA). Các kỹ thuật lấy mẫu tế bào thai nhi có hai loại trực tiếp và gián tiếp. Các kỹ thuật lấy tế bào thai trực tiếp là các kỹ thuật có xâm phạm đến thai nhi bao gồm chọc hút dịch ối, sinh thiết tua rau, máu dây rốn... Kỹ thuật gián tiếp, được gọi là các kỹ thuật không xâm phạm thai nhi tìm các tế bào máu của thai trong máu mẹ nhưng giá trị chẩn đoán và độ tin cậy không cao [65],[66].

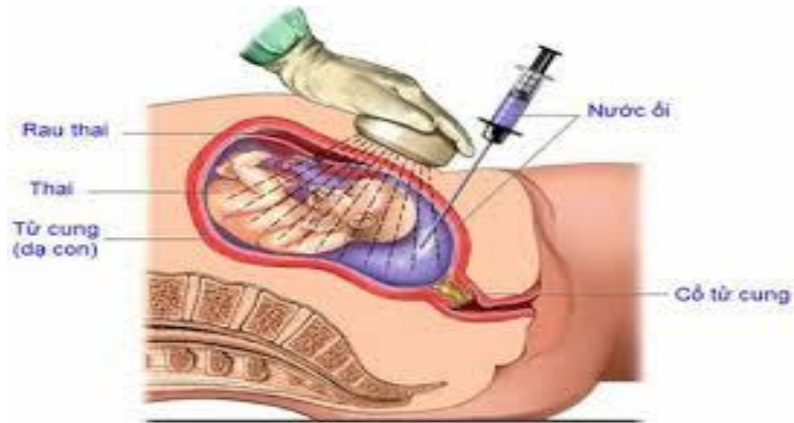
Trong bệnh TSTTBS phương pháp lấy mẫu DNA của thai nhi có thể sử dụng kỹ thuật sinh thiết gai rau hoặc chọc ối. Thời gian để tiến hành chọc hút nước ối thường ở tuổi thai 15-18 tuần, khi đó trong buồng ối có khoảng 150-250ml nước ối, lượng nước ối cần hút ra trung bình 10-15ml [55].

Các xét nghiệm di truyền trong bệnh TSTTBS: tách chiết DNA của thai nhi để phân tích gen *CYP21A2* tìm đột biến gây bệnh và kết hợp xác định giới tính của thai nhi để quyết định hướng điều trị sớm.

1.3.3.1. Các phương pháp lấy mẫu tế bào thai nhi

Chọc hút dịch ối

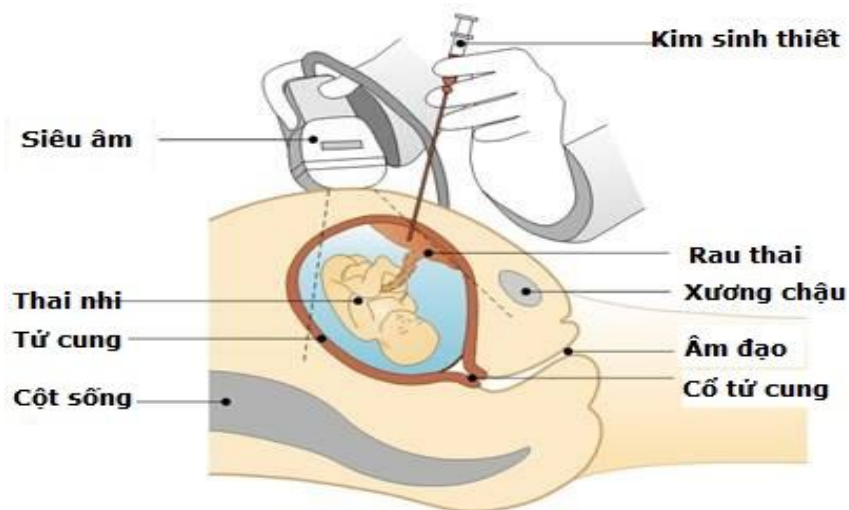
Cách chọc hút dịch ối: dựa vào siêu âm để xác định buồng ối, sau đó chọc kim vào đúng buồng ối, tháo nòng kim và hút từ từ nước ối, bỏ đi 0,5-1ml nước ối đầu tiên, thay bơm tiêm vô khuẩn khác và hút cho đủ lượng nước ối theo yêu cầu. Khi hút đủ dịch ối, thì tháo bơm tiêm, đặt lại nòng kim chọc ối và rút kim ra ngoài. Sau đó theo dõi tình trạng của thai phụ và siêu âm kiểm tra lại tim thai. Để loại trừ hồng cầu của người mẹ lẫn vào nước ối, một số tác giả sử dụng kỹ thuật lọc hồng cầu khi hút dịch ối [65].



Hình 1.8. Hình ảnh chọc ối dưới sự chỉ dẫn của siêu âm [28]

Các tai biến của chọc hút dịch ối gồm có sảy thai (0,5-1%), rỉ ối (1%), nhiễm trùng ối sau khi chọc hút nước ối khá hiếm gặp (0,5- 1,5/1000 trường hợp) làm tăng nguy cơ lây truyền một số bệnh nhiễm trùng từ mẹ sang con [67],[68].

Sinh thiết gai rau



Hình 1.9. Sinh thiết gai rau bằng catheter [30]

Kỹ thuật sinh thiết gai rau được thực hiện đầu tiên vào những năm 1960. Dưới sự hướng dẫn của siêu âm, tiến hành sinh thiết gai rau có hai đường gồm qua đường cổ tử cung và qua đường bụng. Hai đường chọc đều có độ an toàn và kết quả như nhau. Sinh thiết gai rau qua cổ tử cung khi rau bám ở mặt sau tử cung, chọc hút tua rau qua thành bụng khi rau bám ở mặt trước hay ở

đáy tử cung [45],[69].

Kỹ thuật sinh thiết gai rau được tiến hành sớm trong 3 tháng đầu của thai kỳ, khoảng từ ngày thứ 70-90 tính từ ngày đầu của kỳ kinh cuối. Các bất thường của thai nhi có thể phát hiện sớm hơn so với chọc ối. Do đó, các bệnh lý di truyền bất thường cần phải quyết định chấm dứt thai kỳ sẽ được thực hiện thuận lợi hơn, tránh các gánh nặng về tâm lý và sức khỏe cho thai phụ. Nhược điểm của kỹ thuật sinh thiết gai rau là các tai biến gây sảy thai (2- 3%), chảy máu qua đường âm đạo (7-10%), nhiễm khuẩn và dị tật cho thai ít gặp. Nghiên cứu gần đây nhận thấy tỷ lệ sảy thai khoảng 1% [69],[70].

1.3.3.2. Kỹ thuật sinh học phân tử

- Sử dụng các phương pháp di truyền phân tử như phương pháp giải trình tự gen và MLPA ...để phát hiện các đột biến gen *CYP21A2* của thai nhi từ mẫu tế bào thai nhi [71].

1.3.4. Chẩn đoán tiền làm tổ - PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)

Chẩn đoán di truyền phôi trước làm tổ (PGD- Preimplantation Genetic Diagnosis) là kỹ thuật dùng để xác định các rối loạn về gen di truyền hay bất thường trong bộ nhiễm sắc thể của giao tử hay phôi ở giai đoạn trước khi phôi được chuyển vào nội mạc tử cung để làm tổ. Quá trình chẩn đoán di truyền trước làm tổ bao gồm các giai đoạn chính là thụ tinh nhân tạo, sinh thiết và chẩn đoán di truyền. Nhiều nghiên cứu trong 20 năm qua cho thấy quá trình sinh thiết phôi bào không làm ảnh hưởng đến khả năng làm tổ cũng như sự phát triển của em bé sinh ra từ phương pháp này. Tuy nhiên, phương pháp chẩn đoán di truyền trước làm tổ đòi hỏi kỹ thuật cao, chi phí tốn kém, nguy cơ tử vong chu sinh còn cao hơn nhóm chứng, nên chưa được áp dụng cho bệnh TSTTBS và phương pháp còn cần phải được nghiên cứu thực nghiệm lâm sàng ở diện rộng hơn để đánh giá chính xác hiệu quả [47].

1.4. MỘT SỐ KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN *CYP21A2*

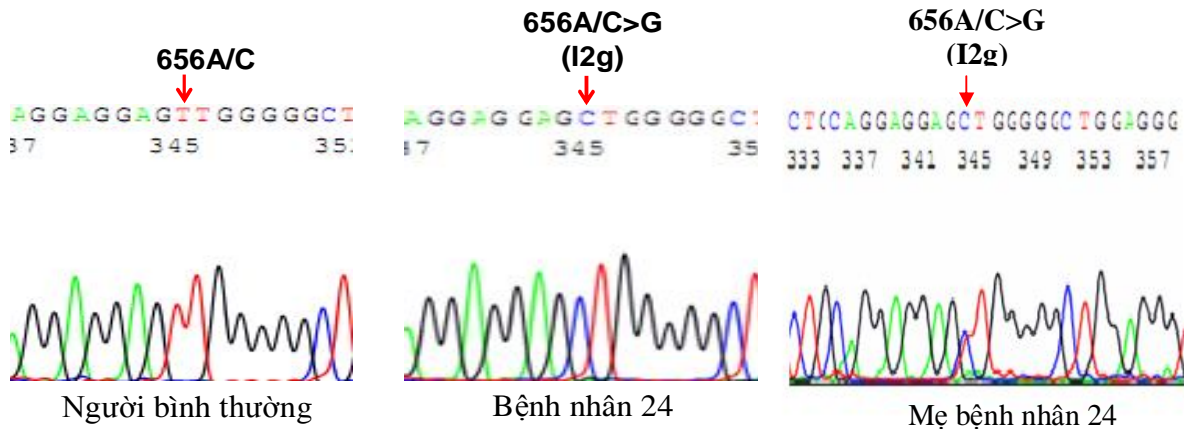
1.4.1. Xác định đột biến điểm

Có nhiều kỹ thuật dùng để phát hiện đột biến điểm bao gồm giải trình tự gen, SSCP- Single Strand Conformation Polymorphism, RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism, khuếch đại alen đặc hiệu (allele specific polymerase chain reaction). Mỗi kỹ thuật đều có các ưu nhược điểm khác nhau. Kỹ thuật SSCP, RFLP có giá thành rẻ nhưng chỉ là kỹ thuật phát hiện đột biến gián tiếp nên cần phải kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp; kỹ thuật khuếch đại alen đặc hiệu chỉ xác định được những đột biến đã biết trước. Kỹ thuật giải trình tự gen là kỹ thuật phát hiện đột biến trực tiếp và có thể phát hiện được tất cả các đột biến trên gen, tuy nhiên đắt hơn các kỹ thuật khác. Ngày nay do kỹ thuật giải trình tự gen có giá thành rẻ hơn trước đây nên đã được sử dụng khá rộng rãi để phát hiện đột biến điểm [56]. Các đột biến điểm phổ biến được phát hiện trên gen *CYP21A2* bao gồm: c.293-13A>G; c.293-13C>G; p.P30L; p.I172N; p.I237A; p.V238G; p.M240L; p.V282L; p.L308P; p.G319X; p.357T; và mất đoạn 30-kb.

Dựa vào kết quả của bệnh nhân đã biết được vị trí đột biến và dạng đột biến trên gen *CYP21A2*, kỹ thuật giải trình tự gen là phương pháp phát hiện được 99-100% các đột biến cho các trường hợp người lành mang gen bệnh.

Đoạn DNA cần giải trình tự được sử dụng như trình tự mẫu cho phản ứng khuếch đại gen (PCR) bắt đầu từ vị trí gắn mồi. Sử dụng máy giải trình tự gen tự động được thiết kế trên nguyên tắc sử dụng dideoxynucleotid (ddNTP) do Sanger và CS phát minh. Dựa vào màu huỳnh quang máy sẽ nhận diện được các nucleotid, từ đó biết được trình tự của DNA đích.

So sánh trình tự gen của mẫu DNA bệnh nhân với trình tự gen chuẩn của GenBank (National center for biotechnology information, NCBI) và phương pháp ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) [11], [57],[72].



Hình 1.10. Hình ảnh giải trình tự gen *CYP21A2* ở Intron 2

(kết quả giải trình tự gen theo chiều ngược)

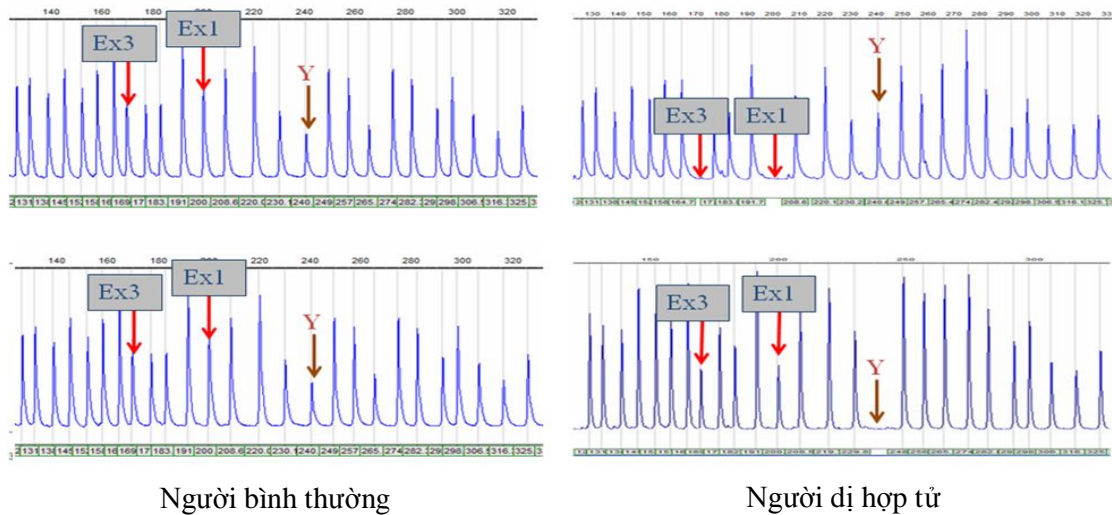
Trình tự bình thường tại vị trí 656 ở intron 2 là A hoặc C, ở mẫu bệnh nhân bị chuyển thành G; mẹ bệnh nhân xuất hiện hai đỉnh tương ứng với nucleotid C và G chứng tỏ là người mẹ mang gen dị hợp tử.

1.4.2. Xác định đột biến mất đoạn/lặp đoạn

Các kỹ thuật để phát hiện đột biến mất đoạn hay lặp đoạn gen bao gồm: PCR, PCR định lượng, Southern blots.... Gần đây, một phương pháp mới là MLPA- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification đã được sử dụng một cách rộng rãi. Đây là phương pháp nhanh và chính xác để phát hiện xóa đoạn và đột biến lặp đoạn ở bệnh TSTTBS nói riêng và một số bệnh lý di truyền nói chung [11].

Phương pháp MLPA được sử dụng cho phát hiện các đột biến mất đoạn, lặp đoạn hoặc chuyển đoạn trên gen *CYP21A2*. Để chẩn đoán bệnh TSTTBS do các đột biến mất đoạn có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau, nhưng để phát hiện cho chẩn đoán dị hợp tử thì kỹ thuật MLPA với độ chính xác cao và cho kết quả nhanh hơn. Trong một nghiên cứu mới năm 2014, ở Đức trên 161 bệnh nhân bị bệnh TSTTBS bằng phương pháp MLPA đã phát hiện trên 30% các đột biến xóa đoạn và các chuyển đoạn nhỏ cho kết quả nhanh hơn phương pháp Southern blot. Nếu các đột biến mất đoạn nhỏ thì dùng

phương pháp giải trình tự gen sẽ cho kết quả chính xác hơn [11],[26],[73], [74].



Hình 1.11. Hình ảnh kết quả đột biến gen bằng kỹ thuật MLPA

1.5. TƯ VẤN DI TRUYỀN (genetic counseling)

Dựa trên kết quả chẩn đoán bệnh bằng các phương pháp:

- Triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm, kết quả phân tích sinh học phân tử tế bào: NST, kết quả phân tích gen... để chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh.
- Lập phả hệ để tìm quy luật di truyền. Phân tích các tỷ lệ phân ly gen bệnh trong sơ đồ phả hệ, tính nguy cơ di truyền, mức độ nguy hiểm của bệnh trong gia đình, trong quần thể.
- Chẩn đoán trước sinh cho thai nhi.

Lời khuyên di truyền được các bác sĩ đưa ra cho cặp vợ chồng về khả năng bị bệnh của con họ, cho một cá thể trước khi kết hôn và sự lựa chọn khả năng sinh con của họ. Lời khuyên di truyền gồm: Phương pháp điều trị, nuôi dưỡng của trẻ bị bệnh, phương pháp phòng bệnh cho gia đình, cho các thành viên khác của dòng họ, khả năng điều trị bệnh di truyền của thai nhi để gia đình quyết định lựa chọn sinh con hay đình sản.

Bệnh TSTTBS là một bệnh di truyền đơn gen lặn, bệnh điều trị được

bằng hormon thay thế suốt đời, do vậy nội dung tư vấn gồm:

1. Thông báo kết quả chẩn đoán bệnh bằng các đột biến gen đã tìm thấy trên gen *CYP21A2*.

- Các phương pháp điều trị: liệu pháp thay thế hormon suốt đời cho cả hai giới, kế hoạch phẫu thuật chỉnh hình bộ phận sinh dục cho trẻ gái bị bệnh.

- Các cách chăm sóc và theo dõi tránh các biến chứng cho trẻ khi ở nhà và trường học...

2. Sự cần thiết và phương pháp xét nghiệm phát hiện người lành mang gen bệnh cho các thành viên gia đình để quản lý và tư vấn di truyền.

3. Chẩn đoán trước sinh cho :

- Các cặp vợ chồng là dị hợp tử mang gen bệnh TSTTBS.

- Gia đình đã sinh con bị bệnh TSTTBS.

- Cặp vợ chồng có một người mang gen dị hợp tử gây bệnh TSTTBS lấy một người bị bệnh TSTTBS.

Khi thai nhi bị bệnh, bác sĩ sẽ thông báo cho gia đình biết và kế hoạch điều trị cho thai nhi. Bác sĩ giải thích kế hoạch điều trị thuốc dexamethasone tiếp tục cho thai nhi nữ bị bệnh đến khi sinh và kế hoạch điều trị hormon thay thế sau khi sinh. Nếu thai nhi bị bệnh là con trai, bác sĩ thông báo và giải thích kế hoạch điều trị sớm cho trẻ ngay sau khi sinh.

4. Cung cấp thông tin và giải thích cho các thành viên gia đình về sự nguy hiểm làm tăng tỷ lệ bệnh khi kết hôn cận huyết hoặc trong các quần thể cô lập của bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường để từ đó giáo dục y tế cho cộng đồng [2],[64].

1.6. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU BỆNH TSTTBS Ở VIỆT NAM

Năm 1991, Nguyễn Thu Nhạn và cộng sự đã tổng kết 36 bệnh nhân mắc hội chứng sinh dục thượng thận trong giai đoạn 1981-1990, chiếm tỷ lệ 1,9% tổng số bệnh nhân nội tiết, có tỷ lệ tử vong là 5,5% [75].

Năm 1996, Nguyễn Thị Phương đã nghiên cứu về phương diện di truyền trên 31 bệnh nhân hội chứng sinh dục thượng thận tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 1980 – 1990. Tác giả đã nhận thấy bệnh mang đủ các đặc tính di truyền lặn nằm trên NST thường [64].

Năm 1994, Nguyễn Thu Nhận tổng kết các dấu hiệu lâm sàng, cận lâm sàng chung của 55 bệnh nhân TSTTBS điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương với phác đồ điều trị cấp cứu con suy thượng thận hiện nay, gần 95% bệnh nhân được cứu sống [76].

Nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh do đột biến gen được bắt đầu bằng đề tài của Võ Kim Huệ. Năm 2000, Võ Thị Kim Huệ, Nguyễn Thu Nhận và Nguyễn Thị Phương công bố nghiên cứu chẩn đoán và điều trị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH ở 43 bệnh nhân khám và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương 1989-1997. Nghiên cứu đưa ra các dấu hiệu lâm sàng và giá trị của 17-OHP, progesteron và testosterone để giúp chẩn đoán, theo dõi bệnh. Nghiên cứu sử dụng hydrocortison và florinef điều trị bệnh thay cho prednisolon, đặc biệt tác giả đã sử dụng kỹ thuật khuếch đại gen để phát hiện đột biến mất đoạn 8bp ở exon 3 cho 9 bệnh nhân [29].

Năm 2001, Thái Thiên Nam, Nguyễn Thị Phương và Võ Thương Lan nghiên cứu phát hiện đột biến mất đoạn ở exon 3 của gen *CYP21A2* cho bệnh nhân bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH và phân tích gen cho 3 gia đình phát hiện được 1 gia đình có người lành mang gen bệnh [77], [78].

Năm 2006, Trần Kiên Hào, Nguyễn Thị Phượng và Võ Thương Lan lần đầu tiên công bố đột biến điểm gây bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH ngoài đột biến mất đoạn ở Việt Nam. Tác giả đã phát hiện trên 10 bệnh nhân có đột biến mất đoạn 8bp ở exon 3 và 8 bệnh nhân có đột biến điểm I2g đơn thuần, 5 bệnh nhân kết hợp I2g với mất đoạn 8bp, 1 bệnh bị đột biến p.P30L và phát hiện người lành mang gen bệnh cho 5 gia đình có 4 người mang gen bệnh [79].

Năm 2012 báo cáo của Vũ Chí Dũng và CS phân tích gen cho 81 bệnh nhân TSTTBS phát hiện các đột biến gen *CYP21A2* đã phát hiện thêm nhiều đột biến mất đoạn và đột biến điểm khác ở Việt Nam [80].

Như vậy nghiên cứu phát hiện người lành mang gen bệnh cho bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH đã có hai đề tài của Thái Thiên Nam và Trần Kiên Hào còn chẩn đoán trước sinh cho bệnh TSTTBS chưa có đề tài được công bố.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu 1: Xác định người lành mang gen bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH

130 thành viên trong gia đình bao gồm bố, mẹ, anh, chị, em ruột của bệnh nhân TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH đã được phát hiện mang đột biến trên gen *CYP21A2*.

2.1.2 Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu 2: Chẩn đoán trước sinh bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH

12 thai phụ mang gen dị hợp tử có nguy cơ cao sinh con bị bệnh (có con và chồng đã được xác định đột biến).

2.1.3 Tiêu chuẩn loại trừ

+ Các thành viên của gia đình không đồng ý hợp tác tham gia xét nghiệm và chẩn đoán trước sinh.

+ Những bệnh nhân và gia đình đã được công bố trong những đề tài nghiên cứu trước.

+ Những thai phụ được phát hiện là người lành mang gen nhưng đang bị các bệnh về rối loạn đông máu, viêm gan B, HIV ...và các bệnh lý có nguy cơ gây sảy thai khi làm thủ thuật chọc ối.

2.2 ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

- Đề tài được tiến hành tại khoa Nội tiết-Chuyển hóa-Di truyền và phòng xét nghiệm sinh hóa, huyết học, khoa chẩn đoán hình ảnh của Bệnh viện Nhi Trung ương là nơi chẩn đoán, điều trị và quản lý bệnh nhân.

- Thủ thuật chọc dịch ối được thực hiện tại Trung tâm Chẩn đoán trước sinh, Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

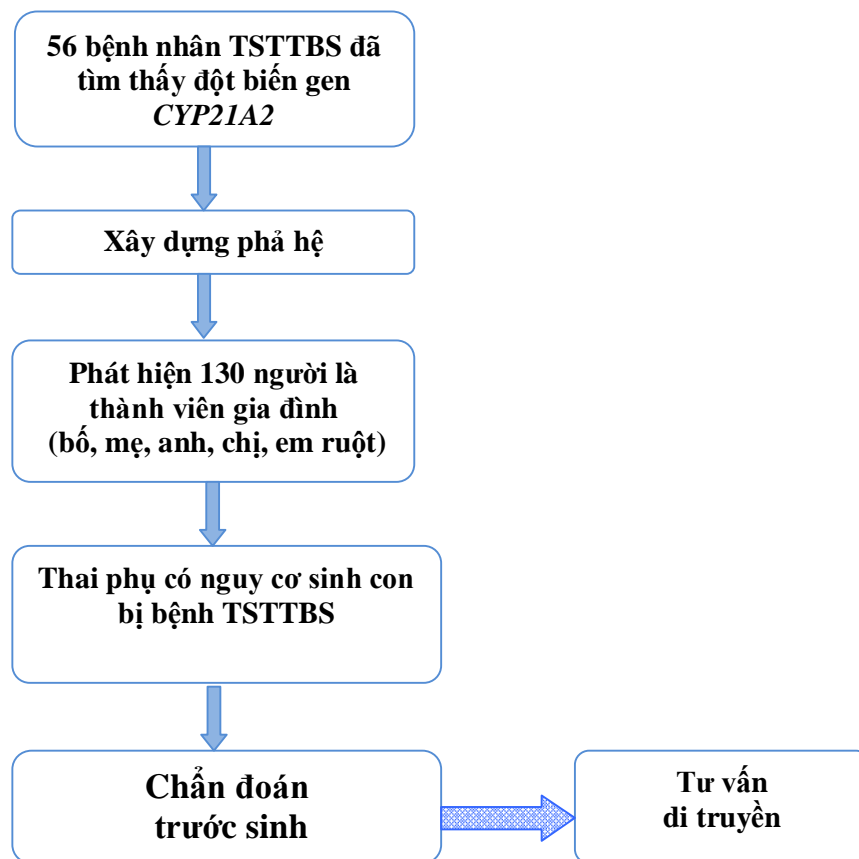
- Các xét nghiệm sinh học phân tử thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Gen và Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

2.3 THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

Thời gian 3 năm: từ tháng 9 năm 2011 đến 9 năm 2014.

2.4 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Thiết kế nghiên cứu. Nghiên cứu tiến cứu mô tả, cắt ngang.



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.4.2. Mẫu nghiên cứu

Số lượng bệnh nhân theo phương pháp chọn mẫu tiện ích.

2.4.3. Chỉ số nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu cho mục tiêu 1:

- Lập phả hệ gia đình bệnh nhân TSTTBS.
- Tuổi của các thành viên gia đình bệnh nhân.
- Kết quả phân tích đột biến gen *CYP21A2* cho bố, mẹ, anh, chị, em bệnh nhân TSTTBS đã tìm thấy đột biến.

Nội dung nghiên cứu cho mục tiêu 2:

- Các thông tin về tình trạng thai sản của các thai phụ đang mang thai tuần thứ 6-16 tuần: tuổi của thai phụ, tuổi thai nhi (tính theo kỳ kinh cuối của thai phụ)
- Chọc ối cho các thai phụ vào 15-16 tuần.
- Phân tích gen *CYP21A2* cho thai nhi.

2.5. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU CHO MỤC TIÊU 1

Lựa chọn bệnh nhân được chẩn đoán xác định bệnh TSTTBS thể thiếu hụt enzym 21-OH dựa theo đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm sinh hóa (phụ lục 1).

Bệnh nhân đã được xác định có đột biến gen *CYP21A2*.

2.5.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

- ◆ Bệnh nhân bị TSTTBS: Tuổi. Giới: nam, nữ. Thể bệnh: mất muối, nam hóa đơn thuần.
- ◆ Khai thác xây dựng phả hệ gia đình cho từng bệnh nhân theo ký hiệu qui ước quốc tế của hội di truyền người qui định (bảng phụ lục 3)[56]
- ◆ Tất cả các thành viên trong gia đình gồm: cha, mẹ, anh, chị, em ruột của bệnh nhân được khám xét lâm sàng theo phương pháp mô tả, tư vấn để tiến hành xét nghiệm phát hiện đột biến gen *CYP21A2*.
- ◆ Thành viên gia đình: Bố, mẹ, anh, chị, em ruột sau khi có kết quả đột biến gen được chia làm ba nhóm:
 - Không mang gen đột biến *CYP21A2* tức là người lành hoàn toàn.
 - Có mang một 1 gen đột biến *CYP21A2* là người lành mang gen bệnh hay còn gọi là dị hợp tử.

- Có mang 2 alen đột biến khác nhau trên gen *CYP21A2* là người bệnh mang gen dị hợp tử kép.

◆ Lập phả hệ cho gia đình bệnh nhân tối thiểu 3 thế hệ: ông, bà, cha, mẹ và các con theo ký hiệu đã được qui định.

Mỗi gia đình nghiên cứu có một hồ sơ gồm các thông tin về bệnh nhân: Tuổi của bệnh nhân và các thành viên gia đình, lâm sàng, chẩn đoán, kết quả đột biến gen và phả hệ của gia đình, các thông tin về anh, chị, em ruột của bệnh nhân.

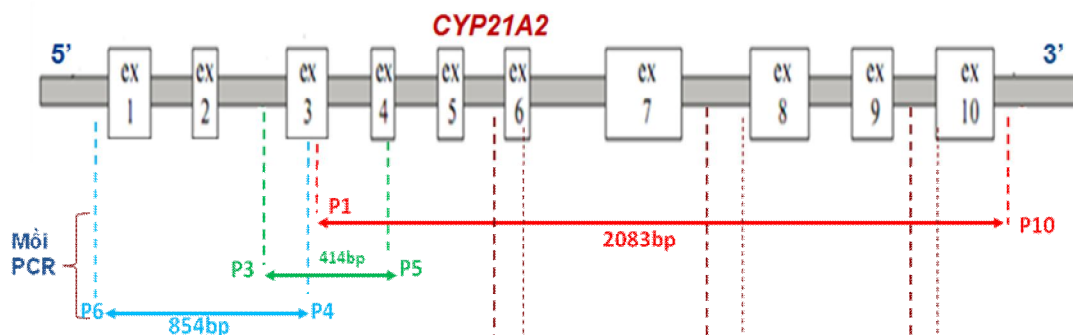
2.5.2 Tiến hành xét nghiệm

2.5.2.1. Quy trình thu thập mẫu nghiên cứu và tách chiết DNA

Tất cả các thành viên của gia đình bệnh nhân lấy 2ml - 5ml máu ngoại biên. Tách chiết DNA bằng Phenol/Chloroform theo phương pháp thường quy của Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein. Đo và kiểm tra nồng độ DNA bằng máy đo nồng độ Nano Drop 1000, chỉ những mẫu DNA có độ tinh sạch 1,8-2 mới được sử dụng phát hiện đột biến gen.

2.5.2.2. Kỹ thuật PCR

Toàn bộ chiều dài gen *CYP21A2* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu P1-P10; P3-P5; P6-P4.



Hình 2.2. Vị trí các mồi cho phản ứng PCR khuếch đại gen *CYP21A2* [4].

- Thành phần phản ứng PCR

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

Chu trình nhiệt phản ứng PCR

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 10 phút		
2 – 34	95°C - 50 giây	55°C - 50 giây	72°C - 2 phút
35			72°C - 10 phút
Bảo quản ở 10°C			

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, 90V trong 30 phút.

2.5.2.3. Kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm

Quy trình thực hiện giải trình tự gen:

Thực hiện theo qui trình và sử dụng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

+ Giai đoạn 1: Chuẩn bị master mix cho phản ứng PCR

- Chuẩn bị effendorf 0,2ml đã đánh dấu sẵn thứ tự các mẫu.
- Chuẩn bị hóa chất để thực hiện phản ứng.
- Làm tan hoàn toàn hóa chất, trộn đều sau đó ly tâm nhẹ để toàn bộ dịch

trên nắp ống rơi xuống.

- Tiến hành pha master mix theo bảng sau:

Thành phần	Thể tích (μl)
Sản phẩm sau PCR đã được tinh sạch	1,0
Big Dye Buffer 5X	3,0
Big Dye terminator V3.1 (2,5X)	2,0
Nước cất PCR	13,0
Mồi đơn (5pmol/ μ l)	1,0
Tổng	20

+ **Giai đoạn 2: Chu trình nhiệt của PCR Sequencing**

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	96°C - 1 phút		
2 – 26	96°C - 10 giây	50°C - 5 giây	60°C - 4 phút
Bảo quản ở 10°C			

- Các sản phẩm sau khi được khuếch đại bằng Big dye kit sẽ được tinh sạch bằng big Dye termination để loại bỏ toàn bộ big dye thừa và đem đọc trên máy giải trình tự gen ABI (Applied Biosystem).

- Các nucleotid trên gen sẽ được biểu hiện bằng các đỉnh (peak) với 4 màu tương đương với 4 loại nucleotid A,T,G,C.

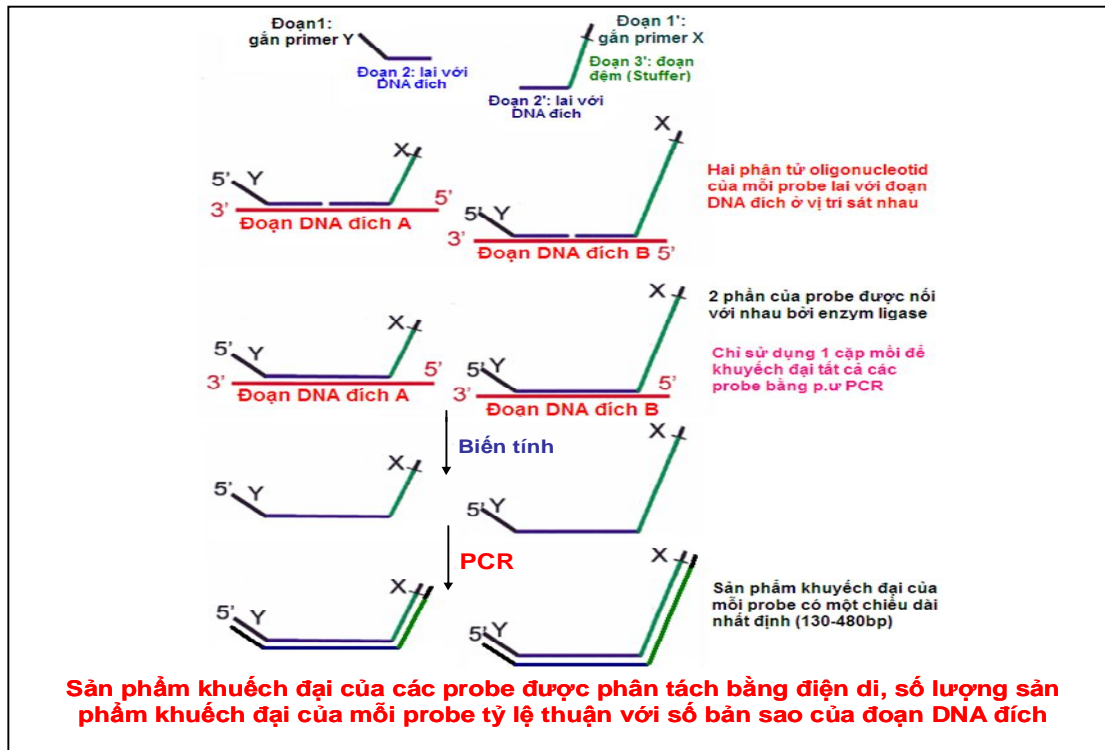
2.5.2.4. Phương pháp phân tích kết quả

- Các nucleotid trên gen sẽ được biểu hiện bằng các đỉnh (peak) với 4 màu tương đương với 4 loại nucleotid A, T, G, C.

Kết quả giải trình tự gen được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. Mẫu DNA của bệnh nhân được so sánh với mẫu DNA đối chứng và trình tự của *CYP21A2* trên GeneBank (Accession number NM_0005002).

2.5.2.5. Kỹ thuật MLPA xác định đột biến xóa đoạn

- *Nguyên tắc:* Trong phản ứng MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) việc thiết kế các probe gắn đặc hiệu với các đoạn DNA đích đóng vai trò cực kỳ quan trọng. Thông thường, mỗi probe chứa hai phân tử oligonucleotid có kích thước khác nhau.



Hình 2.3. Các giai đoạn của kỹ thuật MLPA

+ Phân tử oligonucleotid ngắn gồm 2 đoạn:

- Đoạn 1 có trình tự nucleotid đặc hiệu với đoạn DNA đích và sẽ lai với DNA đích khi tiến hành phản ứng lai. Đoạn này có khoảng 21÷30 nucleotid nằm ở đầu 3' của probe.

- Đoạn 2 nằm ở đầu 5', chứa khoảng 19 nucleotid. Trình tự nucleotid của đoạn này giống nhau cho các probe. Đây là vị trí gắn với môi Y để khuếch đại probe khi tiến hành phản ứng PCR.

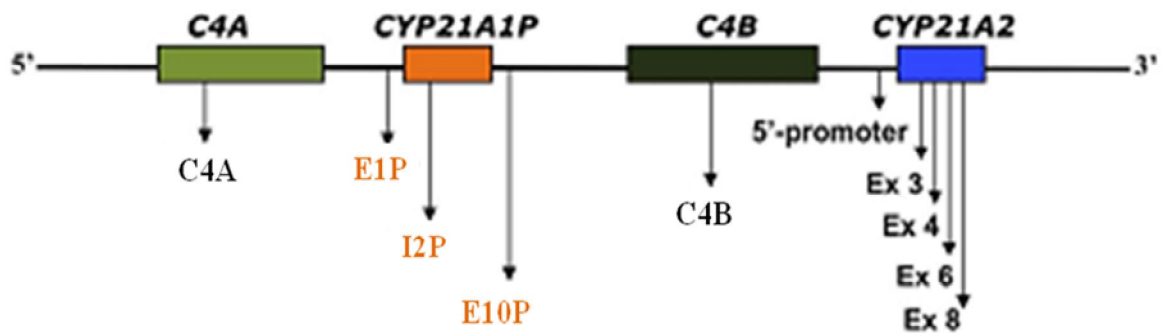
+ Phân tử oligonucleotid dài gồm 3 đoạn:

- Đoạn 1' chứa 25÷43 nucleotid, gắn đặc hiệu với DNA đích ở đầu tận 5'.
- Đoạn 2' gồm 36 nucleotid ở đầu 3', trình tự nucleotid giống nhau cho các probe. Đây là vị trí gắn với môi X đặc hiệu để khuếch đại probe.

• Đoạn 3' còn gọi là đoạn nucleotid đệm (stuffer) nằm giữa hai đoạn 1' và 2', cấu tạo gồm từ 19 đến 370 nucleotid. Trình tự nucleotid không đặc hiệu với DNA đích nên nó không gắn vào DNA đích. Chiều dài đoạn stuffer khác nhau ở các probe, vì vậy các probe khác nhau sẽ có chiều dài khác nhau. Do đó, sản phẩm khuếch đại của các probe sẽ được phân tách bằng điện di.

Trong mỗi phản ứng có chứa các probe nội chuẩn, khi probe nội chuẩn lên đỉnh tương ứng là điều kiện đảm bảo độ tin cậy khi nhận định kết quả. Ngoài ra trong kỹ thuật MLPA có sử dụng chứng là DNA của người bình thường, chạy song song cùng mẫu bệnh nhân để so sánh.

Sau phản ứng PCR, mỗi probe sẽ được khuếch đại thành nhiều bản sao. Các probe khác nhau sẽ có kích thước khác nhau do độ dài đoạn đệm của chúng khác nhau. Do vậy, chúng sẽ được phân tách bằng phương pháp điện di (thường sử dụng phương pháp điện di mao quản). Số lượng sản phẩm khuếch đại của mỗi probe sẽ tỷ lệ thuận với số bản copy của đoạn DNA đích đặc hiệu với probe đó.



Hình 2.4. Sơ đồ và vị trí một số probe của Kit MLPA P050B2 [4]

Chú thích: Ex1, Ex3, Ex4, Ex6, Ex8, là các probe tương ứng với các exon 1, 3, 4, 6, 8 của gen CYP21A2; E1P, I2P, E10P là các probe tương ứng với vị trí exon 1, intron2, exon 10 của gen CYP21A1P; C4A, C4B là probe tương ứng với gen C4A, C4B.

Nghiên cứu này sử dụng kit MLPA (MRC- Holland): Kit gồm các probe sử dụng trong chẩn đoán đột biến gen *CYP21A2* gọi là P050B2. Hỗn hợp probe này bao gồm 5 probe cho gen *CYP21A2* (Ex1, Ex3, Ex4, Ex6, Ex8) tương đương với các đột biến mất đoạn $\Delta 8$ bp, I172N, E6 cluster và Q318X. Hỗn hợp probe này còn bao gồm 3 probe đặc hiệu cho gen *CYP21A1P* (E1P, I2P, E10P), 2 probe cho bổ thể *C4A*, *C4B* (*C4A*, *C4B*). Ngoài ra, có 22 probe đặc trưng cho gen của người cũng được sử dụng trong hỗn hợp để làm đối chứng và 2 probe cho nhiễm sắc thể X và Y để xác định giới tính.

- *Tiến hành phản ứng MLPA*

+ Bước 1: Biến tính DNA.

Cho 5 μ l dung dịch DNA (nồng độ 10÷20 ng/ μ l) cần phân tích vào ống PCR, biến tính ở 98°C trong 5 phút, chuyển về giữ ở 25°C.

+ Bước 2: Gắn (lai) probe vào gen đích.

• Chuẩn bị hỗn hợp lai:

Thành phần	Thể tích
Dung dịch đệm MLPA	1,5 μ l
Hỗn hợp probe	1,5 μ l
<i>Tổng số</i>	<i>3μl</i>

• Cho 3 μ l hỗn hợp lai vào mẫu DNA đã biến tính, nâng nhiệt độ lên 95°C trong 1 phút để biến tính probe, hạ nhiệt độ xuống 60°C, ủ qua đêm (12÷24h). Đây là nhiệt độ để probe gắn đặc hiệu vào đoạn gen đích.

+ Bước 3: Nối 2 đầu probe

• Chuẩn bị dung dịch đệm gắn probe: các dung dịch hóa chất cần vortex nhẹ cho đều trước khi pha dung dịch đệm

Thành phần	Thể tích
-------------------	-----------------

Dung dịch đệm A	3 μ l
Dung dịch đệm B	3 μ l
Nước	25 μ l
Enzym ligase 65	1 μ l
<i>Tổng số</i>	<i>32μl</i>

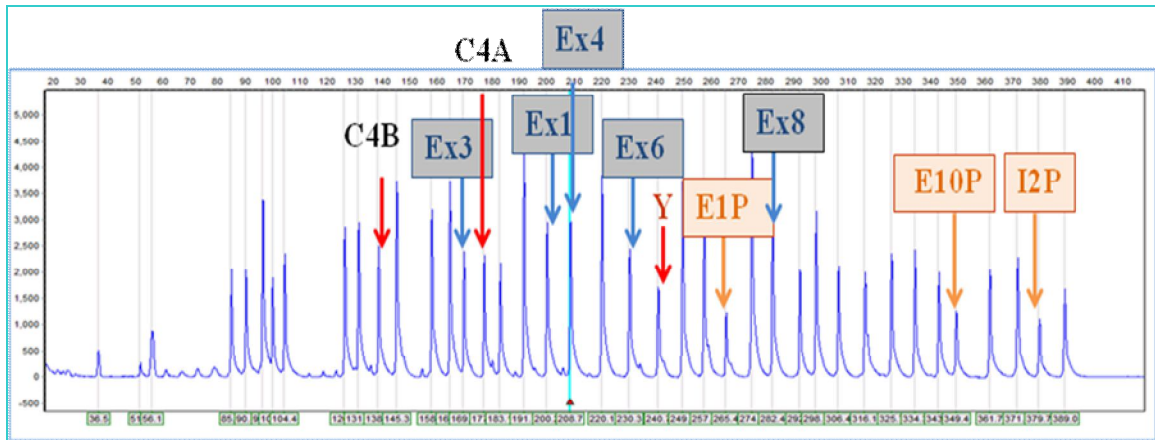
- Cho 32 μ l dung dịch đệm gắn probe vào hỗn hợp lai ủ qua đêm ở trên khi mẫu ở 54°C, tiếp tục chạy theo chu trình nhiệt sau: 54°C/ 15 phút→ 98°C/5 phút→ 4°C/∞. Sản phẩm lai này sẽ lưu trữ được 1 tuần/4°C, hoặc lâu hơn ở -20°C.

+ Bước 4: Khuếch đại sản phẩm lai (probe).

- Dung dịch đệm phản ứng PCR: 4 μ l dung dịch đệm PCR, 26 μ l nước. Cho thêm vào hỗn hợp 10 μ l sản phẩm lai, đưa vào máy giữ ở 60°C.

- Pha hỗn hợp phản ứng PCR gồm primer (có gắn huỳnh quang) 2 μ l, dung dịch đệm 2 μ l, nước 5,5 μ l, Tag polymerase 0,5 μ l. Cho 10 μ l hỗn hợp phản ứng PCR này vào hỗn hợp đang trong máy giữ ở 60°C. Tiếp tục chu trình nhiệt: (95°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/1 phút) x 35 chu kỳ, 72°C/20 phút, giữ ở 4°C.

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



Hình 2.5. Hình ảnh minh họa kết quả MLPA

Chú thích: Trục hoành biểu hiện kích thước sản phẩm PCR tăng dần theo chiều từ trái sang phải. Trục tung thể hiện nồng độ của các sản phẩm PCR tỉ lệ thuận với chiều cao của các đỉnh. Bệnh nhân có đột biến xóa đoạn khi không xuất hiện đỉnh tương ứng với exon bị xóa đoạn và là người lành mang gen bệnh khi chiều cao đỉnh bằng $\frac{1}{2}$ so với chiều cao đỉnh của mẫu đối chứng. Ex1, Ex3, Ex4, Ex6, Ex8, là các đỉnh tương ứng với vị trí exon 1, 3, 4, 6, 8 của gen CYP21A2. E1P, I2P, E10P là các đỉnh tương ứng với vị trí exon 1, intron2, exon 10 của gen CYP21A1P. C4A, C4B là đỉnh tương ứng với gen C4A, C4B. Y là đỉnh tương ứng với nhiễm sắc thể Y.

2.6. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH CHO MỤC TIÊU 2: CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH

Thu thập thông tin nghiên cứu của mỗi thai phụ có nguy cơ cao sinh con bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH bằng các phương pháp tiến hành sau:

+ Mỗi thai phụ nghiên cứu có một hồ sơ bao gồm các thông tin về tình trạng sức khỏe của thai phụ: lâm sàng, chẩn đoán, xét nghiệm sinh hóa, siêu âm, kết quả đột biến gen và phả hệ của gia đình.

+ Sử dụng phương pháp lấy mẫu xâm phạm thai: chọc ối ở tuần thai 15-16 để xác định tế bào thai nhi, sau đó phân tích gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen và MLPA để tìm đột biến gen CYP21A2.

2.6.1. Chỉ số nghiên cứu

- Tuổi mẹ, tuổi thai.
- Dấu hiệu lâm sàng:
 - + Cân nặng: chỉ số cân nặng trước mang thai và số cân nặng hiện tại.
 - + Dấu hiệu phù: có hay không?
 - + Đếm mạch: bắt mạch cánh tay, đếm trong 1 phút. Mạch bình thường 80-90 lần/ phút.
 - + Đo huyết áp: đo huyết áp 1 tháng/ 1 lần.
 - + Hình dáng bên ngoài của thai phụ: có dấu hiệu bất thường không?
 - + Khám các bộ phận khác như nghe tim, phổi, tiêu hóa.... tìm dấu hiệu bất thường.
- Xét nghiệm: glucose máu và protein niệu lấy cùng một lúc và xét nghiệm tại phòng xét nghiệm sinh hóa của bệnh viện nơi đăng ký khám thai.
- Tình trạng của thai:
 - Đo chiều cao tử cung (đơn vị cm).
 - Đo vòng bụng (đơn vị là cm).
 - Nhịp tim thai.
 - Tình trạng nước ối.
- + Quá trình khám và theo dõi thai do các bác sĩ sản khoa nơi sản phụ đăng ký theo dõi thai đảm nhiệm.

2.6.2. Phương pháp lấy mẫu ối và kỹ thuật phân tử để phát hiện đột biến gen *CYP21A2*

Tiến hành làm hồ sơ chọc ối tại khoa Chẩn đoán trước sinh - Bệnh viện Phụ sản Trung ương ở tuần thai thứ 14-16. Mỗi thai phụ sẽ được làm hồ sơ xin chọc ối theo quy định của bệnh viện. Các bác sĩ sản khoa sẽ khám toàn diện về lâm sàng và siêu âm thai để loại trừ các tình trạng nhiễm trùng cấp tính, các tình trạng bất thường của mẹ và thai. Để tránh các tai biến có thể xảy

ra trong quá trình làm thủ thuật chọc ối gây nguy hiểm cho mẹ và thai. Hồ sơ sau khi được thông qua tại Hội đồng chuyên môn của Bệnh viện, thai phụ sẽ được hẹn lịch chọc ối tại Trung tâm Chẩn đoán trước sinh. Phương pháp chọc ối dưới sự hướng dẫn của siêu âm, do các bác sĩ tại Trung tâm Chẩn đoán trước sinh Bệnh viện Phụ sản Trung ương tiến hành.

Dịch ối được bảo quản và vận chuyển về Trung tâm Nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội trong vòng 1-2 giờ.

+ Tách chiết DNA từ tế bào ối.

+ Xác định đột biến gen *CYP21A2* bằng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen. Quy trình được mô tả ở mục 2.5.

Mẫu DNA đối chứng dương, DNA đối chứng âm và DNA của anh hoặc chị thai nhi được phân tích cùng với mẫu DNA thai nhi để xác định đột biến. Kết quả thu được, là cơ sở khoa học để tư vấn di truyền và có kế hoạch điều trị cho thai nhi.

- Thai nhi bị bệnh mang đột biến gen *CYP21A2*, sau khi sinh được thăm khám và điều trị sớm theo phác đồ tại Bệnh viện Nhi Trung ương (phụ lục 2)

- Thai nhi mang gen dị hợp tử sẽ được thông báo cho gia đình và lập hồ sơ theo dõi, quản lý và tư vấn di truyền.

- Thai nhi bình thường, không mang gen gây bệnh thông báo cho gia đình.

2.6.3. Tư vấn di truyền

- Thông báo kết quả chẩn đoán bệnh của thai nhi cho gia đình.

- Nếu thai nhi bị bệnh hướng dẫn gia đình theo dõi và lập kế hoạch điều trị bệnh cho thai nhi sau khi sinh. Lập hồ sơ điều trị và quản lý bệnh di truyền.

- Nếu thai nhi mang gen dị hợp tử, lập hồ sơ cùng với các thành viên trong gia đình để quản lý bệnh di truyền.

- Nếu thai nhi bị bệnh, gia đình xin đình sản, chúng tôi hướng dẫn và giúp đỡ gia đình lập hồ sơ, thực hiện đình sản tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

- Giải thích và hướng dẫn gia đình tham gia sinh hoạt hội “ Câu lạc bộ bệnh Tăng sản thượng thận bẩm sinh” để các thành viên và bệnh nhân được tư vấn đầy đủ về bệnh của trẻ và hợp tác với các bác sĩ để điều trị có hiệu quả tốt và phòng bệnh cho các thành viên khác trong gia đình và dòng họ.

2.7. XỬ LÝ KẾT QUẢ

Các số liệu được nhập bằng phần mềm EPIDATA 3.1.

Tất cả các số liệu và kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê y học. Phân tích thống kê mô tả, so sánh, tỷ lệ phần trăm (%).

2.8. ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

Đề tài tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học. Các thành viên gia đình hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Các gia đình và bệnh nhân có thể rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia. Các thành viên của gia đình được thông báo về kết quả xét nghiệm gen, đồng thời giải thích về khả năng điều trị và phòng bệnh của con họ để gia đình sẵn sàng hợp tác với các bác sĩ trong quá trình điều trị và thực hiện tư vấn di truyền. Bác sĩ di truyền sẽ lập hồ sơ theo dõi lâu dài cho thai nhi và các thành viên gia đình. Các thông tin của bệnh nhân và gia đình sẽ được đảm bảo bí mật.

Chương 3

KẾT QUẢ

Trong thời gian từ tháng 9. 2011 đến 9. 2014, chúng tôi tiến hành xét nghiệm gen cho 130 thành viên của 56 gia đình có con bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21- hydroxylase và chẩn đoán trước sinh cho 12 thai phụ là người mẹ đã mang gen dị hợp tử của các gia đình, thu được kết quả sau:

3.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM NGHIÊN CỨU

Sau khi phân tích gen và lập hồ sơ nghiên cứu cho 56 gia đình bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH có các đặc điểm sau:

3.1.1. Phân bố theo giới và tuổi của bệnh nhân

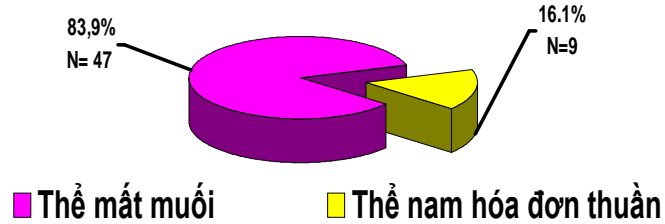
Bảng 3.1. Phân bố theo giới và tuổi của bệnh nhân tại thời điểm nghiên cứu

Nhóm tuổi	Nam		Nữ		Chung hai giới	
	n	Tỷ lệ%	n	Tỷ lệ%	n	Tỷ lệ%
Từ < 1 tuổi	19	63,3	12	46,2	31	55,4
Từ 1 - 5 tuổi	8	26,6	10	38,4	18	32,1
>5 tuổi	3	10,1	4	15,4	7	12,5
Tổng số	30	100	26	100	56	100

Nhận xét :

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

3.1.2. Phân bố thể lâm sàng của bệnh nhân



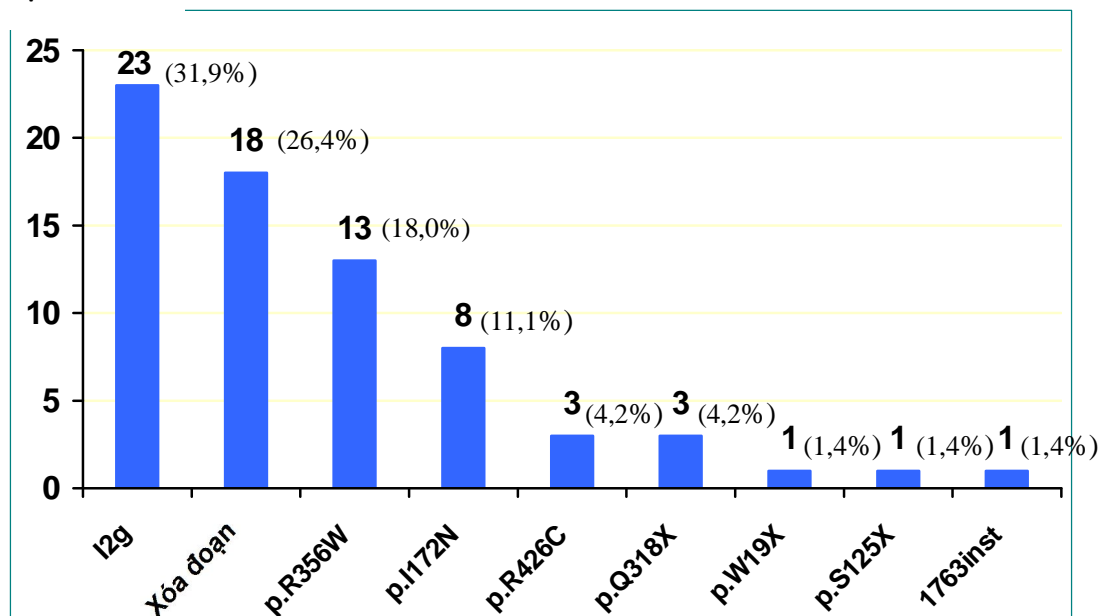
Biểu đồ 3.1. Phân bố theo thẻ lâm sàng của bệnh nhân nghiên cứu

Nhận xét:

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

3.1.3. Phân bố kiểu gen của bệnh nhân

Bệnh nhân



Biểu đồ 3.2. Phân bố kiểu gen của bệnh nhân

Nhận xét:

Trong 56 bệnh nhân, đột biến điểm tại intron 2 (I2g) có tỷ lệ cao nhất: 31,9%, xóa đoạn: 26,4%, p.R356W: 18,0%.

3.1.4. Đặc điểm thành viên gia đình bệnh nhân

Bảng 3.2. Các thành viên trong gia đình bệnh nhân

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

Nhận xét:

Phân tích phả hệ của 56 bệnh nhân bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH, có 130 thành viên gia đình được phân tích gen. Trong các thành viên gia đình, có 56 người mẹ và 55 người bố tỷ lệ: 85,5% (1 người bố vì đã mất nên không phân tích được gen). Anh, chị, em ruột bệnh nhân có 19 người (tỷ lệ 14,5%) đã được phân tích gen, trong đó: anh trai: 3,8%, chị gái: 4,6%, em trai: 3,8%, em gái: 2,3%.

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

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

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

Nhận xét:

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

3.1.6. Đặc điểm thai phụ được chẩn đoán trước sinh

Có 12 thai phụ được tiến hành chẩn đoán trước sinh, là mẹ đã sinh một con bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH, trong lần sinh con tiếp theo.

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

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

Nhận xét:

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

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

3.2. KẾT QUẢ PHÁT HIỆN NGƯỜI LÀNH MANG GEN ĐỘT BIẾN TRÊN GEN *CYP21A2*

3.2.1. Các dạng đột biến của thành viên gia đình và bệnh nhân

Bảng 3.5. Kiểu đột biến gen của bệnh nhân và thành viên gia đình

Bệnh nhân (n)	Kiểu gen đột biến của bệnh nhân (alen/alen)	Bố (alen)	Mẹ (alen)	Anh trai (alen)	Chị gái (alen)	Em trai (alen)	Em gái (alen)	Exon/ Intron
9	p.12g/I2g	I2g	I2g					intron2
1	p.12g/I2g	I2g	I2g	I2g				intron2
1	p.12g/I2g	I2g	I2g	I2g				intron2
1	p.12g/I2g	I2g	I2g				I2g	intron2
1	p.12g/I2g	I2g	I2g		I2g			intron2
1	p.12g/I2g	I2g	I2g		I2g			intron2
1	p.12g/I2g	I2g	I2g			I2g		intron2
7	Xóa đoạn/Xóa đoạn	Xóa đoạn	Xóa đoạn					-/-
1	Xóa đoạn/Xóa đoạn	Xóa đoạn	Xóa đoạn		Xóa đoạn			-/-
1	Xóa đoạn/Xóa đoạn	Xóa đoạn	Xóa đoạn	Xóa đoạn				-/-
02	Xóa đoạn/Xóa đoạn	Xóa đoạn	Xóa đoạn	0				-/-
8	p.R356W/R356W	R356W	R356W					exon 8
1	p.R356W/R356W	R356W	R356W			R356W		exon 8

Bệnh nhân (n)	Kiểu gen đột biến của bệnh nhân (alen/alen)	Bố (alen)	Mẹ (alen)	Anh trai (alen)	Chị gái (alen)	Em trai (alen)	Em gái (alen)	Exon/ Intron
1	p.R356W/R356W	R356W	R356W		R356W			exon 8
1	p.I172N/172N	I172N	I172N					exon 4
1	p.I172N/172N	I172N	I172N		I172N			exon 4
1	p.R426C/R426C	R426C	R426C					exon 10
2	p.I2g/Xóa đoạn	Xóa đoạn	I2g					intron/-
1	p.I2g/Xóa đoạn	I2g	Xóa đoạn					-/intron2
1	p.I2g/1763insT	I2g	1763insT					intron2/exon7
1	p.I2g/R426C	R426C	I2g			I2g		intron2/exon10
1	p.I2g/I172N	I2g	I172N			I172N		intron2/exon4
1	p.I2g/I172N	I172N	I2g				I2g	intron2/exon4
1	pR426C/I172N	R426C	I172N		0			Exon10/exon4
1	p.Q318X/I172N	Q318X	I172N					exon8/exon4
1	p.R356W/Q318X&R356W	R356W	R356W&Q318X					exon 8
1	Xóa đoạn/S125X	S125X	Xóa đoạn					-/exon 3
1	Xóa đoạn/R356W	R356W	Xóa đoạn					-/exon 8

Bệnh nhân (n)	Kiểu gen đột biến của bệnh nhân (alen/alen)	Bố (alen)	Mẹ (alen)	Anh trai (alen)	Chị gái (alen)	Em trai (alen)	Em gái (alen)	Exon/ Intron
1	Xóa đoạn/I172N	Xóa đoạn	I172N			0		-/exon4
1	Xóa đoạn/W19X	W19X	Xóa đoạn				0	-/exon1
1	p.I2g/Q318X&R356W	I2g	Q318X/R356W					intron2/exon 8
1	p.I172N	Đã mất	I172N					intron2
1	I2g/I2g	Không tìm thấy	I2g					intron2
56		56	56					

0: Không mang đột biến gen, người hoàn toàn bình thường

-: Đột biến xóa đoạn trên gen *CYP21A2*

Nhận xét:

Tỷ lệ người mang gen dị hợp tử trong các thành viên gia đình là: 95,4%, không mang gen bệnh là: 4,6%. Trong đó, tỷ lệ bố và mẹ mang gen dị hợp tử là: 84,6%, anh, chị, em ruột mang gen bệnh là 10,7%, không mang gen bệnh là: 4,7%. Tỷ lệ gia đình mang đột biến đồng hợp tử lặn: 73,2% và mang gen dị hợp tử kép là 26,8%. Trong đó, 56/56 (100%) mẹ mang gen bệnh và 54/55 (98,2%) bố mang gen bệnh. Trong đột biến dị hợp tử kép, tỷ lệ cao hay gặp là kiểu đột biến intron 2 (I2g) và xóa đoạn kết hợp với các đột biến khác. Có 3 dạng đột biến ít gặp là: p.W19X, p.S125X và c.1763insT.

Bảng 3.6. Tỷ lệ các dạng đột biến gen *CYP21A2* ở bố, mẹ của bệnh nhân

STT	Dạng đột biến	bố (n)	Tỷ lệ%	mẹ (n)	Tỷ lệ%
1	12g	20	35,7	19	33,8
2	Xóa đoạn	13	25,0	18	30,4
3	p.R356W	13	23,2	9	16,1
4	p.I172N	3	5,4	6	10,7
5	p.R426C	2	3,5	2	3,6
6	p.Q318X	3	5,4	1	1,8
7	p.S125X	1	0	0	1,8
8	p.W19X	1	1,8	0	0
9	c.1763insT	0	0	1	1,8
Tổng		55	100	56	100

Nhận xét:

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

3.2.2. Phân bố kiểu gen của anh chị em bệnh nhân

Trong nghiên cứu có 19 anh, chị, em bệnh nhân được phân tích gen, trong đó có 5 người không mang gen đột biến và 1 chị gái có kiểu hình bình thường, nhưng chưa được phân tích gen, 14 người mang gen dị hợp tử với các dạng đột biến được phân tích trong bảng 3.7.

Bảng 3.7. Tỷ lệ mang gen đột biến của anh, chị, em bệnh nhân

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

Nhận xét:

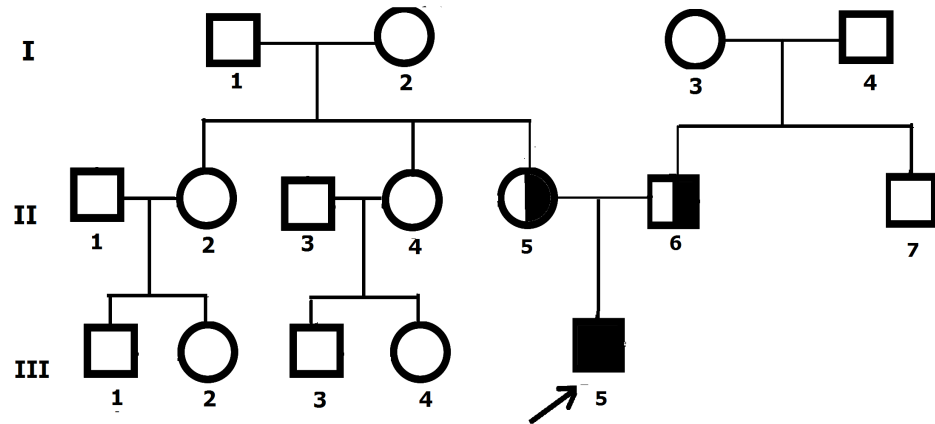
Có 14 anh, chị, em bệnh nhân mang gen dị hợp tử. Ba anh trai mang gen đột biến: I2g: 2 và xóa đoạn:1. Năm chị gái mang đột biến dị hợp tử: I2g: 2, xóa đoạn: 1, p.I172N: 1, p.R356W: 1. Bốn em trai mang dị hợp tử: I2g: 2; p.R356W: 1; p. I172N: 1. Chỉ có 2 em gái mang gen đột biến dị hợp tử I2g.

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

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 9 dạng đột biến trên gen *CYP21A2* hay gặp; đột biến điểm chiếm tỷ lệ: 69,6%, đột biến xóa đoạn có tỷ lệ: 30,4%.

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

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

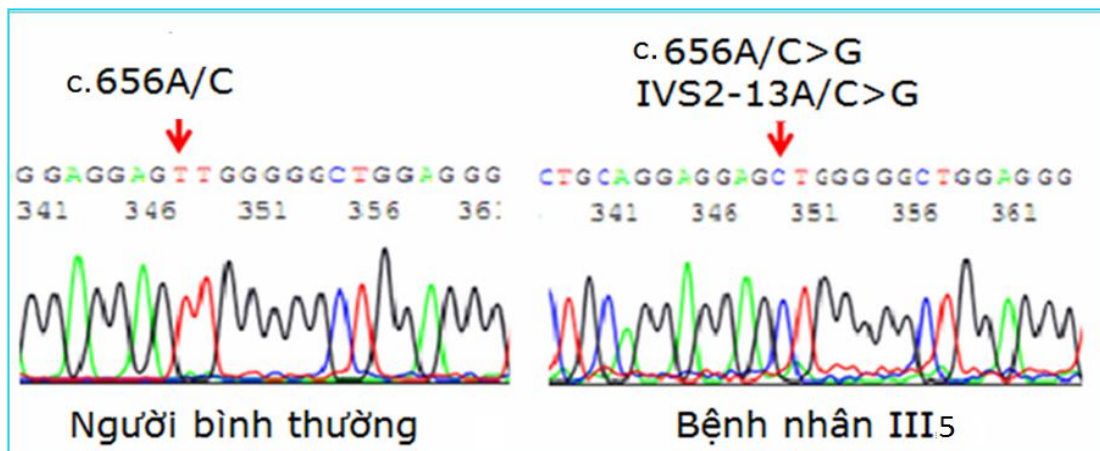


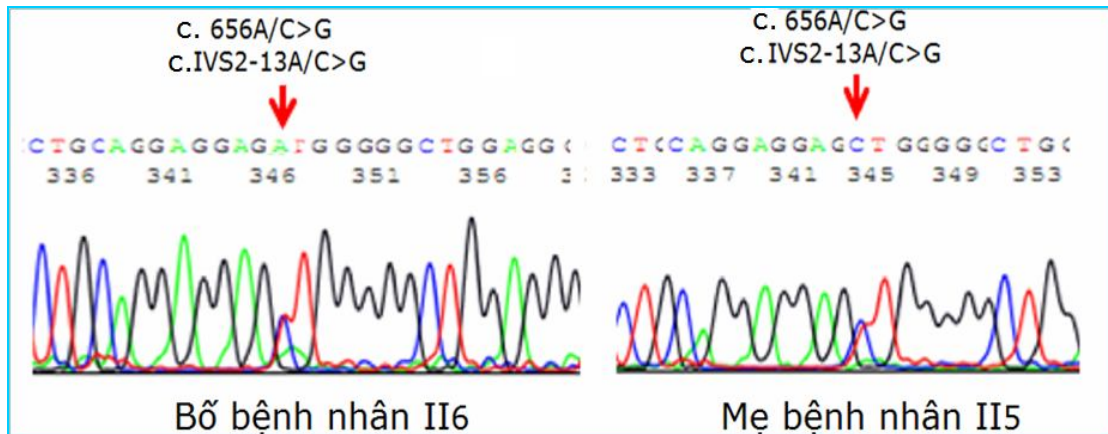
Hình 3.1. Phả hệ gia đình số 01

Nhận xét:

Phả hệ của gia đình số 01 có 3 thế hệ, thế hệ thứ 1 và thứ 2 không có người bị bệnh. Ở thế hệ thứ 3, 1 con trai (III.5), 4 tuổi bị bệnh TSTTBS thể mất muối. Có mang gen đột biến *CYP21A2* kiểu I2g. Các anh, chị (III.1, III.2, III.3, III.4) của bệnh nhân không có biểu hiện bệnh. Bố (II.6) 27 tuổi và mẹ (II.5) 26 tuổi theo quy luật di truyền là người lành mang gen bệnh.

Kiểu gen của gia đình số 01



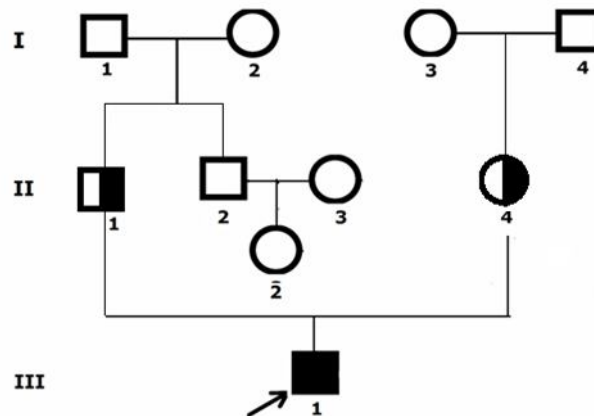


Hình 3.2. Kết quả giải trình tự gen (chiều ngược) gia đình 01

Nhận xét:

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

❖ Hình ảnh đột biến p.R356W/R356W của gia đình bệnh nhân

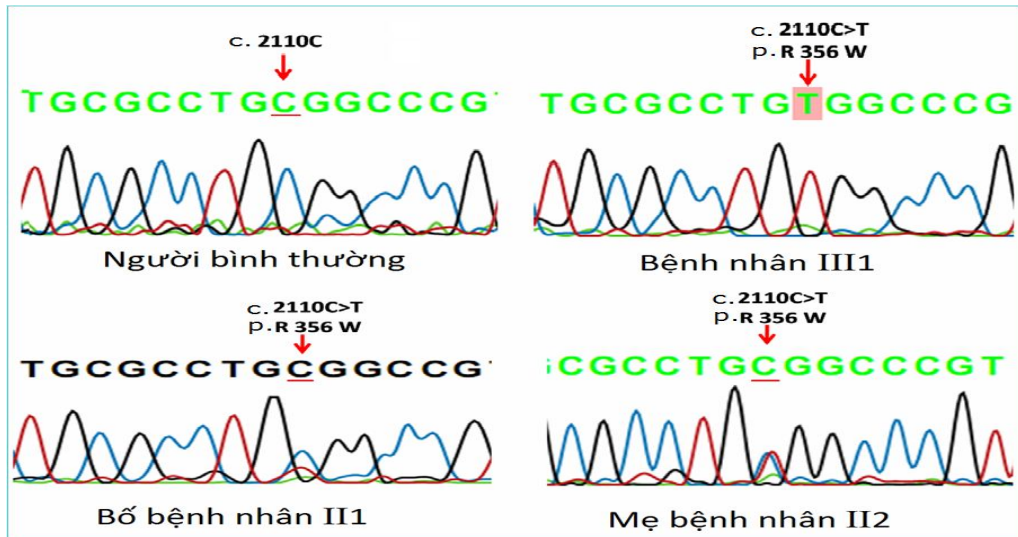


Hình 3.3: Phả hệ gia đình số 27

Nhận xét:

Gia đình có con trai 2 tuổi bị bệnh TSTTBS thể mất muối, kiểu gen đột biến là p.R356W. Trong gia đình không ai mắc bệnh giống bệnh nhân.

Kiểu gen của gia đình số 27

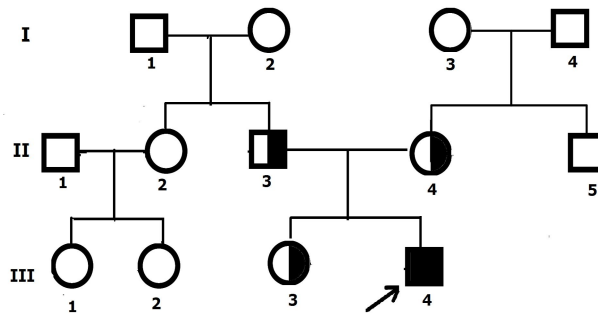


Hình 3.4. Kết quả giải trình tự gen (theo chiều ngược) gia đình số 27

Nhận xét:

Hình ảnh giải trình tự gen ở exon 8, bố II.1 và mẹ II.2 có hình ảnh 2 đỉnh chồng lên nhau tại điểm đột biến ở vị trí 2110 nucleotide C bị chuyển thành T trên 1 alen, chứng tỏ là người mang gen dị hợp tử p.R356W.

❖ Hình ảnh đột biến p.I172N/I172N của gia đình bệnh nhân

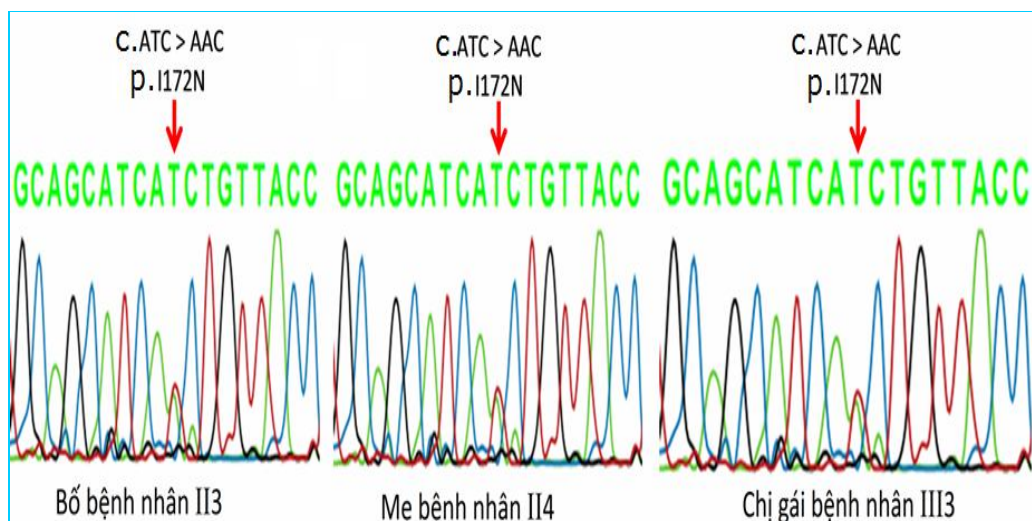
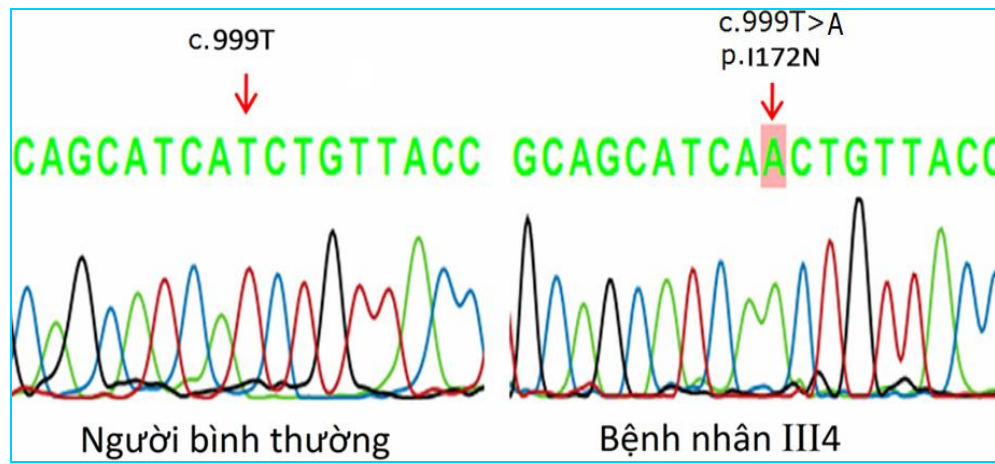


Hình 3.5: Phả hệ gia đình số 08

Nhận xét:

Phả hệ có 3 thế hệ, thế hệ thứ 1 và thứ 2 không có ai bị bệnh. Ở thế hệ thứ 3 có 1 gia đình có con trai 3 tuổi bị bệnh TSTTBS (III.4) thể nam hóa đơn thuần và kiểu gen đột biến là I172N. Chị gái (III.3) có kiểu hình bình thường có khả năng là người bình thường hoặc mang gen bệnh giống bố mẹ.

Kiểu gen của gia đình số 08

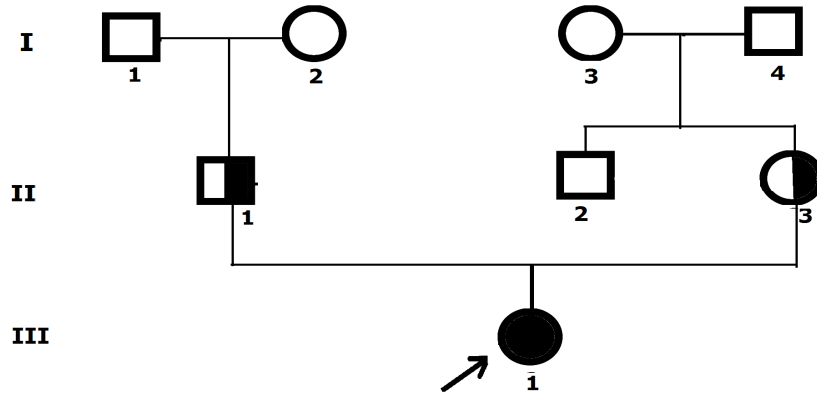


Hình 3.6. Kết quả giải trình tự gen của gia đình số 08

Nhận xét:

Hình ảnh phân tích gen trên exon 4 thấy, bệnh nhân ở vị trí 999 nucleotid T bị đột biến thành A. Bố, mẹ và chị gái đều có hình ảnh xuất hiện 2 đỉnh chồng lên nhau tại điểm đột biến c.999T>A, chứng tỏ là người mang gen đột biến dị hợp tử p.I172N.

❖ Hình ảnh đột biến p.R426C/R426C của gia đình bệnh nhân

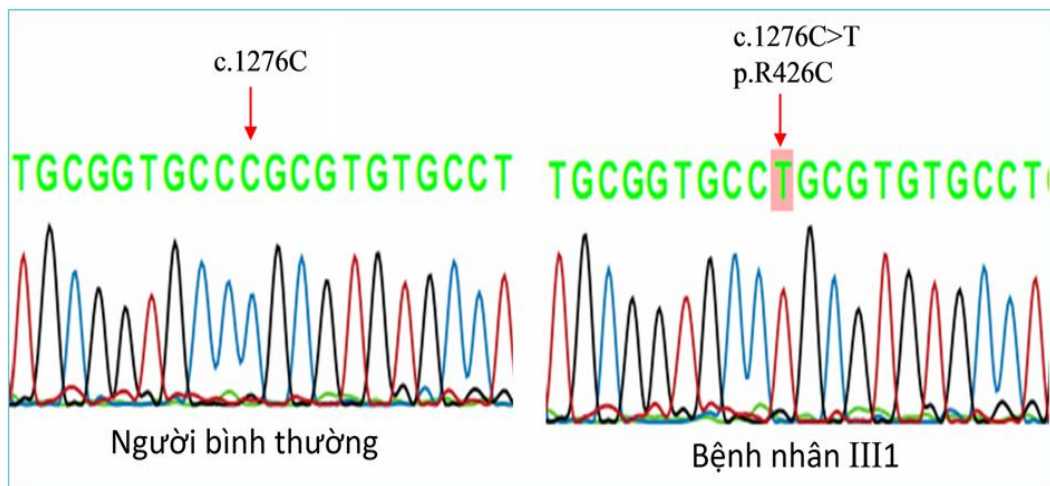


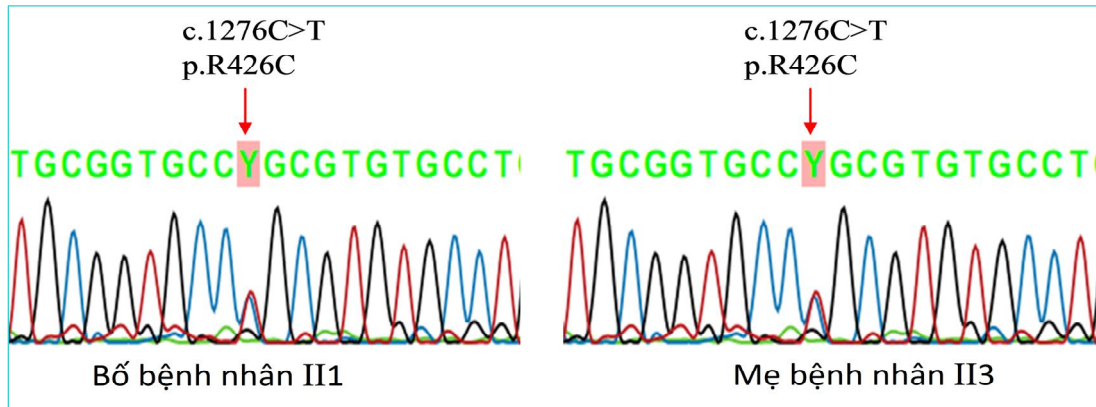
Hình 3.7. Phả hệ gia đình số 17

Nhận xét:

Gia đình có con gái 3 tháng bị bệnh TSTTBS thể mất muối nặng với kiểu gen đột biến p.R426C. Phân tích phả hệ, gia đình không có ai bị bệnh giống bệnh nhân, bố 23 tuổi, mẹ 21 tuổi là người bình thường về lâm sàng.

Kiểu gen của gia đình số 17





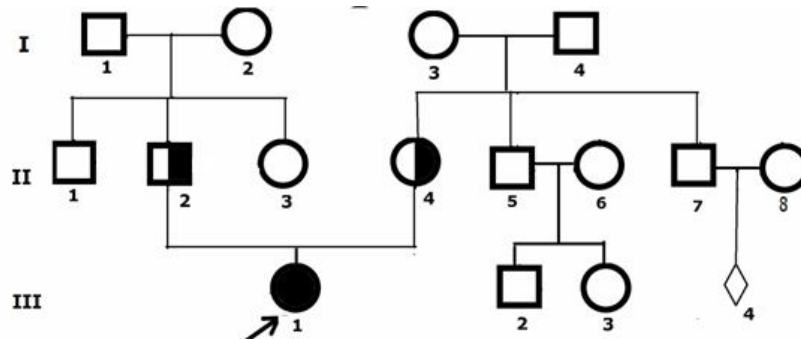
Hình 3.8. Kết quả giải trình tự gen của gia đình số 17

Nhận xét:

Kết quả sau khi giải trình tự gen cho thấy hình ảnh ở vị trí 1276 nucleotid C bị đột biến thành T, bố mẹ có kiểu gen đột biến dị hợp tử p.R456C. Đây là dạng đột biến ít gặp.

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

❖ Hình ảnh đột biến xóa đoạn tại exon 1 và 3 của gia đình bệnh nhân

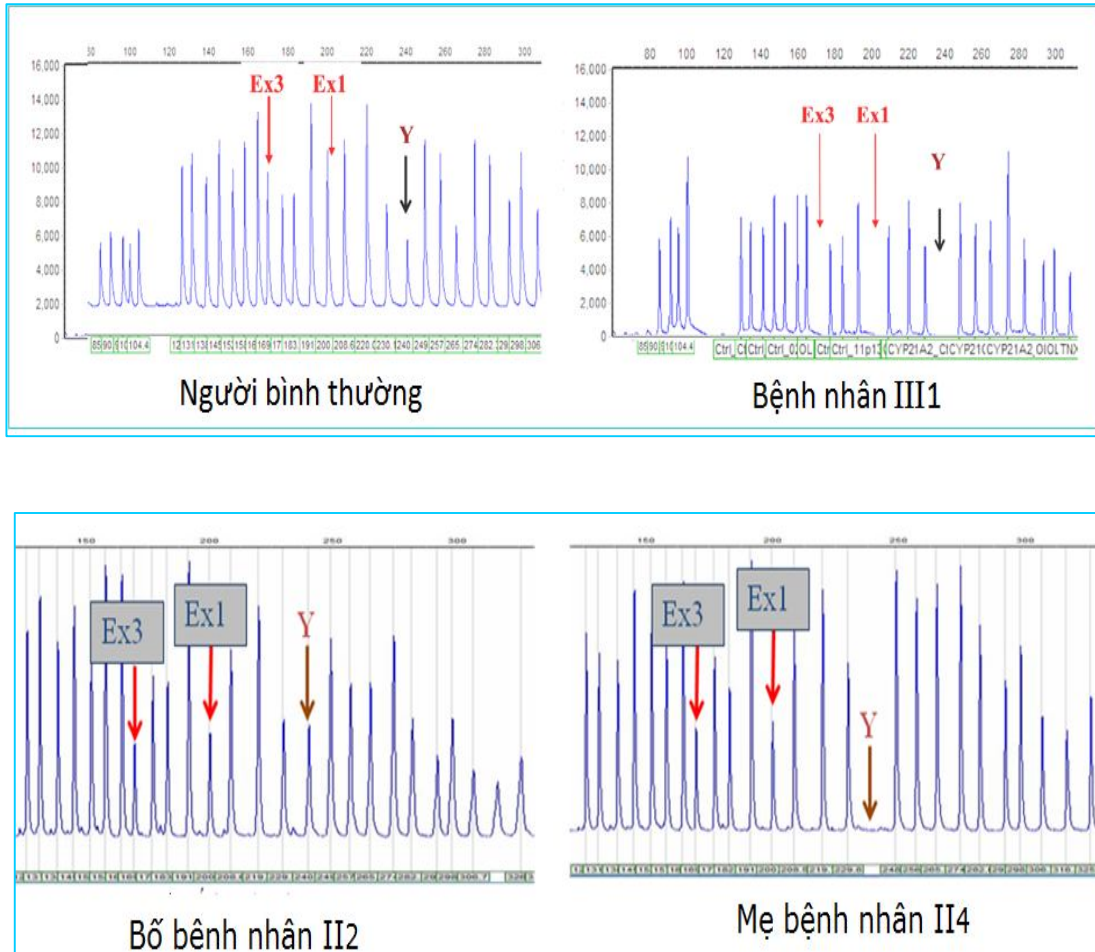


Hình 3.9. Phả hệ gia đình số 34

Nhận xét:

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

Kiểu gen của gia đình số 34

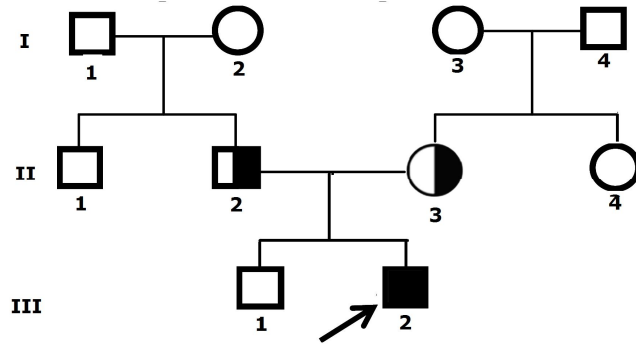


Hình 3.10. Kết quả đột biến gen của gia đình mã số 34

Nhận xét:

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

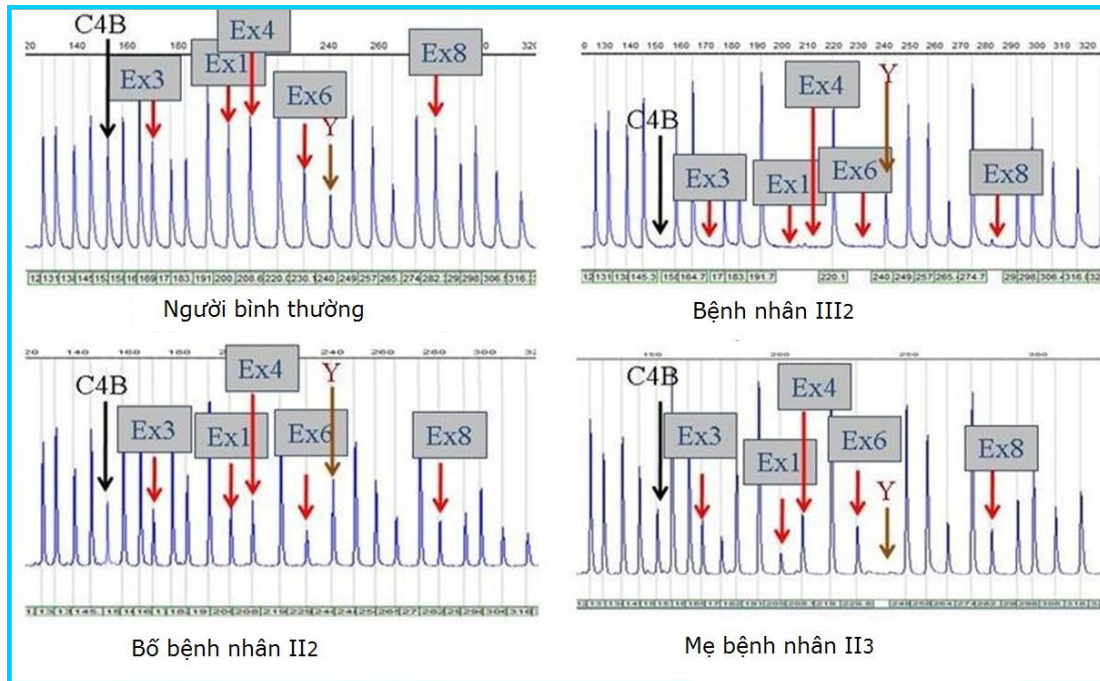
❖ Hình ảnh đột biến xóa đoạn lớn của gia đình bệnh nhân

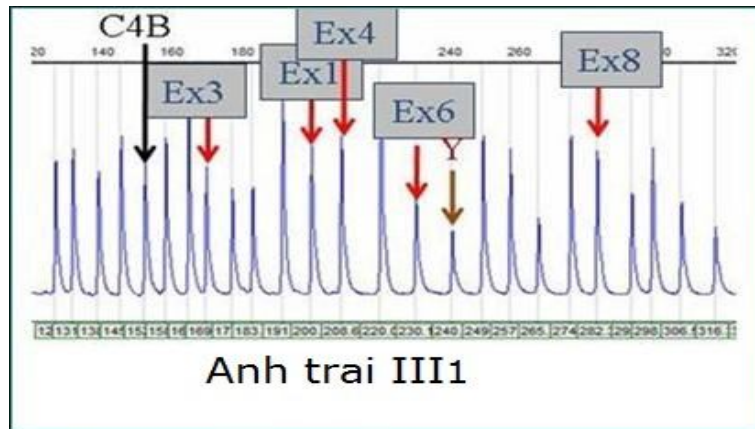


Hình 3.11. Phả hệ gia đình số 43

Nhận xét: Ở thế hệ thứ 3 có 1 con trai 18 tháng, mang đột biến xóa đoạn lớn với kiểu hình mắt muối. Bố 30 tuổi và mẹ 28 tuổi. Anh trai 5 tuổi không có biểu hiện bệnh. Trong phả hệ không ai bị bệnh giống bệnh nhân.

- Kiểu gen của gia đình số 43





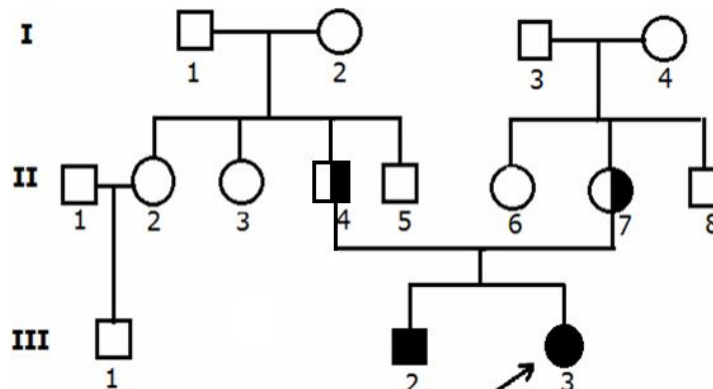
Hình 3.12. Kết quả đột biến gen của gia đình mã số 43

Nhận xét:

Kết quả phân tích gen bằng kỹ thuật MLPA cho thấy bố, mẹ bệnh nhân là người mang gen dị hợp tử gây bệnh. Phân tích kết quả của người anh trai cho thấy chiều cao đỉnh của exon 1, exon 3, exon 4, exon 6, exon 8 và C4B tương tự mẫu người bình thường chứng tỏ anh trai bệnh nhân không phải là người mang gen bệnh.

Minh họa kiểu gen đột biến dị hợp tử kép

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

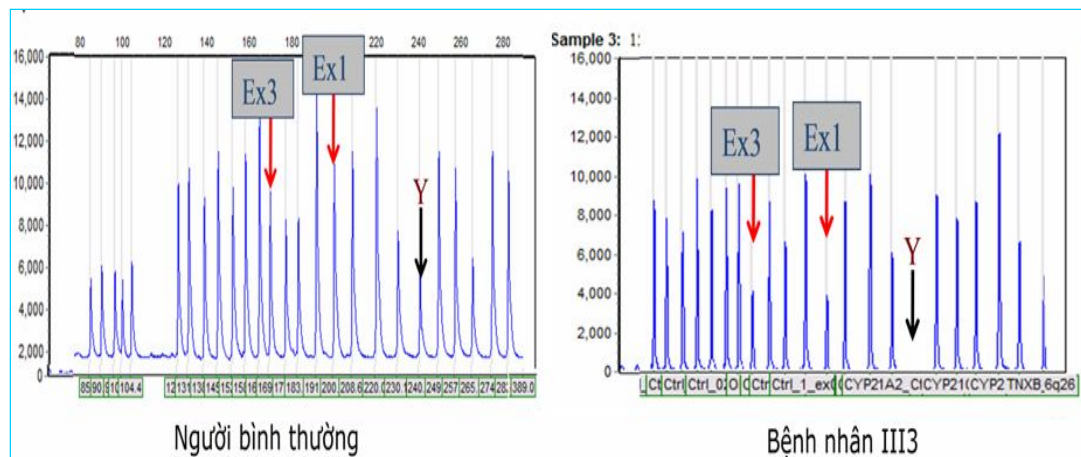
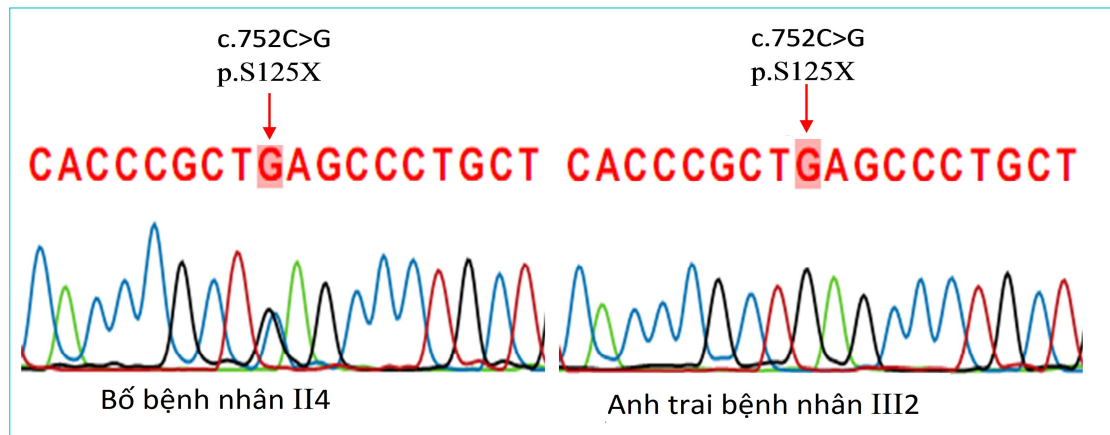
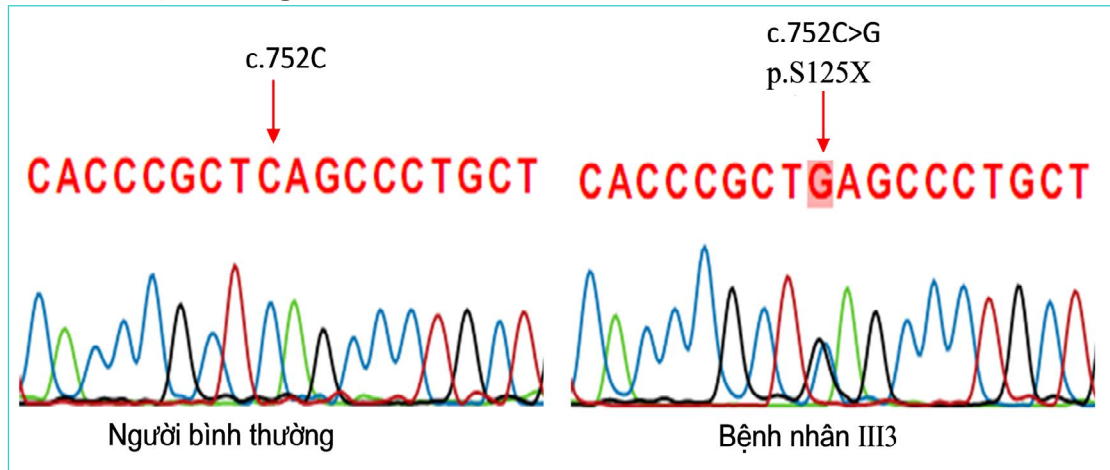


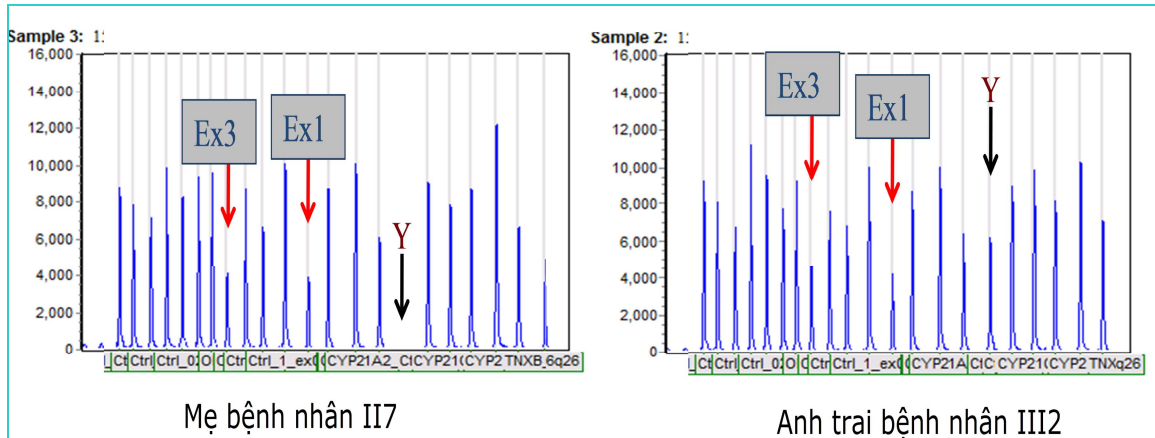
Hình 3.13. Phả hệ gia đình mã số 25

Nhận xét:

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

Kiểu gen của gia đình số 25



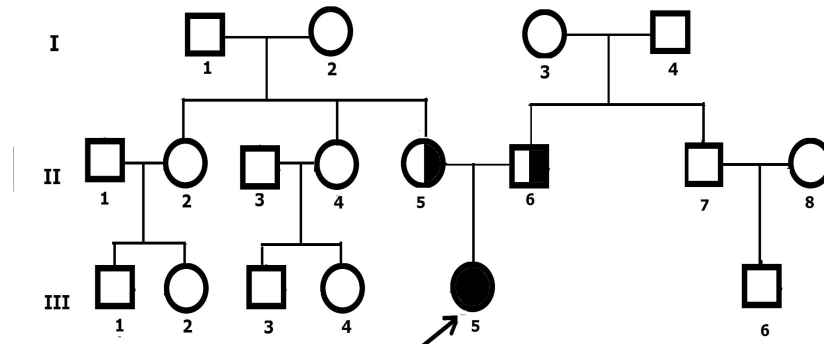


Hình 3.14. Kiểu gen đột biến của gia đình số 25

Nhận xét:

Sau khi phân tích gen mẹ (II.7) bệnh nhân mang gen xóa đoạn, bố (II.4) cho hình ảnh trên exon 1, xuất hiện 2 đỉnh chồng lên nhau tại điểm đột biến c.752 C>G, chứng tỏ bố là người dị hợp tử. Bố mẹ đều mang gen dị hợp tử khác nhau, di truyền các alen lặn gây bệnh, kiểu gen của hai anh em cùng giống nhau, đều mang đột biến dị hợp tử kép trong một gia đình.

❖ *Phả hệ gia đình có đột biến điểm biến điểm p.I172N và Q318X*

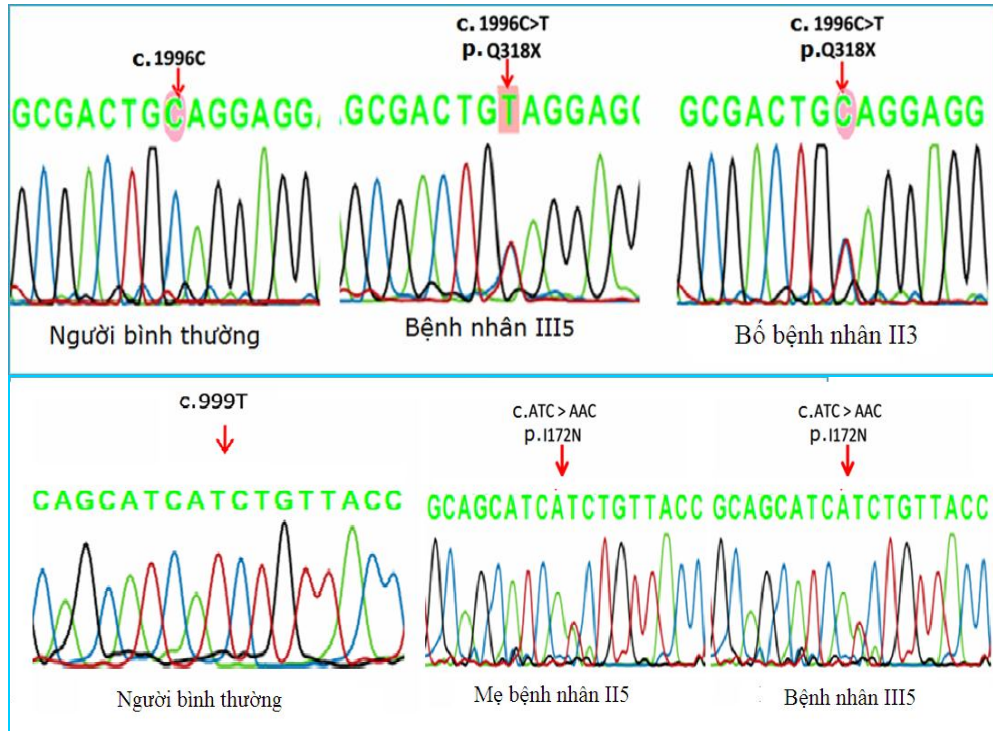


Hình 3.15. Phả hệ gia đình mã số 24

Nhận xét:

Gia đình có con gái 5 tuổi bị bệnh TSTTBS thể mất muối với kiểu gen đột biến p.I172N&Q318X. Trong gia đình không ai bị bệnh như bệnh nhân. Bố 25 tuổi, mẹ 25 tuổi là người mang lành mang gen dị hợp tử.

Kiểu gen của gia đình số 24



Hình 3.16. Kiểu gen của gia đình số 24

Nhận xét:

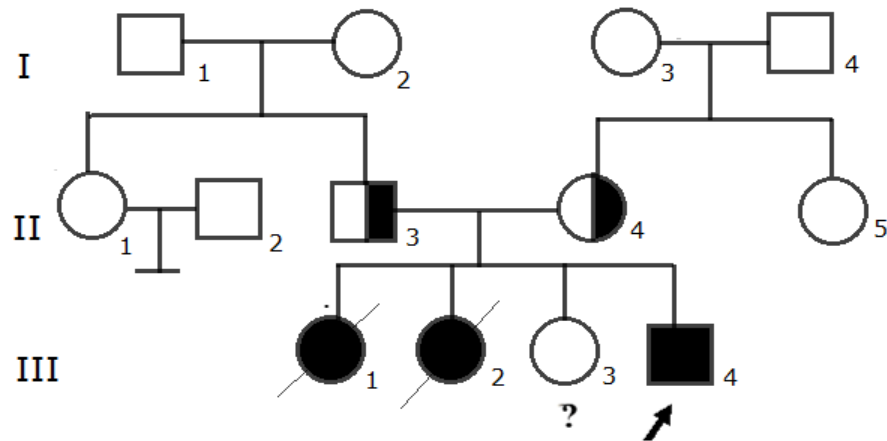
Kết quả phân tích gen: bố mang đột biến dị hợp tử dạng p.I172N, mẹ mang gen đột biến dạng p.Q318X. Con gái nhận 1 alen từ bố và 1 alen từ mẹ



Hình 3.17. Ảnh gia đình bệnh nhân mã số 24

Bố mẹ là người lành mang gen bệnh. Bố mang đột biến dị hợp tử Q318X mẹ mang đột biến dị hợp tử I172N

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

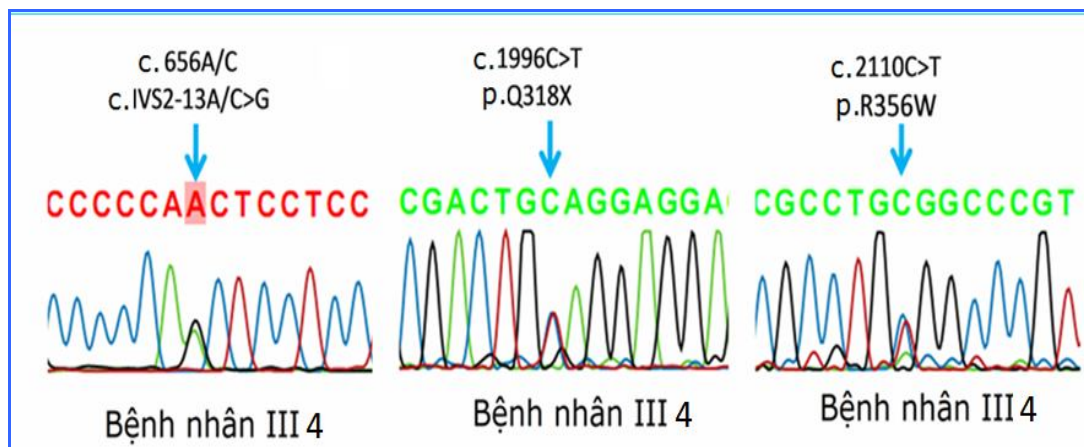


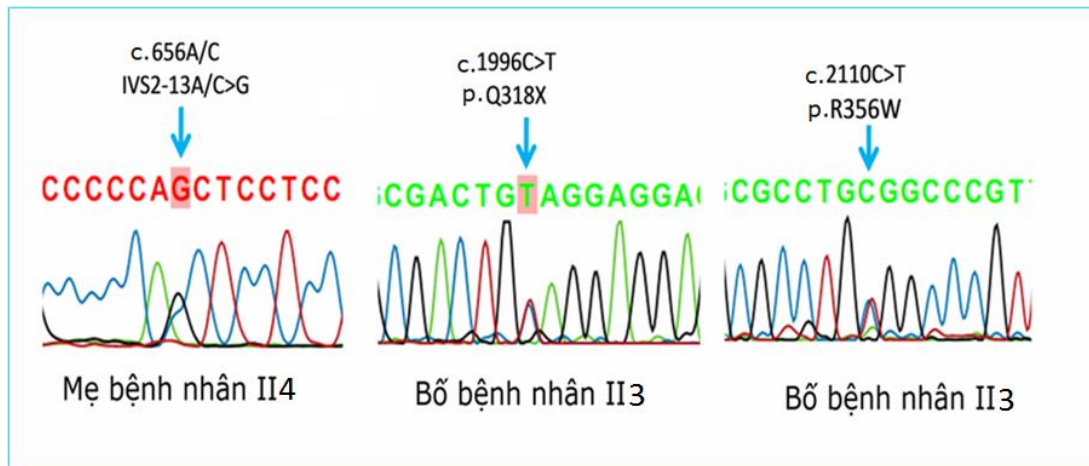
Hình 3.18. Phả hệ gia đình mã số 49

Nhận xét:

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

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





Hình 3.19. Kiểu gen của gia đình mã số 49

Nhận xét:

Hình ảnh phân tích gen cho gia đình: đột biến I2g, p.Q318X7& R356W. Trên exon 8 của bố, xuất hiện 2 đỉnh chồng lên nhau tại điểm đột biến c.1996 C>T và c. 2110 C>T chứng tỏ bố mang đột biến dị hợp tử kép p.Q318X&R356W, tại intron 2 của mẹ mang gen dị hợp tử I2g. Bệnh nhân nhận 1 alen p.Q318X và p.R356W từ bố và 1 alen I2g từ mẹ.

3.3. KẾT QUẢ CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH BỆNH TĂNG SẢN THƯỢNG THẬN BẨM SINH

Trong nghiên cứu, có 12 thai phụ đã được chẩn đoán trước sinh khi thai 15-16 tuần. Xác định kiểu gen cho các thành viên gia đình, các thai phụ và chồng của họ đều là người lành mang gen dị hợp tử gây bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH

Mẫu DNA được tách chiết từ tế bào ối và được kiểm tra độ tinh sạch trên máy Nano drop thu được kết quả ở bảng 3.8.

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

STT	Kiểu gen bệnh nhân (alen)	Bố (alen)	Mẹ (alen)	Thai nhi
1	I2g/I2g	I2g	I2g	Thai gái, bình thường
2	p.R356W/R356W	p.R356W	p.R356W	Thai trai. Năm 2012 p.R356W/R356W
				Thai gái. Năm 2014 p.R356W/R356W
3	xóa đoạn/xóa đoạn	xóa đoạn	xóa đoạn	Thai trai, xóa đoạn
4	I2g/1762inst	I2g	1762inst	Thai trai, bình thường
5	p.R356W/Xóa đoạn	p.R356W	Xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
6	I2g/xóa đoạn	p.I2g	Xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
7	xóa đoạn/xóa đoạn	xóa đoạn	xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
8	p.Q318X/R356W & R356W	p.Q318X & R356W	p.R356W	Thai trai, p.Q318X & R356W
9	I2g/xóa đoạn	Xóa đoạn	I2g	Thai trai, bình thường
10	I2g/xóa đoạn	I2g	xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
11	xóa đoạn/xóa đoạn	xóa đoạn	xóa đoạn	Thai gái, xóa đoạn
12	p.I172N/I172N	p.I172N	p.I172N	Thai trai, p.I172N

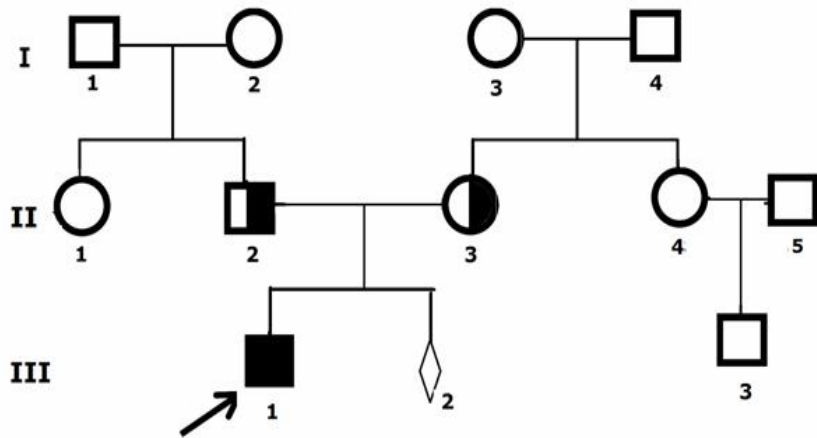
Nhận xét

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

Một số hình ảnh minh họa gia đình được chẩn đoán trước sinh trong nghiên cứu

❖ *Kết quả chẩn đoán trước sinh của gia đình bệnh nhân mã số 06*

Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số 06

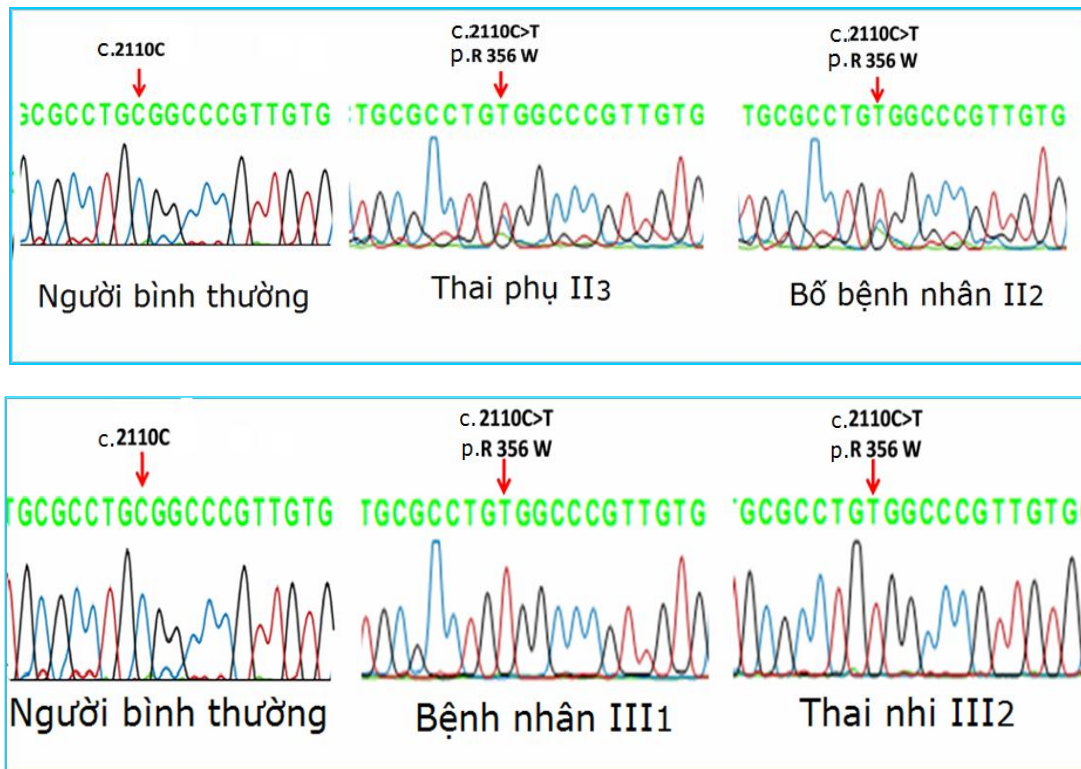


Hình 3.20A. Phả hệ của gia đình số 06, năm 2012

Nhận xét:

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

Kiểu gen của thai nhi và bố mẹ.

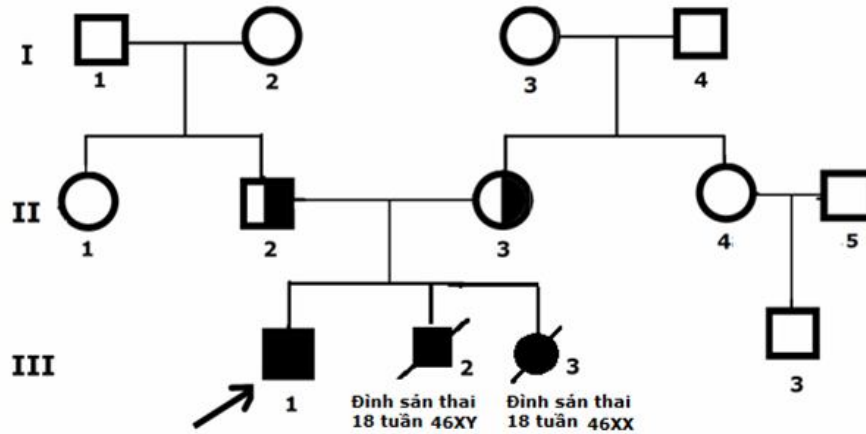


Hình 3.21A. Kiểu gen của gia đình và thai nhi mã số 06

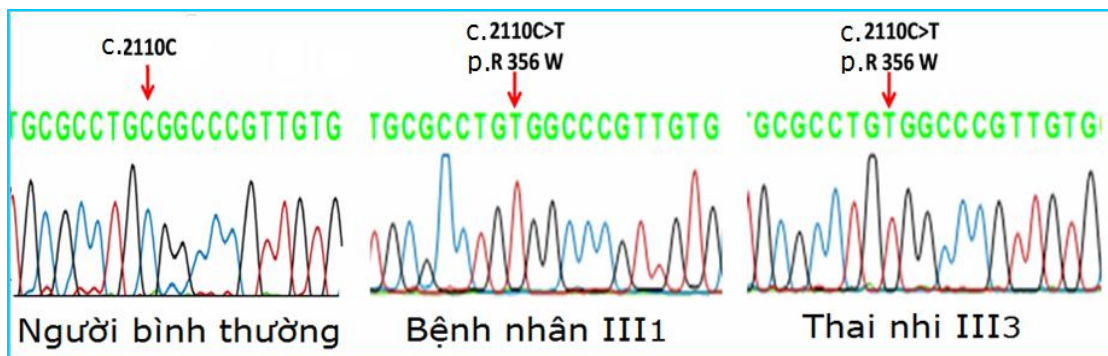
Nhận xét:

Phân tích gen bằng phương pháp giải trình tự gen *CYP21A2* và nuôi cấy nhiễm sắc thể, thai nhi là một bé trai, có kiểu gen đồng hợp tử lặn dạng đột biến p.R356W giống anh trai. Gia đình đã được các bác sĩ tư vấn, sau khi bàn bạc với gia đình, thai phụ xin hủy thai khi thai 18 tuần.

Hai năm sau, năm 2014, mẹ mong muốn sinh thêm con, sau khi mang thai với tuổi của mẹ là 37 và được quản lý thai tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. Khi thai 16 tuần, thai phụ được chọc ối và phân tích gen cho thai nhi. Phả hệ của gia đình số 06 năm 2014 hình 3.20B



Hình 3.20B. Phả hệ của gia đình số 06, năm 2014



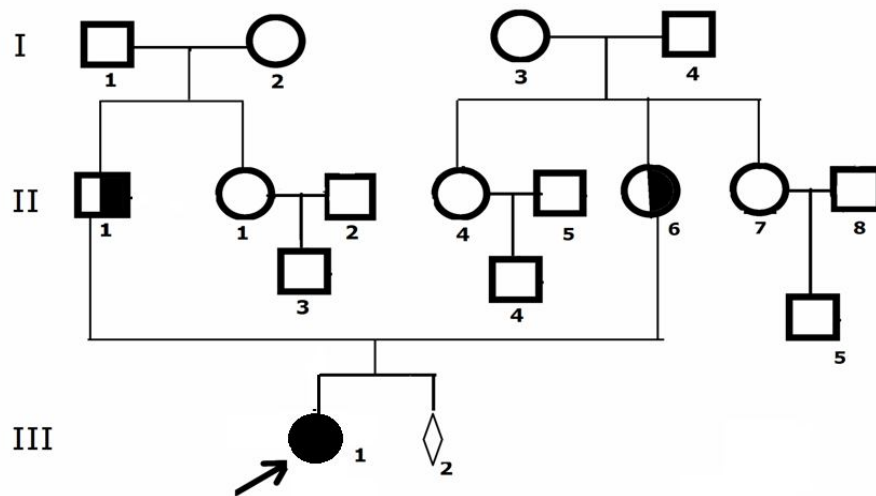
Hình 3.21B. Kiểu gen của mẹ và thai nhi năm 2014

Nhận xét:

Sau khi phân tích chiết tách DNA từ dịch ối, hình ảnh giải trình tự gen *CYP21A2* của thai nhi là thai gái nhưng cũng mang gen đột biến đồng hợp tử dạng p.R356W giống anh trai nên gia đình xin đình sản lúc thai 18 tuần.

❖ *Kết quả chẩn đoán trước sinh của gia đình bệnh nhân mã số 45*

Phả hệ của gia đình và thai nhi số 45

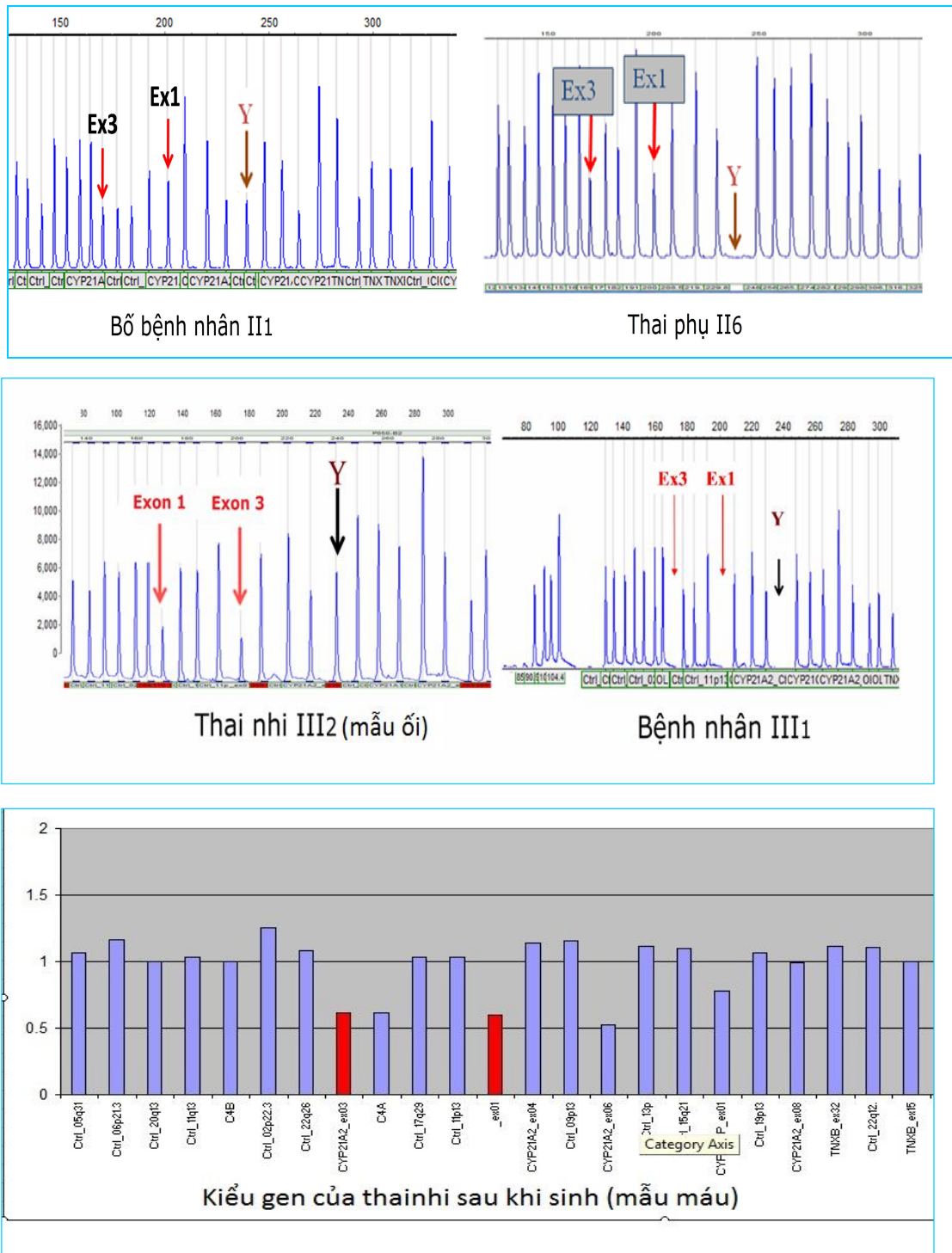


Hình 3.22. Phả hệ của gia đình mã số 45

Nhận xét:

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

Kiểu gen của thai nhi và gia đình



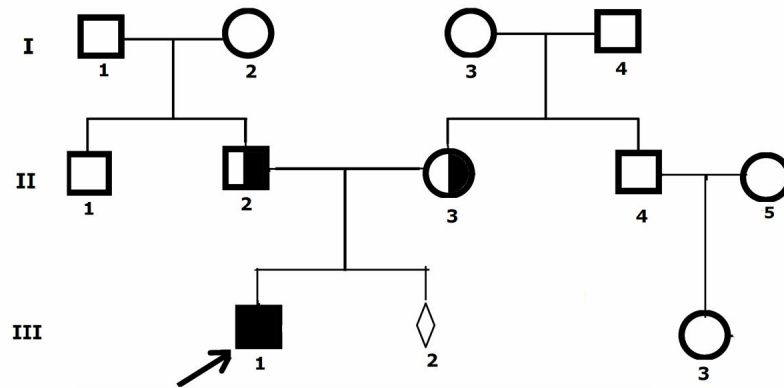
Hình 3.23. Kiểu gen của thai nhi và gia đình

Nhận xét.

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

❖ *Kết quả chẩn đoán trước sinh của gia đình bệnh nhân mã số 55*

Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số 55

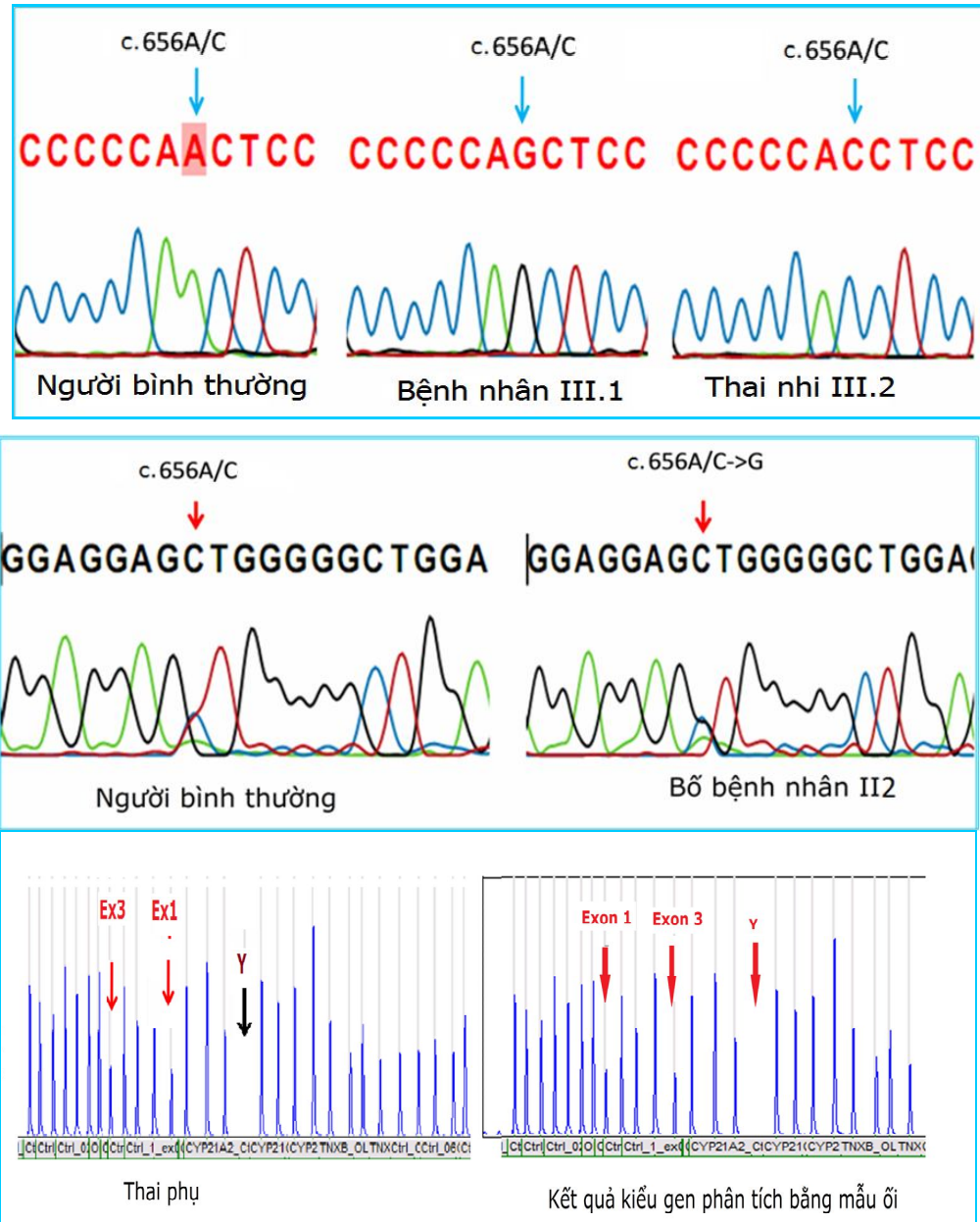


Hình 3.24. Phả hệ của gia đình số 55

Nhận xét:

Gia đình mã số 55 có 1 con trai bị bệnh TSTTBS được chẩn đoán khi 3 tuần tuổi với kiểu hình mất muối nặng. Sau khi phân tích gen bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử kép với dạng đột biến xóa đoạn và I2g. Trong phả hệ gia đình không có ai bị bệnh giống bệnh nhân, bố mẹ đều là người mang gen dị hợp tử. Thai phụ 28 tuổi mang thai lần thứ 2, tuần thứ 15 được chẩn đoán trước sinh.

Kết quả phân tích gen của gia đình và thai nhi.



Hình 3.25. Kiểu gen của thai phụ và thai nhi gia đình số 55

Nhận xét:

Sau khi tách DNA của tế bào ối sử dụng phương pháp giải trình tự gen cho kết quả thai nhi là người mang gen dị hợp tử xóa đoạn exon1 và exon 3.

Thai phụ được tư vấn giữ thai.



Hình 3.26. Thai nhi nữ được chẩn đoán trước sinh khi 16 tuần, có mang đột biến dị hợp tử xóa đoạn exon 1 và exon 3. Hiện tại trẻ 8 tháng.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM NGHIÊN CỨU

Kết quả nghiên cứu cho thấy có 56 bệnh nhân bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH, trong đó tỷ lệ nhóm bệnh nhân dưới 1 tuổi là: 55,4%, trẻ từ 1 đến 5 tuổi: 32,1%, trẻ trên 5 tuổi: 12,5%. Bệnh nhân nghiên cứu chủ yếu ở nhóm dưới 5 tuổi (87,5%), cho thấy bệnh TSTTBS đã được chẩn đoán và điều trị sớm hơn. Trong đó, bệnh nhân nhỏ tuổi nhất là 3 tuần tuổi, bệnh nhân lớn nhất là 9 tuổi. Một nghiên cứu ở Hungary của Torok (2003) cho thấy tuổi được chẩn đoán của thể mất muối trung bình là 2 tuần, thể nam hóa đơn thuần là: 2 – 2,5 năm. Tuổi chẩn đoán của các tác giả nghiên cứu ở nước ngoài sớm hơn so với kết quả của chúng tôi là ở các nước này, chương trình sàng lọc sơ sinh bệnh TSTTBS đã được áp dụng từ những năm 1980 nhờ định lượng nồng độ 17-OHP ngay sau sinh để phát hiện bệnh sớm [81]. Tỷ lệ nam bị bệnh là 53,6% và nữ là 46,4%, cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giới. Thể mất muối chiếm tỷ lệ 83,9% và nam hóa đơn thuần chiếm tỷ lệ 16,1%, phù hợp với một nghiên cứu ở Nhật Bản năm 2002, với thể mất muối là 74,5% và thể nam hóa đơn thuần là 25,5% [82]. Phân tích gia đình bệnh nhân bị TSTTBS, vẽ phả hệ cho mỗi gia đình tối thiểu 3 thế hệ cho thấy có 130 thành viên của gia đình gồm: 56 người mẹ, 55 người bố (có 1 bố của bệnh nhân đã mất) và 19 anh, chị, em ruột của bệnh nhân. Tuổi của bố và mẹ đều trong lứa tuổi sinh đẻ. Bố lớn tuổi nhất là 38 tuổi, thấp nhất là 22 tuổi. Tuổi lớn nhất của mẹ là 37 tuổi, nhỏ nhất là 21 tuổi, nhóm mẹ có tuổi dưới 30 tuổi: (78,6%), đây là lứa tuổi sinh đẻ phù hợp của các thai phụ. Có 19 anh, chị, em ruột của bệnh nhân, trong đó có 5 anh trai, 5 em trai, 6 chị gái và 3 em gái. Tuổi của anh, chị, em ruột lớn nhất là 8 tuổi, nhỏ nhất là sơ sinh.

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

Đặc điểm kiểu gen của bệnh nhân

Trong kết quả phân tích đột biến gen có 41 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử và 15 bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử kép. Vị trí đột biến tại intron 2 (I2g) hay gặp nhất với tỷ lệ: 31,9%, đột biến xóa đoạn: 26,4%, p.R356W: 18,1%, p.I172N: 11,1% và các đột biến khác với tỷ lệ thấp hơn là: p.Q318X, p.R426C, p.S125X, p.W19X và c.1763insT. Đột biến dị hợp tử kép hay gặp trong nghiên cứu của chúng tôi là I2g và xóa đoạn kết hợp với đột biến điểm khác. Đột biến I2g là một dạng đột biến điểm thường gặp trên intron 2 làm thay đổi quá trình cắt nối ở intron 2 và làm giữ lại 19 nucleotide mà bình thường không có trên phân tử mRNA.

Nghiên cứu ở Việt Nam, năm 2012, của Vũ Chí Dũng trên 81 bệnh nhân bị bệnh TSTTBS, có 39% mang đột biến I2g [80]. Một nghiên cứu tại Nhật năm 2002 cho thấy tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến I2g có tăng cao hơn các đột biến khác là 39,8% [82]. Nghiên cứu của Hoa Kỳ, năm 2010, tại bang California khi phân tích gen cho 213 bệnh nhân và 232 thành viên gia đình bằng kỹ thuật giải trình tự gen cho thấy đột biến đồng hợp tử tại intron 2 là 23,4% [83], trong các nghiên cứu tại một số nước châu Á và Châu Âu cho tỷ lệ tương tự như trong bảng 4.1.

Bảng 4.1. Tỷ lệ đột biến điểm I2g [10], [60].

Quốc Gia	Đột biến điểm I2g (%)
Ấn Độ	27,2
Châu Âu	30,3
Nhật Bản	26,5
Singapore	32,7
Đài Loan	34,0
Hồng Kông.	27,0
Nghiên cứu của chúng tôi	31,9

Đột biến xóa đoạn trên gen *CYP21A2* trong nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ là: 26,5%, trong đó hay gặp đột biến tại vị trí exon 1 và exon 3, có 1 trường hợp đột biến xóa đoạn lớn từ gen *C4B* tới exon 8 của gen *CYP21A2*. Tỷ lệ mang đột biến xóa đoạn trên thế giới khoảng 20% trong các alen [1], [11]. Nghiên cứu ở các nước cho thấy kết quả tương tự như: tại Đức (30,3%), tại Mỹ (26%), tại Hồng Kông (27%). Trên thế giới phân tích 3554 alen cho thấy tỷ lệ gặp đột biến xóa đoạn là 24,4% [84]. Năm 2009, một nghiên cứu ở Úc đã đưa ra tỷ lệ gặp đột biến xóa đoạn cao hơn của chúng tôi. Các nhà khoa học Úc đã phân tích gen trên 242 alen và đã tìm thấy tỷ lệ đột biến là 35,5% [60].

Một nghiên cứu ở Ý, Paola. C, năm 2009, tác giả phân tích gen cho 18 bệnh nhân TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH bằng kỹ thuật MLPA nhận thấy tỷ lệ bệnh nhân có mang đột biến xóa đoạn là 7/18 (38,9%). Trong đó có 4 bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử xóa đoạn và đột biến điểm như p.V281L (2 trường hợp), p. P453S (1 trường hợp) và p.P482S (1 trường hợp) [74].

Đột biến dạng p.R356W trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ gặp là 18,1%. Bệnh nhân mang đột biến gen p.R356W có tỷ lệ cao, ở các nước châu Á (9,5% -19,2%) ở người Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Malaysia. Nghiên cứu tại Nhật Bản: 17,6%, Brazil: 14,3% trong khi có một số nước có kết quả thấp hơn như; tại Argentina: 4,2% khi phân tích gen trên 454 bệnh nhân, bang California: 3,6% khi phân tích gen cho 182 bệnh nhân TSTTBS [1],[60],[84],[85].

Trong một nghiên cứu gần đây tại Macedonia (2010) phân tích gen cho 51 bệnh nhân và 70 người thân có liên quan đến bệnh nhân nhận thấy đột biến dạng p.R356W có tỷ lệ thấp 3,6%. Tỷ lệ hay gặp của dạng đột biến này tùy thuộc vào từng chủng tộc. Đột biến này làm mất toàn bộ hoạt động enzym và gây thể lâm sàng nặng [9].

Các dạng đột biến khác

Đột biến của gen *CYP21A2* được nghiên cứu rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới, đến nay đã có hơn 150 đột biến khác nhau của gen *CYP21A2* đã được báo cáo. Trong nghiên cứu, chúng tôi có 9 dạng đột biến tìm thấy, chủ yếu là I2g và xóa đoạn, còn có các dạng đột biến khác với tỷ lệ thấp hơn p.I172N (11,1%), p.Q318X (4,2%), p.R426C (4,2%), p.S125X (1,4%) và W19X (1,4%), p.1762inst (1,4%), có đột biến ít gặp: S125X, W19X, 1762inst. Tỷ lệ mỗi dạng đột biến có thay đổi tùy thuộc vào từng chủng tộc [1],[86], [87].

4.2. PHÁT HIỆN NGƯỜI LÀNH MANG ĐỘT BIẾN GEN *CYP21A2* CHO CÁC THÀNH VIÊN GIA ĐÌNH BỆNH NHÂN TSTTBS

Đột biến trên gen *CYP21A2* đã được tìm thấy cho đến nay là hơn 100 loại khác nhau. Bệnh tuân theo quy luật di truyền đơn gen lặn, việc phát hiện đột biến gen trên bệnh nhân là “mũi tên” quan trọng để phân tích gen cho các thành viên gia đình, tìm người mang gen trong dòng họ để quản lý và tư vấn di truyền. Trong quần thể số người lành mang gen bệnh lớn hơn số người bị

bệnh rất nhiều. Tần suất bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH là 1/10.000-1/16.000 trẻ sơ sinh, trong khi đó tỷ lệ người mang gen bệnh là 1/55, khi hai dị hợp tử kết hôn với nhau thì khả năng sinh con bị bệnh 25%. Gen bệnh được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác. Nếu kết hôn họ hàng, hoặc ở quần thể cô lập sẽ tăng tỷ lệ mắc bệnh vì các gen gây bệnh dễ dàng có cơ hội tổ hợp lại với nhau để sinh ra trẻ bị bệnh [9],[88].

Khi con bị bệnh (rr) thì chắc chắn bố mẹ là hai dị hợp tử (Rr). Sau khi phân tích tìm đột biến gen cho 130 thành viên gia đình, có 56 (100%) người mẹ là dị hợp tử, 54 người bố (98,2%) là dị hợp tử. Có một người bố không tìm thấy đột biến như của con.

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

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy 130 thành viên của gia đình đã được phân tích gen chúng tôi nhận thấy tỷ lệ mang gen của các thành viên gia đình là 95,4% và tỷ lệ không mang gen là 4,6%. Bố mẹ có mang gen dị hợp tử là 84,6% anh, chị, em ruột bệnh nhân 10,7%, người không mang gen 4,7%. Nghiên cứu tại Macedonia, năm 2010 trên 51 bệnh nhân và 70 thành viên gia đình, tỷ lệ bố mẹ có mang đột biến gen là 45,6% [9]. Trong kết quả phân tích gen của chúng tôi có 1 trường hợp con có mang gen đột biến đồng hợp tử I2g, mẹ là người mang gen dạng dị hợp tử I2g, bố không phát hiện thấy đột biến giống như bệnh nhân. Trong trường hợp này chúng tôi có thể lý giải đột biến mới có thể xảy ra ở quá trình phân bào, trong quá trình hình thành giao tử, đột biến thường xảy ra ở vị trí intron 2 với tần số chuyển đoạn là $1/10^4$ hoặc bố cũng mang một gen đột biến khác mà với phương pháp hiện tại của chúng tôi đang sử dụng chưa được phát hiện. Năm 2011, trong một nghiên cứu tại Trung Quốc, lập phả hệ và phân tích gen cho 2 gia đình có con bị bệnh TSTTBS, trong đó có 1 gia đình, mang dị hợp tử. Gia đình có 3 con gái, con gái đầu bị bệnh có mang đột biến p.I172N, biểu hiện kiểu hình thể nam hóa

đơn thuần. Bệnh nhân nhận 1 alen đột biến p.I172N từ bố mà không phát hiện thấy đột biến xóa đoạn, chuyển đoạn hay đột biến điểm nào khác. Mẹ và em gái thứ 2 của bệnh nhân không có mang gen đột biến, em gái út có mang gen dị hợp tử giống bố p.I172N (c.1004T>A). Theo tác giả người con gái đầu bị bệnh có thể mang thêm một đột biến mới xảy ra trong quá trình phiên mã liên quan đến sự chuyển đoạn của gen *CYP21A2* [53]. Trong 6 gia đình có bố, mẹ là người mang gen dị hợp tử, sinh hai con đều bị bệnh TSTTBS. Bệnh thường xuất hiện trong cùng một thế hệ, phân tích phả hệ cho 3 thế hệ nhận thấy bệnh di truyền không liên tục qua các thế hệ, bệnh gặp ở thế hệ thứ 3.

Theo nghiên cứu của Trần Kiên Hào (2007), khi làm xét nghiệm gen cho 5 gia đình tìm thấy 3 người mẹ, 2 người bố có mang gen đột biến I2g và đột biến mất đoạn 8bp. Đặc biệt có hai bố mẹ mang dị hợp tử kép vừa đột biến điểm vừa đột biến xóa đoạn trên cùng một alen [79].

4.2.2. Các dạng đột biến trên gen *CYP21A2* ở bố, mẹ, anh, chị, em ruột bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH

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

Theo nghiên cứu của Krone. N tại Đức (2003) phân tích gen *CYP21A2* cho 198 thành viên của gia đình có con bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH, tỷ lệ mang đột biến I2g là 30,3%, đột biến xóa đoạn: 27,4%, đột biến p.R356W:

4,5%, đột biến p.I172N: 19,3%. Tác giả nhận thấy thể bệnh nam hóa đơn thuần hay gặp ở hai dạng đột biến I2g và p.I172N, đột biến p.R356W và xóa đoạn gây bệnh thể mất muối nặng [13].

Nghiên cứu tại Nhật Bản (2002) cho 52 bệnh nhân và các thành viên của 49 gia đình nhận thấy tỷ lệ mang đột biến I2g: 39,8%, xóa đoạn: 5,1%, I172N: 14,3% và Q318X: 15,3%. Đột biến I2g và Q318X là hai dạng đột biến hay gặp trên bệnh nhân của Nhật, đột biến xóa đoạn ít gặp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi cũng như trên thế giới. Nghiên cứu các thành viên của gia đình có mang đột biến I2g dạng dị hợp tử, hoặc mang 2 đột biến dạng dị hợp tử, biểu hiện lâm sàng không có triệu chứng [82].

Nghiên cứu tại Mỹ [83] (2011) cho 213 bệnh nhân và 232 bố mẹ của 182 gia đình. Phân tích kiểu gen của 182 gia đình với tổng số alen là 364, đứng đầu là đột biến xóa đoạn với tỷ lệ: 30,5%, thứ hai là đột biến điểm I2g dạng đồng hợp tử I2g: 23,4 và dạng dị hợp tử kép I2g và một đột biến khác là 1,6%. Thứ ba là các dạng đột biến khác: p.I172N:12,6%, p.V281L:12,6%, p.Q318X: 3,6% và p.R356W: 3,6%, trong đó đột biến p.R356W dạng dị hợp tử kép với các đột biến khác gặp nhiều hơn. Trong nghiên cứu của chúng tôi, không có bệnh nhân mang dạng đột biến V281L, có lẽ do số lượng bệnh nhân của chúng tôi còn nhỏ, cần phải có nghiên cứu trên số lượng lớn hơn.

Theo một báo cáo mới gần đây của New. I. M (3/2013) phân tích sự liên quan kiểu gen và kiểu hình của 1507 gia đình bị bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH nhận thấy dạng đột biến đồng hợp tử I2g: 78,6% ở thể mất muối và 20% ở thể nam hóa đơn thuần. Dạng đột biến xóa đoạn dạng đồng hợp tử là 19,1% ở thể mất muối và dạng đột biến p.V218L hay gặp. Kiểu đột biến dạng dị hợp tử kép của các dạng đột biến trên cũng chiếm tỷ lệ cao trong nghiên cứu. Đây cũng là các dạng đột biến hay gặp trên thế giới như các nước châu Âu [33].

Theo nghiên cứu của Lee và CS có ước tính tỷ suất mang gen bệnh TSTTBS dị hợp tử là 11,2-12,6%/1.000 hay tỷ lệ 1/83 đối với quần thể người Trung Quốc [58]. Trong khi các báo cáo khác trên thế giới thì tỷ lệ chung người mang gen dị hợp tử là 1/60 [1],[89]. Ở Việt Nam chưa có nghiên cứu đưa ra tỷ lệ người lành mang gen bệnh.

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

Sự ra đời và ngày càng phát triển của sinh học phân tử đã giúp cho chẩn đoán bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH ngày càng chính xác và có thể chẩn đoán sớm từ trong bào thai để giảm tỷ lệ mắc bệnh. Với hơn 100 dạng đột biến đã được công bố trên thế giới và nhờ các kỹ thuật hiện đại các kết quả xét nghiệm phân tích gen nhanh chóng và có độ chính xác cao.

Từ các đột biến của bệnh nhân, các kỹ thuật viên, dễ dàng tìm thấy đột biến mà không cần phải phân tích cả đoạn gen (10 exon và intron) phát hiện người lành mang gen bệnh và các thành viên khác có liên quan huyết thống trong dòng họ.

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

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

Phân tích phả hệ của gia đình số 27 hình 3.3 và 3.4 cho thấy gia đình có con trai bị bệnh với kiểu hình thể mất muối, mang gen đột biến điểm ở vị trí p.R356W đồng hợp tử. Bố mẹ sau khi phân tích gen là người mang gen dị hợp tử, trong dòng họ không ai bị bệnh như bệnh nhân. Đây là dạng đột biến gây thể lâm sàng mất muối nặng. Chăm sóc cho bệnh nhân điều trị bệnh suốt đời là một gánh nặng rất lớn về kinh tế và tâm lý cho cha mẹ bệnh nhân, đặc biệt khi trẻ còn nhỏ, các nguy cơ xuất hiện cơn suy thượng thận cấp, nếu không được điều trị sớm và kịp thời có thể gây tử vong cho trẻ. Đột biến dạng này hay gặp trên thế giới, tùy thuộc vào từng quốc gia mà tỷ lệ có thay đổi. Đột biến dạng p.R356W có tỷ lệ cao hơn ở các nước châu Á khác từ 9,5% - 19,2% ở người Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Malaysia [84]. Đột biến làm thay thế nucleotide 2110C>T làm cho bộ ba thứ 356 CGG mã hóa cho Arginin bị chuyển thành TGG mã hóa cho Tryptophan (R356W) gây mất khả năng tổng hợp enzym, đột biến này đưa đến hậu quả làm nồng độ enzym giảm nặng, không đo được, gây bệnh cảnh lâm sàng là thể mất muối nặng.

Phân tích phả hệ của gia đình số 08 với hình ảnh 3.5 và 3.6 cho thấy gia đình có hai con; con gái đầu có kiểu hình bình thường, con trai sau khi sinh có kiểu hình bình thường, khi trẻ 3 tuổi gia đình thấy trẻ luôn lớn hơn bạn bè, kèm theo bộ phận sinh dục, dương vật phát triển ngày càng to hơn so với bạn bè cùng lứa tuổi. Gia đình đưa trẻ đi khám và được chẩn đoán dậy thì sớm giả của bệnh TSTTBS. Sau khi phân tích gen của con trai cho kết quả mang dạng

đột biến đồng hợp tử p.I172N (c.999T>A) ở exon 4, với kiểu hình thể nam hóa đơn thuần. Kết quả phân tích gen của các thành viên gia đình cho thấy bố mẹ bệnh nhân có mang gen đột biến p.I172N dạng dị hợp tử, chị gái (III.4) là người lành có mang gen đột biến giống bố mẹ. Kết quả cho thấy người con trai thứ hai (II.2) nhận hai alen bị bệnh, 1 từ bố và 1 alen từ mẹ, nhưng chị gái chỉ nhận 1 alen bị bệnh từ bố hoặc mẹ nên là người lành mang gen bệnh giống bố mẹ. Trong gia đình và các thành viên khác không ai mắc bệnh giống bệnh nhân. Dạng đột biến p.I172N hay gặp trên thế giới với tỷ lệ khoảng 1,6- 19%. Đột biến I172N ở vị trí 9994T>A làm giảm hoạt động emzym, nhưng có thể đo được theo báo cáo khoảng 0 - 2%, do vậy dạng đột biến này có thể có kiểu hình mất muối nhẹ hoặc nam hóa đơn thuần, tùy thuộc vào hoạt động của enzym trong mỗi cơ thể. Trong nghiên cứu của chúng tôi có 3 gia đình mang đột biến đồng hợp tử I172N, có hai bệnh nhân có mang kiểu hình thể NHĐT và 1 có kiểu hình thể mất muối, kết quả này của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu Krone. N, năm 2000 ở Đức của 155 bệnh nhân TSTTBS trong đó dạng đột biến p.I172N có tỷ lệ: 19,7%, đột biến cho hai kiểu hình nam hóa đơn thuần hoặc mất muối [87].

Phân tích phá hệ của bệnh nhân mã số 17 ở hình 3.7 và 3.8 cho thấy, gia đình có 1 con gái bị bệnh TSTTBS thể mất muối và mang đột biến điểm ở vị trí p.R426C. Trong dòng họ không ai mắc bệnh giống bệnh nhân. Đây là một dạng đột biến ít gặp trên thế giới, đột biến tại vị trí c.1276 C>T, làm gây biến đổi cấu trúc của protein, sự xuất hiện của acid amin cystein ở vị trí này sẽ dẫn đến enzym bị thay đổi nghiêm trọng và không đo được hoạt tính gây thể mất muối trên lâm sàng. Theo Yulia (2006) nghiên cứu trên bệnh nhân ở Nga cho thấy đây là 1/4 đột biến mới ở Nga, đây là đột biến được tìm thấy trên một bệnh nhân nữ có biểu hiện kiểu hình thể nam hóa đơn thuần và phì đại âm vật typ IV theo Prader, được chẩn đoán khi 6 tuổi với biểu hiện nam hóa và tuổi

xương tương đương với trẻ 13 tuổi. Sau khi phân tích gen bệnh nhân có mang đột biến dị hợp tử kép I172N/R426C, bệnh nhân nhận alen p.R426C từ mẹ và 1 alen p.I172N từ bố [90].

Phân tích phả hệ gia đình số 34 ở hình 3.9 và 3.10, gia đình sống ở Lào cai, một tỉnh miền núi phía Bắc của Việt Nam, trong gia đình có một con gái bị bệnh TSTTBS thể mất muối nặng có phì đại âm vật phân loại theo typ 4 của Prader, do không được chẩn đoán bệnh đúng và sớm, trẻ sau nhiều lần rối loạn điện giải bởi cơn suy thượng thận cấp đã để lại cho trẻ di chứng bại não. Khi trẻ 3 tháng mới được khám và chẩn đoán bệnh TSTTBS tại Bệnh viện Nhi trung ương, và được phẫu thuật chỉnh hình khi 5 tháng tuổi. Hiện tại bệnh nhân đã 8 tuổi, luôn trong tình trạng tăng trương lực cơ và không tự sinh hoạt cá nhân được. Bệnh nhân được phân tích gen bằng kỹ thuật MLPA, kết quả cho thấy bị đột biến xóa đoạn tại exon 1 và exon 3, trong phả hệ thế hệ I và thứ II, không ai bị bệnh giống bệnh nhân. Khi phân tích gen bằng kỹ thuật MLPA cho bố mẹ, cả bố và mẹ đều mang gen đột biến xóa đoạn tại vị trí exon 1 và exon 3. Gia đình bệnh nhân đã tham gia câu lạc bộ TSTTBS tổ chức hàng năm ở Bệnh viện Nhi Trung ương, bảy năm sau người mẹ mới có thai lần 2 và mong muốn được tham gia chẩn đoán trước sinh.

Phân tích phả hệ và kiểu gen gia đình số 43 hình 3.11 và 3.12, có một con trai bị bệnh mang đột biến xóa đoạn lớn. Bố, mẹ là người dị hợp tử mang kiểu gen đột biến xóa đoạn lớn này. Đây là dạng đột biến gây thay đổi hoàn toàn cấu trúc của gen *CYP21A2* với hoạt độ enzym 21-OH không đo được dẫn đến thể lâm sàng mất muối nặng với cơn suy thượng thận cấp. Kiểu đột biến xóa đoạn hay gặp trên thế giới với tỷ lệ khoảng 3,9-34% tùy thuộc vào từng quốc gia [1].

Một nghiên cứu ở Brazil, phân tích gen cho 41 gia đình bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH nhận thấy tỷ lệ gặp dạng đột biến xóa đoạn là 8,1%

[71]. Trong đó đột biến mất đoạn 30kb được tìm thấy với tỷ lệ thấp ở bệnh nhân thể mất muối (4,5%) trong khi tỷ lệ gặp trung bình trong các báo cáo khác là 20% ở thể mất muối ở châu Âu và Mỹ. Tần số gặp đột biến xóa đoạn đã được báo cáo là ở Nhật Bản: 11,8%, Trung Hoa – Đài Loan: 9,5%, Singapor: 3,9% [1],[84].

Một nghiên cứu khác ở Ý (2011), đã sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để phát hiện đột biến điểm và kỹ thuật MLPA với 152 bệnh nhân nhận thấy tỷ lệ đột biến xóa đoạn trung bình là 25,6% [59].

Đột biến xóa đoạn lớn, dẫn đến mất toàn bộ chức năng enzym 21-OH dẫn đến hậu quả trên lâm sàng với thể cổ điển mất muối nặng. Khi xét mối liên quan giữa kiểu gen đột biến xóa đoạn với kiểu hình trên lâm sàng, chúng tôi nhận thấy hoàn toàn phù hợp ở các bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi. Những năm gần đây, ngày càng có nhiều nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật MLPA xác định các đột biến xóa đoạn và chuyển đoạn của gen *CYP21A2*. Kỹ thuật MLPA cho kết quả chính xác và nhanh, đặc biệt có thể phát hiện các đột biến ở người mang gen chính xác hơn thay thế cho kỹ thuật phân tích Southern blot.

Phân tích phả hệ của bệnh nhân gia đình số 25 với hình minh họa 3.13 và 3.14 cho thấy, bố (II4) là người mang gen dị hợp tử dạng đột biến S125X, mẹ mang đột biến xóa đoạn tại exon 1 và exon 3. Trong dòng họ không ai mắc bệnh giống bệnh nhân. Đây là một đột biến mới ở exon 3 vị trí nucleotide 752 C bị chuyển thành G. Dạng đột biến p.S125X ít gặp, gây thể bệnh mất muối trên lâm sàng. Năm 2012, ở Việt Nam, bác sĩ Dũng và CS đã phân tích gen cho 81 bệnh nhân TSTTBBS tỷ lệ gặp dạng đột biến p.S125X là 1,2%, là một kiểu đột biến mới [80].

Phân tích phả hệ và kiểu gen của gia đình số 24 ở hình 3.15 và 3.16 cho thấy, gia đình có một con gái bị bệnh (III5) có mang kiểu gen dị hợp tử kép.

Sau khi phân tích gen cho bố mẹ, bệnh nhân nhận 1 alen gây bệnh mang đột biến p.I172N từ bố và mẹ mang đột biến p.Q318X. Đây là các dạng đột biến hay gặp ở Việt Nam và các nước châu Á. Nghiên cứu năm 2011, Khan. A [86], phân tích gen cho 29 bệnh nhân TSTTBS nhận thấy tỷ lệ gặp đột biến đồng hợp tử là 44%, và đột biến dị hợp tử kép là 34%. Tỷ lệ người mang dị hợp tử kép ở bệnh nhân TSTTBS cao vì bệnh tuân theo quy luật di truyền của Menden, nên gen lặn gây bệnh nằm trong các dòng họ, bệnh chỉ biểu hiện khi có mặt của 2 alen mang gen gây bệnh dạng đồng hợp tử hoặc 2 alen cùng mang gen gây bệnh ở hai vị trí khác nhau. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, có 15/56 gia đình có mang dị hợp tử kép, trong đó hay gặp đột biến I2g kết hợp với một loại đột biến khác.

Phả hệ gia đình số 49 ở hình 3.17 và 3.18 cho thấy, gia đình có hai con gái đầu tử vong trong tháng đầu sau khi sinh, khi 3 tuần tuổi, tại bệnh viện huyện. Cả hai bé đều có biểu hiện nôn sau sinh, da xạm và bất thường bộ phận sinh dục. 1 chị gái hiện đã 26 tuổi, có gia đình và 1 con 1 trai có kiểu hình bình thường. Người con thứ tư, con trai 2 tuổi, bị bệnh sau khi phân tích gen, bệnh nhân có mang 3 loại đột biến I2g, p.Q318X và p.R356W. Sau khi phân tích gen của bố và mẹ, cho thấy mẹ bệnh nhân mang đột biến I2g và bố mang đột biến Q1318X. Đột biến gen p.Q318X và p.R356W là hai vị trí đột biến cùng exon 6 gần nhau, trong quá trình phân chia hình thành giao tử, do đột biến chuyển đoạn từ giả gen *CYP21A1P* chuyển đoạn sang gen *CYP21A2* gây dạng dị hợp tử kép 3 gen đột biến cho bệnh nhân. 2006 một nghiên cứu ở Tây Ban Nha, tỷ lệ lặp đoạn hay xảy ra ở exon 6 nhiều hơn ở exon 1 và 10, trong đó đột biến gây lặp đoạn ở quần thể nói chung là 1,6%, của tác giả trong nghiên cứu này gặp đột biến p.Q318X là 0,8% [24]. Một nghiên cứu ở châu Á, Chan. O. K. A tại Trung Quốc (2011) phân tích gen của 35 bệnh nhân và gia đình cho thấy tỷ lệ gặp đột biến p.Q318X và p.R356W khá cao 3/35 trường hợp trong đó có 2 trường hợp có đột biến lặp đoạn [84].

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

Năm 1965, Jeffcoate và cộng sự lần đầu tiên chẩn đoán trước sinh được tiến hành với những kỹ thuật thô sơ. Đến nay chẩn đoán trước sinh đã sử dụng các kỹ thuật tiên tiến để có độ chính xác cao. Đối với bệnh TSTTBS lúc đầu dựa vào sự tăng lên của nồng độ 17-ketosteroid và pregnanetriol trong nước ối. Năm 1985, Pang và CS thấy rằng 17-OHP trong nước ối tăng cao ở các thai phụ đã sinh con bị bệnh TSTTBS thể mất muối do thiếu hụt enzym 21-OH. Tác giả đã sử dụng định lượng 17-OHP trong dịch ối để chẩn đoán trước sinh thai nhi bị bệnh. Chẩn đoán trước sinh bằng phương pháp này còn hạn chế vì chỉ chẩn đoán được thể mất muối với 17-OHP tăng cao rõ [46]. Ngày nay, việc sử dụng các kỹ thuật di truyền phân tử đã rất phổ biến để phát hiện đột biến gen *CYP21A2* cho kết quả nhanh và chính xác hơn.

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

Khoa Nội tiết - Chuyển hóa- Di truyền Bệnh viện Nhi Trung ương đã thành lập câu lạc bộ “Bệnh TSTTBS” hơn 16 năm nay. Tại các buổi sinh hoạt của câu lạc bộ “Bệnh TSTTBS” được tổ chức hàng năm ở Bệnh viện Nhi Trung ương, các gia đình bệnh nhân TSTTBS đều được giải thích rõ về bệnh của con họ. Các phương pháp điều trị và chăm sóc, cách phát hiện các biến chứng của bệnh cho trẻ. Đồng thời giải thích cách di truyền bệnh trong gia đình cho các thế hệ con cháu tiếp theo của họ. Từ sự hiểu biết đó họ sẽ tự nguyện hợp tác với bác sĩ trong việc tuân thủ điều trị cho trẻ bị bệnh, hợp

tác tham gia xét nghiệm phát hiện người lành mang gen bệnh và chấp nhận chẩn đoán trước sinh khi mẹ bệnh nhân có thai tiếp theo. Hoặc những thành viên khác của gia đình là người lành mang gen bệnh xây dựng gia đình khi họ mang thai. Trong thời gian 3 năm, chúng tôi tư vấn di truyền cho các thành viên của 56 gia đình, mới tiến hành chẩn đoán trước sinh cho 12 thai phụ có mang gen dị hợp tử, có nguy cơ cao sinh con bị bệnh. 12 người mẹ bệnh nhân đều mang thai lần thứ ≥ 2 lần. Còn số chị em gái không có vì đang còn bé tuổi. Số lượng các mẹ và chị, em gái của bệnh nhân được phân tích gen 65 trong đó có 56 bà mẹ, số lượng này vẫn còn ít cần tiếp tục với số lượng lớn hơn.

Có nhiều biện pháp lấy mẫu DNA của thai nhi, nhưng ở nước ta hiện nay, phương pháp lấy mẫu chủ yếu để chẩn đoán trước sinh các bệnh lý di truyền bằng dịch ối ở thai 15- 16 tuần dưới sự hướng dẫn của siêu âm. Đây là biện pháp can thiệp có ảnh hưởng tới sự an toàn của thai nhi và thai phụ như: rỉ ối, sảy thai, lây truyền các bệnh như viêm gan B, HIV...Do vậy, theo dõi thai sản và kỹ thuật lấy dịch ối được thông qua và tiến hành tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương, dịch ối thu được sẽ vận chuyển ngay về Trung tâm Nghiên cứu Gen và Protein của trường Đại học Y Hà Nội để phân tích.

Kết quả phân bố kiểu gen của thai nhi và gia đình ở bảng 3.8, có 12 thai phụ được chẩn đoán trước sinh có 1 thai phụ được chẩn đoán 2 lần, 13 thai nhi đã được xét nghiệm gen, trong đó có 8 thai nhi mang gen đột biến dị hợp tử và 2 thai nhi bị bệnh, 3 thai nhi hoàn toàn bình thường. Hai thai nhi mang đột biến đồng hợp tử p.R356W trong cùng một gia đình. Trong nhóm thai nhi mang đột biến dị hợp tử có 6 thai nhi mang đột biến dị hợp tử xóa đoạn, 1 đột biến p.I172N và 1 đột biến dị hợp tử kép 2 đột biến điểm trên cùng 1 alen (p.Q318X & R356W). Đây là các dạng đột biến hay gặp ở bệnh nhân Việt Nam và trên thế giới.

Phân tích phả hệ gia đình mã số 06 với hình minh họa 3.20 (A&B) và 3.21 (A&B), gia đình không có ai bị bệnh như bệnh nhân, anh trai mang đột biến p.R356W trên exon 8 gây thể mất muối nặng. Bố và mẹ đều là người mang gen dị hợp tử pR356W. Năm 2012, mẹ bệnh nhân được chẩn đoán trước sinh khi thai 16 tuần. Phân tích DNA mẫu ối của thai nhi và nuôi cấy NST, kết quả là một thai nhi trai có mang đột biến đồng hợp tử p.R356W giống anh trai. Dạng đột biến p.R356W ở exon 8 sẽ gây thể mất muối nặng với hoạt độ enzym không đo được. Sau khi được các bác sĩ tư vấn, sau vài ngày suy nghĩ và thống nhất với gia đình, thai phụ đã quyết định hủy thai, dưới sự giúp đỡ của các bác sĩ sản khoa Bệnh viện Phụ sản Trung ương. Hai năm sau, năm 2014 gia đình mong muốn có thêm một em bé và tự nguyện xin chẩn đoán trước sinh, sau khi theo dõi thai sản và chọc ối khi thai 16 tuần tuổi, kết quả phân tích gen *CYP21A2* và NST, cho thấy một thai nhi gái, không may mắn lại mang đột biến đồng hợp tử p.R356W giống anh trai. Sau khi được tư vấn thai phụ xin đình chỉ thai tại Bệnh viện Phụ Sản Trung ương khi thai 18 tuần tuổi.

Phân tích phả hệ gia đình mã số 45 với hình minh họa 3.22 và 3.23 cho thấy con gái bị bệnh TSTTBS thể mất muối với kiểu gen đồng hợp tử xóa đoạn ở exon 1 và exon 3. Bố, mẹ bệnh nhân là người mang gen dị hợp tử xóa đoạn tại exon 1 và 3. Chẩn đoán trước sinh được thực hiện cho thai phụ khi thai 16 tuần. Sau khi phân tích bằng kỹ thuật MLPA cho thấy thai nhi là con trai và mang gen dị hợp tử xóa đoạn. Thai phụ được tư vấn di truyền, đồng thời thai nhi được lập hồ sơ quản lý để có biện pháp tư vấn tiền hôn nhân sau này. Hiện tại bé trai đã 16 tháng và phát triển khỏe mạnh.

Phân tích phả hệ gia đình chẩn đoán trước sinh mã số 55 với phả hệ và kiểu gen ở hình 3.24 và 3.25, gia đình có 1 con trai bị bệnh TSTTBS thể mất muối với kiểu gen dị hợp tử kép I2g và xóa đoạn. Đây là 2 dạng đột biến hay

gặp trên thế giới và một số nghiên cứu ở Việt Nam. Bố có mang gen đột biến xóa đoạn, mẹ có mang gen đột biến I2g. Sau khi được theo dõi thai sản và chọc ối để chẩn đoán trước sinh khi thai 16 tuần, kết quả phân tích gen cho thấy thai nhi là con gái có mang gen dị hợp tử xóa đoạn do nhận alen gây bệnh từ bố, vị trí I2g của thai nhi cho kết quả hình ảnh hoàn toàn bình thường. Gia đình được tư vấn giữ thai, sau khi trẻ sinh ra là một bé gái có kiểu hình hoàn toàn bình thường.

Các gia đình được chẩn đoán trước sinh đều có con mang đột biến hay gặp với kiểu hình là thể mất muối nặng. Do vậy, mong muốn của mỗi gia đình sinh được một em bé bình thường. Nghiên cứu của B. Ezquieta ở Tây Ban Nha (2006) phân tích gen cho một gia đình có con gái đầu bị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-OH, mang gen đột biến đồng hợp tử Q138X với biểu hiện lâm sàng thể mất muối nặng. Kết quả chẩn đoán trước sinh người mẹ cho thấy thai nhi là nam mang đột biến dị hợp tử nên người mẹ được tư vấn giữ thai. Ở Tây Ban Nha chẩn đoán trước sinh cho các gia đình có nguy cơ sinh con bị bệnh TSTTBS có vai trò rất quan trọng, đặc biệt những gia đình mang gen đột biến Q138X, dạng đột biến gây mất hoạt tính của enzym hoàn toàn với biểu hiện lâm sàng thể mất muối nặng [24].

Năm 2014, Deniz và CS đã phân tích gen cho 124 bệnh nhân TSTTBS nhận thấy, chẩn đoán trước sinh, tư vấn di truyền và phát hiện người mang gen có vai trò rất to lớn trong phòng bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH. Bên cạnh đó, những đột biến mới vẫn đang được phát hiện tại các vị trí phức tạp và có sự khác nhau trong mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình trong các nghiên cứu ở các chủng tộc khác nhau. Hiệu quả của điều trị và chẩn đoán trước sinh làm giảm tỷ lệ bất thường bộ phận sinh dục của bệnh rất nhiều [11].

Trong nghiên cứu này của chúng tôi chỉ có 2 thai nhi con của một bà mẹ được chẩn đoán bệnh TSTTBS, trong đó có 1 thai nhi là gái. Vì gia đình đã có 1 con bị bệnh nên cả hai lần gia đình đều quyết định đình sản. Do đó chúng

tôi không có trường hợp nào để điều trị trước sinh cho thai nhi gái. Trong số 8 thai nhi là dị hợp tử và 3 thai nhi bình thường hoàn toàn có 2 trẻ sau sinh có điều kiện kiểm tra lại đột biến gen đều phù hợp với chẩn đoán trước sinh. Các trẻ khác đều bình thường hoàn toàn nên gia đình không cho đến kiểm tra lại.

Tăng sản thượng thận bẩm sinh là một bệnh lý di truyền đơn gen lặn trên NST thường, bố mẹ mang gen dị hợp tử sẽ có khả năng 25% sinh con bị bệnh. Nguy hiểm của bệnh di truyền lặn NST thường là truyền bệnh qua nhiều thế hệ trong gia đình làm tăng tần số bệnh TSTTBS trong cộng đồng. Sinh ra một người con bị bệnh TSTTBS là một gánh nặng rất lớn về kinh tế, nhất là các gia đình có hoàn cảnh khó khăn. Phải theo đuổi điều trị suốt đời cho con họ. Hơn nữa nó còn gây một gánh nặng về tâm lý cho bệnh nhân và gia đình. Do đó yêu cầu đặt ra cho chúng ta là phải thực hiện một cách tích cực biện pháp phòng bệnh chủ động bằng phát hiện người lành mang gen bệnh và thực hiện triệt để chẩn đoán trước sinh chứ không phải để họ sinh ra con bị bệnh rồi chúng ta mới điều trị. Đó cũng là nguyện vọng của chúng tôi khi tiến hành đề tài nghiên cứu này.

KẾT LUẬN

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

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

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

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

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

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

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

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

KIẾN NGHỊ

Cần mở rộng màng lưới tư vấn di truyền từ trung ương đến địa phương để có điều kiện quản lý bệnh nhân và các thành viên gia đình của bệnh nhân mắc bệnh TSTTBS thể thiếu 21-hydroxylase. Hướng dẫn gia đình hợp tác với bác sĩ trong việc điều trị cho bệnh nhân và phát hiện người lành mang gen bệnh cho tất cả thành viên các thế hệ của hai bên nội ngoại để tư vấn di truyền, tiến tới chẩn đoán trước sinh cho những cặp vợ chồng là hai dị hợp tử để phát hiện bệnh và điều trị sớm tránh tử vong hoặc tàn tật cho trẻ.

Giáo dục cho cộng đồng về nguy cơ cao truyền bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH nếu kết hôn cùng huyết thống, hoặc là ở các quần thể cô lập, để tránh sinh con bị bệnh.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Speiser P. W (2000). Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews*, 21(3), 245 -291.
2. Nguyễn Thị Phương (2009). Tăng sản thượng thận bẩm sinh. *Bài giảng Nhi khoa tập 2. Nhà xuất bản Y học*, 209 -217.
3. Pinto. G, Tardy. V, Trivin .C, Thalassinos. C et al (2014). Follow –up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency: Relevance of genotype for management. *The journal of clinical endocrinology &metabolism*, 88 (6), 2624-2633.
4. Forest. G. Maguelone (2004). Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency. *Human Reproduction*, Vol 10, No6, 469-485.
5. Speiser. P.W, White. P.C. (2003) Congenital Adrenal Hyperplasia. *The New England Juornal of Medical*; 349: 776 -788.
6. Sugino. Y, Usui. T, Okubo. K et al (2006). Genotyping of cogenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency presenting as male infertility: case report and literature review. *J Assist Reprod Genet*, 23, 337- 380.
7. Nimkarn. S, New. I. M (2010). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Annals of the New York academy of sciences*, 1192, 5-11.
8. Lee. H. H et al (2004). Use of PCR – based amplification analysis as a substitute for the southern blot method for CYP21 deletion detection in congenital hadrenal hyperplasia. *Clin Chem*, 50, 1074 –1076.

9. Anastasovska.V, Kocova. M (2010). Detected heterozygouts during the molecular analysis of the common *CYP21A2* point mutations in Macedonian patients with congenital adrenal hyperplasia and their relatives. *Contributions Sec Biol Med Sci, MASA*. XXXI, 2, 71-82.
10. Baumgartner-Parzer. S. M, Nowotny. P et al (2004). Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in a Middle European population. *The journal of clinical Endocrinology & Metabolism*, 90 (2), 775-778.
11. Deniz. K, Ahmet. I. G, Teoman. A, Tulay. G et al (2014). The frequency and the effects of 21-hydroxylase gene defects in congenital adrenal hyperplasia patients. *Annals of human genetics*, 78, 399-409.
12. Maurice. G. H (2009). Adrenal glands. *Basic medical endocrinology*. Fourth Edition, 61- 93.
13. Krone M. M. L Stikkelbroeck et al (2003). *CYP21* Gene Mutation Analysis in 198 Patients with 21 – hydroxylase Deficiency in the Netherlands: Six Novel Mutations and a Specific Cluster of Four Mutations. *Jounal. Clin Endocrinol Metab*, 88, 3852-3859.
14. Svetlana. L, Anna. N et Tatja. H (2011). Long –Term outcome of prenatal dexamethasone treatment of 21-hydroxylase deficiency. *Pediatric Adrenal Diseases. Endocr Dev. Basel, Karger, Vol 20*, 96-105.
15. Reisch. N, Willige. M, Kohn. D et al (2012). Frequency and causes of adrenal crises over lifetime in patients with 21- hydroxylase deficiency. *Eur J.Endocrinol*; 167(1), 35-42.
16. Concolino. P, Mello. E et al (2010). Molecular diangosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency. *An update of new CYP21A2 mutations. Clin. Chem. Lab. Med*, 48, 1057-1062.

17. Witchel S. F, Azziz. R (2011). Congenital adrenal hyperplasia. *Journal Pediatr Adolesc Gynecol*, 24, 116-126.
18. Nguyễn Thị Bánh (2003). *Tình hình bệnh nội tiết trong 10 năm tại Viện Nhi Quốc gia*, Luận văn tốt nghiệp bác sỹ Chuyên khoa cấp II, Trường đại học Y Hà Nội.
19. Dorr. H. G, Sippell. W. G (1993). Prenatal dexamethasone treatment in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: effect on midgestational amniotic fluid steroid levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 76 (1), 117-120.
20. Higashi. Y, Yoshioka. H et al (1986). Complete nucleotide sequence of two steroid 21- OH genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 2841-2845.
21. Jeffcote. T et al (1965). Diagnosis of the adrenogenital syndrome before birth. *Lancet*, 2, 553.
22. New. I. M, Ann. C, Jihad. O et al (2001). Extensive personal experience: Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86 (12), 5651-5657.
23. Nimkarn. S, New I. M (2009). Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 300, 192-196.
24. Ezquieta. B, Beneyto. M et al (2006). Gene duplication in 21-hydroxylase deficiency: the importance of accurate molecular diagnosis in carrier detection and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*, 26, 1172-1178.
25. Bajpai A, Kabra M, Menon P. S. N (2004). 21 - Hydroxylase deficiency: Clinical features, Laboratory profile and pointers to diagnosis in Indian children. *Indian Pediatrics*, 41(17),1226 – 1231.

26. Torok. D, Eckhardt. G (2003). Twenty years experience in rapid indentification of Congenital Adrenal Hyperplasia in Hungary. *Eur Journal Pediatric*, 162, 844- 849.
27. Ercan. O, Hateni. S, Kuttu. E, Turan. N (2000). Effect of treatment on growth in Congenital Adrenal Hyperplasia. *Indian Pediatrics*, 67 (11), 783 – 789.
28. Cunniff C et al (2004). Prenatal Screening and Diagnosis for Pediatricians. *Pediatrics*, 114 (3), 889 – 899.
29. Võ Thị Kim Huệ (2000). *Góp phần nghiên cứu chẩn đoán và điều trị bệnh TSTTBS thiếu enzyme 21- hydroxylase ở trẻ em*. Luận án tiến sĩ Y học. Đại học Y Hà Nội.
30. Nelson. W (2007). Disorders of the adrenal gland. *Nelson textbook of Pediatrics*. W. B Saunders Company, 1214 – 1227.
31. Vrzalova. Z, Hrubá. Z et al (2011). Chimeric *CYP21A1P/CYP21A2* genes identified in Czech patients with congenital adrenal hyperplasia. *European journal of Medical Genetics*, 54, 112-117.
32. Tsai. L. P, Cheng. C. F, Chuang. S. H, Lee. H. H (2011). Analysis of the *CYP21A1P* pseudogene: Indication of mutational diversity and *CYP21A2* – like and duplicated *CYP21A2* genes. *Analytical Biochemistry*, 413, 133-141.
33. New. I. M, Moolamannil. A et al (2013). Genotype-phenotype correlation in 1.507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Medical Sciences. PNAS*, 110 (7), 2611-2616.
34. Speiser P. W, New M. I, White. P C (1988). Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21- hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1. *New England Journal Medicine*, 319, 428-439.
35. Koppens P., Hoogenboezem T, Degenhart H (2002). Duplication of the *CYP21A2* gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. *Human Genetics*. Vol.111(4-5), 405-410.

36. Amor. M, Parker. K. I et al (1988). Mutations in the *CYP21B* gene (Ile172-Asn) cause steroid 21-OH deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 1600 -1604.
37. Larsen et al (2003). Congenital Adrenal Hyperplasia. *Williams textbook of Endocrinology 10th*, 458-513.
38. Tusie- Luna. M. T, Speiser. P. W, Dunic. M et al (1991). A mutation (Pro-30 to Leu) in *CYP21* represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Molecular Endocrinology*, 5, 685-692.
39. Krone. N, Felix G et al (2005). Functional Characterization of two novel point mutations in the *CYP21* gene causing simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*, 90 (1), 445-454.
40. Lee. H. H (2004). The chimeric *CYP21P/CYP21* gene and 21-hydroxylase deficiency. *The Japan Society of Human Genetics and Springer- Verlag*, 49, 65-72.
41. Dauber. A, Kellogg. M, Joseph A. Majzoub (2010). Monitoring of therapy in Congenital Adrenal Hyperplasia. *Clinical Chemistry* 56 (8), 1245 – 1251.
42. Marumudi. E, Khadgawat. R et al (2013). Diagnosis and management of classical congenital adrenal hyperplasia. *Steroids* 78, 741-746.
43. Kenneth. L. B et al (2001). Adrenocortical disorders in infancy and childhood. *Principles and Practice of Endocrinology & Metabolism*, 685-701.
44. Felix. G. R, Wolfgang. G. S (2007). Recent advance in diagnosis, treatment and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocr Metab Disord*, 8, 349-363.
45. Mathur R, Kabra M (2000). Prenatal diagnosis and treatment of steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia). *Indian journal pediatrics* 67, 813- 818.

46. Forest. M. G, David. M et al (1993). Prenatal diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 45(1-3), 75-82.
47. Peter Wieacker, Johannes Steinhard (2010). The prenatal diagnosis of genetic diseases. *Dtsch Arzteb Int*, 107 (48), 857-862.
48. Speiser. W. P et al (2010). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-OH deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 4133-4160.
49. Husref. T, Alma. T et al (2009). Untreated congenital adrenal hyperplasia due to 21 – hydroxylase. *Eur J Pediatrics*, 168, 847 – 849.
50. An TT Nguyen, Justin J. Brown, Garry L. Warne (2006). Growth in Congenital Adrenal Hyperplasia. *Indian journal pediatric*, 73 (1), 89-93.
51. Madeleine. D. H, Karen. L. S, New. I. M (2011). Growth hormone treatment in children with congenital adrenal hyperplasia. *Advances in experimental medicine and biology*. Vol 707. 107
52. New. I. M (2001). Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. The United states experience. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 30.1-13
53. Tian. J, Yang. G et al (2011). Molecular diagnosis of two families with classic congenital adrenal hyperplasia. *Gene No* : 368 -89
54. Anna. N et al (2010). Sexual function and Surgical outcome in women with congenital adrenal hyperplasia due to *CYP21A2* deficiency: Clinical perspective and the patient perception. *J Clin Endocrinol Metab*. 95 (8): 3633-3640
55. Merke. D. P, Bornstein. S. R et al (2002). NIH conference. Future directions in the study and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Intern Med*, 136, 320 -334.
56. Robert L. N, Roderick R. M et al (2001). Genetics in medicine. *Thompson &Thompson genetics in medicine*. 17-22.

57. Lopez-Gutierrez. U. A, Riba. L et al (1998). Uniparental disomy for chromosome 6 results in steroid 21-hydroxylase deficiency: evidence of different genetic mechanisms involved in the production of the disease. *Journal Med Genet*, 35, 1014-1019.
58. Lee. H. H, Kuo. J. M, Chao H.T et al (2000). Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-OH deficiency in Chinese. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85 (2), 597 – 600.
59. Ghizzoni Lucia, Marco Cappa et al (2011). Relationship of *CYP21A2* genotype and serum 17 – hydroxyprogesterone and cortisol levels in a large cohort of Italian children with premature pubarche. *European Journal of Endocrinology*, 165, 307-314.
60. Huynh. T, Ivan. M et al (2009). The clinical and biochemical spectrum of congenital adrenal hyperplasia secondary to 21- hydroxylase deficiency. *Clin Biochem Rev*, Vol 30, 75-84.
61. Bachega.S.S.A, Brenha.M.L.E et al (2002). Variable ACTH-Stimulated 17- hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different *CYP21* gene mutations. *The journal of clinical endocrinology &metabolism*, 87 (2), 786-790.
62. Keegan C. E, Killeen A. A (2001). An Overview of Molecular Diagnosis of Steroid 21 – Hydroxylase Deficiency. *Journal of Molecular Diagnostics*, 3(2), 49-53.
63. Gordon B. Cutler, Lousia. L (1990). Congenital adrenal hyperplasia due to 21 – hydroxylase deficiency. *The new England journal of Medicine*, 323, 1806 – 1813.
64. Nguyễn Thị Phương (1996). Đặc điểm di truyền của hội chứng sinh dục thượng thận. *Di truyền học và ứng dụng*, 1 -5.

65. Lee. P. S, Sherman. E (1993). Amniocentesis and chorionic villus sampling. *Fetal Medicine (Special issue). West J Med*, 159, 260-268.
66. Summers. A (2003). Prenatal diagnosis for paediatricians. *Paediatr Child Health*, 8 (1), 25-29.
67. Trần Danh Cường (2009). Một số nhận xét về kết quả chọc hút nước ối trong chẩn đoán trước sinh tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. *Hội nghị Sản Phụ khoa Việt Pháp*, 297-331.
68. Book C. G. D (2000). Antenatal treatment of a mother bearing a fetus with congenital adrenal hyperplasia. *Archive Disease Children Fetal Neonatal Ed*, 82, 176 – 181.
69. Alfirevic Z, Mujezinovic F et al (2009). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *The Cochrane Library*, 35-38.
70. Stefan. A. W, Janos H, Walter. M. T (1994). Successful prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr*, 153, 556-559.
71. American Academy of Pediatrics (2000). Technical Report: Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatrics*, 106 (6), 1511 -1515.
72. Speiser P. W (2005). The Genetics of Steroid 21 – Hydroxylase Deficiency. *The Endocrinologist*, 15 (1), 37-41.
73. Coeli B. F, Soardi. C. F et al (2010). Novel deletion alleles carrying *CYP21A1P/A2* chimeric genes in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *BMC medical Genetics*, 104-124.
74. Paola. C et al (2009). Multiplex ligation – dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of *CYP21A2* gene deletions/ duplications in Congenital Adrenal Hyperplasia: First technical report. *Clinical Chimica Acta 402. Elsevier B.V*, 164-170.

75. Nguyễn Thu Nhạn, Cao Quốc Việt, Nguyễn Nguyệt Nga, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Hoàn, Trần Thị Hòa (1991). Bệnh rối loạn nội tiết-chuyển hóa và di truyền tại viện bảo vệ sức khỏe trẻ em, *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học 10 năm (1981-1990)*, 66 – 75.
76. Nguyễn Thu Nhạn (1994). Dậy thì sớm. *Cẩm nang điều trị Nhi khoa*. NXB Y học, 245- 246.
77. Thái Thiên Nam, Nguyễn Thị Phương, Võ Thương Lan (2002). Phát hiện đột biến gen *CYP21* trong tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu enzyme 21-hydroxylase ở trẻ em và gia đình trẻ bị bệnh tại viện Nhi. *Nhi khoa; tập 10, số đặc biệt chào mừng 100 năm Trường Đại học Y Hà Nội*.
78. Thái Thiên Nam (2001). *Phát hiện đột biến gen cho bệnh nhân bị bệnh TSTTBS thể thiếu enzyme 21-OH và thành viên trong gia đình*. Luận văn Thạc sĩ Y học, Trường đại học Y Hà Nội.
79. Trần Kiên Hào (2007). *Xác định một số đột biến CYP21 gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu enzym 21- hydroxylase và phát hiện người lành mang gen bệnh*. Luận án tiến sĩ y học. Đại học Y Hà Nội
80. Vu Chi Dung, Tran Van Khanh, Fukami. M et al (2012). Mutation spectrum of CYP21A2 and correlation between genotype-phenotype in 81 Vietnamese patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, S1, 128.
81. Torok. D, Eckhardt. G (2003). Twenty years experience in rapid identification of Congenital Adrenal Hyperplasia in Hungary. *Eur Journal Pediatric*, 162, 844- 849.
82. Koyama S, Toyoura T, Saisho S, Shimazawa K, Yata J (2002). Genetic analysis of Japanese patient with 21 – hydroxylase deficiency: identification of a patient with a new mutation of a homozygous deletion of adenine a co don 246 and patients without demonstrable within the structural gene for CYP21. *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87 (6), 2668 – 2673.

83. Fibkielstain. P. G, Chen. W, Mehta. P. S et al (2010). Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 96 (1), 161-172.
84. Angel. O. K Chan, But. M. W (2011). Molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency in Hong Kong Chinese patients. *Steroids* , 76, 1057-1062.
85. Paulino. L. C et al (1999). Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of 21 – Hydroxylase Deficiency. *Journal Acta Pediatric*, 88, 275-283.
86. Khan. H. A, Muniba. A, Jamal. R et al (2011). Ethnic disparity in 21 – hydroxylase gene mutations identified in Pakistani congenital adrenal hyperplasia patients. *BMC Endocrine Disorders. Biomed central*, 1- 13.
87. Krone. N, Braun. A et al (2000). Predicting phenotype in steroid 21- hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, Well Defined patients from southern Germany. *The journal of clinical Endocrinology&Metabolism*, 85, 1059- 1064.
88. Agneta. N, Gundela. H, Louise. F et al (2008). Type of mutation and surgical procedure affect long – term quality of life for women with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 93 (2), 380-386.
89. Marino. R, Ramirez. P, Galeano. J, Garrido. N.P, Rocco. C, Ciaccio. M et al (2011). Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*.
90. Yulia .G, Rubtsor. P et al (2006). Four novel missence mutation in the CYP21 gene detected in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia: Identification, functional characterization and structural analysis. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*, 4976- 4980.

PHỤ LỤC 1

Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh TSTTBS thể thiếu enzym 21-OH

1. Triệu chứng suy thượng thận cấp do thiếu hụt Cortisol và Aldosteron:

Thể mất muối

+ Trĩ n«n nhiĐu, n«n tù nhi^an kh«ng li^an quan ®Õn b÷a b, ®«i khi klm theo ða chñy.

+ Do nôn nhiều trẻ bị mất nước, da nhn nheo, sốt cn, mt hc h₂c, mt trng, m«i kh«.

+ X¹m da, ®c bit là bé phn sinh dục.

+ Trĩ trong tnh trng sc: da ni vn tm, mạch nhanh nh kh bt, huyết áp tt, loạn nhịp tim. Trong nhng trng hp này tr d b chn ®o₂n nhóm ví i ti^au chñy cp mt nước, vi^am ruột hoi t hoặc mt bnh nhiễm trùng kh₂c.

+ Ri loạn ®in gii nng: Na⁺ giảm, Cl⁻ giảm, K⁺ tng cao trên 5,2 mEq. Kh«ng x tr kp thi tr sĩ t vong do try mạch hoặc ngng tim.

Triệu chứng nam ho₂ do tng Testosteron

* Ở trẻ trai: dư-ng vt to, di hn so ví i tuổi, vi ng bu thm, tinh hoàn b tương đồng với tuổi.

* Ở tr g₂i: b nam ho₂, ®m vật ph®i như dư-ng vt, nn c tr mí i sinh t-ng nhm con trai. Hai m«i lí n dnh vào nhau, nhn trng hi ging bu, kh«ng c tinh hoàn. Trong trng hp này tr b khai sinh nhm con trai.

Th nam ho₂ ®n thun.

Biểu hiện lm sng chn yếu do cng Testosteron gy nam ho₂.

* Tr trai: dy th sm gi, dư-ng vt to, di hn so ví i tuổi tuy vậy th tch tinh hoàn b dư-ng ®r-ng ví i tuổi của bnh nhn, kh«ng dư-ng xng ví i dư-ng vt. Mc lng sinh dục sm.

* Tr g₂i: ®m vt ph®i trng như dư-ng vt. m vt ph®i ®rc chia theo 5 tp của Prader. Hai m«i lí n dnh nhau, nhn trng ging bu. Kh«ng c tinh hoàn c

khi khám lâm sàng và kiểm tra bằng siêu âm. Phải làm xét nghiệm nhiễm sắc thể để xác định giới tính chính xác như ví dụ Karyotyp 46. XX.

+ Tăng cân nhanh, có biểu hiện triệu chứng tăng trưởng lúc lúống. Tuổi xương sớm so với tuổi thực nhưng do xương tăng sớm nên tuổi dậy thì trễ hơn so với trẻ cùng lứa tuổi khác.

+ Giảm âm, mất trọng lượng, mất lông sinh dục sớm so với tuổi.

2. Triệu chứng xét nghiệm

Xét nghiệm máu:

+ Cortisol máu giảm.

+ Aldosteron giảm.

+ Testosteron tăng cao >1nmol/l.

+ Progesteron, 17-OH Progesteron tăng cao > 6.0 nmol/l.

+ Điện giải đồ máu: Na^+ <130mEq/l, Cl^- giảm, K^+ tăng cao >5mEq/l.

+ Số lượng enzym 21-hydroxylase thiếu hụt cả giới trẻ con mắc hội chứng này ở Việt Nam chưa được.

Xét nghiệm giải trình tự gen và MLPA : Có thể phát hiện gen CYP21A2.

PHỤ LỤC 2

Điều trị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh

1 Nguyên nhân và điều trị

Tăng sản thượng thận bẩm sinh là bệnh di truyền do thiếu hụt enzyme chuyển đổi cholesterol thành hormone steroid, dẫn đến tích tụ các hormone steroid, nhưng tỷ lệ theo thứ tự giảm dần, di truyền theo kiểu lặn. Bệnh cần phải chẩn đoán sớm, điều trị sớm để tránh biến chứng.

2 Điều trị nội suy thận cấp :

+ Thay thế hormone steroid:

* Cortisol: thường dùng Hydrocortison 30 - 50 mg/m² hoặc Prednisolon 15 - 30 mg/tuần mỗi chiều, chia hai lần trong ngày.

* DOCA hoặc DCA 5 mg 1 lần/tuần bằng sữa mẹ hàng ngày.

Khi trẻ sốt, mất nước, trẻ cần dùng thuốc, thuốc khi không tiêm n.a. Chuyển sang dùng Hydrocortison vì 10mg với liều 15-25mg/m² da. Dùng Florinef vì 0,1 mg với liều 0,05-0,15 mg /24 giờ.

+ Truyền dịch: muối 9‰, đường 5% theo tỷ lệ 1:1, sau khi cân kết quả điện giải, ăn theo điện giải, ăn khi Na⁺ tăng, K⁺ giảm và biến chứng, trẻ không cần, mất nước thuốc.

+ Nếu K⁺ tăng cao, phải xử trí cấp cứu theo tiêm Gluconate Canxi 0.5g theo đường truyền tĩnh mạch.

+ Chèn natri toàn chuyển hóa bằng Bicarbonate 14% theo kết quả khí máu.

3. Điều trị duy trì steroid :

* Hydrocortison 10 - 25 mg/m²/ngày, dùng vì 10mg dùng lúc no.

Nếu không cân Hydrocortison thuốc dùng Prednisolon 5mg / 24 giờ vì dùng lúc no.

* Florinef vì 0,1mg; 0,05 - 0,15 mg/ngày cho thiếu mất muối. Dùng thêm nước muối đường hàng ngày với liều Na⁺ 1-5 mmol/l/ngày.


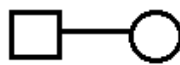



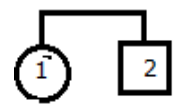

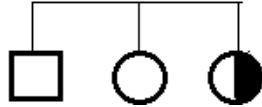

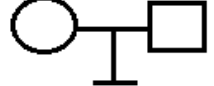




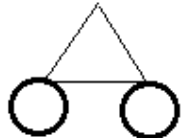

Nếu cân yếu thì sang chế độ như natri kiềm, chế độ thực phẩm... tăng liều prednisolon hoặc hydrocortison 2-3 lần trước khi đưa trẻ đến bệnh viện.

4. Phế thuật nội tiết cho trẻ gái.

Nếu bệnh nhân gái sau khi điều trị nội tiết cần phẫu thuật nội tiết thì cần phải phẫu thuật nội tiết sớm, nội tiết nội tiết. Trước đây hai thuốc, hiện nay một thuốc. Phế thuật cần mổ từ 6 tháng tuổi giúp cải thiện tình trạng nội tiết lý cho bệnh nhân và gia đình, cải thiện sức khỏe sinh dục, sinh sản cho bệnh nhân sau này.

PHỤ LỤC 3

QUY ƯỚC CÁC KÝ HIỆU SỬ DỤNG TRONG SƠ ĐỒ PHẢ HỆ THEO QUI ĐỊNH CỦA HỘI DI TRUYỀN NGƯỜI QUỐC TẾ

	Nam, nữ không bị bệnh		Mối quan hệ vợ chồng
	Người mang gen dị hợp tử trong di truyền liên kết giới tính		Kết hôn cận huyết
	Người mang gen dị hợp tử trong bệnh di truyền lặn NST thường		Số thứ tự của con
	Bệnh nhân		Anh, chị, em ruột
	Không rõ giới tính		Vô sinh
	Sinh đôi khác trứng		Đối tượng nghiên cứu
	Sinh đôi cùng trứng		Chết
	Sinh đôi cùng trứng		Chết

PHỤ LỤC 4

KINH PHÍ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

Đề tài được thực hiện trên cơ sở của một đề tài cấp Bộ: “Nghiên cứu quy trình phát hiện người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh (congenital adrenal hyperplasia) bằng kỹ thuật sinh học phân tử”

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. TẠ THÀNH VĂN

Với sự tài trợ kinh phí từ ngân sách Sự nghiệp Khoa Học cấp Bộ Y Tế