

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN

LỜI CAM ĐOAN

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC BẢNG, HÌNH VÀ BIỂU ĐỒ

ĐẶT VẤN ĐỀ 1

Chương 1 TỔNG QUAN 4

1.1. Lịch sử mô tả bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh 4

1.2. Định nghĩa, cơ sở hóa sinh, sinh lý bệnh học của tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu 21-OH..... 5

1.2.1. Định nghĩa TSTTBS và các enzym tham gia tổng hợp cortisol 5

1.2.2. Cơ sở hóa sinh của TSTTBS 5

1.2.3. Sinh lý bệnh của TSTTBS do thiếu 21-OH 7

1.3. Kiểu hình lâm sàng và tỷ lệ mới mắc của TSTTBS do thiếu 21-OH... 11

1.3.1. Kiểu hình lâm sàng của TSTTBS do thiếu 21-OH 11

1.3.2. Tỷ lệ mới mắc của thiếu 21-OH..... 14

1.4. Cơ sở di truyền phân tử của bệnh TSTTBS do thiếu 21-OH 15

1.4.1. Gen *CYP21A2* và cấu trúc RCCX (RP-C4-CYP21-TNX) 15

1.4.2. Lịch sử nghiên cứu về di truyền phân tử của bệnh TSTTBS trên thế giới..... 16

1.5. Các đột biến của gen *CYP21A2* gây thiếu 21-OH..... 19

1.5.1. Các đột biến xóa đoạn và hoán vị lớn của gen..... 21

1.5.2. Các đột biến vô nghĩa và đột biến gây lệch khung dịch mã (nonsense và frameshift mutations) 23

1.5.3. Các đột biến điểm phổ biến khác 24

1.5.4. Các đột biến hiếm gặp..... 26

1.6. Các tiến bộ kỹ thuật của phân tích phân tử phát hiện các đột biến gen <i>CYP21A2</i>	26
1.6.1. Phân tích các đột biến xóa đoạn và hoán vị lớn của gen	26
1.6.2. Các tiến bộ về phát hiện các đột biến điểm và các biến đổi nhỏ phổ biến và hiếm gặp của gen <i>CYP21A2</i>	29
1.7. Nghiên cứu về vai trò của phân tích đột biến gen <i>CYP21A2</i>	32
1.7.1. Dự báo kiểu hình	32
1.7.2. Tính phức tạp của tư vấn di truyền đối với thiếu 21-OH.....	35
1.7.3. Vai trò của di truyền phân tử đối với chương trình sàng lọc sơ sinh TSTTBS.....	36
1.7.4. Chẩn đoán và điều trị trước sinh ở những gia đình có nguy cơ cao thiếu 21-OH.....	37
1.8. Nghiên cứu về di truyền phân tử trên các bệnh nhân TSTTBS ở Việt Nam.....	39
Chương 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	41
2.1. Đối tượng nghiên cứu	41
2.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân.....	41
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ	41
2.2. Trang thiết bị, dụng cụ và hóa chất sử dụng cho phát hiện đột biến gen <i>CYP21A2</i>	42
2.2.1. Trang thiết bị nghiên cứu	42
2.2.2. Dụng cụ nghiên cứu	42
2.2.3. Hóa chất nghiên cứu.....	42
2.3. Phương pháp nghiên cứu	43
2.3.1. Thu thập và tách chiết mẫu nghiên cứu	45
2.3.2. Xác định đột biến gen <i>CYP21A2</i>	47
2.3.3. Nhận định và đánh giá các đột biến của gen <i>CYP21A2</i>	53

2.3.4. Đánh giá kiểu hình của các bệnh nhân và mối tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình.....	54
2.3.5. Xử lý số liệu thống kê	57
2.4. Đạo đức trong nghiên cứu	57
Chương 3. KẾT QUẢ.....	59
3.1. Kết quả xác định đột biến gen <i>CYP21A2</i> và bản đồ đột biến gen <i>CYP21A2</i> của bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH.....	59
3.1.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu	59
3.1.2. Kết quả xác định đột biến gen <i>CYP21A2</i>	61
3.2. Mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH	77
3.2.1. Kiểu hình của các nhóm kiểu gen khác nhau và giá trị dự báo dương tính	77
3.2.2. Kiểu gen phổ biến của các kiểu hình khác nhau	82
3.2.3. Tương quan kiểu gen - kiểu hình của một số đột biến điểm phổ biến	82
3.2.4. Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh của các bệnh nhân không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình	83
3.2.5. Kiểu hình của các bệnh nhân có đột biến mới của gen <i>CYP21A2</i> . 85	
3.2.6. Kiểu hình của những bệnh nhân có kiểu gen gồm hơn 2 đột biến. 86	
3.2.7. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân thiếu 21-OH có khối u thượng thận.....	87
3.2.8. Kiểu gen - kiểu hình thể cổ điển MM của các bệnh nhân được chẩn đoán sớm < 5 ngày tuổi khi chưa có triệu chứng mất muối.....	89
3.2.9. Tương quan giữa mức độ nặng nam hóa Prader với kiểu gen	91
3.2.10. Tương quan giữa mức độ mất muối và tăng kali với kiểu gen	92

3.2.11. Tương quan giữa mức độ tăng của nồng độ trong huyết thanh của 17-OHP, testosterone và progesterone với kiểu gen.....	93
3.2.12. Minh họa phả hệ và ảnh của các bệnh nhân nghiên cứu.....	95
Chương 4. BÀN LUẬN	104
4.1. Các đột biến và bản đồ đột biến gen <i>CYP21A2</i> ở các bệnh nhân nghiên cứu.....	105
4.1.1. Đột biến xóa đoạn lớn của gen <i>CYP21A2</i> ở các bệnh nhân nghiên cứu	108
4.1.2. Các đột biến điểm phổ biến có nguồn gốc từ <i>CYP21A1P</i> ở các bệnh nhân nghiên cứu	109
4.1.3. Các đột biến hiếm phát sinh tại gen <i>CYP21A2</i> và không do hoán vị gen ở các bệnh nhân nghiên cứu	115
4.1.4. Các đột biến mới của gen <i>CYP21A2</i> ở các bệnh nhân nghiên cứu	121
4.2. Kiểu gen của các bệnh nhân thiếu 21-OH	122
4.3. Tương quan kiểu gen - kiểu hình.....	127
4.3.1. Kiểu hình của các bệnh nhân thiếu 21-OH	127
4.3.2. Tương quan kiểu gen - kiểu hình của thiếu 21-OH ở các bệnh nhân nghiên cứu	128
4.3.3. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân TSTTBS có u vỏ thượng thận.....	134
4.3.4. Tương quan giữa kiểu gen và mức độ nam hóa Prader ở trẻ gái .	135
4.3.5. Tương quan giữa kiểu gen và nồng độ 17-OHP huyết thanh	136
4.4. Giá trị của phân tích đột biến gen <i>CYP21A2</i> trong thực hành lâm sàng	136
4.4.1. Dự báo kiểu hình dựa trên kiểu gen.....	136

4.4.2. Dự báo kiểu hình ở các bệnh nhân được chẩn đoán sớm khi chưa có triệu chứng lâm sàng và trong điều trị trước sinh	138
KẾT LUẬN	141
KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO	
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ VỀ NỘI DUNG LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
17-OHP	17-hydroxyprogesterone	
21-OH	21-hydroxylase	
ABS	Antley-Bixler syndrome	Hội chứng Antley-Bixler
AD	Androstenedione	
ACTH	Adrenocorticotroph hormone	Hormon kích thích vỏ thượng thận
AMH	Anti-Mullerian hormone	Hormon kháng Muller
ARMS	Allele-specific PCR amplification	Phản ứng nhân bản allele đặc biệt
ASOs	Allele-specific oligonucleotides	Các oligo allele đặc biệt
cDNA	Complementary DNA	DNA bổ xung
cffDNA	Cell-free fetal DNA	DNA tự do của thai nhi
CRH	Corticotropin releasing hormone	Hormon giải phóng hormon hướng vỏ thượng thận
Del	Deletion	Đột biến xóa đoạn lớn
DHEA	Dehydroepiandrosterone	
DHEAS	Dehydroepiandrosterone sulfate	
DHPLC	Denaturing high pressure liquid chromatography	Sắc ký lỏng cao áp biến tính
DHT	Dihydrotestosterone	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
DOC	11-deoxycorticosterone	
ELISA	enzyme-linked immunosorbent	Miễn dịch enzym

	assay	
FSH	Follicle stimulating hormone	Hormon kích thích nang trứng
HGMD	Human gene mutation database	Dữ liệu đột biến gen người
HLA	Human leukocyte antigens	Kháng nguyên bạch cầu người
I2g	IVS2-13A/C>G	Đột biến trên intron 2
kb	kilobase	
LDL	Low-density lipoprotein	Lipoprotein trọng lượng thấp
LDR	Ligation detection reaction	Phản ứng phát hiện nối
LH	Luteinizing hormone	Hormon kích thích thể vàng
MHC	Major histocompatibility	Phức hợp tương thích mô chính
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification	Kỹ thuật khuếch đại đầu dò đa môi dựa vào phản ứng nối
MM	Salt wasting	Mất muối
NHĐT	Siple virilizing	Nam hóa đơn thuần
NST		Nhiễm sắc thể
OMIM	Online Mendelian Inheritance in man	Cơ sở dữ liệu của dự án di truyền Mendel ở người
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi
PPV	Positive predictive value	Giá trị dự báo dương tính
RCCX	<i>RP-C4-CYP21-TNX</i>	Trình tự sắp xếp của 4 gen
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic

SNP	Single nucleotide polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein	Protein điều hòa sản xuất steroid cấp tính
T	Testosterone	
TMC	Tandem mass spectrometry	Phổ khối rộng
TSTTBS	Congenital adrenal hyperplasia	Tăng sản thượng thận bẩm sinh

DANH MỤC BẢNG, HÌNH VÀ BIỂU ĐỒ

Bảng 1.1. Các thể bệnh TSTTBS và thiếu hụt tổng hợp cortisol do thiếu enzym vỏ thượng thận	10
Bảng 1.2. Biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH	14
Bảng 1.3. Các đột biến phổ biến ở <i>CYP21A2</i> gây thiếu 21-OH	20
Bảng 1.4. Biểu hiện nam hoá bộ phận sinh dục ngoài theo mức độ nặng của Prader (0-V) của từng nhóm kiểu gen.....	33
Bảng 2.1. Trình tự mỗi đùng cho phản ứng PCR và giải trình tự gen.....	48
Bảng 2.2. Tên, kích thước và vị trí của các sản phẩm PCR trong Kit MLPA P050B2 (MRC- Holland).....	51
Bảng 3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu	60
Bảng 3.2. Tần số và tỷ lệ các đột biến của gen <i>CYP21A2</i>	71
Bảng 3.3. Kiểu gen của 202 bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH.....	73
Bảng 3.4. Kiểu gen - kiểu hình của bệnh nhân TSTTBS có kiểu gen thuộc nhóm “null”, A, B và C.....	78
Bảng 3.5. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân có kiểu gen thuộc nhóm D	81
Bảng 3.6. Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh của các bệnh nhân không phù hợp giữa kiểu gen - kiểu hình.....	84
Bảng 3.7: Kiểu hình (triệu chứng lâm sàng và hóa sinh) của các bệnh nhân có đột biến mới của gen <i>CYP21A2</i>	85
Bảng 3.8. Kiểu gen và kiểu hình của bệnh nhân có kiểu gen phức tạp	86
Bảng 3.9. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân có u vỏ thượng thận khi chẩn đoán hoặc xuất hiện u trong quá trình điều trị.....	88
Bảng 3.10. Kiểu gen và diễn biến lâm sàng của các bệnh nhân kiểu hình MM được chẩn đoán sớm khi chưa có suy thượng thận cấp	89

Bảng 3.11. Nồng độ điện giải đồ huyết thanh của các nhóm kiểu gen.....	92
Bảng 3.12. Nồng độ trong huyết thanh của 17-OHP, testosterone và progesterone của các nhóm kiểu gen khác nhau.....	93
Bảng 4.1: Tần suất của các đột biến trong các nghiên cứu khác nhau	112
Bảng 4.2: Giá trị dự báo kiểu hình dương tính của các nhóm kiểu gen khác nhau ở một số nghiên cứu	137
Hình 1.1. A) Tổng hợp steroid thượng thận ở thai nhi bình thường.....	8
B) Tổng hợp steroid trong trường hợp thiếu 21-OH.....	8
Hình 1.2. Các phản ứng xúc tác bởi P45021A2.....	9
Hình 1.3. Vùng nhiễm sắc thể 6p21.3 bao gồm gen <i>CYP21A2</i> của cấu trúc RCCX module.....	16
Hình 1.4. <i>CYP21A2</i> và <i>CYP21A1P</i>	21
Hình 1.5. Hiện tượng tái cấu trúc gen <i>CYP21A2</i>	22
Hình 1.6. Xóa đoạn của gen <i>CYP21A2</i>	23
Hình 1.7. Hoạt độ enzym theo các nghiên cứu <i>in vitro</i> của gen <i>CYP21A2</i>	33
Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu.....	45
Hình 2.2. Vị trí các môi sử dụng cho PCR và giải trình tự gen.....	47
Hình 2.3. Các giai đoạn của kỹ thuật MLPA.....	49
Hình 2.4. Sơ đồ và vị trí một số probe của Kit MLPA P050B2	51
Hình 2.5. Hình ảnh minh họa kết quả MLPA	52
Hình 3.1. Hình ảnh xóa đoạn exon 1-3 (exon 1-3 del) gen <i>CYP21A2</i>	61
Hình 3.2. Hình ảnh xóa đoạn từ gen <i>C4B</i> đến exon 8 của gen <i>CYP21A2</i>	62
Hình 3.3. Hình ảnh sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>CYP21A2</i>	64
Hình 3.4. Hình ảnh đột biến đồng hợp tử g.655A/C>G.....	65
Hình 3.5. Hình ảnh đột biến dị hợp tử p.I172N và p.R426C kết hợp.....	65
Hình 3.6. Hình ảnh đột biến đồng hợp tử p.Q318X và p.R356W	66

Hình 3.7. Hình ảnh đột biến dị hợp tử p.Q318X và đồng hợp tử p.R356W...	66
Hình 3.8. Hình ảnh 3 đột biến dị hợp tử g.655A/C>G, p.Q318X và p.R356W	67
Hình 3.9. Hình ảnh đột biến p.I236N, p.V237E, p.M239K cluster E6	68
Hình 3.10. Hình ảnh đột biến lặp đoạn p.P459_L464dup	69
Hình 3.11. Hình ảnh đột biến dị hợp tử p.Y112X và p.I172N	69
Hình 3.12. Bản đồ vị trí đột biến gen <i>CYP21A2</i> gây bệnh TSTTBS thiếu 21- OH ở các bệnh nhân nghiên cứu	76
Hình 3.13. Phả hệ gia đình có 4 con mắc thể cổ điển MM do đột biến đồng hợp tử xóa đoạn toàn bộ gen <i>CYP21A2</i>	95
Hình 3.14. Phả hệ gia đình có 2 con mắc thể NHĐT do đột biến đồng hợp tử p.I172N/p.I172N	95
Hình 3.15. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 192 có kiểu gen xóa đoạn đồng hợp tử toàn bộ gen <i>CYP21A2</i> (Del/Del).	96
Hình 3.16. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 167 có kiểu gen dị hợp tử kép xóa đoạn toàn bộ gen <i>CYP21A2</i> và đột biến phổ biến nhóm A (I2g).	96
Hình 3.17. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 132 có kiểu gen đồng hợp tử nhóm “null” p.R356W/p.R356W.....	97
Hình 3.18. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 160 có kiểu gen dị hợp tử kép một allele xóa đoạn toàn bộ gen <i>CYP21A2</i> và một allele đột biến điểm nặng và hiếm gặp	97
Hình 3.19. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 119 có kiểu gen mang 3 đột biến khác nhau	98
Hình 3.20. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM ở bệnh nhân nữ số 131 có kiểu gen phức tạp nhóm “null”	98

Hình 3.21. Kiểu hình thể MM của bệnh nhân nam số 173 có kiểu gen dị hợp tử kép một allele xóa đoạn toàn bộ gen <i>CYP21A2</i> (nhóm “null”) và một allele đột biến phổ biến nhóm A.....	99
Hình 3.22. Kiểu hình thể MM của bệnh nhân nam số 177 có kiểu gen dị hợp tử kép hai đột biến hiếm và nặng	99
Hình 3.23. Kiểu hình lúc 5,4 tuổi có dậy thì sớm của bệnh nhân nam số 149 có kiểu gen đồng hợp tử đột biến nhóm “null”.....	100
Hình 3.24. Kiểu hình NHĐT của bệnh nhân nữ số 165 có kiểu gen đột biến đồng hợp tử nhóm B.....	100
Hình 3.25. Kiểu hình thể cổ điển NHĐT của bệnh nhân nữ số 172 có kiểu gen chỉ phát hiện được 1 allele đột biến trên intron 2	101
Hình 3.26. Kiểu hình NHĐT của bệnh nhân nam số 158 có kiểu gen dị hợp tử kép một allele xóa đoạn toàn bộ gen <i>CYP21A2</i> và một allele khác là đột biến nhóm B	101
Hình 3.27. Kiểu gen, kiểu hình của bệnh nhân nữ số 191 mắc thể không cổ điển có mang allele đột biến p.P30L và một allele đột biến mới lặp đoạn...	102
Hình 3.28. Kiểu hình nam hóa của bệnh nhân nữ số 189 mắc thể cổ điển NHĐT có kiểu gen nhóm “null”	103
Hình 3.29. Kiểu hình NHĐT của bệnh nhân nam số 150 có kiểu gen không phù hợp với kiểu hình là đột biến đồng hợp tử nhóm A.....	103
Biểu đồ 3.1. Phân bố tần suất theo các dạng đột biến gen <i>CYP21A2</i>	71
Biểu đồ 3.2. Kiểu hình của các kiểu gen thuộc nhóm “null”.....	79
Biểu đồ 3.3. Kiểu hình của các kiểu gen thuộc nhóm A.....	80
Biểu đồ 3.4. Kiểu hình của các kiểu gen thuộc nhóm B.....	80
Biểu đồ 3.5. Kiểu hình của các kiểu gen có ít nhất 1 trong 3 đột biến điểm phổ biến.....	83

Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ (%) của các mức độ nam hóa theo phân loại Prader của từng nhóm kiểu gen khác nhau	91
Biểu đồ 3.7. Nồng độ 17-OHP huyết thanh của các bệnh nhân có các nhóm kiểu gen khác nhau.....	94

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTB) (Congenital adrenal hyperplasia - CAH) là một nhóm các bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường do thiếu một trong các enzym cần thiết cho quá trình tổng hợp cortisol từ cholesterol của vỏ thượng thận. Khoảng 95% các trường hợp là do thiếu hụt 21-hydroxylase (21-OH) dẫn đến thiếu cortisol kèm theo (hoặc không) thiếu hụt aldosterone và tăng tiết androgen thượng thận. Biểu hiện lâm sàng của bệnh được chia ra thành hai thể là thể nặng (thể cổ điển) và thể nhẹ hơn (không cổ điển). Thể cổ điển có tỷ lệ mới mắc là 1:10 000 ÷ 1:16 000 trẻ đẻ sống đối với hầu hết các chủng tộc và bao gồm thể mất muối (MM) và thể nam hóa đơn thuần (NHĐT) [1],[2],[3].

Những tiến bộ của khoa học đã giúp chúng ta hiểu biết và đạt được những thành tựu quan trọng về chẩn đoán và điều trị TSTTB. Từ mô tả lâm sàng đầu tiên của De Crecchio về một bệnh nhân nữ mắc TSTTB (1865), tiếp theo là các mốc quan trọng bao gồm điều trị nội khoa đầu tiên được tiến hành bởi Wilkins và cộng sự (1950). Các phân tích di truyền đầu tiên được tiến hành bởi Levine và cộng sự bằng phân tích liên kết *HLA* halotype (1978), tới việc xác định hầu hết các gen mã hóa cho các enzym tổng hợp steroid vào những năm 1980 [2],[4],[5],[6]. Phân tích di truyền gen *CYP21A2* mã hóa cho 21-OH là phương pháp chuẩn mực để góp phần chẩn đoán, điều trị và phòng bệnh. Các tiến bộ về phân tích di truyền không những giúp cải thiện khả năng chẩn đoán các thể nhẹ nhất của bệnh mà còn cho phép hiểu biết rõ hơn về tương quan kiểu gen - kiểu hình trong bệnh TSTTB. Tiến bộ hơn nữa là việc phân tích gen *CYP21A2* sử dụng bệnh phẩm là các giọt máu thấm khô từ các đĩa của giấy thấm trong chương trình sàng lọc sơ sinh, như là xét nghiệm bước 2 để tăng tính tin cậy và giảm tỷ lệ dương tính giả. Chẩn đoán và điều trị

trước sinh cho các gia đình có nguy cơ mắc thể cổ điển của bệnh cần được tiến hành chủ động mang ý nghĩa dự phòng. Những khía cạnh nêu trên được nghiên cứu rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới từ hơn 30 năm nay [7],[8],[9],[10],[11].

Ở Việt Nam, tỷ lệ mới mắc của TSTTBBS chưa được xác định do tỷ lệ thấp các trẻ được sàng lọc sơ sinh. Những bệnh nhân đầu tiên mắc TSTTBBS được chẩn đoán từ đầu những năm 1980, và số lượng bệnh nhân tăng lên rõ rệt do mỗi năm có khoảng từ 40 - 60 bệnh nhân mới được chẩn đoán tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Đây cũng là một trong các trung tâm hiện đang quản lý số lượng lớn nhất các bệnh nhân mắc TSTTBBS trên thế giới. Trong số 842 bệnh nhân được chẩn đoán và điều trị trong 17 năm (1999-2016) thì thể thiếu 21-OH chiếm 98,3% (828 bệnh nhân); thiếu 11 β -hydroxylase chiếm 1,3% (11 bệnh nhân) và thiếu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase chiếm 0,4% (3 bệnh nhân) (Vũ Chí Dũng và cộng sự).

Các nghiên cứu về di truyền phân tử trong đó có xác định các đột biến của gen *CYP21A2* ở các bệnh nhân Việt Nam cũng được bắt đầu từ những năm 2000, tuy nhiên hạn chế chỉ ứng dụng kỹ thuật PCR để sàng lọc một số đột biến phổ biến. Các kỹ thuật sinh học phân tử tiên tiến đã bắt đầu được nghiên cứu ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh và sau sinh TSTTBBS. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào trên số lượng đủ lớn các bệnh nhân Việt Nam mắc TSTTBBS để phát hiện các dạng đột biến gen và phân bố của các đột biến trên gen *CYP21A2*, và cũng chưa có nghiên cứu nào về kiểu gen và tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình của các bệnh nhân TSTTBBS với số lượng bệnh nhân đủ lớn. Hơn nữa, việc phân tích đột biến gen gây bệnh TSTTBBS là cần thiết trong thực hành lâm sàng để: *i*) khẳng định chẩn đoán và cho phép điều trị sớm, phòng tránh được cơn suy thượng thận cấp trong các trường hợp xét nghiệm về hormon không rõ ràng; *ii*) chẩn đoán trước sinh và điều trị trước sinh cho thai nhi gái mắc bệnh để phòng và làm giảm nam hóa gây mơ hồ giới

tính sau sinh; *iii*) xác định người lành mang gen, phục vụ tư vấn di truyền; *iv*) áp dụng các liệu pháp mới để tối ưu hóa điều trị bao gồm việc quyết định liều lượng steroid thay thế trên cơ sở mối tương quan kiểu gen - kiểu hình, do đó giúp giảm được hậu quả ức chế tăng trưởng do quá liều steroid.

Xuất phát từ các lý do trên đây, nghiên cứu này được tiến hành với các mục tiêu sau đây:

Mục tiêu 1: Phát hiện các đột biến của gen *CYP21A2* và mô tả bản đồ đột biến gen *CYP21A2* ở các bệnh nhân mắc tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-OH.

Mục tiêu 2: Phân tích mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-OH.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Lịch sử mô tả bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh

Bệnh nhân đầu tiên có các triệu chứng lâm sàng của TSTTBS được mô tả trong y văn vào năm 1865 bởi nhà giải phẫu người Ý là Luigi de Crecchio; ông đã đề cập đến một bệnh nhân ngoại hình nam, tử vong lúc 44 tuổi với các biểu hiện đợt cấp suy thượng thận Addison. Kết quả giải phẫu bệnh cho thấy tuyến thượng thận có kích thước lớn, chiều dài dương vật là 10 cm, tật lỗ tiểu thấp độ I, không có tinh hoàn, hai buồng trứng bình thường, có vòi trứng, có tử cung và âm đạo [1],[2],[3]. Kể từ khi ca bệnh đầu tiên này được công bố cho đến nay có hơn 5 thể bệnh TSTTBS được mô tả, trong đó thể thiếu 21-OH là phổ biến nhất. Cuộc sống của các bệnh nhân mắc TSTTBS đã được cải thiện rõ rệt kể từ khi hydrocortisone được sử dụng trong điều trị một cách có hiệu quả vào những năm 1950 [4]. Những năm sau đó của cùng thập kỷ thì việc điều trị thay thế bằng mineralocorticoid cũng được áp dụng và tiếp tục cải thiện kết quả điều trị [5]. Việc làm sáng tỏ cơ sở phân tử của bệnh lý di truyền đơn gen này vào những năm 1980 và 1990, cũng như phát triển các kỹ thuật và quy trình xác định các đột biến gây bệnh đã là công cụ trong chẩn đoán cũng như giúp hiểu biết về sinh lý bệnh học của bệnh. Các phân tích di truyền của bệnh được tiến hành lần đầu vào những năm 1980 và dựa trên cơ sở về mặt liên kết các gen HLA [6]. Trong những năm 1990 thì việc xác định nhanh kiểu gen của bệnh đối với các đột biến phổ biến và giải trình tự toàn bộ gen *CYP21A2* đã được nghiên cứu rộng rãi [7],[8]. Việc chẩn đoán bệnh đi từ mô tả, thăm khám lâm sàng đến xét nghiệm các dấu ấn sinh học và phân tích phân tử. Như vậy, trải qua hơn 60 năm, đến nay khoa học đã có những bước tiến nổi bật về hiểu biết TSTTBS, đặc biệt về di truyền, sinh lý bệnh, lâm sàng, điều trị và phòng bệnh.

1.2. Định nghĩa, cơ sở hóa sinh, sinh lý bệnh học của tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu 21-OH

1.2.1. Định nghĩa TSTTBS và các enzym tham gia tổng hợp cortisol

Tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS) (congenital adrenal hyperplasia - CAH) bao gồm một nhóm các bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường, do khiếm khuyết một phần hoặc hoàn toàn của một trong số các enzym tham gia tổng hợp cortisol từ cholesterol ở tuyến thượng thận. Kiểu hình lâm sàng và hóa sinh phụ thuộc vào khiếm khuyết enzym đặc hiệu và giảm hoạt độ của enzym đặc hiệu.

Các enzym sau đây tham gia tổng hợp cortisol vỏ thượng thận: P450_{scc} (*CYP11A1*), P450_{c17} (*CYP17A1*), P450_{c21} (*CYP21A2*), P450_{c11} (*CYP11B1*), 3 β HSD (*HSD3B2*). Ngoài ra ngay ở bước đầu tiên của tổng hợp steroid thượng thận, cholesterol đi vào trong ty thể là nhờ một protein vận chuyển tên là StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (*STAR*). Hơn nữa, đột biến bất hoạt gen *POR* mã hóa enzym cho điện tử P450 oxidoreductase cũng gây ra các biểu hiện của TSTTBS với các triệu chứng kết hợp của thiếu P450_{c17} và P450_{c21} (hình 1.1 và bảng 1.1) [3],[9],[10],[11]. Thiếu hụt 21-OH (*CYP21A2*) và 11 β -hydroxylase (*CYP11B1*) chỉ gây tổn thương tổng hợp steroid thượng thận, trong khi thiếu 17 α -hydroxylase (*CYP17A1*) và 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (*HSD3B2*) cũng gây tổn thương tổng hợp steroid ở tuyến sinh dục.

1.2.2. Cơ sở hóa sinh của TSTTBS

Cytochrome P450 là thuật ngữ chung chỉ một nhóm các enzym oxy hóa, tất cả các enzym nhóm này đều có khoảng 500 axit amin và có một nhóm HEME đơn độc. Các enzym này được gọi là P450 (pigment 450) vì tất cả đều hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 450 nm. Hệ gen người bao gồm 57 enzym thuộc nhóm cytochrome P450. Một vài hệ thống danh pháp quốc tế đã

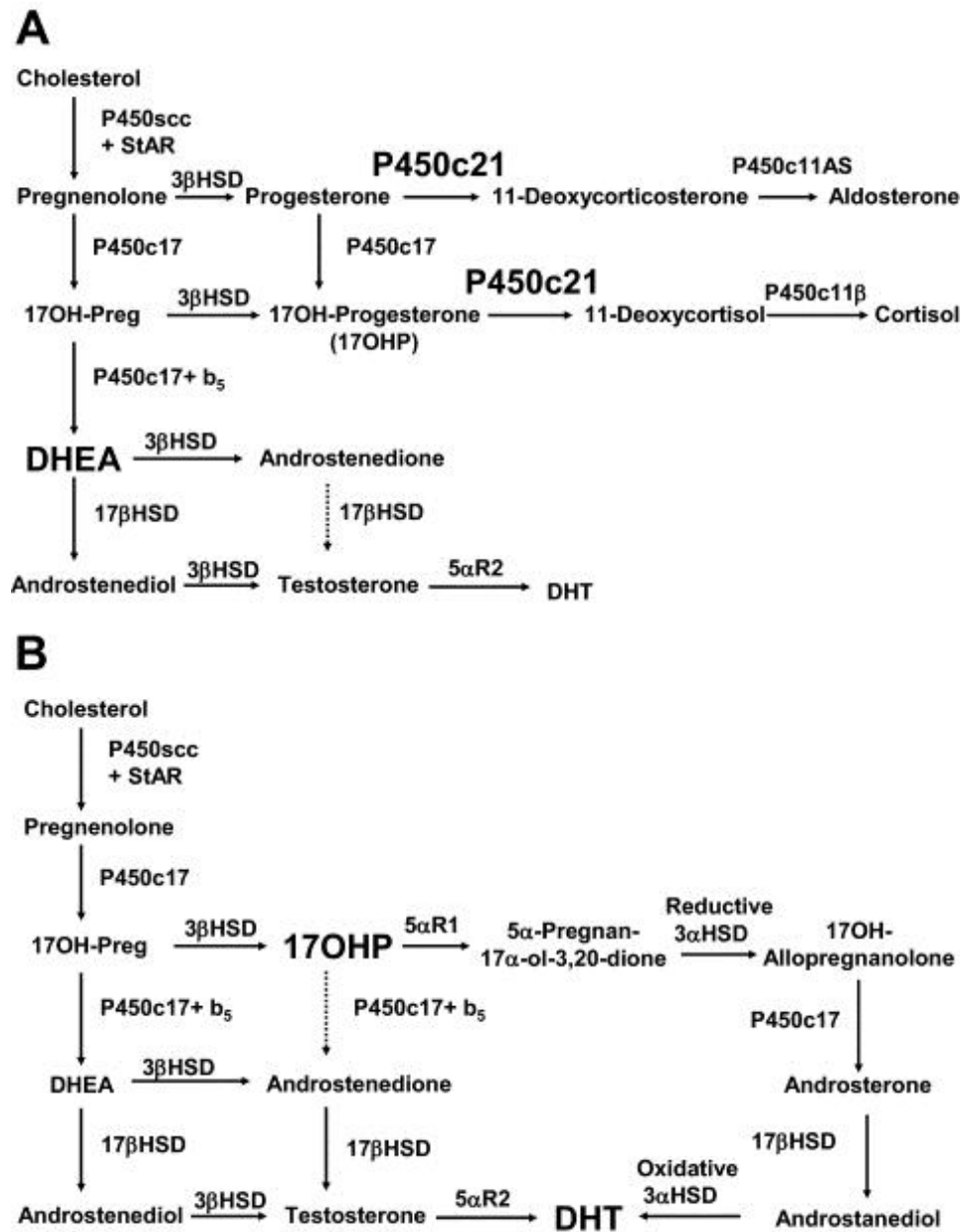
được đề xuất cho các gen và các enzym nhóm này trong các thập kỷ qua. Hiện nay, các gen có thuật ngữ chính thức là các gen *CYP* và có một hệ thống danh pháp hợp lý cho các enzym và các gen này đã được mô tả (<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>); các protein được mã hóa bởi các gen có thể có cùng tên nhưng không viết nghiêng [10].

Sinh tổng hợp steroid được bắt đầu với nguyên liệu là cholesterol không ester hóa, một phân tử gồm 27 carbon có nguồn gốc từ lipoprotein phân tử thấp (low-density lipoprotein: LDL) lưu hành trong tuần hoàn [12]. Cholesterol được vận chuyển từ bào tương vào màng trong của ty thể thông qua protein phosphor (steroidogenic acute regulatory protein - StAR) [13]. Enzym tách nhánh bên P450 (*CYP450_{scc}*) có tên gen là *CYP11A1* xúc tác chuyển cholesterol thành steroid trung gian là pregnenolone bằng cách hydroxyl hóa carbon 20 và 22 sau đó tách liên kết giữa hai carbon hydroxyl hóa này [14]. Pregnenolone vì không phải là cơ chất trong ty thể nên đi ra lưới nội bào và tại đây được chuyển thành các steroid đặc hiệu phụ thuộc vào enzym và các yếu tố đồng vận đặc hiệu. Tuyến thượng thận có vai trò thiết yếu cho sự sống sẽ sản xuất ra các steroid tại phần vỏ. Về mặt cấu trúc mô học thì vỏ thượng thận được chia thành 3 lớp riêng biệt: mỗi lớp này lại sở hữu hoặc bị thiếu những enzym cần thiết để tổng hợp steroid đặc hiệu: lớp cầu ngoài cùng khi bị thiếu 17α -hydroxylase thì chuyển pregnenolone sang hướng sản xuất mineralocorticoid 21 carbon là aldosterone. Sự có mặt của 17α -hydroxylase ở lớp bó (lớp giữa) sẽ cho phép sản xuất ra cortisol (bao gồm 21 carbon); hoạt độ của $17,20$ -lyase ở lớp lưới cho phép sản xuất steroid 19 carbon là dehydroepiandrosterone (DHEA) và testosterone (T) (hình 1.1) [11]. Sản xuất steroid thượng thận bị kích thích bởi hormon thùy trước tuyến yên là adrenocorticotroph hormon (ACTH). Hormon giải phóng hormon hướng vỏ thượng thận (corticotropin releasing hormone - CRH) được sản xuất

bởi vùng dưới đồi điều khiển hoạt động của thùy trước tuyến yên tiết ACTH theo nhịp [15].

1.2.3. Sinh lý bệnh của TSTTBS do thiếu 21-OH

Khi thiếu hụt enzym đặc hiệu tổng hợp cortisol thì nồng độ thấp của cortisol kích thích sản xuất quá mức CRH ở vùng dưới đồi và ACTH của tuyến yên, và kích thích liên tục tuyến thượng thận gây tăng sinh của mô tuyến. Tùy thuộc vào enzym nào bị thiếu hụt mà việc tổng hợp các hormon steroid bị tổn thương khác nhau. Hơn 95% các bệnh nhân TSTTBS là do thiếu steroid 21-hydroxylase (21-OH, OMIM +201910). Steroid 21-hydroxylase còn có tên P450c21 là một enzym cytochrome P450 có mặt ở lưới nội bào. 21-OH xúc tác chuyển 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) thành 11-deoxycortisol, một tiền chất của cortisol, và chuyển progesterone thành deoxycorticosterone, một tiền chất của aldosterone (hình 1.1 và 1.2). Ở vỏ thượng thận, enzym này hydroxyl hóa steroid ở vị trí 21. Thiếu hụt 21-OH gây thiếu hụt tổng hợp cortisol và thêm vào là thiếu hụt mineralocorticoids ở các bệnh nhân mắc thể nặng. Các tiền chất steroid ngay phía trước vị trí enzym bị thiếu hụt (progesterone và 17-OHP) bị tích tụ và chuyển hướng sang tổng hợp androgen của thượng thận, dẫn đến sản xuất quá mức androgen thượng thận (hình 1.1) [11],[16],[17],[18].



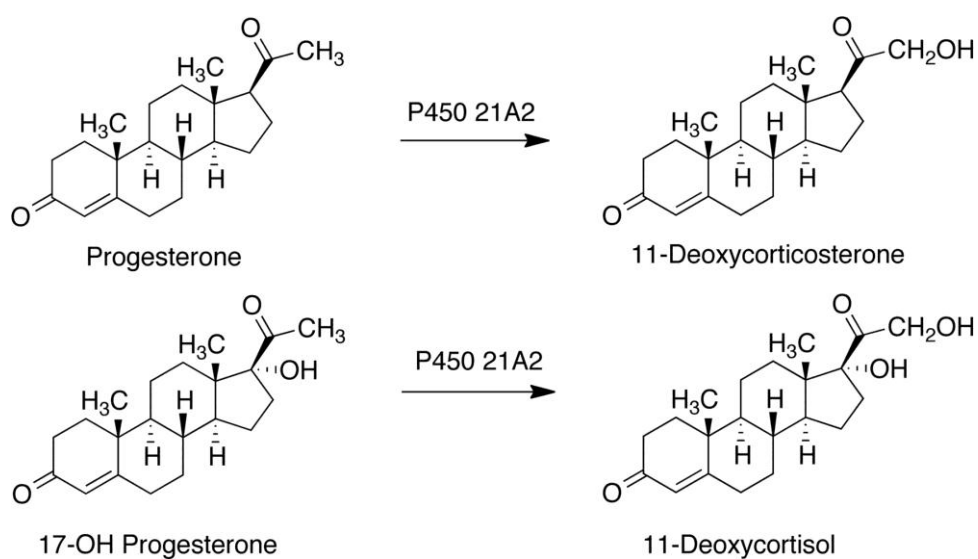
Hình 1.1. A) Tổng hợp steroid thượng thận ở thai nhi bình thường.

B) Tổng hợp steroid trong trường hợp thiếu 21-OH

A) 21-OH thượng thận, P450c21, là enzym thiết yếu cho cả hai con đường tổng hợp aldosterone và cortisol. Tuyến thượng thận có thể tổng hợp một lượng nhỏ testosterone dưới tác dụng của 17β-HSD.

B) trong trường hợp thiếu hoạt độ 21-OH của P450c21 thì có ba con đường dẫn đến tổng hợp androgen: i/ con đường từ cholesterol đến DHEA

vẫn còn hoạt động, tăng sản xuất DHEA sẽ dẫn đến một lượng DHEA bị chuyển thành testosterone và dihydrotestosterone (DHT). ii/ lượng lớn 17-OHP được sản xuất ở thượng thận bệnh nhân TSTTBS sẽ cho phép một lượng 17-OHP chuyển thành androstenedione và sau đó thành testosterone. iii/ con đường phụ thuộc vào 5 α và 3 α reduction của 17-OHP thành 17OH-allopregnanolone. Steroid này dễ dàng được chuyển thành androstanediol, mà sau đó có thể bị oxy hóa thành DHT bởi enzym 3 α -HSD [11].



Hình 1.2. Các phản ứng xúc tác bởi P45021A2 (21-hydroxylase) [19]

Bảng 1.1. Các thể bệnh TSTTBS và thiếu hụt tổng hợp cortisol do thiếu enzym vỏ thượng thận [3]

Enzym thiếu hụt	Gen/ NST	Tỷ lệ mới mắc và chủng tộc	Triệu chứng lâm sàng	Dấu ấn sinh học
21-hydroxylase (P450c21)	<i>CYP21A2</i> / 6p21.3	Cổ điển 1:16 000 Không cổ điển < 1:1000 Gặp nhiều hơn ở Ashkenazi Jews, và Yupik Eskimos	Suy thượng thận ở thể cổ điển, nam hóa ở các mức độ khác nhau	17OHP; AD; T
11 β -hydroxylase (P450c11 β)	<i>CYP11B1</i> / 8q24.3	1:100 000 ở chủng tộc da trắng; 1:7000 ở Moroccan Jews	Tăng huyết áp ở hầu hết các bệnh nhân; hạ kali máu; nam hóa	DOC, 11-deoxycortisol, AD, T
3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2	<i>HSD3B2</i> / 1p13.1	Hiếm	Mất nước, hạ natri máu và tăng kali máu. 46,XX: nam hóa 46,XY: nam hóa kém	Pregnenolone, 17OH-pregnenolone, DHEA, DHEAS
17-hydroxylase/ 17,20-lyase (P450c17)	<i>CYP17A1</i> / 10q21-q22	1:50 000 toàn thế giới, phổ biến hơn ở Bra-xin và châu Á	Cao huyết áp, hạ kali máu, thiếu năng sinh dục 46,XX; 46,XY: nam hóa kém, tinh hoàn trong ổ bụng	Progesterone, DOC, corticosterone; LH và FSH
Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)	<i>STAR</i> / 8p11.2	Hiếm, phổ biến hơn ở Nhật Bản, Palestine, Hàn Quốc	Suy thượng thận, thượng thận phì đại, thượng thận bị thâm nhiễm lipid, cả hai giới có bộ phận sinh dục ngoài giống nữ	Giảm tất cả các steroid
Cholesterol side-chain cleavage enzym (P450scc)	<i>CYP11A1</i> / 15q23-q24	Hiếm	Suy thượng thận, có thể không có tuyến thượng thận	Giảm tất cả các steroid
Thiếu P450-oxidoreductase (POR)	<i>POR</i> / 7q11.2	Hiếm, phổ biến hơn ở Nhật và	Giảm thể tích tuần hoàn, dị tật xương (Antley-Bixler); nam	Mức độ cao khác nhau, thiếu hụt một phần nhiều

Enzym thiếu hụt	Gen/ NST	Tỷ lệ mới mắc và chủng tộc	Triệu chứng lâm sàng	Dấu ấn sinh học
		Hàn Quốc	hóa ở mẹ. 46,XX: nam hóa nhẹ đến trung bình. 46,XY: nam hóa kém	steroid

DOC, 11-deoxycorticosterone; AD, androstenedione; T, testosterone; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, DHEA sulfate; LH, luteinizing hormone; FSH, follicle stimulating hormone.

Về mặt bào thai học, ở thai nhi gái bình thường về kiểu gen sẽ không có hormon kháng thể Muller (anti-Mullerian hormon - AMH), và cấu trúc Muller bình thường sẽ biệt hóa thành vòi trứng, tử cung, cổ tử cung, 2/3 trên của âm đạo. Ở thai nhi gái bình thường cũng không có mô tinh hoàn và androgen nên cấu trúc Wolffian sẽ thoái triển và các buồng trứng sẽ ở vị trí tiểu khung. Trong trường hợp thiếu 21-OH thì thai nhi có kiểu gen là gái cũng không có hormon kháng thể Muller nên sự phát triển của cấu trúc Muller vẫn bình thường và buồng trứng vẫn có ở vị trí tiểu khung. Testosterone có thể tăng lên nhưng không phải có nguồn gốc từ tế bào Leydig của tinh hoàn mà từ nguồn androgen của thượng thận. Sự tích tụ các tiền chất steroid phía trước enzym bị thiếu hụt (21-OH) sẽ chuyển hướng sang con đường tổng hợp testosterone (hình 1.1) [11]. Mức độ rối loạn chức năng enzym sẽ quy định mức độ chuyển hướng tổng hợp này. Sự phát triển của bộ phận sinh dục ngoài nhạy cảm với androgene, do vậy nồng độ cao của testosterone trong tuần hoàn sẽ dẫn đến nam hóa bộ phận sinh dục ngoài ở bào thai gái ở các mức độ khác nhau từ I đến V như phân loại của Prader (phụ lục 2) [17].

1.3. Kiểu hình lâm sàng và tỷ lệ mới mắc của TSTTBS do thiếu 21-OH

1.3.1. Kiểu hình lâm sàng của TSTTBS do thiếu 21-OH

Mức độ nặng của các triệu chứng lâm sàng khác nhau và phụ thuộc vào hoạt độ 21-OH còn lại. Mặc dù ranh giới khác nhau về biểu hiện kiểu hình đôi

khi khó phân biệt nhưng kiểu hình lâm sàng được chia ra thành thể cổ điển hay thể nặng và thể không cổ điển hay thể nhẹ của bệnh. Thể cổ điển lại được chia ra thành thể cổ điển mất muối (MM) (salt wasting - SW) và nam hóa đơn thuần (NHĐT) (simple virilizing - SV) phản ánh mức độ thiếu hụt aldosterone. Thể cổ điển MM chiếm 75% các ca mắc thể cổ điển [16],[17]. Thiếu hụt hoàn toàn hoạt độ enzym gây nguy hiểm đến tính mạng và tử vong do mất nước, hạ natri máu (thể MM), và các trẻ gái mắc thể nặng thiếu 21-OH có biểu hiện nam hoá bộ phận sinh dục ngoài từ thời kỳ bào thai và được phát hiện sau sinh, đây là hậu quả của tiếp xúc với nồng độ androgene cao từ trong tử cung. Đây cũng là nguyên nhân phổ biến nhất của mơ hồ giới tính ở trẻ sơ sinh. Các triệu chứng đặc trưng bao gồm: âm vật phì đại, hai môi lớn dính liền với nhau và có nếp nhăn, niệu đạo và âm đạo riêng rẽ nhưng đổ vào xoang niệu dục chung, cơ quan sinh dục bên trong của nữ bình thường bao gồm tử cung, vòi trứng, buồng trứng; không có cấu trúc của ống Wolff. Trẻ trai mắc thể cổ điển không có triệu chứng khi sinh ngoại trừ xạm da kín đáo và dương vật có thể có kích thước lớn hơn. Do vậy, tuổi chẩn đoán ở trẻ trai thể cổ điển MM khác nhau tùy theo mức độ nặng của thiếu hụt aldosterone. Các trẻ trai mắc thể cổ điển MM thường xuất hiện triệu chứng từ 7 - 14 ngày sau sinh với các biểu hiện nôn, sụt cân, li bì, mất nước, hạ natri, tăng kali huyết thanh và có thể có sốc. Các trẻ gái mắc thể cổ điển MM nếu không được điều trị sớm sau sinh có thể xuất hiện các triệu chứng suy thượng thận cấp, mất muối trong giai đoạn sơ sinh. Tuy nhiên, mơ hồ giới tính phát hiện khi sinh là lý do giúp chẩn đoán và điều trị sớm hơn. Các trẻ trai mắc thể cổ điển NHĐT (không mất muối) có các triệu chứng nam hóa, dậy thì sớm ngoại biên ở tuổi từ 2 đến 4 tuổi. Như vậy, các thể nhẹ hơn biểu hiện với mức độ khác nhau của tăng androgen sau năm đầu sau sinh [16],[17],[18].

Ở thể không cổ điển, cortisol và aldosterone được sản xuất bởi vỏ

thượng thận giúp ngăn ngừa được các biểu hiện lâm sàng cần phải điều trị bằng liệu pháp thay thế glucocorticoid hoặc mineralocorticoid. Cho dù không cần điều trị để duy trì sự sống nhưng sản xuất cortisol của tuyến thượng thận cũng không đủ để ức chế thỏa đáng việc sản xuất quá mức ACTH, các tiền chất steroid sẽ chuyển sang tổng hợp androgen và gây tăng androgen trong máu. Tại thời điểm mới sinh, các bệnh nhân mắc thể không cổ điển có bộ phận sinh dục ngoài bình thường và có nồng độ 17-OHP ở điều kiện cơ bản trong giới hạn bình thường. Các triệu chứng của thể không cổ điển ở trẻ em có thể bao gồm: lông mu sớm [20], các biểu hiện của tăng androgen, trứng cá, tăng chiều cao nhanh và/hoặc tuổi xương phát triển sớm. Tăng trưởng chiều cao có thể kết thúc sớm gây hậu quả chiều cao cuối cùng thấp. Các triệu chứng muộn hơn bao gồm: rậm lông (60-78%), rối loạn kinh nguyệt (55%), trứng cá (33%) và vô sinh (12%) [21]. Các triệu chứng này là hậu quả của tăng androgen ở tuần hoàn. Các triệu chứng kín đáo ở bệnh nhân nam thậm chí không có triệu chứng hoặc chỉ có nhiều trứng cá và/hoặc khó khăn về sinh sản [22],[23],[24],[25].

Tiêu chuẩn để phân loại kiểu hình dựa trên các triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm hormon: nam hóa bộ phận sinh dục ngoài ở trẻ gái được đánh giá theo các mức độ của Prader để chẩn đoán thể cổ điển (bao gồm cả ở thể MM hoặc NHĐT); ở thể cổ điển MM (hoạt độ 21-OH còn < 2%) bệnh nhân có các biểu hiện sụt cân hoặc chậm tăng cân sau đẻ, nôn, dấu hiệu mất nước thậm chí sốc giảm thể tích; cùng với khuyến cáo của Pang và Clark (1993) trong một nghiên cứu hợp tác quốc tế thì xếp các bệnh nhân vào thể MM khi Na^+ huyết thanh < 130 mmol/l hoặc 130-135 mmol/l kết hợp với K^+ > 5,5 mmol/l [26], hoặc bất kỳ khi nào xét nghiệm thấy hoạt độ renin huyết thanh tăng bất thường. Thể NHĐT (hoạt độ enzym tăng khoảng 1 - 2% so với thể cổ điển MM) bao gồm dậy thì sớm giả và tăng phát triển chiều cao, tuổi xương. Thể

không cổ điển (hoạt độ enzym còn 20-50%) được định nghĩa ở trẻ gái không có nam hóa bộ phận sinh dục ngoài lúc sinh hoặc nam hóa ở mức độ nhẹ, ở cả hai giới có lông mu và lông nách sớm (bảng 1.2). Nồng độ 17-OHP ở điều kiện cơ sở và sau kích thích ACTH là một tiêu chuẩn bổ xung cho chẩn đoán [11],[16],[17]. 17-OHP được sử dụng như dấu ấn sinh học để chẩn đoán và theo dõi điều trị TSTTBS thiếu 21-OH, và được phân tích bằng kỹ thuật miễn dịch phóng xạ lần đầu giữa những năm 1986 và 1990, và từ những năm 1991 về sau thì bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (Delfia; Wallac Oy Corporation, Turku, Finland) [27].

Bảng 1.2. Biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH [28]

Biểu hiện lâm sàng	Thể bệnh thiếu 21-OH	
	Thể cổ điển	Thể không cổ điển
Nam hóa trước sinh	Biểu hiện ở trẻ gái	Không có
Nam hóa sau sinh	Cả trẻ gái và trẻ trai	Mức độ khác nhau
Mất muối	75% các ca	Không
Thiếu cortisol	100% các ca	Hiếm

1.3.2. Tỷ lệ mới mắc của thiếu 21-OH

Dữ liệu từ một số chương trình sàng lọc sơ sinh cho thấy TSTTBS do thiếu 21-OH là một trong những bệnh di truyền đơn gen phổ biến. Từ kết quả sàng lọc sơ sinh cho khoảng 6,5 triệu sơ sinh ở 13 nước khác nhau (Mỹ, Pháp, Ý, Niu Di-Lân, Nhật Bản, Anh, Bra-xin, Thụy sĩ, Thụy Điển, Đức, Bồ Đào Nha, Ca-na-đa, Tây Ban Nha) cho thấy tỷ lệ mới mắc là 1:15000 trẻ đẻ sống đối với thể cổ điển [17],[26],[29],[30]. Do vậy, tỷ lệ người lành mang gen của thể cổ điển ước tính khoảng 1:60. Tỷ lệ mới mắc tùy thuộc vào chủng tộc và vùng địa lý. Tỷ lệ mới mắc của thể nhẹ hơn hay thể không cổ điển thì phổ biến hơn nhiều (khoảng 1:500 - 1:1000 ở các chủng tộc khác nhau), một nghiên cứu ở cộng đồng New York cho thấy thể không cổ điển của TSTTBS

phổ biến hơn ở một số chủng tộc như người gốc Do Thái có nguồn gốc Đông Âu, người gốc La Tinh và gốc Nam Tư (1,0 - 3,7%) [31].

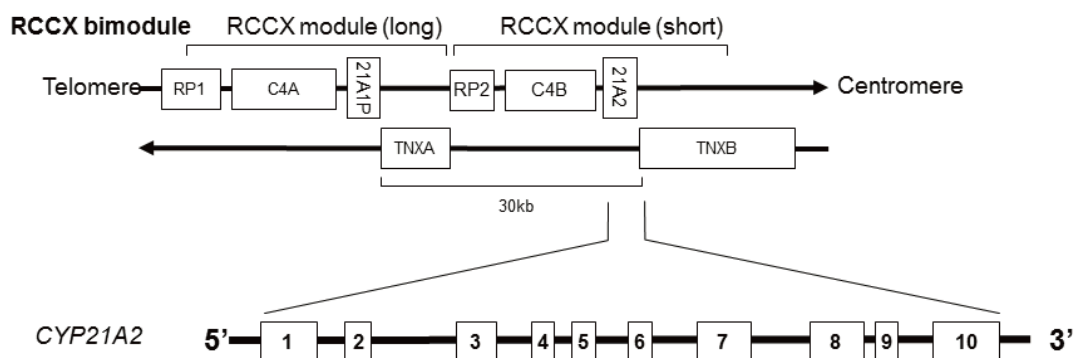
1.4. Cơ sở di truyền phân tử của bệnh TSTTBS do thiếu 21-OH

1.4.1. Gen *CYP21A2* và cấu trúc *RCCX (RP-C4-CYP21-TNX)*

Thiếu hụt 21-OH gây nên bởi các đột biến của gen *CYP21A2* (trước kia được gọi là gen *CYP21* hoặc *CYP21B*, GeneID 1589, GenBank NC_000006.10), gen này nằm ở vùng HLA class III phức hợp hoà hợp mô chủ yếu (major histocompatibility: MHC) hay phức hợp kháng nguyên bạch cầu người trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể 6 (6p21.3), cùng với giả gen *CYP21A1P* (trước kia gọi là *CYP21P* hoặc *CYP21A*) mà có sự giống nhau lớn so với gen chức năng. Hai gen này cách nhau khoảng 30 kb và đều có 10 exon, có kích thước 3,4 kb và giống nhau về trình tự đến 98% ở các exon và khoảng 96% ở các intron. *CYP21A1P* là gen không hoạt động vì mang một số đột biến gây mất chức năng của gen. Đơn vị *C4/CYP21* nằm xen kẽ với gen *RP* (serine threonine nuclear protein kinase) ở phía telomer và gen *TNX* phía centromere, tạo nên module *RCCX (RP-C4-CYP21-TNX)*. *RP1* mã hoá cho protein nhân tương tự như chuỗi xoắn DNA hiện chưa rõ chức năng và có tên là serine-threonine kinase 19 (*STK19*), *RP2* là dạng cắt ngắn và không có chức năng như *RP1*, *TNXB* mã hoá cho protein đệm ở ngoại bào có tên là tenascin X, gen này nằm cạnh với gen *CYP21A2*, còn gen *TNXA* là bản sao bị cắt cụt của *TNXB* và nằm cạnh *CYP21A1P* ở phía đối diện. Hầu hết haplotype có dạng bimodular bao gồm hai bộ của bốn gen được sắp xếp như sau: *RP1 - C4A - CYP21A1P - TNXA - RP2 - C4B - CYP21A2 - TNXB* (hình 1.3) [9],[16],[17],[32]. Tuy nhiên, số lượng module cũng có thể thay đổi từ 1 đến 4. Khoảng 70% ở chủng tộc da trắng có số module là 2 [33] và bao gồm một module chứa gen *CYP21A2* và module khác chứa gen *CYP21A1P*. Cấu trúc dạng 3 module chiếm 14% các nhiễm sắc thể [34] và hầu hết các trường hợp mang 2 bản sao của *CYP21A1P* và 1 bản sao của *CYP21A2*, nhưng 2 bản sao

của *CYP21A2* và 1 bản sao của *CYP21A1P* cũng đã được mô tả. Dạng haplotype của đơn vị RCCX có số lượng lớn hơn một gen *CYP21A2* (trên 1 nhiễm sắc thể) được ghi nhận ở các chủng tộc khác nhau như chủng tộc da trắng Tuy-ni-di 12,5% (trong số 272 nhiễm sắc thể); Tây Ban Nha 7% (trong số 288 nhiễm sắc thể); Thụy Điển < 2% (trong số 186 nhiễm sắc thể); Áo 13,2% (trong số 38 nhiễm sắc thể); Hà Lan 1% (trong số 286 nhiễm sắc thể); Trung Quốc 2,5% (trong số 200 nhiễm sắc thể) [35],[36],[37],[38],[39].

Theo trình tự của vùng RCCX từ nguồn của ngân hàng gen (GeneBank) (AF019413 và AL049547) thì chiều dài trình tự của bimodule là khoảng 120 kb [35]. Gen *CYP21A2* mã hóa cho protein gồm 494 acid amin có trọng lượng phân tử là 55 Kilo Dalton (kDa) [40].



Hình 1.3. Vùng nhiễm sắc thể 6p21.3 bao gồm gen *CYP21A2* của cấu trúc RCCX module [32]

1.4.2. Lịch sử nghiên cứu về di truyền phân tử của bệnh TSTTBS trên thế giới

Năm 1986, White và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu cloning và biểu hiện gen và nhận thấy cDNA tương ứng với 21-OH dài 2 kb, protein là sản phẩm của gen được ước tính có 494 acid amin với trọng lượng phân tử 55 000 Dalton. Enzym này có tính đồng nhất cao (28%) so với các enzym cytochrome P450 khác đã được nghiên cứu [40]. Cũng năm 1986, Higachi và cộng sự đã nghiên cứu cấu trúc của gen và chỉ ra rằng gen mã hóa cho 21-OH

bao gồm 10 exon, trong khi đó các gen mã hóa cho các enzym P450 khác có 7, 8 hoặc 9 exon. Gen bất hoạt A có đột biến 8 bp (base pair) ở vị trí mã hóa 110 và 112 gây nên lệch khung dịch mã và ngừng phiên mã tại vị trí 130. Hai gen P450C21 có 9 intron và có chiều dài khoảng 3,4 kb [41].

Các nghiên cứu về mapping của gen trong đó có nghiên cứu của Carrol và cộng sự đã xác định hai gen 21-OH nằm cạnh các gen C4A và C4B: 5-prime--C4A--2-OHA--C4B--21-OHB--3-prime [42]. White và cộng sự (1985) đã báo cáo bằng chứng về sự tồn tại của 2 gen mã hóa cho steroid 21-OH ở vùng của gen C4, trong phức hợp các gen MHC class III. Gen 21-OH B và vùng tiếp giáp gen C4B bị mất đoạn trên nhiễm sắc thể mang HLA-Bw47 và allele gây thể mất muối do thiếu 21-OH. Ngược lại, nhiễm sắc thể mang haplotype HLA-A1; B8; DR3 thì không kết hợp với thiếu 21-OH và kết luận của White và cộng sự (1985) dựa trên phân tích enzym giới hạn và có thể có mất đoạn của các gen C4A và 21OH A [43]. Điều này gợi ý gen A không có chức năng. Higashi và cộng sự (1986) cũng gợi ý rằng có cấu trúc đặc biệt của hệ gen khiến gen chức năng trở nên đột biến là do hoán vị gen hoặc xóa đoạn gen bởi tái tổ hợp đồng nhất và trao đổi chéo không cân xứng [41].

Các nghiên cứu về di truyền phân tử bao gồm nghiên cứu của Rodrigues và cộng sự (1987) đã khẳng định rằng gen 21-OH A là giả gen do có 3 đột biến ở exon. So sánh với các công bố về trình tự gen và đã xác định rằng gen 21-OH B là dạng đa hình. Các tác giả cũng gợi ý là 4 thể lâm sàng riêng biệt của thiếu 21-OH là thể NHĐT, MM, xuất hiện muộn và thể kín đáo rất có thể là hậu quả của các đột biến allele khác nhau của gen 21-OH B [44].

Sử dụng ‘multiple restriction enzymes’ để phân tích gen mã hóa cho 21-OH ở 10 gia đình, và mỗi gia đình có từ 2 người bị bệnh trở lên, Matteson và cộng sự (1987) đã kết luận rằng: xóa đoạn là đột biến thường gặp ở bệnh nhân TSTTBS và có thể do hiện tượng hoán vị gen, hiện tượng trao đổi chéo không cân hơn là các xóa đoạn đơn thuần [45]. Harada và cộng sự (1987) đã

sử dụng phân tích Southern blot DNA hệ gen sử dụng đầu dò DNA của 21-OH và đã phát hiện vắng mặt của đoạn giới hạn tương ứng với 21-OH. Các tác giả cũng chứng minh rằng sự vắng mặt này không phải do xóa đoạn gen mà do sự hoán vị của gen chức năng và giả gen [46]. Olney và cộng sự (2002) đã phát triển kỹ thuật “real-time quantitative PCR” để phát hiện xóa đoạn của *CYP21A2*. Kỹ thuật này cho phép phát hiện xóa đoạn gen dị hợp tử với sai số alpha < 5% và với một lực > 95%. Khi so sánh với kỹ thuật “allele-specific PCR” để phân tích 9 đột biến phổ biến thì có thể hoàn thành trong 2 giờ đối với mẫu máu [47]. Turkel và cộng sự (2003) đã tiến hành kỹ thuật “allele-specific PCR” cho 8 đột biến phổ biến nhất đã được báo cáo là các đột biến điểm của *CYP21* ở 31 gia đình có ít nhất một người thiếu 21-OH. Tỷ lệ các allele đột biến phổ biến nhất bao gồm I2g (22%); p.I172N (11,4%); p.R356W (9,6%) và p.Q318X (8%) [48]. Kharrat và cộng sự (2004) sử dụng kỹ thuật cắt enzym giới hạn và giải trình tự gen *CYP21A2* cho 51 bệnh nhân thể cổ điển của thiếu 21-OH và phát hiện được đột biến ở 94% các nhiễm sắc thể phân tích và nhận thấy đột biến phổ biến nhất là p.Q318X; xóa đoạn lớn (35,3%); I2g (17,6%) và p.I172N (10,8%). Bốn đột biến mới phát hiện được ở 4 bệnh nhân thể MM [49].

Các nghiên cứu về nguồn gốc của các đột biến bao gồm:

Mornet và cộng sự (1991) ước tính rằng hoán vị gen bao gồm các đoạn nhỏ DNA chiếm 74% các bệnh nhân thiếu 21-OH. Xóa đoạn hoàn toàn của gen chiếm khoảng 20% các bệnh nhân của thể cổ điển. Xóa đoạn hoàn toàn của *CYP21A2* kết hợp với thể MM giống như mất 8 bp trên exon 3. Đột biến p.V281L trên exon 7 kết hợp với thể xuất hiện muộn [50]. Ghanem và cộng sự (1990) kết luận rằng khoảng 70% các đột biến ở gen *CYP21A2* gây bệnh thể cổ điển và không cổ điển là các đột biến điểm [51]. Do vùng gen này có số lượng các đơn vị lặp lại của C4/21-OH nên khác nhau về chiều dài giữa

các halotype. Những halotype mang một đơn vị C4/21-OH với một gen *CYP21A1P* thì mắc thể nặng của thiếu 21-OH. Haglund-Stengler và cộng sự (1991) phát hiện sự kết hợp giữa 3 đơn vị lặp lại của C4/21-OH và thể nhẹ của thiếu 21-OH [52].

Tajima và cộng sự (1993) kết luận rằng khoảng 90% các đột biến ở bệnh nhân thiếu 21-OH là do các đột biến từ giả gen hoặc do xóa đoạn và chỉ khoảng 10% là do các đột biến không tồn tại trên giả gen [53].

Araujo và cộng sự (2007) nghiên cứu vùng promoter/điều hòa của gen *CYP21A2* ở 17 bệnh nhân chưa có kiểu gen mắc thể không cổ điển của thiếu 21-OH và 50 trường hợp đối chứng. Các đột biến vùng promoter được phát hiện và dị hợp tử kép với đột biến p.V281L ở một bệnh nhân và với đột biến I2g ở bệnh nhân khác. Các tác giả đã kết luận rằng các hoán vị nhỏ của gen giữa promoter của *CYP21A2* và *CYP21A1P* có thể gây ra thể không cổ điển và phân tích promoter của *CYP21A2* nên được tiến hành trong nghiên cứu di truyền TSTTBS [54].

1.5. Các đột biến của gen *CYP21A2* gây thiếu 21-OH

Các đột biến ở gen *CYP21A2* gây bệnh TSTTBS được chia làm ba nhóm: i/ hiện tượng hoán vị nhỏ của giả gen *CYP21A1P* sang gen chức năng *CYP21A2*; ii/ các đột biến tự phát sinh tại gen chức năng *CYP21A2*; iii/ đơn vị RCCX ở dạng kết hợp (chimeric RCCX module) bao gồm: dạng kết hợp của *CYP21A1P/CYP21A2* và các gen *TNXA/TNXB* [35]. Các đột biến phổ biến của gen *CYP21A2* được phát hiện trên 95% các bệnh nhân TSTTBS do thiếu 21-OH. Khoảng 20-25% các allele đột biến là xóa đoạn gen *CYP21A2* và trạng thái kết hợp (chimera) của gen *CYP21A1P/CYP21A2* (thuật ngữ cũ là hoán vị lớn của gen) gây nên bởi hiện tượng trao đổi chéo không cân xứng ở vùng RCCX [37]. Hầu hết các đột biến phát hiện được ở *CYP21A2* cho đến nay là do hoán vị nhỏ của *CYP21A1P* sang *CYP21A2* trong quá trình gián

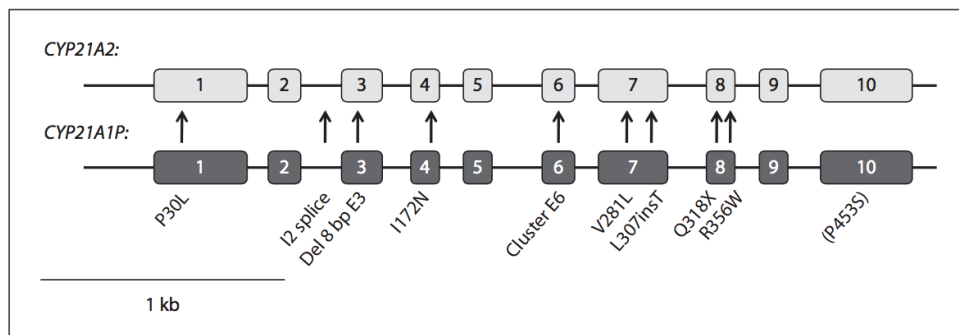
phân và giảm phân, và chiếm khoảng 70-80% các đột biến gây bệnh của gen *CYP21A2* bao gồm 7 đột biến điểm, đột biến xóa đoạn 8 bp của exon 3, và một nhóm gồm 3 đột biến điểm trên exon 6 [41],[55]. Hơn nữa, có khoảng hơn 100 các đột biến tự phát sinh ở gen *CYP21A2* không phụ thuộc vào giả gen đã được liệt kê tại dữ liệu của uỷ ban danh pháp “Cytochrome P450 allele” người. (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>). Các đột biến hiếm hoặc đột biến mới tự phát sinh ở gen *CYP21A2* chiếm khoảng 3-5% các allele đột biến qua các nghiên cứu với số lượng lớn các bệnh nhân thiếu 21-OH. Khoảng 1% các đột biến không di truyền từ bố mẹ (*de novo mutation*) [7],[56],[57],[58].

Kiểu gen của *CYP21A2* được phân loại thành các nhóm khác nhau dựa trên hoạt độ 21-OH trên nghiên cứu *in vitro*; khi sử dụng phân loại này thì mối tương quan chặt chẽ giữa kiểu gen và kiểu hình đã được thiết lập với giá trị dự báo dương tính cao [57]. Lịch sử phát hiện và các nghiên cứu về chức năng protein của các đột biến phổ biến có nguồn gốc từ giả gen và tương quan với kiểu hình được tóm tắt tại bảng 1.3.

Bảng 1.3. Các đột biến phổ biến ở *CYP21A2* gây thiếu 21-OH

Các đột biến	Vị trí	% hoạt độ enzym <i>in vitro</i>	Mức độ nặng	Tham khảo
Xóa đoạn lớn		0	Nặng	White PC. 1984 [60]
c.89C>T (p.P30L)	Exon 1	30 - 60	Nhẹ	Tusie-Luna MT. 1991 [61]
c.290-13A/C>G (I2g)	Intron 2	< 5	Nặng	Higashi Y. 1991 [62]
del 8 bp E3 (E3Δ8bp)	Exon 3	0	Nặng	White PC. 1994 [63]
c.515T>A (p.I172N)	Exon 4	1	Vừa	Amor M. 1988 [64] Tusie-Luna M. 1990 [65]
c.841G>T (p.V281L)	Exon 7	20 - 50	Nhẹ	Tusie-Luna M. 1990 [65] Speiser PW. 1988 [66]
c.952C>T (p.Q318X)	Exon 8	0	Nặng	Globerman H. 1988 [67]
p.R356W (c.1066C>T)	Exon 8	0	Nặng	Chiou SH. 1990 [68]

Cùng với đột biến xóa đoạn lớn làm mất toàn bộ gen *CYP21A2* và sự hoán vị lớn của gen, thì 9 đột biến của giả gen được chuyển sang gen chức năng chiếm khoảng 95% của tất cả các allele trong bệnh TSTTBS ở hầu hết các chủng tộc. Có vài khác biệt về tần suất của các đột biến cụ thể giữa các chủng tộc. Các đột biến xuất phát từ giả gen bao gồm: p.P30L (c.89C>T), I2g (IVS2-A/C>G hay c.290-13A/C>G), del 8 bp E3 (c.329_336delGAGACTAC), p.I172N (c.515T>A), Cluster E6 (c.707T>A+710T>A+716T>A), p.V281L (c.841G>T), p.L307FfsX6 (c.920_921insT), p.Q318X (c.952C>T), and p.R356W (c.1066C>T) (hình 1.4; bảng 1.3) [59]. Đột biến p.P453S (c.1357C>T) cũng xuất hiện với tỷ lệ thấp ở *CYP21A1P* do vậy cũng chuyển sang gen chức năng với cùng cơ chế. Thêm vào các đột biến xuất phát từ giả gen thì các đột biến hiếm phát sinh ở gen chức năng và xuất hiện ở các gia đình riêng biệt hoặc có những allele hiếm đặc biệt lưu hành ở những chủng tộc đặc biệt.



Hình 1.4. *CYP21A2* và *CYP21A1P*

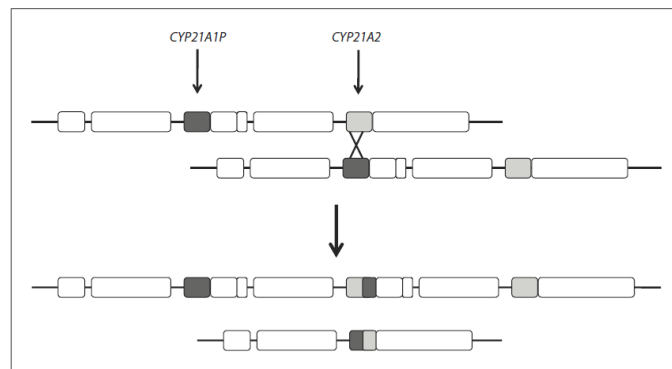
CYP21A1P là gen không hoạt động do các đột biến gây bất hoạt gen, các đột biến này có thể được chuyển sang *CYP21A2* qua sự tái tổ hợp hoặc hoán vị gen [59].

1.5.1. Các đột biến xóa đoạn và hoán vị lớn của gen

Xóa đoạn lớn bao gồm *C4B* và *CYP21A2* và chiếm khoảng 20 - 25% của các allele ở các bệnh nhân thiếu 21-OH thể cổ điển ở hầu hết các chủng

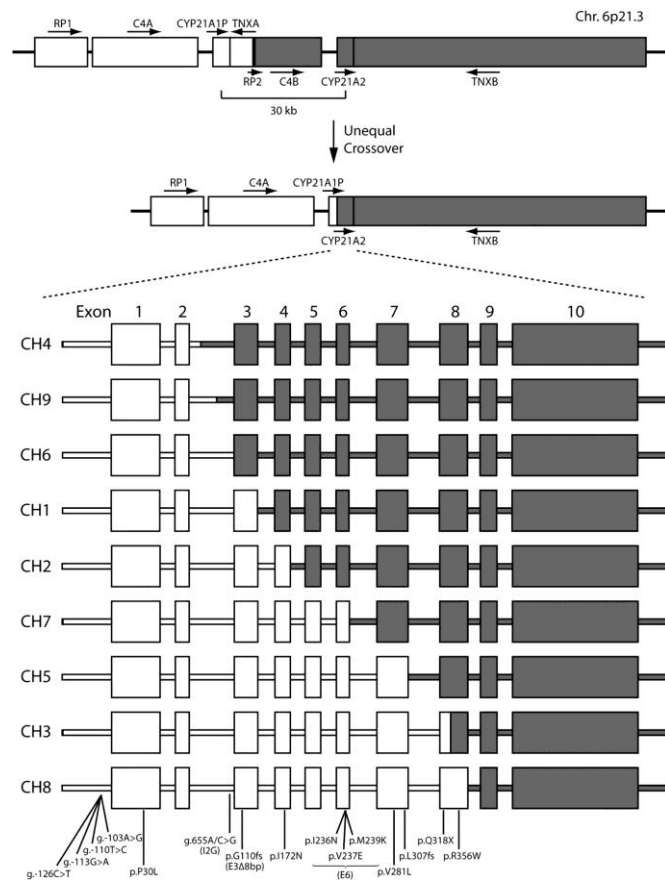
tộc nhưng hiếm hơn ở vài nước châu Mỹ La tinh [17]. Nhiều allele bị xóa đoạn kết hợp với haplotype *HLA A3; Bw47; DR7*. Các xóa đoạn thường có kích thước khoảng 30 kb nằm giữa exon 3 và exon 8 của *CYP21A1P* kéo dài đến *C4B* và tiếp tục đến một điểm nhất định của gen *CYP21A2* và tạo ra phần còn lại của gen *CYP21A2* trong đó đầu 5' tương ứng với *CYP21A1P* và đầu 3' tương ứng với *CYP21A2*. Đột biến xóa đoạn tạo ra một gen không có khả năng mã hoá cho enzym hoạt động. Tất cả các bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử xóa đoạn đều có kiểu hình là thể cổ điển MM.

Sự trao đổi chéo không cân xứng có thể xuất hiện bất kể ở vị trí nào trong vùng lặp đoạn 30-kb bao gồm các gen *RP*, *C4* và *TNX*, và thường xuất hiện các nhiễm sắc thể với 1 hoặc 3 bản sao của vùng 30-kb, và việc tái cấu trúc này được phát hiện ở 16% và 12% tương ứng ở các nhiễm sắc thể 6. Chỉ những điểm gãy xảy ra trao đổi chéo nằm giữa hoặc ở đầu 3' của gen *CYP21A2* gây thiếu 21-OH; các điểm gãy ở các gen *C4* sẽ xóa đoạn gen *CYP21A1P* và một trong số các gen *C4* và được xác định ở các haplotype *HLA* phổ biến là *A1; B8; DR3* (hình 1.5 và 1.6) [59],[69].



Hình 1.5. Hiện tượng tái cấu trúc gen *CYP21A2*

Gồm các gen lặp lại và vùng RCCX bị thay đổi rất lớn do sự sắp xếp lại của các gen. Phụ thuộc vào điểm bị đứt gãy mà các dạng khác nhau của gen được tạo thành [59].



Hình 1.6. Xóa đoạn của gen *CYP21A2*

Hiện tượng tái sắp xếp trong quá trình giảm phân gây nên xóa đoạn 30 kb và gây ra tình trạng kết hợp (chimera) *CYP21A1P/CYP21A2*. Đến nay có 9 dạng kết hợp (CH1-CH9) với các vị trí nối khác nhau giữa hai gen đã được xác định. Các exon của *CYP21A1P* và *CYP21A2* được ký hiệu là các hộp trắng và đen tương ứng [69].

1.5.2. Các đột biến vô nghĩa và đột biến gây lệch khung dịch mã (nonsense và frameshift mutations)

Hai đột biến được phát hiện ở *CYP21A1P* gây thiếu hụt hoàn toàn tổng hợp enzym và gây nên thể MM nếu các đột biến này xuất hiện ở *CYP21A2* là đột biến vô nghĩa ở mã 318 (p.Q318X) [67] và xóa đoạn 8 bp ở exon 3 [70]. Đột biến thêm 1 nucleotid ở exon 7 (c.920_921insT) của gen *CYP21A1P* nhìn chung không được phát hiện một cách đơn độc ở bệnh nhân thiếu 21-OH [17].

Đột biến intron 2

A hoặc C được thay thế bằng G ở intron 2. Nucleotid cách 13 bp từ vị trí tận cùng của intron 2 (nt 656 trên genome) là A hoặc C ở người bình thường. Đột biến thành G và đây là allele đột biến phổ biến nhất gây thiếu 21-OH thể cổ điển. Đột biến này gây tổn thương gắn nối ở intron 2 và giữ lại 19 nucleotid mà bình thường sẽ bị loại khỏi mRNA qua quá trình gắn nối và hậu quả là làm lệch khung dịch mã. Hầu hết mRNA bị thay đổi quá trình gắn nối nhưng trên tế bào nuôi cấy còn lượng nhỏ mRNA có gắn nối bình thường, nếu không có thêm đột biến nặng khác thì một lượng nhỏ enzym vẫn được sản xuất. Cho dù không biết được tỷ lệ bao nhiêu mRNA có quá trình gắn nối bình thường ở thượng thận của bệnh nhân mang đột biến này, nhưng hầu hết bệnh nhân mang đồng hợp tử đột biến này hoặc mang một đột biến này có kiểu hình là thể MM, điều này cho thấy có sự thiếu hụt nặng hoạt độ enzym thích hợp để tổng hợp aldosterone. Đôi khi có thể gặp các biểu hiện mất muối muộn hơn vài tháng sau sinh ở các bệnh nhân mang đột biến này [17],[71]. Khả năng người mang đồng hợp tử đột biến này được coi là không có biểu hiện triệu chứng cũng đã được báo cáo [72].

1.5.3. Các đột biến điểm phổ biến khác

Đột biến Pro-30→Leu (p.P30L): Đột biến này dẫn đến hoạt độ enzym giảm còn 30-60% so với bình thường khi nghiên cứu biểu hiện gen trên tế bào nuôi cấy [61]. Tuy nhiên, hoạt độ enzym nhanh chóng bị mất khi tế bào bị dung giải, gợi ý enzym không ổn định khi mang đột biến này. Bệnh nhân mang đột biến này có các biểu hiện nam hoá nặng hơn các bệnh nhân mang đột biến phổ biến hơn gây thể lâm sàng không cổ điển p.V281L [7]. Đột biến này được phát hiện ở 1/6 các allele ở các bệnh nhân thể không cổ điển nhưng gặp cao hơn ở các bệnh nhân Nhật Bản [73].

Đột biến Ile-172→Asn (p.I172N): Đây là đột biến duy nhất kết hợp với thể lâm sàng NHĐT và hoạt độ enzym còn khoảng 1% so với bình thường với ái lực cơ chất bình thường (K_m). Bình thường acid amin isoleucine ở vị trí trên xoắn E được bảo tồn ở nhiều enzym P450 khác nhau, và ở vùng này của protein P450 tương tác khác với màng của lưới nội bào [74]. Đột biến ở vị trí kỵ nước này đến cực đối diện có thể gây phá vỡ sự tương tác, làm giảm sự kết hợp enzym với lưới nội bào. Đột biến này có thể phá hủy sự tương tác kỵ nước bên trong phân tử và tính ổn định của cấu trúc enzym; enzym đột biến nhạy cảm bất thường với protease phân cắt và không kết hợp chặt chẽ với heme một cách thích hợp.

Bình thường thì aldosterone được bài tiết với một lượng nhỏ hơn 100-1000 lần so với cortisol, điều rất rõ ràng là hoạt độ 21-OH có thể giảm đến mức rất thấp trước khi đạt đến mức giới hạn mà ảnh hưởng đến tổng hợp aldosterone. Trên thực tế, hoạt độ chỉ còn 1% so với bình thường là đủ để tổng hợp aldosterone và tránh được mất muối ở hầu hết bệnh nhân [17].

Các đột biến p.I235N; p.V236E và p.M238K trên exon 6:

Nhóm này gồm ba đột biến sai nghĩa ở xoắn G và phá hủy hoạt độ enzym [62],[65] và giả thuyết là gây bất thường việc gắn với cơ chất (dựa trên cơ sở sự bảo tồn trình tự với enzym phân cắt chuỗi nhánh cholesterol là cytochrome P450 khác) nhưng không được khẳng định bởi việc mô hình hoá phân tử CYP21 trên cơ sở cấu trúc tinh thể của CYP102.

Đột biến Val-281→Leu (p.V281L): Đột biến này xuất hiện ở tất cả hoặc gần tất cả các bệnh nhân thể không cổ điển thiếu 21-OH mang haplotype *HLA B14; DR1*. Ở một vài chủng tộc như người Do Thái ở Đông Âu thì đây là một đa hình di truyền phổ biến với tần suất gen là hơn 10%. Ngược lại, sàng lọc phân tử trực tiếp của trẻ sơ sinh bình thường ở Niu Di-Lân đã phát hiện tần suất là 2%. Nhìn chung khoảng 70% của tất cả các allele của thể

không cổ điển mang đột biến p.V281L [75]. Tuy nhiên, kết hợp haplotype *HLA-B14, DR1* thì ít phổ biến hơn ở các bệnh nhân thể không cổ điển ở một vài nhóm chủng tộc như Yugoslavs [76] và ở người Nhật [73]. Đột biến này làm giảm hoạt độ enzym còn 50% so với bình thường đối với cơ chất là 17-OHP, nhưng chỉ còn 20% so với bình thường đối với cơ chất là progesterone. Nghiên cứu đã cho thấy enzym đột biến không có mặt bình thường ở lưới nội bào trong khi đó có giả thiết khác là liên kết heme bị tổn thương. Một khả năng khác là đột biến này nằm ở vị trí liên quan đến xoắn I mà có chứa các acid amin được cho là tham gia chuyển proton [65],[77].

Đột biến Arg-356→Trp (p.R356W):

Đột biến này phá hủy hoạt độ enzym khi biểu hiện trên tế bào động vật có vú [62],[68]. Đột biến này nằm ở vị trí của gen mã hóa cho xoắn K của enzym và giả thiết là đột biến đã gây tổn thương sự tương tác với cytochrome P450 reductase, nhưng chưa được chứng minh bằng thực nghiệm [78].

1.5.4. Các đột biến hiếm gặp

Các đột biến không do hoán vị gen (không luôn phát hiện được trên gen *CYP21A1P*) chiếm khoảng 5-10% các allele gây thiếu hụt 21-OH ở hầu hết các chủng tộc. Đột biến thường gặp nhất trong số này là p.P453S và xuất hiện ở các chủng tộc khác nhau. Điều này gợi ý rằng *CYP21A1P* có thể mang p.P453S đôi khi như một đa hình và đột biến này được chuyển sang gen *CYP21A2* cùng cơ chế như các đột biến khác hay gặp ở thiếu 21-OH [69],[79].

1.6. Các tiến bộ kỹ thuật của phân tích phân tử phát hiện các đột biến gen *CYP21A2*

1.6.1. Phân tích các đột biến xóa đoạn và hoán vị lớn của gen

Có khuyến cáo cho rằng thuật ngữ hoán vị lớn của gen “large gene conversion” nên ngừng sử dụng bởi vì cả xóa đoạn lớn và hoán vị lớn của gen

đều xuất hiện do hậu quả của trao đổi chéo không cân xứng trong quá trình giảm phân [80].

Cả hoán vị và xóa đoạn lớn của gen là do sự trao đổi chéo không cân xứng và đã được phân tích bằng kỹ thuật Southern blotting. Kỹ thuật này được sử dụng trong một thời gian dài và được coi như không có kỹ thuật khác thay thế để đảm bảo có cùng tính chính xác [80],[81],[82]. Nhưng đây là một tiếp cận vất vả và tốn kém thời gian, không thích hợp cho các trường hợp cần có kết quả trả lời nhanh như chẩn đoán trước sinh, hơn nữa nhược điểm lớn của phương pháp này là cần sử dụng phóng xạ, yêu cầu có lượng lớn DNA có chất lượng cao. Mặc dù Southern blotting không sử dụng phóng xạ trong phân tích *CYP21A2* đã khắc phục được nhược điểm nhưng chỉ được sử dụng ở quy trình tại labo nghiên cứu [79].

Các kỹ thuật khác đã được nghiên cứu để phát hiện số lượng các bản sao như “real-time quantitative PCR” [83], và đã góp phần rút ngắn thời gian phân tích, có thể xác định được số lượng các bản sao của gen và tình trạng tái tổ hợp giữa gen chức năng và giả gen một cách tin cậy. Tuy nhiên, kỹ thuật này cũng không thích hợp để xác định một cách chi tiết các sắp xếp lại phức tạp của gen chẳng hạn khi có hơn 2 bản sao của gen/hoặc giả gen cũng như khi cần nhắc sự đa dạng của giả gen.

Các phương pháp “locus-specific PCR amplification” với sự kết hợp các primer khác nhau đã được nghiên cứu như một tiếp cận khác thay thế cho phân tích Southern blot [84],[85]. Tuy nhiên, phương pháp này không phải là tiếp cận thích hợp cho tất cả các labo [84],[86].

Một tiếp cận mới gần đây đã chứng tỏ có sự tiến bộ rõ rệt về mặt kỹ thuật để phát hiện các xóa đoạn/hoán vị gen, sắp xếp lại của gen và hợp nhất của gen là phương pháp khuếch đại đầu dò đa môi dựa vào phản ứng nối (multiplex ligation-dependent probe amplification – MLPA) (www.mrc-

holland.com). Kỹ thuật này có những ưu điểm nổi bật là tiết kiệm thời gian để phân tích (48 giờ), chính xác, và thích hợp để phát hiện số lượng các bản sao của gen và chỉ cần lượng nhỏ DNA (25 - 250 ng). Các đầu dò đặc hiệu cho các vị trí khác nhau được cho vào mẫu bệnh phẩm DNA, sau đó được khuếch đại và được lượng hóa và so sánh với mẫu DNA chuẩn. Khuếch đại PCR đầu dò phụ thuộc vào sự có mặt của trình tự mà đầu dò hướng tới của bệnh phẩm. Mỗi một đầu dò bao gồm 1 primer tổng hợp và một primer M13 chuẩn, mà sẽ lai với các vị trí sát ngay với trình tự mong muốn. Các primer đầu dò lai được nối và sau đó được khuếch đại PCR. Sự khuếch đại kết hợp đồng thời cùng lúc bởi một cặp primer PCR được diễn ra thuận tiện bởi primer và trình tự đúng. Mỗi đầu dò sẽ cho ra sản phẩm khuếch đại có chiều dài nhất định mà có thể phân tích được trên máy sequencer tự động [87]. Kit thương mại cho locus của *CYP21A2* bao gồm các đầu dò đặc hiệu cho 5' *CYP21A2* và 3' *CYP21A1P*. Một thử nghiệm bao gồm 15 đầu dò đặc hiệu để phân tích locus của gen *CYP21A2* với 5 đầu dò đặc hiệu cho gen *CYP21A2* và 3 đầu dò đặc hiệu cho gen *CYP21A1P*. Cũng như một đầu dò cho mỗi *C4* (A và B), 3 đầu dò cho *TNXB* và 1 đầu dò cho gen *CREBL1*. Các đầu dò cho *CYP21A2* và *CYP21A1P* được thiết kế trên những điểm đặc trưng để phân biệt giữa hai gen. MLPA đã chứng tỏ sự tiện lợi để phát hiện các xóa đoạn/lặp đoạn hoặc sắp xếp lại phức tạp của gen ở các bệnh nhân có số lượng khác nhau của đơn vị RCCX ở trên 2 allele. Tuy nhiên cũng cần lưu ý đến việc nhận định kết quả của MLPA đòi hỏi kinh nghiệm toàn diện trong phân tích gen *CYP21A2*, đặc biệt là cần đánh giá cẩn thận hai khía cạnh: sự biến đổi của trình tự giả gen có thể làm thay đổi kết quả mong đợi và vấn đề sử dụng nội kiểm. Một loạt các nghiên cứu gần đây đã sử dụng kỹ thuật này để phát hiện các đột biến xóa đoạn/lặp đoạn của gen *CYP21A2* ở nhiều nước khác nhau [88],[89],[90],[91].

Hạn chế của kỹ thuật MLPA bao gồm: hạn chế lớn nhất là dương tính giả xảy ra trong các trường hợp các đột biến/đa hình có vị trí ở vùng gần với đầu dò và ở vị trí nối, điều này sẽ ngăn cản quá trình lai đầu dò và nối [92]. Bởi vậy, “long - range PCR” hoặc giải trình tự trực tiếp nên được tiến hành để xác định lại các xóa đoạn một exon được phát hiện bởi MLPA.

Đối với mỗi phương pháp thì việc phát hiện nhiều bản sao của gen gấp 3 hay 4 lần thì đều có khó khăn [93].

1.6.2. Các tiến bộ về phát hiện các đột biến điểm và các biến đổi nhỏ phổ biến và hiếm gặp của gen CYP21A2

Như đã được đề cập ở các phần trên đây thì gen *CYP21A2* bao gồm 10 exon và các intron ngắn, điều này cho phép khuếch đại toàn bộ vùng bao gồm exon-intron. Hơn nữa, 9 đột biến có nguồn gốc từ giả gen *CYP21A1P* chiếm tới 90 - 95% các đột biến điểm/xóa đoạn nhỏ/thêm đoạn nhỏ ở các bệnh nhân thiếu 21-OH. Tuy nhiên, hiện tượng này lại gây ra một khó khăn lớn cho các kỹ thuật để phân tích đột biến bởi vì chúng ta phải khuếch đại đặc hiệu gen chức năng *CYP21A2* và phải tránh khuếch đại phải giả gen không có chức năng *CYP21A1P*.

Các phương pháp nhanh khác nhau để phát hiện các đột biến phổ biến này và các kỹ thuật cũng đã được nghiên cứu như: “allele-specific oligonucleotide hybridization” (ASO) [41],[94], “allele -specific PCR amplification” (ARMS) [95], “real-time PCR” để phát hiện các đột biến phổ biến đã được mô tả [47] và có ưu điểm là sẽ không phải tiến hành các kỹ thuật sau phản ứng. Các kỹ thuật này đều có hạn chế là cần nhiều thao tác bằng tay so với những tiếp cận kết hợp như “ligation detection reaction” (LDR) [96] và “multiplex minisequencing” [85],[97]. Tất cả các kỹ thuật đều phải cân nhắc tới vấn đề khó khăn khi khuếch đại đặc hiệu gen *CYP21A2* do trình tự giống nhau với giả gen. Sự giống nhau này có thể gây nên sai lệch kết quả và allele

hiếm khi mà trình tự của bệnh nhân có mặt của nucleotide có nguồn gốc từ giả gen ở vùng đã được sử dụng để thiết kế primer đặc hiệu.

Một trong các quy trình sàng lọc nhanh và chính xác nhất đối với các đột biến này đã được tiến hành bởi Krone và cộng sự (2002) [97]: trong nghiên cứu này thì trước hết PCR đặc hiệu cho *CYP21A2* được tiến hành, sau đó là phản ứng minisequencing 12-plex. Nghiên cứu này cũng bao gồm PCR phát hiện nhanh đột biến mất 8 bp của exon 3 để loại trừ xóa đoạn và hoán vị lớn của gen. Phương pháp này đã đưa đến kết quả sánh với phương pháp PCR định lượng của Olney và cộng sự [47]. Phương pháp minisequencing chỉ yêu cầu một phản ứng đối với mẫu DNA; việc nhận định các kiểu đỉnh đơn giản và có thể tự động hoá. Do ưu điểm rút ngắn được thời gian và giá thành thấp nên phương pháp đã được sử dụng như bước thứ phát để khẳng định bệnh ở các ca dương tính giả của chương trình sàng lọc sơ sinh [98].

Liên quan đến vấn đề giá thành và tần suất xuất hiện các đột biến ở một số chủng tộc ví dụ ở các bệnh nhân người Ý, tỷ lệ rất thấp các bệnh nhân mang một số đột biến trong số 9 đột biến phổ biến (đặc biệt hiếm đối với đột biến del(8) bp E3, cluster E6 và p.L307FfsX6 chiếm dưới 0,8%) và tỷ lệ cao các bệnh nhân (khoảng 5%) mang hơn một đột biến gây bệnh, trong đó có những đột biến rất hiếm mà Balsamo A và cộng sự (2010) đã đề xuất quy trình phân tích đột biến gen *CYP21A2* ở các bệnh nhân thiếu 21-OH [93]: Trong quy trình này thì:

i/ Ở các ca bệnh chỉ điểm (proband): khuếch đại đặc hiệu gen *CYP21A2* ở ba đoạn chồng lên nhau sử dụng primer PCR đặc hiệu sau đó giải trình tự trực tiếp tự động hoá toàn bộ gen và vùng proximal promoter (từ nt. -420 đến nt. +2907), sử dụng bộ primer chuẩn đã được thiết kế trước đó bởi Barbaro và cộng sự (2004) [99]. Hơn nữa, các primers để giải trình tự được sử dụng cho các allele đặc hiệu và khẳng định đột biến trên cả hai sợi. Với

phương pháp này tác giả có thể xác định được: (a) tất cả các đột biến gây bệnh bao gồm các đột biến phổ biến, đột biến hiếm, và đột biến mới chưa báo cáo trong y văn; (b) sự có mặt của các nucleotid có nguồn gốc từ giả gen có thể hình thành hiện tượng allele không được phát hiện (allele dropout), quy trình PCR/giải trình tự có thể được tiến hành để phân tích các allele ẩn này. Hơn nữa, sự vắng mặt của đoạn PCR cho thấy sự vắng mặt hoàn toàn của gen *CYP21A2* (đột biến xóa đoạn lớn đồng hợp tử), và đồng hợp tử cho tất cả các nucleotide đa hình (single nucleotide polymorphisms - SNPs) đã biết gợi ý khả năng xóa đoạn *CYP21A2* trên một allele (dị hợp tử xóa đoạn).

ii/ Phân tích DNA của bố mẹ không những khẳng định các đột biến đã được phát hiện và sự phân ly của các đột biến này và xác định tình trạng người lành mang gen, mà còn có ý nghĩa phân tích tính phân ly của các SNPs trong từng gia đình cụ thể, điều này sẽ hỗ trợ giả thiết có sự tồn tại của xóa đoạn hay hoán vị lớn của gen trên một allele;

iii/ Phân tích MLPA ở tất cả các trường hợp nghi ngờ xóa đoạn/lặp đoạn của gen, hoặc có tái sắp xếp phức tạp của gen hoặc không có sự phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình.

Sự khuếch đại phức hợp gen *CYP21A2/CYP21A1P* [84] được tiến hành thường quy trong quá khứ dần dần bị loại bỏ nhờ độ tin cậy tăng lên của dữ liệu MLPA.

Với quy trình này, các tác giả đã xác định được trên 98% các allele gây thiếu 21-OH và đã phân tích > 1000 allele và đã nhận thấy có mối tương quan lớn về kiểu gen - kiểu hình. Điều này có ý nghĩa lớn trong thực hành lâm sàng, đặc biệt khi có chỉ định chẩn đoán trước sinh cho các trường hợp có nguy cơ cao mang thai ngoài ý muốn [93].

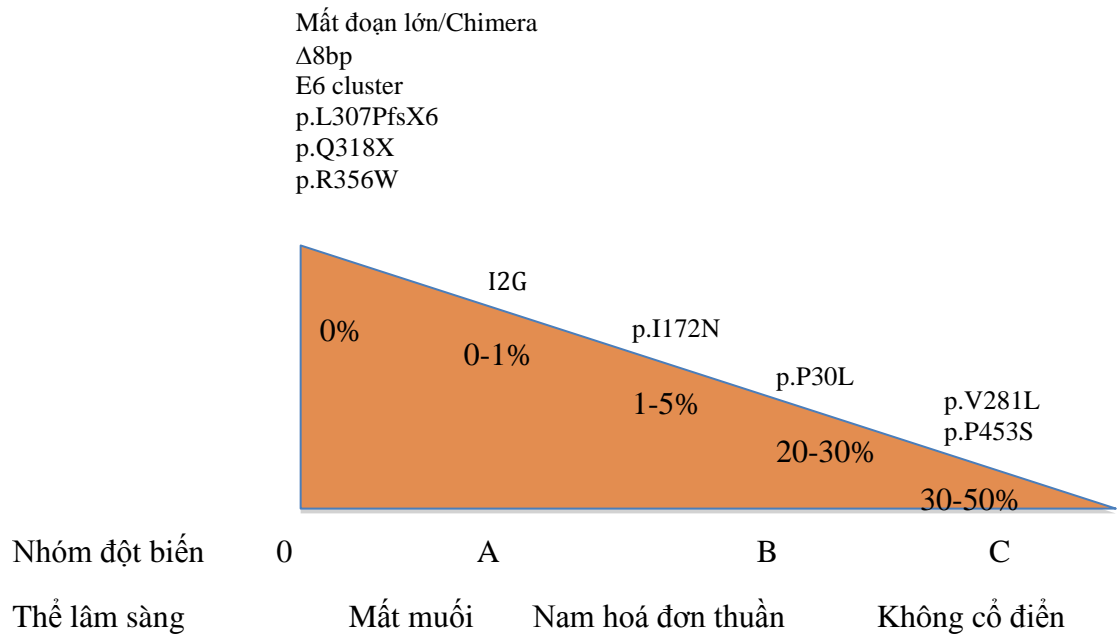
Tóm lại, có nhiều cách tiếp cận khác nhau để phát hiện hầu hết các đột biến phổ biến đã được nghiên cứu và ứng dụng bao gồm: “allele specific

oligonucleotide hybridization” (ASO) [94]; “allele specific PCR amplification” (ARMS) [95]; “ligation detection reaction” (LDR) [96]; “Real-time PCR” [47]; “phân tích DHPLC” [100] và “multiplex minisequencing” [85],[97]. Tuy nhiên, giải trình tự trực tiếp gen *CYP21A2* là cách tiếp cận tốt nhất để đảm bảo các đột biến hiếm gặp và đột biến mới không bị bỏ sót và phương pháp này cho phép phát hiện 100% các đột biến hiếm. Ngày nay, nhiều labo trong đó có nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã sử dụng phương pháp giải trình tự trực tiếp để phân tích đột biến gen *CYP21A2* [90],[101],[102],[103],[104],[105],[106],[107]. Những năm gần đây, kỹ thuật và hệ thống giải trình tự mới đã được ứng dụng cho phép phân tích kết quả nhanh với vật liệu sử dụng lớn [108].

1.7. Nghiên cứu về vai trò của phân tích đột biến gen *CYP21A2*

1.7.1. Dự báo kiểu hình

Kiểu hình của các bệnh nhân thiếu 21-OH liên quan chặt chẽ với hoạt độ enzym, các đột biến gây thiếu 21-OH là tiêu chuẩn chính để dự báo mức độ nặng của bệnh [7],[109], chí ít là khả năng giữ muối. Một phương pháp có tính thực hành để đánh giá tương quan kiểu gen - kiểu hình đã được đề xuất bởi Krone và cộng sự (2000) [57], tác giả phân kiểu gen làm 4 nhóm đột biến (“null” hay 0, A, B, và C) dựa trên hậu quả về chức năng được dự đoán và tính giá trị dự báo dương tính (predictive positive value - PPV) cho 4 nhóm. Kiểu hình được dự báo kết hợp với các nhóm 0 và A là thể cổ điển MM, với nhóm B là cổ điển NHĐT, và nhóm C là thể không cổ điển. Thể cổ điển MM kết hợp với các allele đột biến xóa đoạn/hoán vị gen hoặc các đột biến điểm có hoạt độ enzym <1% so với bình thường (nhóm 0 và A trên hình 1.7); các thể lâm sàng khác phụ thuộc vào sự có mặt của các allele đột biến có hoạt độ enzym tăng dần: khoảng 1-5% đối với thể cổ điển NHĐT (đột biến nhóm B) và 15-60% đối với thể không cổ điển (đột biến nhóm C) (hình 1.7)



Hình 1.7. Hoạt độ enzym theo các nghiên cứu *in vitro* của gen *CYP21A2*. Các nhóm đột biến theo phân loại của Krone và cộng sự (2000) [57].

Bảng 1.4. Biểu hiện nam hoá bộ phận sinh dục ngoài theo mức độ nặng của Prader (0-V) của từng nhóm kiểu gen

Nhóm đột biến	0	A	B	C
Thể lâm sàng	Mất muối		Nam hóa đơn thuần	Không cổ điển
Tác giả				
Speiser 1992 [109]	II-IV (IV)	III-V (IV)	I-IV (III)	0-IV (0)
Wedell 1994 [7]	III-IV	II-V	I-IV	
Jaaskelainen 1997 [110]	II-V	0-V	II-V	0
Krone 2000 [57]	III-V (IV)	II-V (IV)	II-V (III)	0-IV (0)

Về mặt hình thể của bộ phận sinh dục ngoài: trong khi nhóm đột biến C có khả năng dự báo cao là không có nam hoá bộ phận sinh dục ngoài. Tuy nhiên, không có khả năng dự báo rõ ràng đối với mức độ nam hoá đối với các đột biến thuộc nhóm '0', 'A', và 'B'. Trên thực tế thì mức độ nam hoá nặng

hơn thường có ở các bệnh nhân có kiểu gen nặng nhất [111]. Các mức độ nam hoá từ Prader II đến V được báo cáo ở mỗi nhóm đột biến [9] (bảng 1.4).

Đối với các đột biến mới được phát hiện thì đánh giá mối tương quan với kiểu hình của bệnh nhân là một thử thách, hầu hết các bệnh nhân có đột biến mới là các đột biến sai nghĩa. Để đánh giá chức năng của protein với các đột biến mới thì cần thử nghiệm gây đột biến (mutagenesis) ở vị trí trực tiếp, tiếp theo là phân tích biểu hiện gen *in vitro*. Các phương pháp này rất có ích giúp đánh giá mức độ nặng của lâm sàng với hoạt độ enzym bị mất do đột biến gây ra [78],[99],[112]. Tuy nhiên các phương pháp trên khó thực hiện thường quy ở các labo. Thay vào đó các thử nghiệm có thể được hoàn thiện nhờ các nghiên cứu dựa vào máy tính để đánh giá hậu quả về mặt cấu trúc và chức năng của các đột biến của *CYP21A2* trên các protein P450c21. Cấu trúc và chức năng của enzym đột biến có thể được dự báo dựa trên khuôn mẫu phân tử và các phương pháp mô phỏng động học phân tử [113],[114],[115],[116],[117]. Kết quả của các phân tích này cho phép nghiên cứu tương quan kiểu gen/kiểu hình và giúp phân biệt thể không cổ điển với thể cổ điển NHĐT [113].

Vì hầu hết các bệnh nhân là dị hợp tử kép với 2 hoặc nhiều hơn các đột biến khác nhau trên 2 allele, mức độ nặng của bệnh phụ thuộc chính vào đột biến gây tổn thương hoạt độ enzym ít nhất (tức là đột biến nhẹ nhất) [7],[109]. Tuy nhiên, vai trò của đột biến thứ hai được ghi nhận đối với các bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử kép trong đó một đột biến nhẹ và đột biến nặng thường có kiểu hình lâm sàng nặng hơn là kiểu hình của các bệnh nhân mang hai allele đột biến nhẹ [118].

Một số nhỏ các bệnh nhân kiểu gen và kiểu hình không có sự tương quan với nhau rất có thể là do các lý do sau: trạng thái ẩn của allele kèm với dự báo quá mức đặc biệt với đột biến đồng hợp tử trên intron 2 (I2g) [71]; khác nhau về số lượng bản sao với lặp đoạn *CYP21A2*, điều này dẫn đến thiếu sót khi

nhận định kết quả các allele thiếu 21-OH [37]; và không phân tích vùng promoter kết hợp với đột biến p.P30L, bất thường này dẫn đến chuyển kiểu hình sang dạng nặng hơn của bệnh [119].

Kiểu gen phân tử của *CYP21A2* cũng có mối tương quan với nồng độ metanephrine là chất đánh giá chức năng tủy thượng thận. Trên thực tế, nồng độ metanephrine ($\leq 18,5$ pg/ml) dự báo các đột biến nặng [120]. Thăm khám mô bệnh học của tuyến thượng thận từ 3 bệnh nhân TSTTBS cho thấy tăng sinh vỏ thượng thận, thâm nhiễm quá mức của vùng vỏ và các tế bào chromaffin. Do vậy, thiếu hụt cortisol ở bệnh nhân TSTTBS gây phát triển bất thường tủy thượng thận và thiếu hụt epinephrine. Giả thiết rằng đây cũng là yếu tố góp phần gây hạ đường máu ở bệnh nhân suy thượng thận cấp [121].

Nghiên cứu mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình sẽ cung cấp các thông tin rất hữu ích để hiểu rõ hơn về thể lâm sàng, đặc biệt phân biệt giữa thể không cổ điển và thể NHĐT ở một số trẻ trai và giữa thể NHĐT với thể MM ở một số bệnh nhân ở cả hai giới được phát hiện qua sàng lọc sơ sinh trước khi xuất hiện các triệu chứng mất muối. Sự có mặt của các đột biến nhóm “null” cũng bao hàm rối loạn chức năng của tủy thượng thận và cần thiết để phòng tránh hạ glucose máu trong các hoàn cảnh sang chấn.

1.7.2. Tính phức tạp của tư vấn di truyền đối với thiếu 21-OH

Hậu quả của sự biến đổi về số lượng bản sao ở locus của gen *CYP21A2* không chỉ gây rắc rối trong việc xác định các allele ở các bệnh nhân mà còn gây khó khăn trong việc xác định người lành mang gen và trong tư vấn di truyền. Phần lớn các nhiễm sắc thể với 3 modules RCCX mang 2 bản sao của giả gen *CYP21A1P* và 1 bản sao của gen *CYP21A2*. Tuy nhiên, một halotype có 3 đơn vị với 1 bản sao của *CYP21A1P* và 2 bản sao của *CYP21A2* cũng được mô tả, điều này cho thấy là việc hiểu biết thực trạng đột biến của mỗi gen *CYP21A2* trên cùng một nhiễm sắc thể là có tính quyết định.

Một trường hợp cụ thể, các allele với một gen *CYP21A2* mang đột biến nặng p.Q318X và một gen *CYP21A2* bình thường nằm trên cùng nhiễm sắc thể theo các nghiên cứu trước đây thì hiếm gặp [80],[122], nhưng nghiên cứu gần đây hơn lại thấy chiếm tỷ lệ tới 7% [37]. Sử dụng MLPA thì Balsamo A và cộng sự (2010) cũng ghi nhận như vậy [93]. Do vậy, mỗi khi một đột biến p.Q318X được phát hiện thì khả năng còn một gen *CYP21A2* bình thường phải được tính đến.

Hơn nữa, lặp đoạn của giả gen đã được báo cáo kết hợp với đột biến p.V281L ở 78% các allele [123]. Thông tin này phải được tính đến khi sử dụng các kỹ thuật để xác định số lượng các bản sao của gen (MLPA, Southern blot) hoặc để xác định tình trạng kết hợp *CYP21A2/CYP21A1P*. Hơn nữa, lặp đoạn của gen *CYP21A2* được báo cáo như yếu tố nguy cơ của đột biến mới xuất hiện (*de novo* mutation) [124]. Sự phức tạp nêu trên đây nhấn mạnh sự cần thiết để phân tích cấu trúc RCCX bằng việc sử dụng các kỹ thuật hiện đại để tránh sự nhầm lẫn trong chẩn đoán bệnh nhân và đánh giá nguy cơ mắc bệnh đối với những thành viên trong gia đình có liên quan.

1.7.3. Vai trò của di truyền phân tử đối với chương trình sàng lọc sơ sinh TSTTBS

Sàng lọc sơ sinh được coi là phương pháp hữu ích để chẩn đoán thể cổ điển của TSTTBS. Nhưng đôi khi gặp khó khăn khi nhận định kết quả dương tính với việc định lượng 17-OHP đơn thuần ở trẻ sơ sinh chưa có triệu chứng. Hơn nữa, sơ sinh đẻ non khỏe mạnh cũng có nồng độ các hormon cao hơn bình thường, và cho dù có giá trị giới hạn cho tuổi thai, cân nặng đối với các dấu ấn sinh học thì vẫn có khoảng 1-1,2% có dương tính giả. Những trường hợp này cần theo dõi vài tháng cho tới khi có chẩn đoán xác định hoặc nồng độ 17-OHP trở về trị số bình thường. Tình huống này góp phần làm căng thẳng tâm lý cho cha mẹ và làm tăng giá thành của chương trình sàng lọc sơ

sinh. Để cải thiện giá trị dự báo dương tính của xét nghiệm sàng lọc thì 2 tiếp cận khác nhau gần đây đã được đề xuất như bước sàng lọc thứ 2 ở những trường hợp sàng lọc sơ sinh dương tính: sử dụng phổ khối rộng (tandem mass spectrometry - TMS) [125],[126] và phân tích phân tử đối với gen *CYP21A2* [98]. Các phương pháp này đã góp phần làm giảm xét nghiệm lại bằng miễn dịch hóa sinh trong 90% các trường hợp. Phương pháp sử dụng giọt máu thấm khô trên đĩa giấy thấm để phân tích đột biến *CYP21A2* có thể được triển khai với trang thiết bị ít tốn kém hơn ở nhiều đơn vị xét nghiệm phân tử. Hơn nữa, ưu việt của phương pháp phân tích phân tử gen *CYP21A2* như là bước sàng lọc thứ hai nhưng cũng giúp khẳng định chẩn đoán di truyền đối với TSTTBS [93],[98],[127],[128],[129],[130]. Tóm lại, việc áp dụng phân tích phân tử *CYP21A2* trong chương trình sàng lọc sơ sinh sẽ giúp giảm thiểu tỷ lệ dương tính giả, giúp chẩn đoán xác định nhanh hơn và chính xác hơn ở những trẻ sơ sinh có 17-OHP tăng liên tục, giúp chẩn đoán phân biệt giữa các thể lâm sàng của bệnh đặc biệt ở trẻ trai, và giúp cho việc theo dõi các trẻ nữ nhi không có triệu chứng được tốt hơn.

1.7.4. Chẩn đoán và điều trị trước sinh ở những gia đình có nguy cơ cao thiếu 21-OH

Tư vấn di truyền trước sinh được khuyến cáo cho tất cả các gia đình có con mắc TSTTBS. Tình huống thường gặp là một gia đình có con mắc thể cổ điển của TSTTBS và bố mẹ là dị hợp tử bắt buộc của các đột biến gây thể cổ điển của gen *CYP21A2*. Trong tình huống này thì nguy cơ của mỗi lần sinh con mắc TSTTBS là 1/4 và nguy cơ 1/8 cho một trẻ gái mắc bệnh. Tuy nhiên tư vấn trước sinh cũng được khuyến cáo cho người nào của một cặp mà đã được biết là dị hợp tử với đột biến nặng của *CYP21A2* hoặc thậm chí có nguy cơ mang đột biến nặng. Điều này có thể xảy ra với các anh chị em ruột của các bệnh nhân TSTTBS hoặc ở các bệnh nhân mắc thể không cổ điển mà

chưa được phân tích di truyền trước đó (họ có thể dị hợp tử kép với một đột biến nặng của *CYP21A2*). Đối với những tình huống như vậy thì cần chỉ định phân tích di truyền cho vợ hoặc chồng [11],[17]. Kiểu gen của xóa đoạn hoặc hoán vị gen hoặc các đột biến nặng là chỉ định để chẩn đoán trước sinh và có thể điều trị trước sinh trong khi đó nếu kiểu gen là các đột biến nhẹ hơn (hoặc đồng hợp tử hoặc dị hợp tử) thì sẽ không có chỉ định. Giới tính thai nhi là một phần của chẩn đoán trước sinh thiếu 21-OH và sẽ được xem xét khi điều trị trước sinh được cân nhắc [131].

Điều trị trước sinh: Thai nhi gái mắc thể cổ điển thiếu 21-OH biểu hiện mức độ khác nhau của nam hóa bộ phận sinh dục ngoài. Quá trình nam hóa bắt đầu từ tuần thứ 8 của thời kỳ bào thai khi mà trục dưới đồi - tuyến yên - tuyến thượng thận bắt đầu hoạt động. Việc sử dụng dexamethasone ở các bà mẹ mang thai có nguy cơ cao sinh con mắc thể cổ điển thiếu 21-OH được tiến hành từ những năm 1980 [132], và có hiệu quả ngăn ngừa mơ hồ giới tính do nam hóa bộ phận sinh dục ngoài đến 85% các thai nhi gái thiếu 21-OH. Tuy nhiên, chỉ những thai nhi gái mắc bệnh cần điều trị (1/8 thai nhi), việc điều trị bằng glucocorticoid cần bắt đầu trước 8 tuần thai để phòng nam hóa bộ phận sinh dục. Các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã được nghiên cứu để phân tích DNA thai nhi lưu hành tự do (free fetal DNA - ffDNA) từ máu mẹ, hoặc từ nước ối để xác định giới tính thai nhi và góp phần thay đổi tiếp cận điều trị trước sinh. Trên thực tế, xác định giới tính thai nhi bằng phương pháp không xâm nhập đã được báo cáo có thể thành công ngay từ tuần thứ 5 của thai kỳ dựa trên đầu dò DAZ lặp lại đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y; mức chính xác của kỹ thuật này có thể đạt 100% vào tuần thứ 8 của thai kỳ. Việc xác định giới tính thai trước khi bắt đầu điều trị và số lượng các thai được điều trị không cần thiết giảm xuống từ 3 trong 4 trường hợp. Phát hiện cff DNA đã được sử dụng để loại trừ trước sinh TSTTBS trong các nghiên cứu đầu tiên

của Chiu và cộng sự (2002). Với việc sử dụng các kỹ thuật mới thì phân tích *CYP21A2* từ dịch cơ thể người mẹ có khả năng đối với cả hai giới, và những tiến bộ hơn nữa về điều trị trước sinh bằng dexamethasone cho các gia đình có nguy cơ mắc TSTTBS sẽ đạt được hiệu quả. Tóm lại, tiến bộ vượt bậc trong những năm gần đây là việc ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến đã cho phép chọn lọc điều trị trước sinh chỉ ở thai nhi gái mắc bệnh bằng việc phân tích *CYP21A2* của thai nhi từ máu mẹ ở giai đoạn sớm của thai kỳ [15],[133],[134],[135],[136].

1.8. Nghiên cứu về di truyền phân tử trên các bệnh nhân TSTTBS ở Việt Nam

Những nghiên cứu về đột biến gen *CYP21A2* trên các bệnh nhân TSTTBS ở Việt Nam được bắt đầu từ những năm 2000. Võ Kim Huệ và cộng sự (2000) [137], Thái Thiên Nam (2002) và cộng sự đã ứng dụng kỹ thuật PCR để sàng lọc đột biến mất 8 bp ở các bệnh nhân mắc TSTTBS ở Việt Nam cũng như các thành viên trong gia đình của những bệnh nhân này [138]. Trần Kiên Hào và cộng sự (2006) cũng ứng dụng kỹ thuật PCR để sàng lọc một số đột biến phổ biến trên các bệnh nhân TSTTBS tại Bệnh viện Nhi Trung ương [139]. Nghiên cứu phát hiện dị hợp tử và chẩn đoán trước sinh cho các bệnh nhân TSTTBS được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội và tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2008 và trở thành thực hành lâm sàng thường quy. Ngô Thu Hương và cộng sự (luận án nghiên cứu sinh. 2015) đã nghiên cứu phát hiện người lành mang gen và chẩn đoán trước sinh cho các người mẹ có nguy cơ sinh con thiếu 21-OH. Các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại như MLPA đã được ứng dụng để phát hiện các đột biến xóa đoạn, và kỹ thuật giải trình tự gen đã được áp dụng để phát hiện các đột biến điểm trên các bệnh nhân, thành viên gia đình và DNA thu được từ bệnh phẩm nước ối trong các trường hợp chẩn đoán và điều

trị trước sinh [140],[141]. Những nghiên cứu về kiểu hình hiếm, đặc biệt như khối u thượng thận cũng được nghiên cứu ở các bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH đã được khẳng định bằng kết quả phân tích đột biến gen *CYP21A2* [142]. Trong những năm gần đây, các nghiên cứu về điều trị cho các lứa tuổi khác nhau cũng được tiến hành, trong đó có ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán và điều trị từ giai đoạn bào thai (điều trị trước sinh) cũng như điều trị ở giai đoạn trưởng thành. Điều đặc biệt và cũng là niềm hy vọng cho hơn 400 bệnh nhân nữ mắc TSTTBS đang được quản lý tại Bệnh viện Nhi Trung ương là đã có 3 người mẹ mắc bệnh đã sinh con bình thường và khỏe mạnh [141]. Ngoài các nghiên cứu về đột biến gen *CYP21A2* ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị trước và sau sinh thì các nghiên cứu di truyền phân tử và kiểu hình cũng được tiến hành đối với các thể hiếm của TSTTBS như thiếu 11 β -hydroxylase [143],[144],[145]; và thiếu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase typ 2 [146]. Những nghiên cứu này cung cấp bức tranh toàn diện hơn về các thể bệnh TSTTBS do thiếu các enzym khác nhau đang lưu hành ở Việt Nam. Vũ Chí Dũng và cộng sự công bố chẩn đoán phân loại thể thiếu các enzym đặc hiệu khác nhau trên 715 bệnh nhân TSTTBS bao gồm 375 trẻ trai (52%) và 340 (48%) trẻ gái tại Bệnh viện Nhi Trung ương, trong đó thể thiếu 21-OH là 703 bệnh nhân (98,3%); thiếu 11-OH là 9 bệnh nhân (1,3%) và thiếu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase typ 2 là 3 bệnh nhân (0,4%) [147]. Cả 3 bệnh nhân mắc thể hiếm của thiếu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase typ 2 đều được khẳng định bằng phân tích đột biến gen *HSD3B2* và đã phát hiện được các bệnh nhân này mang đột biến mới đồng hợp tử của gen [146]. Những nghiên cứu này bổ sung cho dữ liệu ngân hàng gen đặc biệt với các bệnh hiếm bởi cho đến nay chỉ khoảng 60 bệnh nhân mắc thể TSTTBS hiếm do đột biến *HSD3B2* được báo cáo trên y văn thế giới.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

212 bệnh nhân thuộc 204 gia đình (8 gia đình có 2 con mắc bệnh), tuổi từ 3 giờ đến 31 tuổi được khám, chẩn đoán TSTTBS thiếu 21-OH, điều trị và theo dõi tại khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương từ 01/1/2011 đến 31/10/2016.

2.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân

- Tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm: theo tiêu chuẩn của Nimkarn S, New MI và cộng sự (cập nhật 2016) [28]:

+ Trẻ gái: có nam hóa được phát hiện khi sinh hoặc nam hóa sau sinh, tăng trưởng sớm chiều cao và tuổi xương.

+ Trẻ trai: dậy thì sớm giả, tăng sớm chiều cao và tuổi xương.

+ Cả hai giới: có biểu hiện mất muối những tuần đầu sau sinh: mất nước, hạ natri và clo, tăng kali huyết thanh.

+ Tăng 17-OHP huyết thanh vào lúc sáng sớm:

Trẻ sơ sinh ≥ 1 ng/ml (bình thường < 1 ng/ml) (Speiser PW và White PC. 2003) [16].

Sau tuổi sơ sinh: ≥ 2 ng/ml (Speiser PW và cộng sự. 2010) [11].

- Gia đình chấp thuận tham gia vào nhóm nghiên cứu.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Loại trừ các thể tăng sản thượng thận bẩm sinh khác (được khẳng định bằng chẩn đoán phân tử) bao gồm thiếu 11 β -hydroxylase; thiếu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase typ 2.

- Loại trừ các bệnh nhân suy thượng thận bẩm sinh do các nguyên nhân khác như giảm sản thượng thận bẩm sinh, suy thượng thận bẩm sinh do suy yên.

- Loại trừ các bệnh nhân nam dậy thì sớm giả và bệnh nhân nữ nam hóa do các nguyên nhân khác như u vỏ thượng thận nam hóa.

- Các bệnh nhân không chấp thuận tham gia nghiên cứu.

2.2. Trang thiết bị, dụng cụ và hóa chất sử dụng cho phát hiện đột biến gen *CYP21A2*

2.2.1. Trang thiết bị nghiên cứu

- Máy PCR (Eppendorf)
- Máy điện di: Mupid (Nhật Bản).
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động (Dolphin Chemi Wealtec, USA).
- Máy quang phổ kế Nano- Drop (Nhật Bản).
- Máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm các loại (Đức).
- Lò vi sóng.
- Tủ lạnh âm sâu: -30°C và - 80°C (Sanyo-Nhật Bản)).
- Máy đọc trình tự gen 3100-Avant Genetic Analyzer của hãng ABI-PRISM
- Tủ ấm.

2.2.2. Dụng cụ nghiên cứu

Dụng cụ được vô trùng tuyệt đối bằng hấp 120°C trong 20 phút.

- Pipet, đầu côn các loại.
- Ống Eppendorf các loại.

2.2.3. Hóa chất nghiên cứu

2.2.3.1. Hóa chất tách chiết DNA từ máu ngoại vi:

- Dung dịch lysis buffer
- Dung dịch K
- Dung dịch SDS 10%
- Proteinase K (10 mg/l)
- Dung dịch phenol: cloroform: isoamyl có tỷ lệ: 25: 24: 1
- Dung dịch cloroform: isoamyl có tỷ lệ: 24: 1
- Sodium acetate 3M, PH 5,2
- Ethanol tuyệt đối (100%) và Ethanol 70%
- Dung dịch TE để hòa tan DNA và bảo quản DNA sau khi tách

2.2.3.2. Hóa chất cho phản ứng PCR

- GoldenTag,
- Các cặp mồi (xuôi và ngược),
- Nước cất khử ion.

2.2.3.3. Hóa chất điện di

- Agarose
- Dung dịch TBE 10X (Khi sử dụng pha thành 1X): Tris 0,89 M, Acid Boric 0,89 M, EDTA 0,02M, dung dịch Ethyidium bromide.

2.2.3.4. Hóa chất giải trình tự gen

Sử dụng kit giải trình tự cho máy ABI 3100

- BigDye® Terminator v3.1
- BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X)
- Hi-Di™ Formamide

2.2.3.5. Hóa chất MLPA

Sử dụng SALSA kit bao gồm 9 thành phần sau

- MLPA buffer: 200:1
- Ligase-65: 120.1
- Ligase-65 buffer A: 400.1
- Ligase-65 buffer B
- PCR buffer: 600.1
- PCR primer mix: 250.1
- Tag polymerase: 75.1
- Đệm hòa loãng enzym - Enzym dilution buffer: 250.1
- Probemix: 160.1 (đặt trước theo trình tự đoạn gen đích).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu một loạt các ca bệnh (case series study), nội dung nghiên cứu bao gồm: kiểu hình (đánh giá tại thời điểm chẩn đoán, theo dõi tiến cứu và hồi cứu), phát hiện đột biến gen *CYP21A2*, phân tích kiểu gen và tương

quan kiểu gen – kiểu hình. Chọn mẫu theo phương pháp thuận tiện trên cơ sở bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn lựa chọn và các tiêu chuẩn loại trừ.

Kiểu hình lâm sàng: được tiến hành tại Khoa Nội tiết – Chuyển hóa – Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương, mỗi bệnh nhân có hồ sơ nghiên cứu riêng: vẽ phả hệ gia đình, khai thác tiền sử, bệnh sử, khám lâm sàng toàn diện: đo chiều cao đứng đối với trẻ ≥ 2 tuổi và chiều dài nằm với trẻ < 2 tuổi hoặc trẻ không thể đứng bằng thước SECA, cân nặng, phát hiện các triệu chứng xạm da, mất nước, khám bộ phận sinh dục ngoài gồm phân loại mức độ nam hóa theo Prader (phụ lục 2), đánh giá các giai đoạn dậy thì của Tanner bao gồm: các giai đoạn phát triển lông mu ở cả hai giới; các giai đoạn phát triển tuyến vú ở bệnh nhân nữ; đo chiều dài và chu vi dương vật; đo thể tích tinh hoàn bằng bộ dụng cụ orchidometer; phát hiện các biểu hiện khác như: giọng ồm, ria mép ở bệnh nhân nữ; cơ bắp phát triển, trứng cá ở cả hai giới.

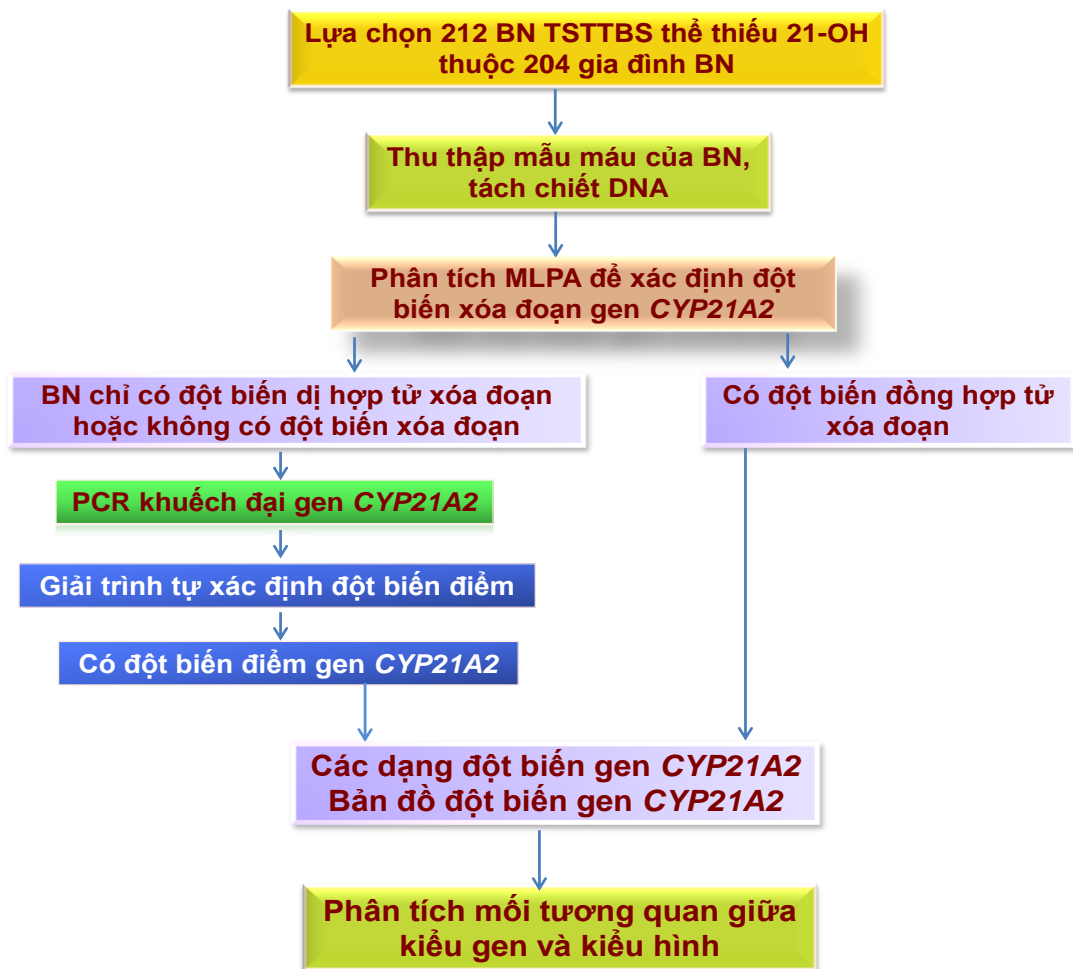
Di truyền tế bào: karyotype băng G, tiến hành tại Khoa Xét nghiệm Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương, chỉ định để xác định giới khi có mơ hồ giới tính: bệnh phẩm 2 ml máu ngoại vi chống đông bằng heparin.

Chẩn đoán hình ảnh: tại Khoa chẩn đoán hình ảnh, Bệnh viện Nhi Trung ương bao gồm: siêu âm tiểu khung phát hiện tử cung và buồng trứng cho trẻ mơ hồ giới tính, siêu âm thượng thận, chụp Xquang tuổi xương cho trẻ > 3 tuổi và nhận định kết quả dựa trên atlas của Greulich và Pyle.

Các xét nghiệm sinh hóa được tiến hành tại Khoa Sinh hóa, Bệnh viện Nhi Trung ương, bệnh phẩm 2 ml máu ngoại vi chống đông bằng heparin được thu thập trước khi điều trị hormon thay thế, bao gồm: điện giải đồ huyết thanh (nồng độ Na^+ , K^+ và Cl^-) theo phương pháp điện cực chọn lọc ion gián tiếp, sử dụng máy tự động Beckman Coulter AU2700/ AU 680. Định lượng các hormon ACTH, cortisol, testosterone, androstenedione được tiến hành với các kit thương mại. Định lượng 17-OHP ở điều kiện cơ bản và sau kích thích ACTH (1 giờ sau tiêm tĩnh mạch 250 μg ACTH tổng hợp – Cortrosyn) ở

những bệnh nhân mà xét nghiệm ở điều kiện cơ bản không rõ chẩn đoán bằng phương pháp ELISA, kit của hãng DRG và máy đọc Elx808.

Phân tích đột biến gen *CYP21A2* được tiến hành tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội và tại Khoa Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương. Các bước tiến hành theo hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.3.1. Thu thập và tách chiết mẫu nghiên cứu

2.3.1.1. Quy trình thu thập mẫu máu tĩnh mạch

Các đối tượng nghiên cứu bao gồm: bệnh nhân (proband hay ca chỉ điểm), anh chị em ruột có triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm của TSTTBS

thiếu 21-OH, bố/mẹ bệnh nhân và nhóm đối chứng được thu thập 2 ml máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA 1,5 mg/mL. Quy trình đảm bảo tuyệt đối vô trùng.

2.3.1.2. Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số từ máu ngoại vi

DNA được tách chiết theo phương pháp thường quy Phenol/Chloroform

- Cho 0,5 ml máu toàn phần chống đông EDTA vào ống eppendorf 1,5 ml; thêm vào 0,5 ml dung dịch lysis buffer, để trên đá 10 phút, ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, bỏ dịch và thu cặn.

- Cho vào 0,5 ml dung dịch K, ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ dịch và thu cặn.

- Cho vào 0,5 ml lysis buffer; 12,5µl SDS 10%; 10 µl Protease K; ủ ở 56°C trong 2÷3 giờ. Cho 0,5 ml dung dịch Phenol: Chloroform : Isoamyl; ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; hỗn hợp được chia làm 3 phần: lớp dung dịch phía trên có chứa DNA, lớp giữa gồm các thành phần của tế bào, lớp dưới cùng là dịch chiết. Hút lấy phần dịch trên cùng chứa DNA và tiến hành lặp lại bước chiết suất này một lần nữa để đảm bảo không còn tạp chất trong mẫu DNA.

- Cho vào dung dịch mẫu DNA 0,5 ml chloroform: Isoamyl, ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Hút lấy phần dịch trên cùng và tiến hành lặp lại một lần nữa.

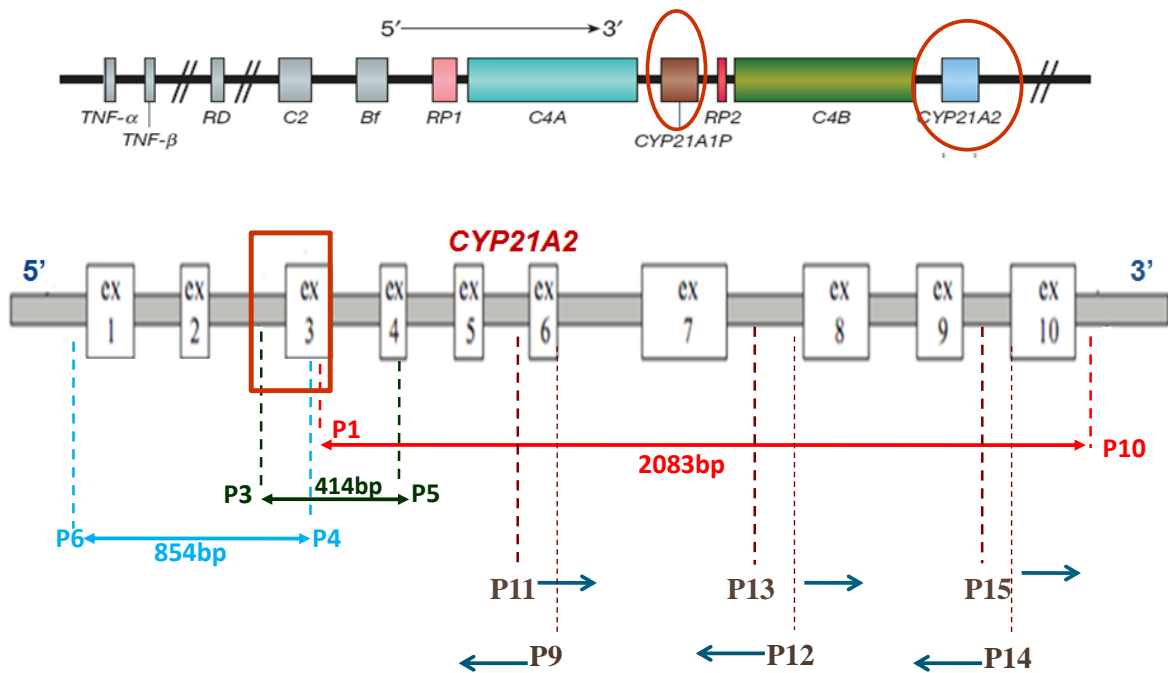
- Rửa DNA bằng 1ml alcol tuyệt đối, thêm 50 µl Na acetat, để lạnh qua đêm ở -20°C. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, bỏ dịch trên, thu rửa.

- Rửa rửa bằng cồn 70°. Rửa DNA được hoà tan bằng 50 microlit nước tinh khiết hoặc TE. Dung dịch DNA sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm.

2.3.2. Xác định đột biến gen *CYP21A2*

2.3.2.1. 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 sử dụng cho PCR và giải trình tự gen

- *Thành phần phản ứng*: thể tích 20 μ l gồm: 100 ÷ 150 ng DNA, 5 pmol primer, 200 μ mol/l dNTP, 2 đơn vị enzym Taq polymerase và 2 μ l GeneAmp 10 x buffer.

- *Chu trình nhiệt*: 94°C/5phút, [94°C/1phút, 60°C/1phút, 72°C/1phút] x 35 chu kỳ, 72°C/2 phút, giữ ở 15°C.

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

2.3.2.2. Kỹ thuật giải trình tự gen

Sản phẩm PCR sau khi điện di trên gel agarose được tinh sạch bằng Gel purification Kit trước khi tiến hành giải trình tự gen. Để giải trình tự được toàn bộ gen *CYP21A2*, sử dụng các mồi như đã mô tả ở bảng 2.1. Quy trình được thực hiện theo phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

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)

Bảng 2.1. Trình tự mỗi dùng cho phản ứng PCR và giải trình tự gen

Tên mỗi	Trình tự mỗi (5' - 3')	Vị trí
P1	GGACCTGTCCTTGGGAGACTAC	Exon 3
P3	AGGTCAGGCCCTCAGCTGCCTTCA	Exon 3
P4	GGCTTTCCAGAGCAGGGAGTAGTC	Exon 3
P5	TCTCCGAAGGTGAGGTACCAG	Exon 4
P6	TCGGTGGGAGGGTACCTGAA	Promoter
P9	AGCTGCATCTCCACGATGTGA	Exon 6
P10	CTGAGGTACCCGGCTGGCATCGGT	Intron 10
P11	CCTTCCCACAGCTGCATTCTCATGC	Intron 5
P12	GTGAGCCTGAGTGCCGGTGAGG	Intron 7
P13	GCAAAAGGCTCCTTCCCAGCAAC	Intron 7
P14	CCTGGCTCCAGGAACGATC	Intron 9
P15	CGTGAAAATGTGGTGGAGGCTGGT	Intron 9

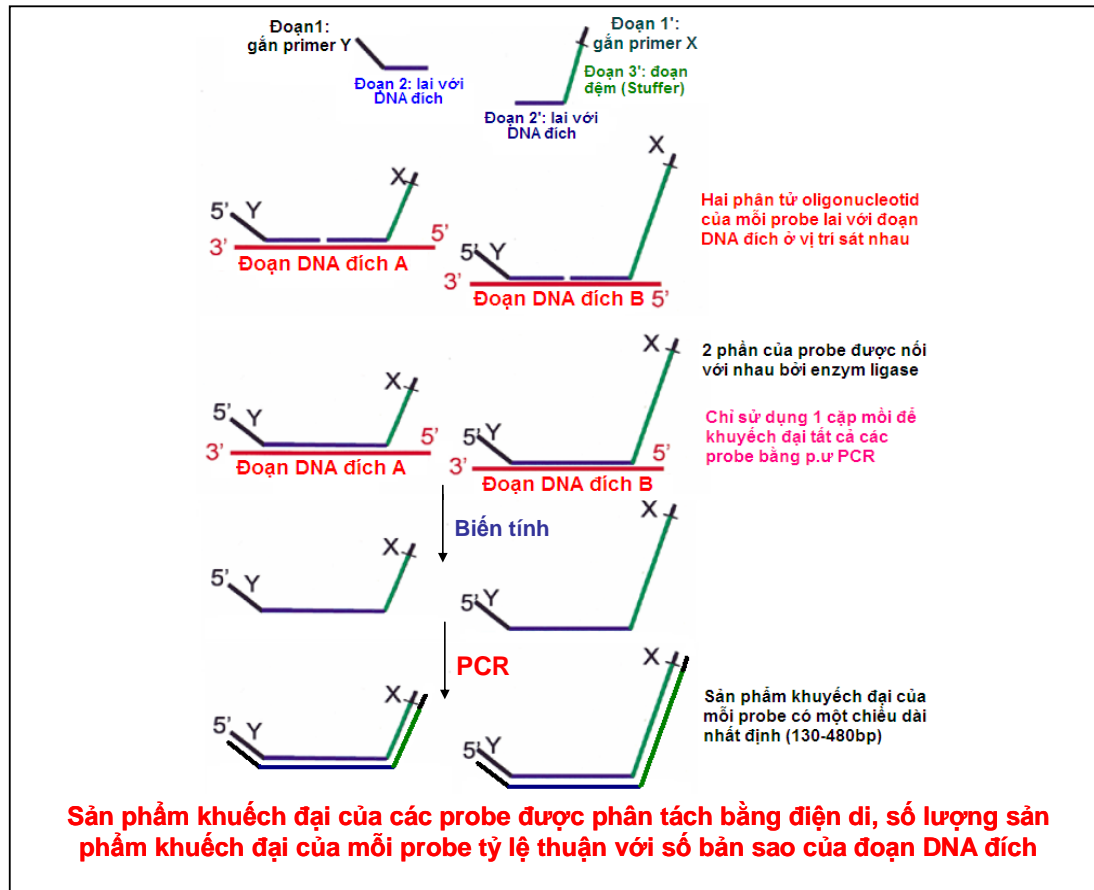
2.3.2.3. Kỹ thuật MLPA

- *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).

+ 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.



Hình 2.3. Các giai đoạn của kỹ thuật MLPA

(Schouten JP và cộng sự 2002) [87]

+ 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.

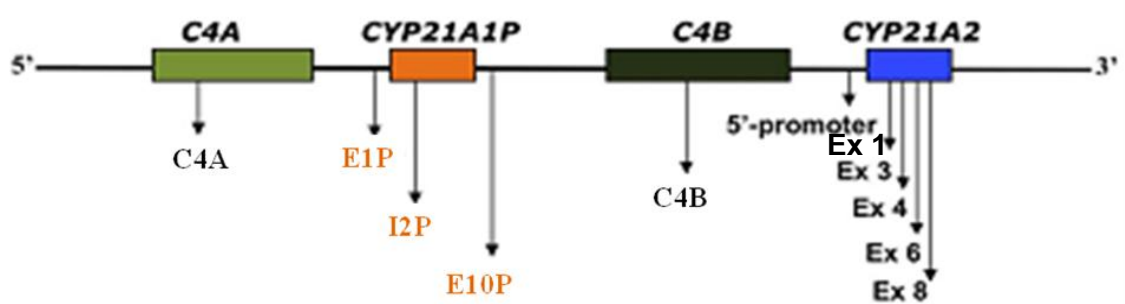
Trong mỗi phản ứng có chứa các probe nội chuẩn, khi probe nội chuẩn lên đỉnh tương ứng là điều kiện đảm bảo độ tin cậy khi nhận định kết quả. Ngoài ra trong kỹ thuật MLPA có sử dụng chứng là DNA của người bình thường, chạy song song cùng mẫu bệnh nhân để so sánh.

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.

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 xóa đoạn đoạn 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. Vị trí và kích thước của các probe được mô tả như bảng 2.2.

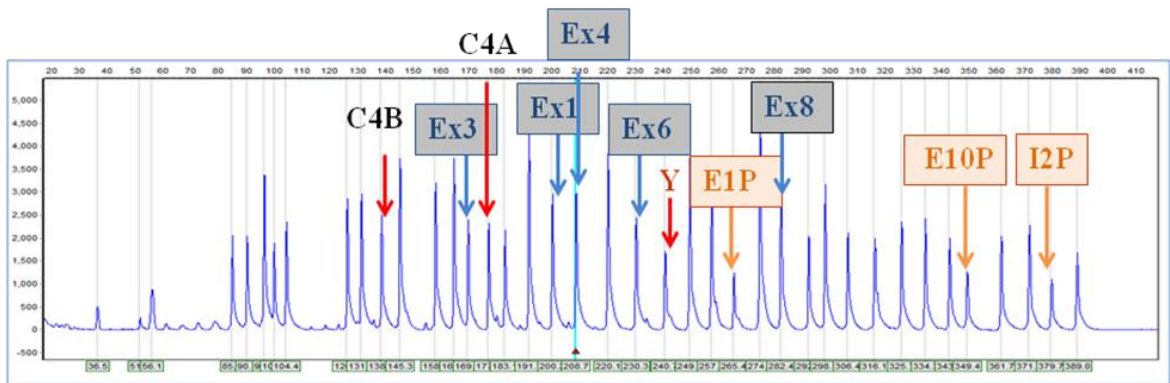
Bảng 2.2. Tên, kích thước và vị trí của các sản phẩm PCR trong Kit MLPA P050B2 (MRC- Holland)

STT	Tên probe	Vị trí của probe trên gen	Kích thước (bp)
1	X-fragment	X chromosome	100
2	C4B probe 02357-L02586	C4B Exon 19	154
3	CYP21A2 probe 01974-L01507	Exon 3	172
4	C4A probe 04802-L04177	C4A Exon 26	178
5	CYP21A2 probe 04804-L04179	Exon 1	202
6	CYP21A2 probe 01975-L01508	Exon 4	210
7	CYP21A2 probe 01976-L01509	Exon 6	229
8	UTY probe 01071-L00464	Yq11	240
9	CYP21A1P probe 04805-L04180	5' exon 1	265
10	CYP21A2 probe 05477-L04895	Exon 8	283
11	CYP21A1P probe 04807-L04182	Exon 10	352
12	CYP21A1P probe 04806-L04181	Intron 2	382



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

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.



Hình 2.5. Hình ảnh minh họa kết quả MLPA

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 hoặc đột biến dạng dị hợp tử khi chiều cao đỉnh bằng 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.

- Tiến hành phản ứng MLPA

+ Bước 1: Biến tính DNA

Cho 5ul dung dịch DNA (nồng độ 10÷20 ng/μl) 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: tổng số thể tích hỗn hợp lai là 3 μl bao gồm: dung dịch đệm MLPA (1,5 μl) và hỗn hợp probe (1,5 μl).

- Cho 3 μl 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

Bảng 2.3. Thành phần dung dịch đệm gắn probe

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
Tổng số	32 μl

- 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.

2.3.3. Nhận định và đánh giá các đột biến của gen CYP21A2

2.3.3.1. Viết danh pháp các đột biến

Các đột biến phát hiện được ở các bệnh nhân được viết theo danh pháp ở dạng thay đổi của nucleotid trong phân tử cDNA và ở dạng thay đổi của protein đột biến theo danh pháp “Genome Variation Nonmenclature”

(<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Đối với cDNA thì danh pháp được đánh số bắt đầu từ nucleotid A của bộ ba mã hóa cho acid amin đầu tiên (HGVS Recommendations for the description of sequencing variants: 2016 update. Hum Mutat. 2016).

2.3.3.2. Nhận định các đột biến

Trình tự gen *CYP21A2* thu được sau khi giải trình tự cho các bệnh nhân nghiên cứu sẽ được so sánh với trình tự gen *CYP21A2* tham khảo ở “reference sequencing NM_000500.2”

Các đột biến của *CYP21A2* phát hiện được ở các bệnh nhân nghiên cứu sẽ được so sánh với dữ liệu từ Human Gene Mutation database (HGMD)

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=CYP21A2> và so sánh với dữ liệu của uỷ ban danh pháp Cytochrome P450 allele người. Gen *CYP21A2* tại <http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>

Đối với các đột biến chưa được báo cáo tại các cơ sở dữ liệu trên đây sẽ được kiểm tra đối chiếu với dữ liệu tại 1000 genomes database tại "MutationTaster". <http://www.mutationtaster.org>. Đột biến nào chưa được báo cáo tại các cơ sở dữ liệu trên đây sẽ được coi là đột biến mới (novel mutation) hay đột biến chưa được báo cáo (unreported mutation).

2.3.4. Đánh giá kiểu hình của các bệnh nhân và mối tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình

1.3.4.1. Đánh giá kiểu hình

Đánh giá kiểu hình: dựa trên kết quả các dữ liệu nghiên cứu lâm sàng (tại thời điểm chẩn đoán, tiền sử và diễn biến trong quá trình theo dõi điều trị), chẩn đoán hình ảnh và xét nghiệm sinh hóa. Đối với các bệnh nhân được chẩn đoán sớm (< 5 ngày sau sinh) và được điều trị hormon thay thế sớm, trước khi có các biểu hiện mất muối trên lâm sàng, và bất thường điện giải đồ huyết thanh thì đánh giá thể mất muối dựa trên theo dõi diễn biến trong quá trình theo dõi điều trị, và khẳng định thể MM khi bệnh nhân có các biểu hiện

suy thượng thận cấp, mất nước, mất muối (Na^+ huyết thanh hạ và K^+ huyết thanh tăng cao). Phân loại kiểu hình: theo tiêu chuẩn lâm sàng và hóa sinh của Pang S, Clark A. 1993 [26].

- Thể cổ điển mất muối (MM): cả ở trẻ trai và trẻ gái có biểu hiện chậm tăng cân/sụt cân sau đẻ, nôn, mất nước, Na^+ huyết thanh < 130 mmol/l, hoặc 130-135 mmol/l kết hợp với K^+ huyết thanh $> 5,5$ mmol/l, tăng hoạt độ renin. Kết hợp với nam hóa bộ phận sinh dục ngoài, mơ hồ giới tính (mức độ nặng theo phân loại của Prader) ở trẻ gái (phụ lục 2) [17]. Nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng > 100 ng/ml.

- Thể cổ điển nam hóa đơn thuần (NHĐT): mơ hồ giới tính ở trẻ gái, dậy thì sớm ngoại biên ở trẻ trai, tăng chiều cao và tuổi xương ở cả hai giới, không có biểu hiện lâm sàng của mất muối, hoạt độ renin không tăng, điện giải đồ huyết thanh bình thường. Nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng > 100 ng/ml.

- Thể không cổ điển: không có hoặc nam hóa nhẹ bộ phận sinh dục ngoài sau sinh ở trẻ gái, các triệu chứng của tăng androgen sau sinh như: mọc lông mu và lông nách sớm ở tuổi tiền dậy thì ở cả trẻ trai và gái, rậm lông và rối loạn vòng kinh ở tuổi vị thành niên. Nồng độ 17-OHP huyết thanh trước kích thích bằng ACTH từ 2 - 100 ng/ml, 60 phút sau kích thích bằng ACTH từ 10 - 100 ng/ml.

2.3.4.2. Đánh giá mối tương quan kiểu gen - kiểu hình

Để đánh giá tương quan kiểu gen - kiểu hình, các đột biến gây bệnh được chia thành 4 nhóm dựa theo dữ liệu về hoạt độ 21-OH đã được nghiên cứu *in vitro* và đã được đề xuất bởi Krone N và cộng sự có bổ xung [57].

- Nhóm “null” (0): bao gồm các bệnh nhân mang các đột biến gây mất toàn bộ hoạt độ enzym: xóa đoạn, exon 6 cluster, p.L307FfsX6, p.Q318X, p.R356X, và các đột biến mới gây lệch khung dịch mã trên cả 2 allele.

- Nhóm A: bao gồm các bệnh nhân đồng hợp tử đột biến trên intron 2 (c.290-13A/C>G hay I2g), hoặc có một allele là đột biến I2g và allele khác là

đột biến trong nhóm “null”. Đột biến I2g được biết là còn lượng hoạt độ enzym rất nhỏ.

- Nhóm B: bao gồm các bệnh nhân mang đột biến p.I172N (hoạt độ enzym còn khoảng 2%) đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép với các đột biến của nhóm “null” hoặc A, hoặc hoán vị gen promoter + p.P30L.

- Nhóm C: bao gồm các bệnh nhân mang đột biến p.P30L, p.V281L (còn khoảng 20-60% hoạt độ enzym) đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép với các đột biến của nhóm “null”, hoặc A, hoặc B.

- Nhóm D: bao gồm các bệnh nhân mang các đột biến chưa đánh giá được ảnh hưởng của đột biến trên hoạt độ enzym và các bệnh nhân chưa xác định được đột biến.

Kiểu hình được dự báo kết hợp với các nhóm kiểu gen “null” và A là thể cổ điển MM, với nhóm kiểu gen B là cổ điển NHĐT, và nhóm kiểu gen C là thể không cổ điển.

Giá trị dự báo dương tính (positive predictive value – PPV) được tính bằng số bệnh nhân có kiểu hình đúng như dự báo của mỗi nhóm kiểu gen chia cho tổng số bệnh nhân của nhóm đó và nhân với 100. Cụ thể như sau:

$PPV-0 = \frac{n \text{ bệnh nhân thể MM của nhóm "null"}}{\text{tổng số bệnh nhân có kiểu gen thuộc nhóm "null"}} \times 100;$

$PPV-A = \frac{n \text{ bệnh nhân thể MM trong nhóm A}}{\text{tổng bệnh nhân có kiểu gen thuộc nhóm A}} \times 100;$

$PPV-B = \frac{n \text{ bệnh nhân thể NHĐT trong nhóm B}}{\text{tổng số bệnh nhân có kiểu gen thuộc nhóm B}} \times 100;$

$PPV-C = \frac{n \text{ bệnh nhân thể không cổ điển trong nhóm C}}{\text{tổng số bệnh nhân có kiểu gen thuộc nhóm C}} \times 100.$

Để đánh giá tương quan giữa mức độ nặng của nam hóa bộ phận sinh dục ngoài với kiểu gen của các bệnh nhân nữ thì tỷ lệ của các mức độ nam hóa giữa các nhóm kiểu gen khác nhau được so sánh.

Để đánh giá tương quan kiểu gen và kiểu hình dấu ấn sinh học nồng độ 17-OHP, testosterone, progesterone và điện giải đồ trong huyết thanh thì trị số trung bình, trung vị của nồng độ các chất này trong huyết thanh của các bệnh nhân của từng nhóm kiểu gen “null”, A, B, C được so sánh với nhau.

2.3.5. Xử lý số liệu thống kê

Sử dụng phần mềm SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Các số liệu được diễn tả dưới dạng các phân bố về tần số (frequency distributions) hoặc các tham số thống kê mô tả và được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm, hoặc trị số trung bình \pm SD và trung vị. Tỷ lệ nam/nữ trong từng kiểu hình được so sánh sử dụng test binomial. Tuổi trung vị của các bệnh nhân nam và nữ của từng nhóm kiểu hình được so sánh với nhau sử dụng test Wilcoxon ranksum. Giá trị trung bình hoặc trung vị của các biến liên tục như nồng độ 17-OHP, testosterone, progesterone, điện giải đồ (Na^+ ; K^+ và Cl) huyết thanh của các nhóm kiểu gen được so sánh với nhau. Các giá trị trung bình được so sánh với nhau sử dụng test ANOVA nếu là phân bố chuẩn (kiểm định lại bằng test BONFERRONI); so sánh các trung vị sử dụng test KRUSKAL WALLIS nếu không phải là phân bố chuẩn. So sánh tỷ lệ phần trăm các triệu chứng lâm sàng ở các nhóm bệnh nhân theo giới tính sử dụng test χ^2 và FISHER’S EXACT (nếu n nhỏ). So sánh tỷ lệ phần trăm mức độ nam hóa giữa các nhóm kiểu gen sử dụng test FISHER’S EXACT. Giá trị $p \leq 0,05$ được coi là khác nhau có ý nghĩa thống kê.

2.4. Đạo đức trong nghiên cứu

Lợi ích đối với người bệnh: có chẩn đoán chắc chắn, có kiểu gen của bệnh nhân chỉ điểm trong gia đình là cơ sở chắc chắn của việc điều trị suốt

đòi bằng liệu pháp hormon thay thế, là cơ sở của tư vấn di truyền, chẩn đoán và điều trị trước sinh.

Lợi ích đối với khoa học: kết quả nghiên cứu sẽ là bằng chứng khoa học về dữ liệu đột biến gen *CYP21A2* ở người Việt Nam mắc TSTTBS, đóng góp cho dữ liệu về đột biến gen *CYP21A2* ở ngân hàng gen.

Giá trị đối với công tác đào tạo và thực hành lâm sàng: kết quả nghiên cứu sẽ giúp các bác sỹ lâm sàng có cơ sở chắc chắn để điều trị và quản lý bệnh nhân, có dữ liệu về y học chứng cứ trong đào tạo và thực hành. Hơn nữa, kết quả kiểu gen sẽ giúp các nhà lâm sàng cá thể hóa điều trị đối với từng bệnh nhân.

Sự chấp thuận: Đề tài được chấp thuận của hội đồng Y đức, Bệnh viện Nhi Trung ương, được sự đồng ý của bản thân bệnh nhân (tuổi trưởng thành), cha mẹ hoặc người chăm sóc đối tượng nghiên cứu và đảm bảo tính bí mật cho các đối tượng nghiên cứu.

Chương 3

KẾT QUẢ

3.1. Kết quả xác định đột biến gen *CYP21A2* và bản đồ đột biến gen *CYP21A2* của bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH

3.1.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, 212 bệnh nhân của 204 gia đình (8 gia đình có 2 con mắc bệnh) được phân tích gen *CYP21A2* xác định đột biến. Trong số 204 gia đình thì 30 gia đình có ít nhất 2 con mắc bệnh (14,7%) trong đó 25/30 gia đình có hai con mắc bệnh; 3/30 gia đình có ba con mắc bệnh và 2 gia đình có 4 con mắc bệnh.

Trong số 212 bệnh nhân thiếu 21-OH được phân tích đột biến gen *CYP21A2* thì có 97 bệnh nhân nam (45,8%) và 115 bệnh nhân nữ (54,2%); Kiểu hình thể cổ điển chiếm chủ yếu với 96,7% (205/212) trong tổng số các bệnh nhân nghiên cứu, trong đó thể cổ điển MM chiếm 78,5% (161/205) bệnh nhân, NHĐT chiếm 21,5% (44/205) bệnh nhân; thể không cổ điển chỉ gặp ở 4/212 bệnh nhân (1,9%); còn lại là 3/212 (1,4%) bệnh nhân chưa xác định được thể lâm sàng. Như vậy, có 209 bệnh nhân đã xác định được kiểu hình. Phân bố về giới, tuổi chẩn đoán, các biểu hiện lâm sàng chính của từng kiểu hình trong số 209 bệnh nhân được trình bày tóm tắt tại bảng 3.1.

Bảng 3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Các đặc điểm	Các thể bệnh					
	Mất muối n = 161		Nam hóa đơn thuần n = 44		Không cổ điển n = 4	
Giới (n; %)	Nam (86; 54,4%)	Nữ (75; 46,6%)	Nam (8; 18,2%)	Nữ (36; 81,8%)	Nam (3; 75%)	Nữ (1; 25%)
<i>p</i> (test binomial)	0,4		0,000025		0,6	
Tuổi chẩn đoán (ngày); trung vị (Min – Max)	32 (1 – 4740)		1590 (4 – 11220)		18,5 (1 – 570)	
<i>p</i> (test Kruskal-Wallis)	<i>p</i> = 0,0001					
Tuổi chẩn đoán theo giới (ngày); trung vị (Min - Max)	40 (3 - 3450)	25 (1 - 4740)	1710 (1170 - 2700)	1545 (4-11220)	6 (1 – 31)	570
<i>p</i> (test Wilcoxon ranksum)	0,0001		0,27		0,18	
Mơ hồ giới tính		72		35		1
Suy thượng thận cấp lúc chẩn đoán	79	59	0	0		
Sàng lọc/chẩn đoán sớm < 5 ngày tuổi	1	15	0	1	3	
Tiền sử gia đình/xét nghiệm di truyền	15	16	1	6		
Dậy thì sớm /lông mu sớm	6		8	6		
Tăng trưởng sớm	6		8	27		

Nhận xét: Trẻ gái được chẩn đoán nhiều hơn trẻ trai ở thể NHĐT. Thể cổ điển MM được chẩn đoán sớm hơn thể NHĐT. Trẻ gái được chẩn đoán sớm hơn trẻ trai ở thể MM. Tỷ lệ suy thượng thận cấp tại thời điểm chẩn đoán ở trẻ trai cao hơn gái ($p = 0,017$; test χ^2). Tỷ lệ chẩn đoán sớm < 5 ngày tuổi ở trẻ gái nhiều hơn trẻ trai ở thể MM ($p = 0,0001$; test Fisher's exact).

3.1.2. Kết quả xác định đột biến gen *CYP21A2* của bệnh nhân TSTTBS

3.1.2.1. Kết quả tách chiết DNA

Tất cả các mẫu DNA thu được của các bệnh nhân nghiên cứu có nồng độ trong khoảng $100 \div 891$ ng/ μ l, độ tinh sạch ở bước sóng 260/280nm trong khoảng $1,8 \div 2,0$. Như vậy, các mẫu DNA được tách chiết có chất lượng tốt để thực hiện cho các quy trình phân tích gen tiếp theo (Phụ lục 1).

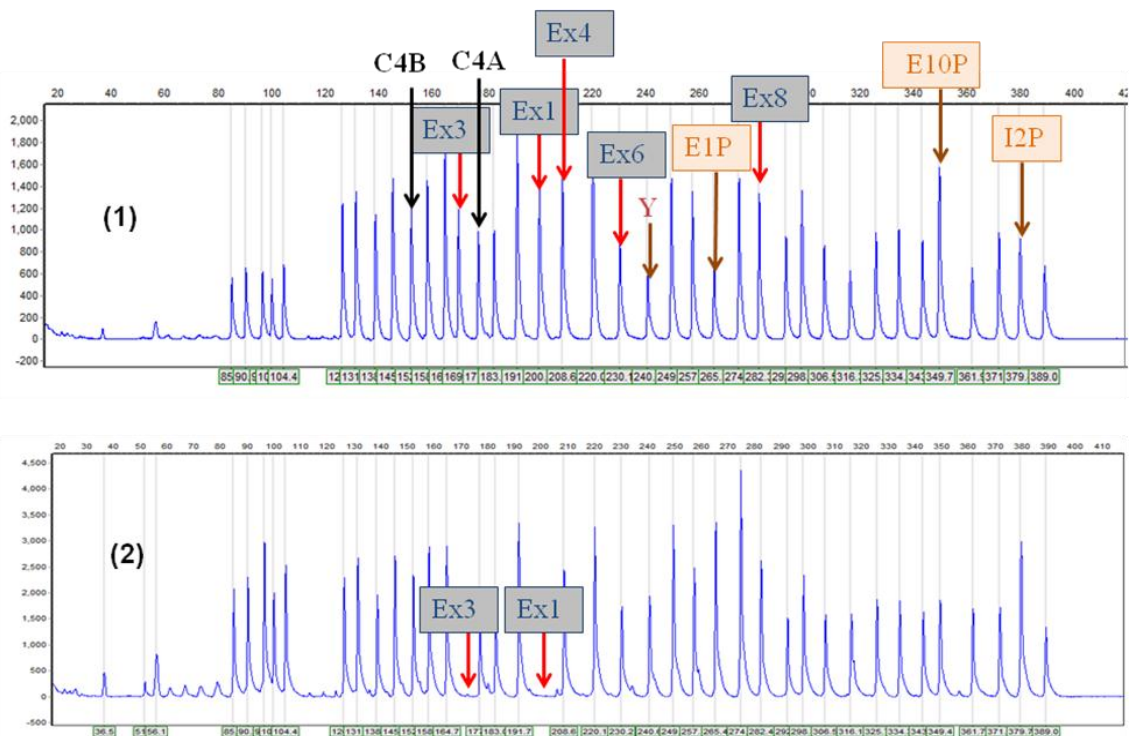
3.1.2.2. Kết quả xác định đột biến gen *CYP21A2*

Tiến hành xác định đột biến gen *CYP21A2* trên 212 bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH. Kỹ thuật MLPA được áp dụng để xác định đột biến xóa đoạn, kỹ thuật giải trình tự trực tiếp được áp dụng để phát hiện đột biến điểm.

Kết quả xác định đột biến xóa đoạn bằng kỹ thuật MLPA

Phát hiện được 8 dạng đột biến xóa đoạn khác nhau gồm các đột biến xóa một đến một vài exon hoặc có xóa đoạn toàn bộ gen *CYP21A2*.

Bệnh nhân có đột biến xóa đoạn từ exon 1 đến exon 3 gen *CYP21A2*:



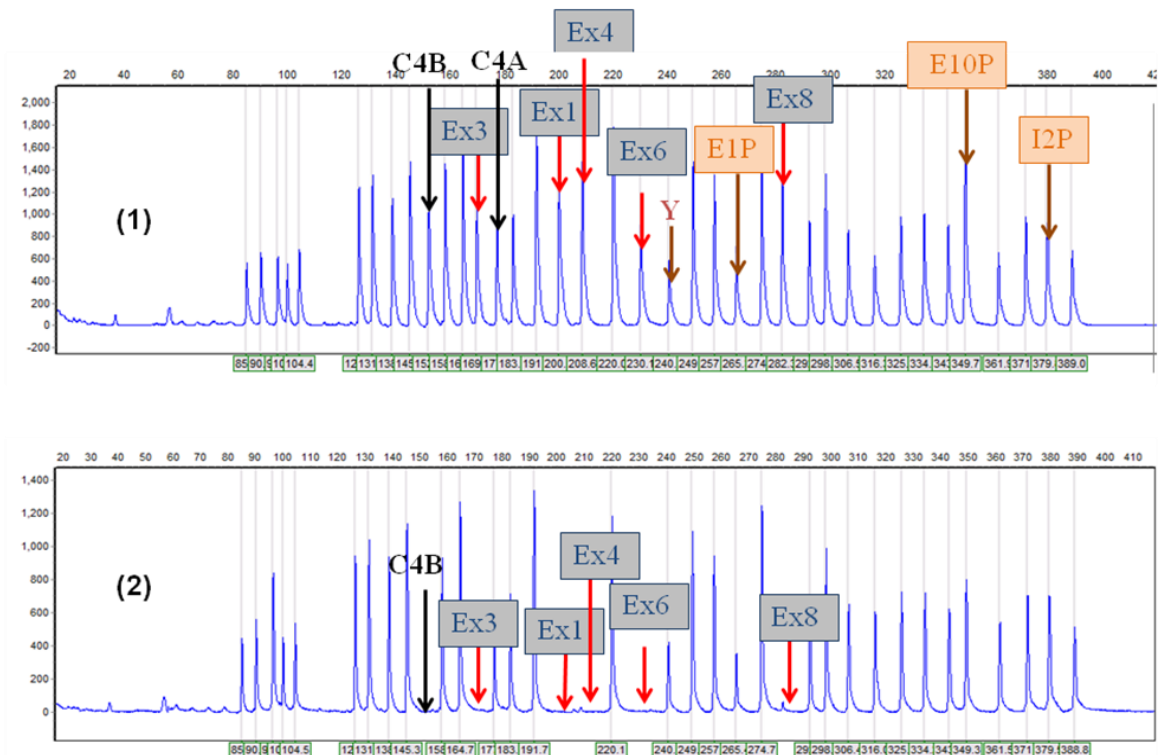
Hình 3.1. Hình ảnh xóa đoạn exon 1-3 (exon 1-3 del) gen *CYP21A2*

(1) Mẫu người bình thường; (2) Mẫu bệnh nhân mã số 52

- + 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, intron 2, và exon 10 của gen CYP21A1P
- + C4A, C4B là đỉnh tương ứng với gen C4A, C4B
- + Y là đỉnh tương ứng với NST Y

Nhận xét: Kết quả MLPA cho thấy **bệnh nhân mã số 52 bị đột biến xóa đoạn gen từ exon 1 đến exon 3 gen CYP21A2** do không xuất hiện các đỉnh tương ứng với các exon 1, 3 của gen CYP21A2 và gen C4B so sánh với kết quả của mẫu đối chứng.

Bệnh nhân có đột biến xóa đoạn từ gen C4B đến exon 8 của gen CYP21A2:



Hình 3.2. Hình ảnh xóa đoạn từ gen C4B đến exon 8 của gen CYP21A2

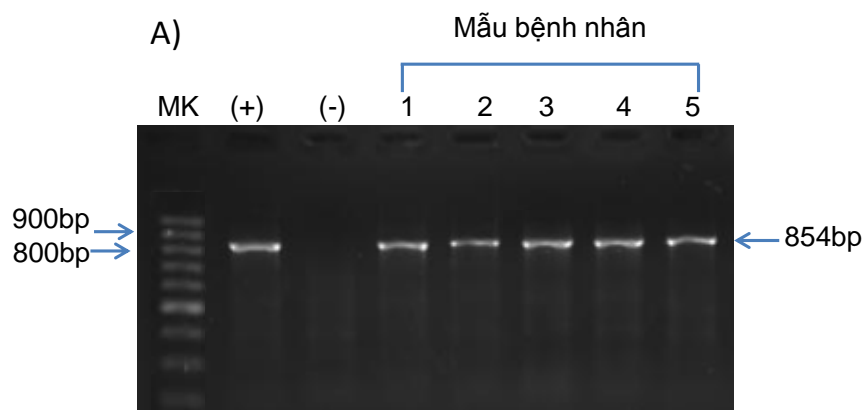
(1) Mẫu người bình thường; (2) Mẫu bệnh nhân số 90

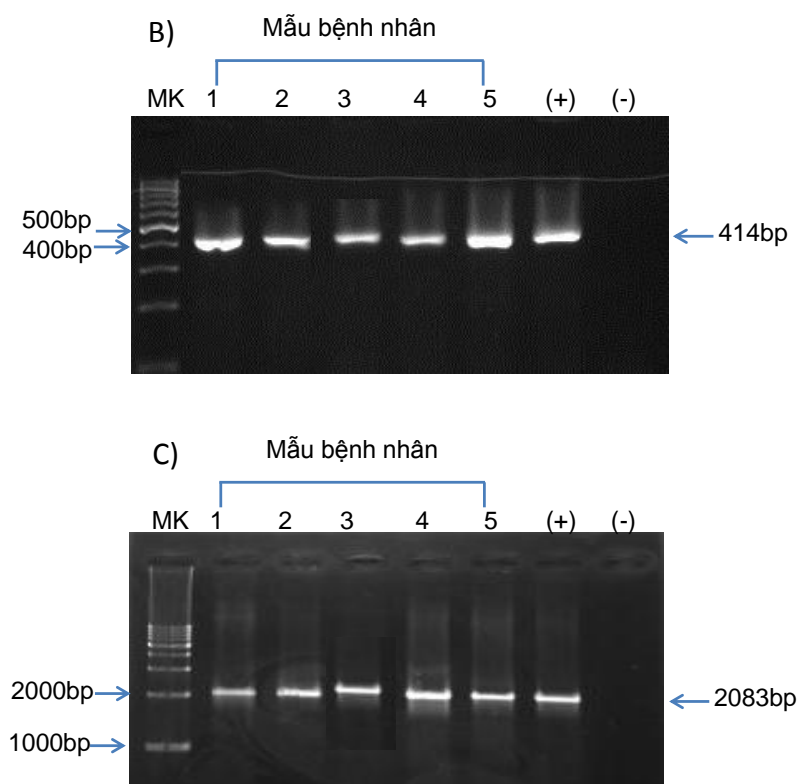
- + *Ex1, Ex3, Ex4, Ex6, Ex8*, là các đỉnh tương ứng với vị trí exon 1, 3, 4, 6, 8, của gen *CYP21A2*
- + *E1P, I2P, E10P* là các đỉnh tương ứng với vị trí exon 1, intron 2 và exon 10 của gen *CYP21A1P*
- + *C4A, C4B* là đỉnh tương ứng với gen *C4A, C4B*
- + *Y* là đỉnh tương ứng với *NST Y*

Nhận xét: Kết quả MLPA phát hiện **bệnh nhân mã số 90 bị xóa đoạn gen *CYP21A2* từ gen *C4B* đến exon 8 gen *CYP21A2*** do không xuất hiện các đỉnh tương ứng với gen *C4B* và exon 1, 3, 4, 6, 8 gen *CYP21A2* so sánh với mẫu đối chứng.

Kết quả xác định đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự gen

Để xác định đột biến điểm, trước tiên tiến hành khuếch đại toàn bộ 10 exon của gen *CYP21A2* bằng 3 cặp mồi P4-P6; P3-P5; P1-P10 theo như quy trình đã mô tả ở phần phương pháp. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Hình 3.3 là hình ảnh minh họa kết quả PCR khuếch đại các sản phẩm PCR của gen *CYP21A2* tương ứng với các cặp mồi.





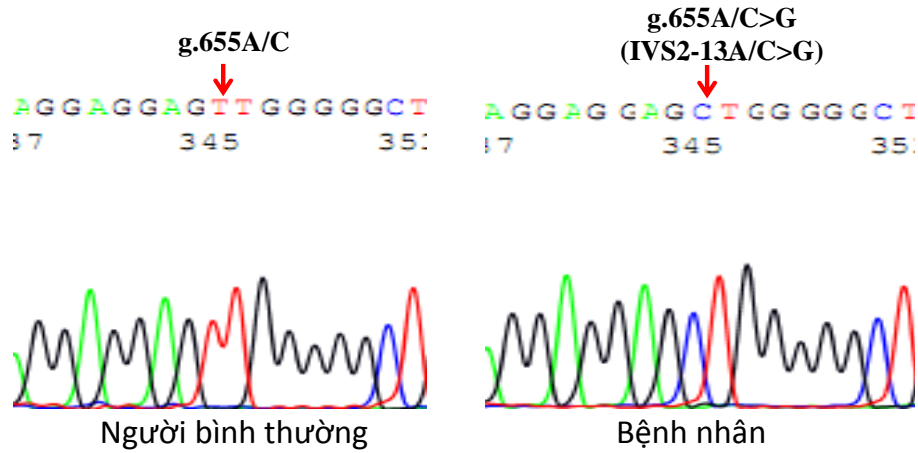
Hình 3.3. Hình ảnh sản phẩm PCR khuếch đại gen *CYP21A2*

(A) sản phẩm PCR của đoạn gen P6-P4, (B) sản phẩm PCR của đoạn gen P3-P5, (C) sản phẩm PCR của đoạn gen P1-P10, M: marker 100 bp và 1kb, (-) Mẫu nước, (+) Mẫu đối chứng, 1 ÷ 5 mẫu bệnh nhân.

Nhận xét: Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR của các mẫu bệnh nhân từ 1 đến 5 đều thu được vạch đặc hiệu tương tự như mẫu đối chứng.

Sản phẩm PCR được giải trình tự gen để xác định đột biến điểm. Kết quả đã phát hiện được nhiều dạng đột biến khác nhau như: sai nghĩa, vô nghĩa, đột biến ở vùng không mã hoá gen (intron, promoter), đột biến thêm hoặc mất nucleotid gây lệch khung dịch mã và đột biến lặp đoạn. Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử tại 1 vị trí; dị hợp tử, đồng hợp tử kết hợp 2 hoặc 3 vị trí đột biến. Nghiên cứu cũng phát hiện được 6 đột biến mới gồm 2 đột biến tạo mã kết thúc sớm, 2 đột biến sai nghĩa, 1 đột biến lặp đoạn và 1 đột biến thêm nucleotid.

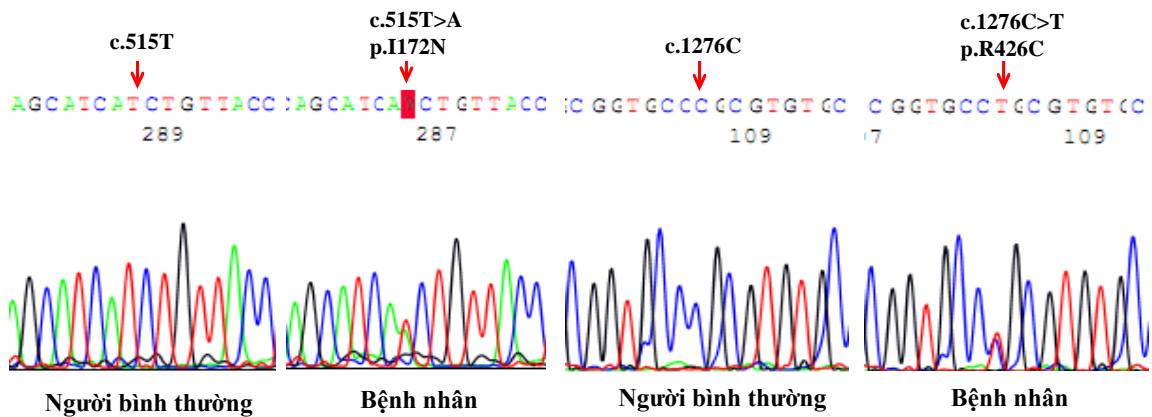
Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử g.655A/C>G (I2g):



Hình 3.4. Hình ảnh đột biến đồng hợp tử g.655A/C>G
(Hình ảnh giải trình tự gen theo chiều ngược)

Nhận xét: Giải trình tự gen *CYP21A2* phát hiện **bệnh nhân mã số 111** có **đột biến đồng hợp tử** tại vị trí g.655A/C>G trên intron 2.

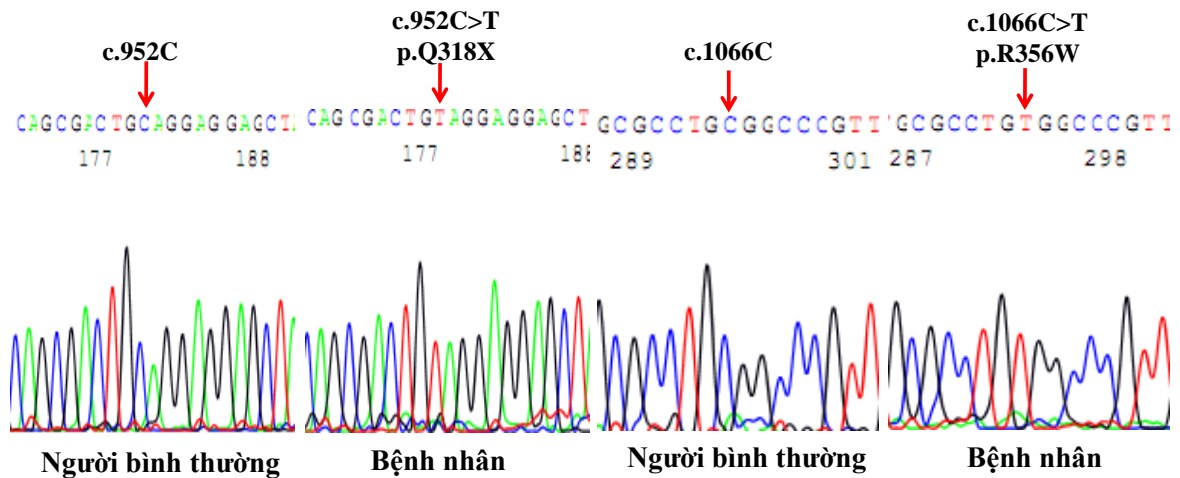
Bệnh nhân có đột biến dị hợp tử p.I172N và p.R426C kết hợp:



Hình 3.5. Hình ảnh đột biến dị hợp tử p.I172N và p.R426C kết hợp

Nhận xét: Giải trình tự gen *CYP21A2* phát hiện **bệnh nhân mã số 57** bị **đột biến dị hợp tử p.I172N và p.R426C** ở 2 vị trí: (1) thay thế nucleotid 515T>A dẫn đến bộ ba thứ 172 ATC mã hóa Isoleucin chuyển thành AAC mã hóa Asparagin (I172N), (2) thay thế nucleotid 1276C>T dẫn đến bộ ba thứ 426 CGC mã hóa Arginin chuyển thành TGC mã hóa Cystein (p.R426C).

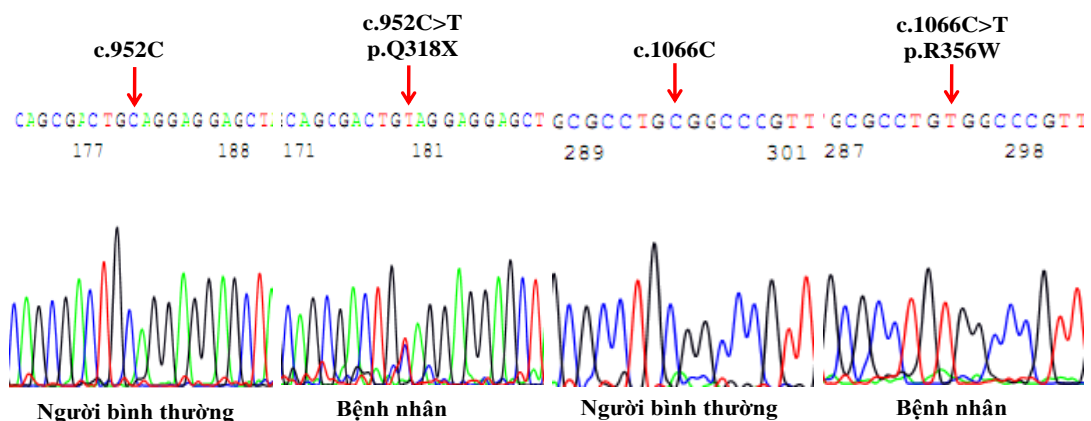
Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử p.Q318X và p.R356W kết hợp:



Hình 3.6. Hình ảnh đột biến đồng hợp tử p.Q318X và p.R356W

Nhận xét: Giải trình tự gen *CYP21A2* phát hiện **bệnh nhân mã số 211** bị **đột biến đồng hợp tử p.Q318X và p.R356W** ở 2 vị trí: (1) thay thế nucleotid 952C> T làm cho bộ ba thứ 318 CAG mã hóa Glutamin chuyển thành TAG là bộ ba kết thúc (Stop Codon) (Q318X); (2) thay thế nucleotid 1066C>T làm cho bộ ba thứ 356 CGG mã hóa Arginin chuyển thành TGG mã hóa Tryptophan (R356W).

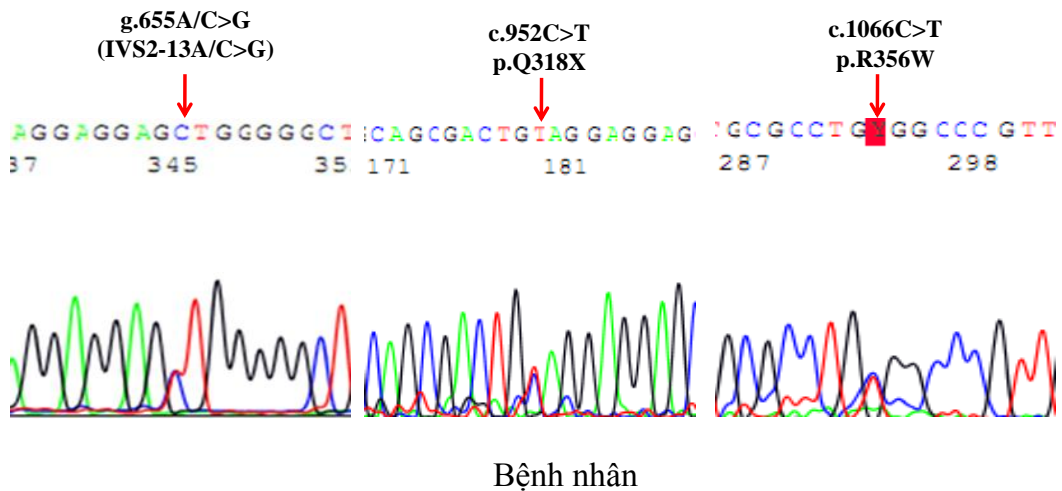
Bệnh nhân có đột biến dị hợp tử p.Q318X và đồng hợp tử p.R356W tại 2 vị trí:



Hình 3.7. Hình ảnh đột biến dị hợp tử p.Q318X và đồng hợp tử p.R356W

Nhận xét: Giải trình tự gen *CYP21A2* phát hiện **bệnh nhân mã số 88** có **đột biến dị hợp tử p.Q318X** và **đồng hợp tử p.R356W** ở 2 vị trí: (1) đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 952C>T làm cho bộ ba thứ 318 CAG mã hóa Glutamin chuyển thành TAG là bộ ba kết thúc (Stop Codon) (Q318X), (2) đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid 1066C>T làm cho bộ ba thứ 356 CGG mã hóa Arginin chuyển thành TGG mã hóa Tryptophan (R356W).

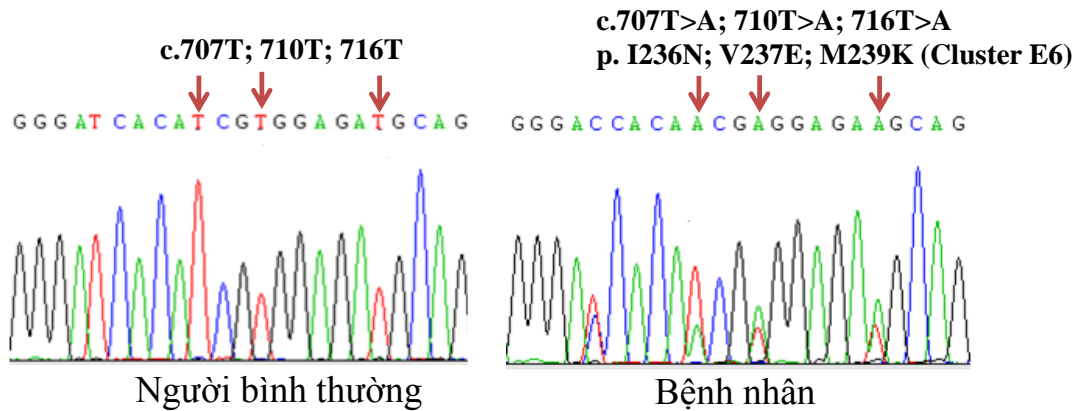
Bệnh nhân có 3 đột biến dị hợp tử g.655A/C>G (I2g), p.Q318X và p.R356W:



Hình 3.8. Hình ảnh 3 đột biến dị hợp tử g.655A/C>G, p.Q318X và p.R356W

Nhận xét: Giải trình tự gen *CYP21A2* phát hiện **bệnh nhân mã số 119** có **3 đột biến dạng dị hợp tử kết hợp g.655A/C>G (I2g), p.Q318X và p.R356W**: (1) đột biến thay thế nucleotid tại vị trí 656A/C>G trên intron 2, (2) đột biến thay thế nucleotid 952C> T làm cho bộ ba thứ 318 CAG mã hóa Glutamin chuyển thành TAG là bộ ba kết thúc (Stop Codon) (Q318X), (3) đột biến thay thế nucleotid 1066C>T làm cho bộ ba thứ 356 CGG mã hóa Arginin chuyển thành TGG mã hóa Tryptophan (R356W).

Bệnh nhân có đột biến p.I236N, p.V237E, p.M239K dạng cluster E6



Hình 3.9. Hình ảnh đột biến p.I236N, p.V237E, p.M239K cluster E6

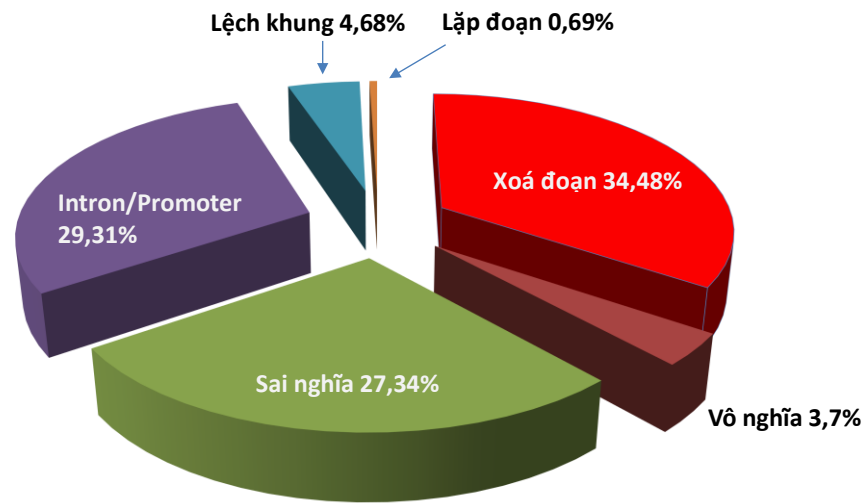
Nhận xét: Giải trình tự gen *CYP21A2* phát hiện **bệnh nhân mã số 189** có **đột biến cluster** tại 3 vị trí liên tiếp trên cùng 1 alen: **p.I236N, p.V237E, p.M239K**. (1) đột biến thay thế nucleotid tại vị trí c.707T>A làm cho bộ ba thứ 236 ATC mã hóa Isoleucin chuyển thành AAC mã hóa Asparagin (I236N), (2) đột biến thay thế nucleotid tại vị trí c.710T>A làm cho bộ ba thứ 237 GTG mã hóa Valin chuyển thành GAG mã hóa Glutamic acid (V237E), (3) đột biến thay thế nucleotid tại vị trí c.716T>A làm cho bộ ba thứ 239 ATG mã hóa Methionin chuyển thành AAG mã hóa Lysin (M239K).

Nhận xét: Giải trình tự gen *CYP21A2* phát hiện **bệnh nhân mã số 181 xuất hiện đột biến dị hợp tử p.Y112X và p.I172N** ở 2 vị trí: (1) đột biến thay thế nucleotid c.336C>G làm cho bộ ba thứ 112 TAC mã hóa Tyrosin chuyển thành TAG là bộ ba kết thúc (Stop Codon) (Y112X), (2) đột biến thay thế nucleotid c.515T>A dẫn đến bộ ba thứ 172 ATC mã hóa Isoleucin chuyển thành AAC mã hóa Asparagin (I172N).

3.1.2.3. Tần số và tỷ lệ các đột biến gen *CYP21A2*

Để tính tỷ lệ đột biến gen, chúng tôi lựa chọn mỗi gia đình một bệnh nhân (bệnh nhân đầu tiên trong mỗi gia đình được chẩn đoán - proband). Nghiên cứu này gồm 212 bệnh nhân của 204 gia đình. 8 cặp anh chị em ruột mắc bệnh có cùng kiểu gen đối với mỗi cặp, do đó chúng tôi tính tỷ lệ đột biến gen trên 204 bệnh nhân. Trong số 204 bệnh nhân được lựa chọn, nghiên cứu đã phát hiện được 202/204 bệnh nhân có đột biến gen *CYP21A2* chiếm tỷ lệ 99%. Đột biến điểm chiếm tỷ lệ cao với 65,52%; còn lại là đột biến xóa đoạn lớn chiếm tỷ lệ 34,48%.

Về phân bố tần suất theo từng dạng đột biến gen cho thấy, đột biến xóa đoạn lớn chiếm tỷ lệ cao nhất với 34,48%; đứng thứ 2 là các đột biến sai nghĩa chiếm tỷ lệ 27,34%; đứng thứ 3 là đột biến ở vùng không mã hóa gen (Intron/Promoter) với 29,31%; các dạng đột biến còn lại như: gây lệch khung dịch mã, đột biến vô nghĩa, đột biến lặp đoạn gen chiếm tỷ lệ thấp lần lượt tương ứng là 4,68%; 3,7% và 0,69% (biểu đồ 3.1).



Biểu đồ 3.1. Phân bố tần suất theo các dạng đột biến gen *CYP21A2*

Các đột biến cụ thể, tần số xuất hiện và tỷ lệ của các đột biến này được trình bày tại bảng 3.2

Bảng 3.2. Tần số và tỷ lệ các đột biến của gen *CYP21A2*

Exon/ intron	Các đột biến gen <i>CYP21A2</i>		Tần số	Tỷ lệ %
	c.DNA (hoặc g.DNA)	Protein		
exon 1	Xóa đoạn exon 1 (exon 1 del)		2	0,49
exon 1-2	Xóa đoạn exon 1-2 (exon 1-2 del)		2	0,49
exon 1-3	Xóa đoạn exon 1-3 (exon 1-3 del)		23	5,67
exon 1-6	Xóa đoạn exon 1-6 (exon 1-6 del)		2	0,49
exon 1-8	Xóa đoạn exon 1-8 (exon 1-8 del)		4	0,99
exon 4-6	Xóa đoạn exon 4-6 (exon 4-6 del)		2	0,49
exon 8	Xóa đoạn exon 8 (exon 8 del)		2	0,49
<i>CYP21A2</i> -gen	Xóa toàn bộ gen (del)		103	25,37
Promoter	g.-113G>A; g.-110T>C; g.-103A>G		3	0,74
exon 1	c.3G>A	p.M1I	1	0,25
exon 1	c.56G>A	p.W19X	1	0,25
exon 1	c.89C>T	p.P30L	2	0,49

exon 1	c.185A>T	p. H62L	1	0,25
Intron 2	g.665A/C>G (IVS2-13A/C>G) (I2g)		116	28,57
exon 3	c.336C>G	p.Y112X	1	0,25
exon 3	c.368C>T	p.T123I	2	0,49
exon 3	c.374C>G	p.S125X	1	0,25
exon 4	c.515T>A	p.I172N	43	10,59
exon 6	c.707T>A; c.710T>A; c.716T>A (Cluster 6 hay E6)	p.I236N; p.V237E; p.M239K	1	0,25
exon 7	c.737delA	p.E246GfsX11	3	0,74
exon 7	c.841G>T	p.V281L	3	0,74
exon 7	c.920_921insT	p.L307FfsX6	9	2,21
exon 8	c.952C>T	p.Q318X	12	2,95
exon 8	c.del1054-1261insCGGCA	p.V352RfsX103	1	0,25
exon 8	c.1066C>T	p.R356W	50	12,31
exon 9	c.1202C>T	p.P401L	1	0,25
exon 10	c.1276C>T	p.R426C	7	1,72
exon 10	c.1375_1392dupCCCTCCCTGCAG CCCCTG	p.P459_L464dup	2	0,49
exon 10	c.1447_1448delGGinsC	p.R483PfsX58	5	1,23
exon 10	c.1447_1448insC	p.R483PfsX40	1	0,25
Tổng: 34			406	100

Nhận xét: 34 đột biến khác nhau đã được phát hiện trong tổng số 202 bệnh nhân mang đột biến gen *CYP21A2*, trong đó 4 đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất: IV2-13A>G (I2g) (28,57%), xóa toàn bộ gen (25,37%), p.R356W (12,31%), p.I172N (10,59%). Tổng các đột biến xóa đoạn lớn chiếm 34,48%.

3.1.2.4. Kiểu gen của các bệnh nhân có đột biến gen *CYP21A2*

Tổng cộng 55 kiểu gen khác nhau đã được xác định ở 202 bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH (bảng 3.3).

Bảng 3.3. Kiểu gen của 202 bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH

Số TT	Kiểu gen	Kiểu hình lâm sàng				Số ca bệnh (n)	Tỷ lệ %
		MM	NHĐT	Không cổ điển	Chưa xác định		
1	Mất toàn bộ gen (Del/Del)	29				29	14,36
2	exon 1 del/ exon 1 del	1				1	0,49
3	exon 1-2 del /exon 1-2 del	1				1	0,49
4	exon 1-3 del/exon 1-3 del	11				11	5,45
5	exon 1-8 del/exon 1-8 del	2				2	1,00
6	exon 8 del/exon 8 del	1				1	0,49
7	exon 1-6 del/exon 4-6 del	2				2	1,00
8	Del/exon 1-3 del	1				1	0,49
9	Del/p.W19X	1				1	0,49
10	Del/I2g	22				22	10,89
11	Del/p.S125X	1				1	0,49
12	Del/p.I172N		10			10	4,95
13	Del/p.E246GfsX11	1				1	0,49
14	Del/p.L307FfsX6	2				2	1,00
15	Del/p.Q318X+p.R356W	1				1	0,49
16	Del/p.R356W	10				10	4,95
17	Del/p.R426C	1				1	0,49
18	Del+p.H62L/p.Q318X				1	1	0,49
19	Del/p.V352RfsX103	1				1	0,49
20	g.-113G>A + g.-110T>C + g.-103A>G + I2g + p.P30L/ I2g	1				1	0,49
21	g.-113G>A + g.-110T>C + g.-103A>G/I2g	1				1	0,49
22	g.-113G>A + g.-110T>C + g.-103A>G /p.I172N		1			1	0,49
23	p.P30L+p.P459_L464dup/			1		1	0,49

Số TT	Kiểu gen	Kiểu hình lâm sàng				Số ca bệnh (n)	Tỷ lệ %
		MM	NHDT	Không cổ điển	Chưa xác định		
	p.P459_L464dup						
24	I2g/I2g	27	2		2	31	15,35
25	I2g/p.M1I	1				1	0,49
26	I2g+p.T123I/I2G+p.T123I	1				1	0,49
27	I2g/p.I172N		4			4	1,99
28	I2g/p.L307FfsX6	1				1	0,49
29	I2g/p.Q318X	1				1	0,49
30	I2g/p.R356W	2				2	1,00
31	I2g/?	2	3			5	2,49
32	I2g/I2g +p.I172N		1			1	0,49
33	I2g+p.I172N/p.I172N	1				1	0,49
34	I2g/p.Q318X+p.R356W	2				2	1,00
35	p.Y112X/p.I172N		1			1	0,49
36	p.I172N/p.I172N	1	8			9	4,47
37	p.I172N/p.Q318X		1			1	0,49
38	p.I172N/p.R356W		2			2	1,00
39	p.I172N/p.R426C		2			2	1,00
40	p.I172N/?		2			2	1,00
41	p.E246GfsX11/p.E246GfsX11	1				1	0,49
42	p.I236N+p.V237E+p.M239K/ p.L307FfsX6		1			1	0,49
43	p.V281L/ p.L307FfsX6			3		3	1,49
44	p.L307FfsX6/p.L307FfsX6 + p.Q318X	1				1	0,49
45	p.Q318X/?	2				2	1,00
46	p.Q318X+p.R356W/p.Q318X+ p.R356W	1				1	0,49
47	p.Q318X+p.R356W/p.R356W	1				1	0,49
48	p.R356W/p.R356W	12	1			13	6,44

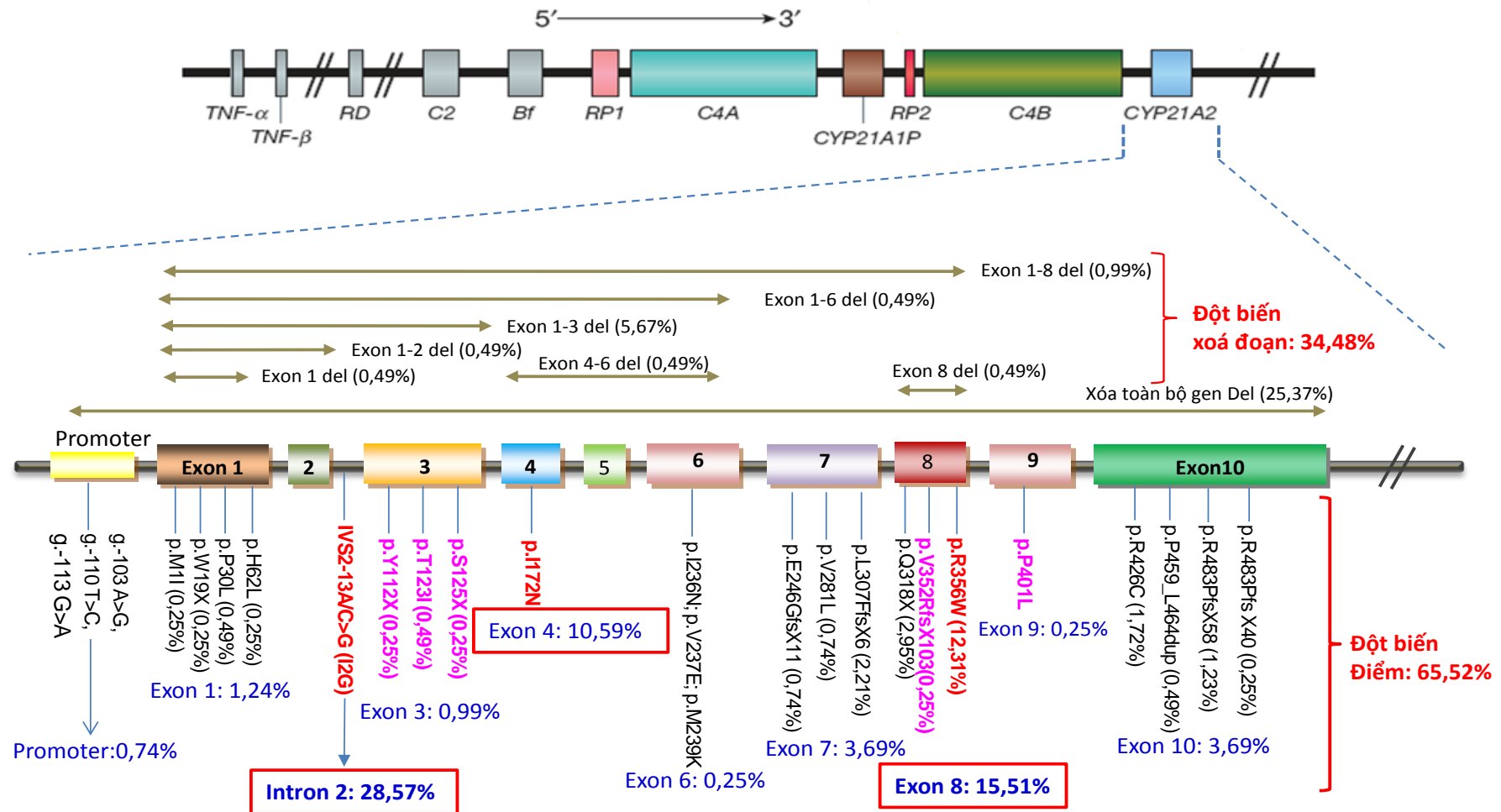
Số TT	Kiểu gen	Kiểu hình lâm sàng				Số ca bệnh (n)	Tỷ lệ %
		MM	NHDT	Không cổ điển	Chưa xác định		
49	p.R356/p.P401L		1			1	0,49
50	p.R356W/?	2				2	1,00
51	p.R426C/p.R426C	1				1	0,49
52	p.R426C/p.R483PfsX40	1				1	0,49
53	p.R426C/?		1			1	0,49
54	p.R483PfsX58/p.R483PfsX58	2				2	1,00
55	p. R483PfsX58/?		1			1	0,49
Tổng		153	42	4	3	202	100%

Nhận xét: 102 bệnh nhân (50,5%) có 1 đột biến ở dạng đồng hợp tử; 75 bệnh nhân (37,2%) có 2 đột biến dạng dị hợp tử kép; 12 bệnh nhân (5,9%) có hơn 2 đột biến và 13 bệnh nhân (6,4%) chỉ phát hiện được 1 đột biến ở dạng dị hợp tử và không phát hiện được allele đột biến thứ hai.

Các kiểu gen phổ biến chiếm tỷ lệ cao bao gồm: I2g/I2g (31/202; 15,35%); Del/Del (29/202; 14,36%); Del/I2g (22/202; 10,89%); p.R356W/p.R356W (13/202; 6,44%) và exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/202; 5,44%).

Đồng hợp tử xuất hiện ở 13 kiểu gen khác nhau, tỷ lệ cao các bệnh nhân trong nhóm đồng hợp tử bao gồm: I2g/I2g (31/102; 30,4%); Del/Del (29/102; 28,4%); exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/102; 10,8%); p.I172N/p.I172N (9/102 ca; 8,8%) và p.R356W/p.R356W (13/202; 6,4%).

3.1.2.5. Bản đồ đột biến gen CYP21A2 gây bệnh TSTTBS thể thiếu 21-OH ở nhóm bệnh nhân nghiên cứu



Hình 3.12. Bản đồ vị trí đột biến gen *CYP21A2* gây bệnh TSTTBS thiếu 21-OH ở các bệnh nhân nghiên cứu

(Chữ màu đỏ chỉ đột biến phổ biến; chữ màu tím đỏ chỉ đột biến mới; chữ viền khung đỏ chỉ exon và intron với tỷ lệ đột biến cao)

Nhận xét:

Các đột biến phân bố ở hầu hết các vùng gen như: vùng promoter, vùng intron 2 và 8/10 exon (trừ exon 2 và exon 5).

Đột biến điểm chiếm tỉ lệ cao 65,52%; còn lại là đột biến xóa đoạn lớn chiếm tỉ lệ 34,48%.

Tỷ lệ gặp đột biến điểm cao ở vùng intron 2 (28,57%), exon 8 (15,51%) và exon 4 (10,59%).

Phát hiện được 6 đột biến mới gồm: p.112X; p.T123I; p.S125X; p.V352RfsX103; p.401L và p.P459_L464dup

Tổng các allele có các đột biến điểm do hoán vị nhỏ của gen chiếm 58,85%; tổng các đột biến xóa đoạn lớn và các đột biến điểm do hoán vị gen chiếm 93,33%; 13 đột biến hiếm phát sinh tại gen chức năng trong đó có 6 đột biến mới chiếm 6,67%.

3.2. Mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH

3.2.1. Kiểu hình của các nhóm kiểu gen khác nhau và giá trị dự báo dương tính

202 bệnh nhân chỉ điểm trong tổng số 210 bệnh nhân có đột biến *CYP21A2* (có 8 cặp anh chị em ruột đều có cùng kiểu gen và cùng kiểu hình đối với mỗi cặp), 3 bệnh nhân nữ chưa xác định được kiểu hình do được chẩn đoán và điều trị sớm < 2 ngày tuổi. Như vậy 199 bệnh nhân có kiểu hình và phát hiện được đột biến được xếp vào các nhóm kiểu gen khác nhau (bảng 3.4 và 3.5).

3.2.1.1. Tương quan kiểu gen - kiểu hình của các bệnh nhân có kiểu gen thuộc các nhóm "null", A, B, C và giá trị dự báo dương tính

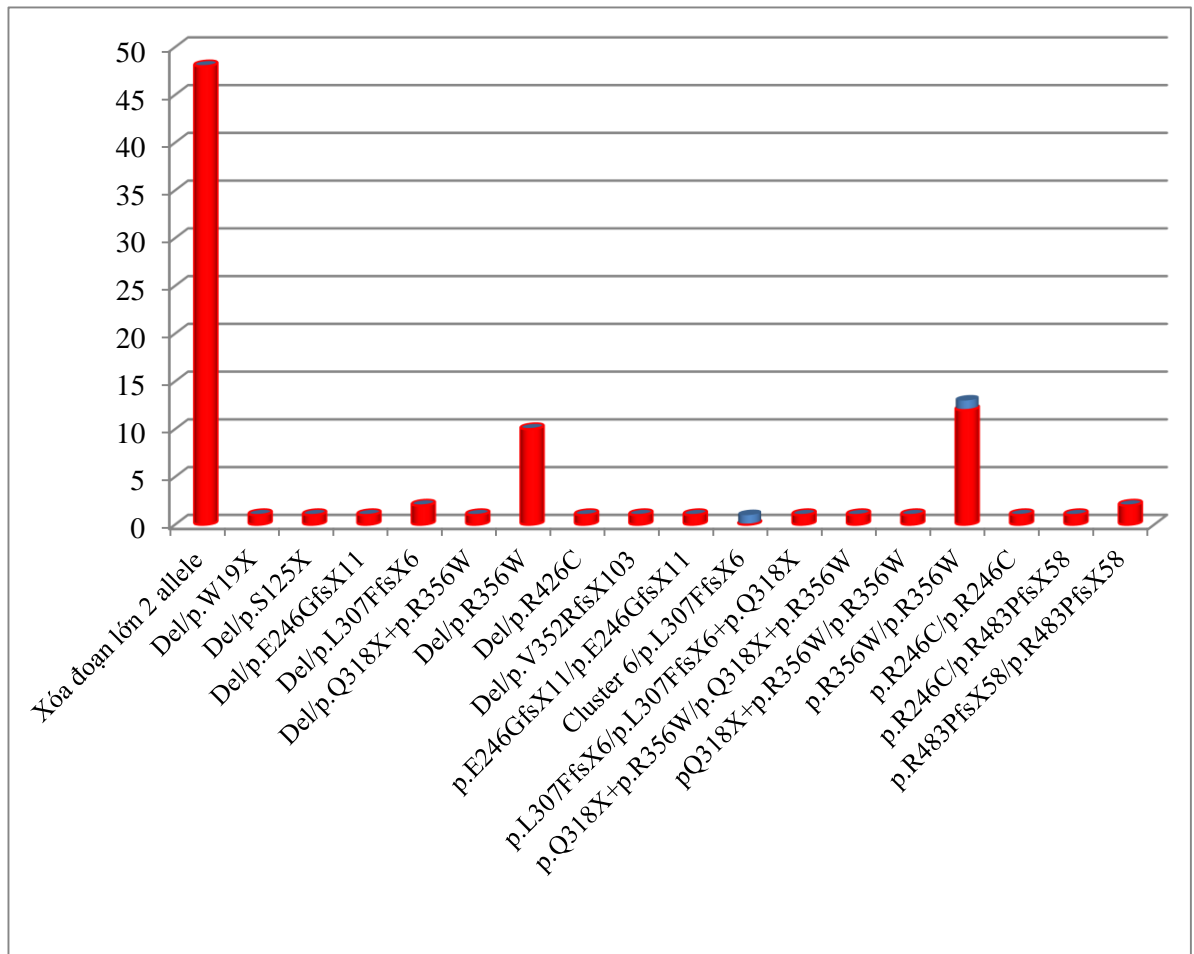
Phân bố về tần số các bệnh nhân theo kiểu hình khác nhau của từng nhóm kiểu gen được trình bày ở bảng 3.4 và các biểu đồ 3.2; 3.3 và 3.4.

Bảng 3.4. Kiểu gen - kiểu hình của bệnh nhân TSTTBS có kiểu gen thuộc nhóm “null”, A, B và C

Nhóm đột biến			Kiểu hình dự báo	Kiểu hình của các bệnh nhân nghiên cứu			Tổng số	Tỷ lệ dự báo dương tính
Nhóm	Allele 1	Allele 2		MM	NHĐT	Không cổ điển		
Null (0)	0	0	MM	88	2		90	99,8% (88/90)
A	A	0	MM	28			57	96,5% (55/57)
	A	A	MM	27	2			
	Cộng			55	2			
B	B	0	NHĐT		17		32	90,6% (29/32)
	B	A	NHĐT	1	4			
	B	B	NHĐT	2	8			
	Cộng			3	29			
C	C	0	Không cổ điển			4	4	100% (4/4)

Ghi chú: 0 (các đột biến xóa đoạn gen; exon 6 cluster; p.L307FfsX6; p.Q318X; p.R356W; các đột biến mới gây lệch khung dịch mã trên cả 2 allele); A (I2g); B (p.I172N; promoter+ p.P30L); C (p.P30L; p.V281L).

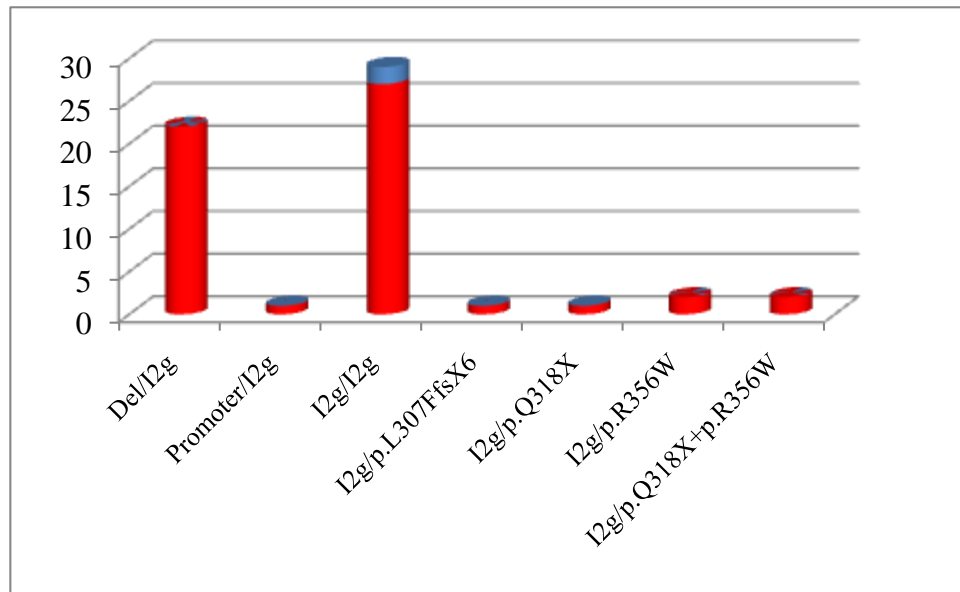
Nhận xét: Nhóm kiểu gen “null” và “A” có kiểu hình chủ yếu là thể MM; nhóm kiểu gen B có kiểu hình chủ yếu là thể NHĐT. Giá trị dự báo kiểu hình dương tính của các nhóm kiểu gen “null”, A, B và C tương ứng là 99,8%; 96,5%; 90,6% và 100%.



Biểu đồ 3.2. Kiểu hình của các kiểu gen thuộc nhóm “null”

Trục hoành là các kiểu gen của nhóm “null”. Trục tung là số lượng bệnh nhân có kiểu hình MM (màu đỏ) và NHĐT (màu xanh).

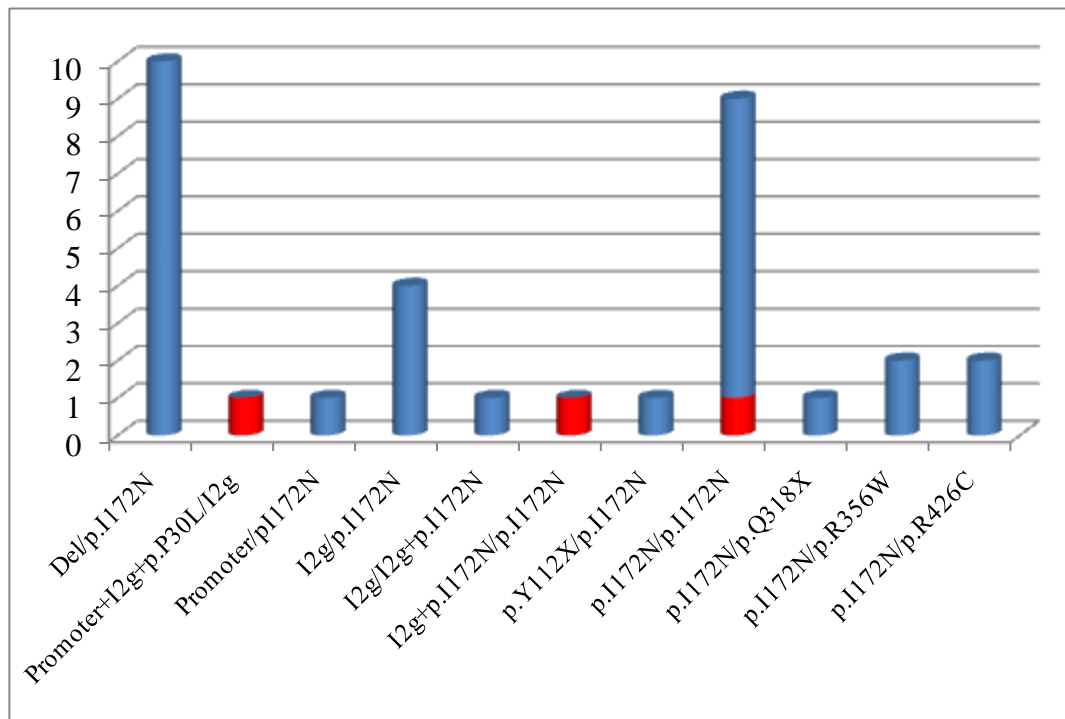
Nhận xét: 88/90 bệnh nhân có kiểu hình MM và chỉ 2/90 bệnh nhân (kiểu gen p.R356W/p.R356W và cluster 6/p.L307FfsX6) có kiểu gen nhóm “null” có kiểu hình NHĐT.



Biểu đồ 3.3. Kiểu hình của các kiểu gen thuộc nhóm A

Trục hoành là các kiểu gen khác nhau của nhóm A, trục tung là số bệnh nhân có kiểu hình cổ điển MM (màu đỏ) hoặc NHĐT (màu xanh).

Nhận xét: 2/57 bệnh nhân kiểu gen I2g/I2g có kiểu hình NHĐT trong số các bệnh nhân có kiểu gen nhóm A.



Biểu đồ 3.4. Kiểu hình của các kiểu gen thuộc nhóm B.

Trục hoành là các kiểu gen thuộc nhóm B, trục tung là số bệnh nhân có kiểu hình MM (màu đỏ) hoặc NHĐT (màu xanh).

Nhận xét: 29/32 bệnh nhân có kiểu hình NHĐT; 3/32 bệnh nhân (có kiểu gen tương ứng là p.I172N/p.I172N; p.I172N/p.I172N+I2g và Promoter+I2g+p.P30L/I2g) có kiểu hình MM trong số các bệnh nhân có kiểu gen nhóm B.

3.2.1.2. Kiểu hình của các bệnh nhân có kiểu gen thuộc nhóm D

Nhóm kiểu gen D bao gồm các đột biến sai nghĩa (đã được báo cáo hoặc đột biến mới) chưa chứng minh được chức năng protein đột biến *in vitro*; các kiểu gen chỉ phát hiện được một đột biến ở dạng dị hợp tử và không phát hiện được allele đột biến thứ hai. Phân bố về tần số các kiểu hình khác nhau của mỗi kiểu gen được trình bày tại bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân có kiểu gen thuộc nhóm D

STT	Kiểu gen	Kiểu hình		Tổng số bệnh nhân (n)	%
		MM	NHĐT		
1	I2g/p.M1I	1		1	6,25
2	I2g+p.T231I/I2g+p.T231I	1		1	6,25
3	I2g/?	2	3	5	31,25
4	p.I172N/?		2	2	12,5
5	p.Q318X/?	2		2	12,5
6	p.R356W/?	2		2	12,5
7	p.R356W/p.P401L		1	1	6,25
8	p.R426C/?		1	1	6,25
9	p.R483fsX58/?		1	1	6,25
	Tổng	8	8	16	100

Nhận xét: Các đột biến phổ biến I2g; p.I172N; p.Q318X và p.R356W xuất hiện ở 7/9 kiểu gen khác nhau của nhóm D. Đột biến sai nghĩa p.P401L kết hợp với p.R356W gây kiểu hình NHĐT ở 1 bệnh nhân.

3.2.2. Kiểu gen phổ biến của các kiểu hình khác nhau

Các kiểu gen phổ biến cho mỗi kiểu hình riêng rẽ cũng được phân tích trên cơ sở dữ liệu được trình bày ở bảng 3.3 phần 3.1.2.4

Kiểu gen phổ biến của thể cổ điển MM bao gồm: Del/Del (29/153; 18,9%); I2g/I2g (27/153; 17,6%); Del/I2g (22/153; 14,4%); p.R356W/p.R356W (12/153; 7,8%); exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/153; 7,2%) và Del/p.R356W (10/153; 6,5%).

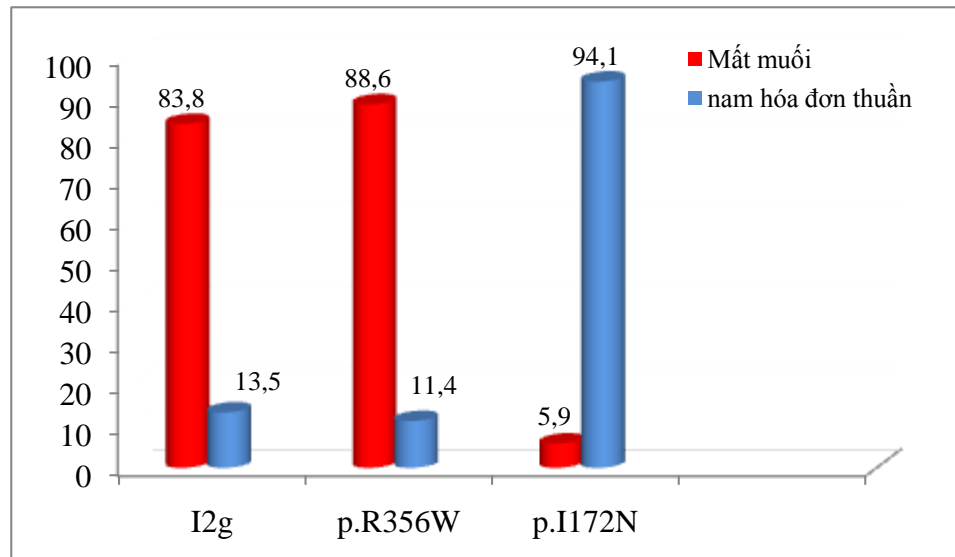
Kiểu gen phổ biến của thể NHĐT bao gồm: Del/p.I172N (10/42; 23,8%); p.I172N/p.I172N (8/42; 19,1%) và I2g/p.I172N (4/42; 9,5%).

Kiểu gen phổ biến của thể không cổ điển là p.V281L/p.L307FfsX6 (3/4; 75%).

3.2.3. Tương quan kiểu gen - kiểu hình của một số đột biến điểm phổ biến

Bảng 3.3 phần 3.2.1.4. cũng cho thấy kiểu hình của các bệnh nhân mà trong đó kiểu gen có ít nhất một allele là các đột biến điểm phổ biến I2g; hoặc p.I172N; hoặc p.R356W.

Tỷ lệ bệnh nhân có ít nhất 1 allele đột biến I2g, hoặc p.R356W, hoặc p.I172N tương ứng là 74/202 (36,6%); 35/202 (17,3%) và 34/202 (16,8%). Kiểu hình của các bệnh nhân có ít nhất 1 đột biến trong số 3 đột biến này được trình bày tại biểu đồ 3.5.



Biểu đồ 3.5. Kiểu hình của các kiểu gen có ít nhất 1 trong 3 đột biến điểm phổ biến.

Trục hoành là các kiểu gen có ít nhất một allele đột biến là I2g, hoặc p.R356W hoặc p.I172N; trục tung là tỷ lệ bệnh nhân có kiểu hình MM (màu đỏ) và NHĐT (màu xanh).

Nhận xét: hầu hết các bệnh nhân có ít nhất một allele đột biến I2g hoặc p.R356W có kiểu hình MM trong khi hầu hết các bệnh nhân có ít nhất một allele đột biến p.I172N có kiểu hình NHĐT.

3.2.4. Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh của các bệnh nhân không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình

Có 7/202 (3,5%) bệnh nhân không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình. Kiểu gen, kiểu hình dự báo, kiểu hình thực tế và các triệu chứng lâm sàng, hóa sinh của các bệnh nhân này được trình bày tại bảng 3.6.

Bảng 3.6. Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh của các bệnh nhân không phù hợp giữa kiểu gen - kiểu hình

STT	Nhóm kiểu gen	Kiểu gen (kiểu hình dự báo)	Kiểu hình thực tế	Giới, Tuổi chẩn đoán	Lâm sàng và xét nghiệm hóa sinh
1	B	I2g/I2g + Promoter + p.P30L (NHĐT)	MM	Nữ, 2,3 tháng	Mơ hồ giới tính, mất nước, mất muối (Na 122; K 5; Cl 100 mmol/l). 17-OHP 21 ng/ml.
2	A	I2g/I2g (MM)	NHĐT	Nam, 4,5 tuổi	Dậy thì sớm giả (cao 123 cm, giọng ồm, dương vật 6 cm, lông mu P2, thể tích tinh hoàn 3 ml). 17-OHP 821 ng/ml; testosterone 11,47 nmol/l. ACTH 20,7 pg/ml. Tuổi xương 11 tuổi.
3	A	I2g/I2g (MM)	NHĐT	Nam, 5,5 tuổi	Dậy thì sớm giả (cao 116 cm, giọng ồm, dương vật 6 cm, lông mu P3, thể tích tinh hoàn 2 ml); 17-OHP 167 ng/ml, tuổi xương 11 tuổi.
4	B	I2g+p.I172/p.I172N (NHĐT)	MM	Nữ, 21 ngày	Prader II-III; nôn; mất nước; Na 125; K 4,7; Cl 94 mmol/l; 17-OHP 40,8 ng/ml; testosterone 16,96 nmol/l.
5	B	p.I172N/p.I172N (NHĐT)	MM	Nữ, 6 ngày	Prader III, xạm da. Na 126; K 4,7; Cl 93,3 mmol/l; 17-OHP 17,2 ng/ml; cortisol 96,3 nmol/l.
6	0	Cluster 6 (p.I236N+p.V237E+p.M239K)/p.L307FfsX6 (MM)	NHĐT	Nữ, 5 tuổi	Prader III, xạm da, Na 142; K 3,7; Cl 106 mmol/l; 17-OHP 43,3 ng/ml; tuổi xương 13 tuổi.
7	0	p.R356W/p.R356W (MM)	NHĐT	Nam, 4,5 tuổi	Dậy thì sớm giả (lông mu P3; dương vật 8 cm; thể tích tinh hoàn 1,5 ml); 17-OHP 725 ng/ml; testosterone 8,4 nmol/l; tuổi xương 6 tuổi.

Nhận xét: 2 bệnh nhân có kiểu gen nhóm “null” nhưng có kiểu hình NHĐT; 2 bệnh nhân nhóm A có kiểu hình NHĐT và 3 bệnh nhân nhóm B có kiểu hình MM.

3.2.5. Kiểu hình của các bệnh nhân có đột biến mới của gen *CYP21A2*

6/202 bệnh nhân có đột biến mới của gen *CYP21A2*. Kiểu gen, triệu chứng lâm sàng và hóa sinh của các bệnh nhân này được trình bày tại bảng 3.7.

Bảng 3.7: Kiểu hình (triệu chứng lâm sàng và hóa sinh) của các bệnh nhân có đột biến mới của gen *CYP21A2*

Số TT	Kiểu gen	Kiểu hình	Giới, Tuổi chẩn đoán	Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh
1	p.Y112X /p.I172N	NHĐT	Nữ, 14 tháng	Prader III-IV. Na 137; K 4,5; Cl 106 mmol/l. 17-OHP 27,7 ng/ml; testosterone 16,3 nmol/l.
2	I2G+ p.T123I /I2G+ p.T123I	MM	Nữ, 1 ngày	Prader III. Mất muối lúc 12 ngày tuổi (Na 116; K 6,32; Cl 86 mmol/l). 17-OHP 26,8 ng/ml.
3	Del/ p.S125X	MM	Nam, 45 ngày	Xạm da, mất nước. Na 121; K 5,7; Cl 102 mmol/l; 17-OHP 221,4 ng/ml; testosterone 13,9 nmol/l; progesterone 64,9 nmol/l.
4	p.R356W/ p.P401L	NHĐT	Nữ, 9 tháng	Prader II, không suy thượng thận cấp. Na 131; K 4,3; Cl 100. 17-OHP 28,8 nmol/l; testosterone 1,41 nmol/l.
5	p.P30L+ p.P459_L464dup / p.P459_L464dup	Không cổ điển	Nữ, 19 tháng	Prader I-II. Na 131; K 4,6; Cl 100 mmol/l; tuổi xương bằng tuổi thực. 17-OHP 59 ng/ml.
6	Del/ p.V352RfsX103	MM	Nam, 26 ngày	Bú kém, không tăng cân sau đẻ, mất nước, xạm da. Na 109; K 8,9 mmol/l; 17-OHP 35,4 ng/ml; testosterone 3,1 nmol/l.

Nhận xét: Đột biến mới tạo mã kết thúc sớm (đột biến vô nghĩa) p.S125X và đột biến lệch khung dịch mã p.V352RfsX103 kết hợp với đột biến nhóm “null” gây kiểu hình MM, đột biến mới vô nghĩa p.Y112X kết hợp với kiểu gen nhóm “B” gây kiểu hình NHĐT.

3.2.6. Kiểu hình của những bệnh nhân có kiểu gen gồm hơn 2 đột biến

12/202 (5,9%) bệnh nhân có kiểu gen phức tạp. Kiểu gen và kiểu hình (âm sàng, hóa sinh) của các bệnh nhân này được trình bày tại bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kiểu gen và kiểu hình của bệnh nhân có kiểu gen phức tạp

STT	Kiểu gen	Kiểu hình	Giới, Tuổi	Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh
1	Del+p.H62L/p.Q318X	Chưa rõ	Nữ, 16 giờ	Ngạt nặng, xạm da, Prader II. Na 130,9; K 5,1; Cl 97,4 mmol/l. 17-OHP 26 ng/ml.
2	g.-113G>A + g.-110T>C + g.-103A>G +I2g + p.P30L/I2g	MM	Nữ 2,5 tháng	Mất nước, xạm da, âm vật phì đại. Na 122; K 5; Cl 100 mmol/l; 17-OHP 21 ng/ml.
3	p.P30L+ p.P459_L464dup/ p.P459_L464dup	Không cổ điển	Nữ, 19 tháng	Prader I-II. Na 131; K 4,6; Cl 100 mmol/l; tuổi xương bằng tuổi thực; 17-OHP 59 ng/ml.
4	I2g+p.T123I/ I2g+p.T123I	MM	Nữ, 1 ngày	Prader III. Mất muối lúc 12 ngày tuổi (Na 116; K 6,32; Cl 86). 17-OHP 26,8.
5	I2g/I2G+p.I172N	NHĐT	Nữ, 8 tuổi	Prader IV. tuổi xương 13,5 tuổi. Na 138; K 4,1; Cl 105 mmol/l; 17-OHP 236,5 ng/ml.
6	I2g+p.172N/p.I172N	MM	Nữ, 21 ngày	Prader II-III. Na 125; K 4,7; Cl 94 mmol/l; 17-OHP 40,8 ng/ml.
7	Del/p.Q318X+p.R356W	MM	Nữ, 25 ngày	Prader IV. Na 132; K 7,9; Cl 102 mmol/l); 17-OHP 6,8 ng/ml.
8	I2g/p.Q318X+p.R356W	MM	Nữ, 22 giờ	Prader IV, xạm da, mất muối lúc 5 tháng tuổi (Na 122; K 6,9; Cl

STT	Kiểu gen	Kiểu hình	Giới, Tuổi	Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh
				92 mmol/l). 17-OHP 25,8 ng/ml.
9	I2g/p.Q318X+p.R356W	MM	Nam, 4 tháng	Mất nước, Na 115; K 9,2; Cl 88 mmol/l; 17-OHP 39,7 ng/ml.
10	p.L307fsX6/p.L307fsX6+p. Q318X	MM	Nữ, 44 ngày	Prader IV, mất nước, Na 106; K 5,4 mmol/l; 17-OHP 59,9 ng/ml.
11	p.Q318X+p.R356W/p.R356W	MM	Nam, 2,5 tháng	Mất nước, Na 120; K 6 mmol/l). 17-OHP 333 ng/ml.
12	p.Q318X+p.R356W/p.Q318X+p.R356W	MM	Nữ, 3,5 tháng	Prader IV, mất nước, 17-OHP 287,7 ng/ml.

Nhận xét: 9/12 có kiểu hình MM; 7/12 bệnh nhân đều mang đột biến p.Q318X và 5/12 bệnh nhân mang đột biến p.R356W.

3.2.7. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân thiếu 21-OH có khối u vỏ thượng thận

4/202 (1,9%) bệnh nhân đã phát hiện được đột biến gen *CYP21A2* xuất hiện u vỏ thượng thận trong quá trình theo dõi điều trị, hoặc u vỏ thượng thận được chẩn đoán trước khi có chẩn đoán TSTTBS. Kiểu gen và triệu chứng lâm sàng, hóa sinh của các bệnh nhân này được trình bày tại bảng 3.9.

Bảng 3.9. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân có u vỏ thượng thận khi chẩn đoán hoặc xuất hiện u trong quá trình điều trị

Số TT	Nhóm kiểu gen	Kiểu gen	Kiểu hình	Giới, Tuổi	Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh
1	0	Del/Del	MM	Nam, 23 ngày	Suy thượng thận cấp lúc chẩn đoán. Na 120; K 7,1; Cl 98 mmol/l; 17-OHP 51 ng/ml; testosterone 35 nmol/l. U vỏ thượng thận phải 41 x 30 mm lúc 8,5 tuổi.
2	0	Del/Del	MM	Nam, 10 ngày	Nhiều cơn suy thượng thận cấp, u vỏ thượng thận phải 45x21 mm lúc 14,5 tuổi. 17-OHP 299 ng/ml; testosterone 11,29 nmol/l. Na 105; K 5,2; Cl 95 mmol/l.
3	0	p.E246GfsX11/ p.E246GfsX11	MM	Nữ, 13 tuổi	Prader IV, nhiều cơn suy thượng thận cấp từ 1 tháng tuổi. 17-OHP 35,3 ng/ml; u vỏ thượng thận trái 31x58 mm phát hiện năm 13 tuổi.
4	0	p.R356W/Del	MM	Nam, 7,5 tuổi	Suy thượng thận cấp lúc 1 tháng tuổi, dậy thì sớm giả từ 5 tuổi (chiều dài dương vật 7 cm, lông mu P3, thể tích tinh hoàn 3 ml). U thượng thận phải 24x17 mm. Tuổi xương 13 tuổi, testosterone 12,4nmol/l; 17-OHP 25,5 ng/ml.

Nhận xét: 3/4 bệnh nhân có u vỏ thượng thận đều có kiểu gen đồng hợp tử và 1/4 có kiểu gen dị hợp tử kép nhưng đều thuộc nhóm “null” và có kiểu hình thể MM.

3.2.8. Kiểu gen - kiểu hình thể cổ điển MM của các bệnh nhân được chẩn đoán sớm < 5 ngày tuổi khi chưa có triệu chứng mất muối

14/202 (6,9%) bệnh nhân kiểu hình MM nhưng được chẩn đoán sớm < 5 ngày tuổi qua sàng lọc lâm sàng/sàng lọc sơ sinh/tiền sử gia đình. Tất cả các bệnh nhân này đều được điều trị hormon thay thế ngay khi vào viện có chẩn đoán. Tuy nhiên, diễn biến xuất hiện mất muối, suy thượng thận cấp trong quá trình theo dõi điều trị. Nhóm kiểu gen, kiểu gen cụ thể và triệu chứng lâm sàng, hóa sinh của từng bệnh nhân được trình bày tại bảng 3.10.

Bảng 3.10. Kiểu gen và diễn biến lâm sàng của các bệnh nhân kiểu hình MM được chẩn đoán sớm khi chưa có suy thượng thận cấp

Số TT	Nhóm kiểu gen	Kiểu gen	Giới, Tuổi	Diễn biến lâm sàng
1	A	I2g/I2g	Nữ, 3 giờ	Prader III; xạm da, chưa có mất nước và muối lúc chẩn đoán (Na 137; K 5,1; Cl 108 mmol/l). Mất muối lúc 2 tuần tuổi (Na 132; K 6,4; Cl 101 mmol/l); 17-OHP 147,7 ng/ml.
2	A	I2g/I2g	Nữ, 12 giờ	Prader III. Na 145; K 4,0; Cl 112; 17-OHP 22,2 ng/ml; testosterone 52 nmol/l; progesterone 190 nmol/l. Sốt, suy thượng thận cấp lúc 13 tháng tuổi (Na 122; K 6,1; Cl 94 mmol/l).
3	0	I2g/ p.Q318X+ p.R356W	Nữ, 22 giờ	Prader IV, xạm da, điều trị từ ngày đầu sau đẻ, Mất muối lúc 5 tháng tuổi (Na 122; K 6,9; Cl 92 mmol/l).
4	0	Del/Del	Nữ, 23 giờ	Xạm da nặng, Prader II, chưa mất nước và muối lúc chẩn đoán (Na 144; K 5,07; Cl 114); 17-OHP 31,7 ng/ml; progesterone 63,5 nmol/. Suy thượng thận cấp lúc 40 ngày tuổi (Na 109; K 6,8; Cl 86 mmol/l).
5	0	exon 1-3 del/ exon 1-3 del	Nữ, 25 giờ	Điều trị ngay sau đẻ; 17-OHP 9638 ng/ml; mất muối lúc 4 tháng tuổi (Na 128; K 4,9; Cl 97 mmol/l).

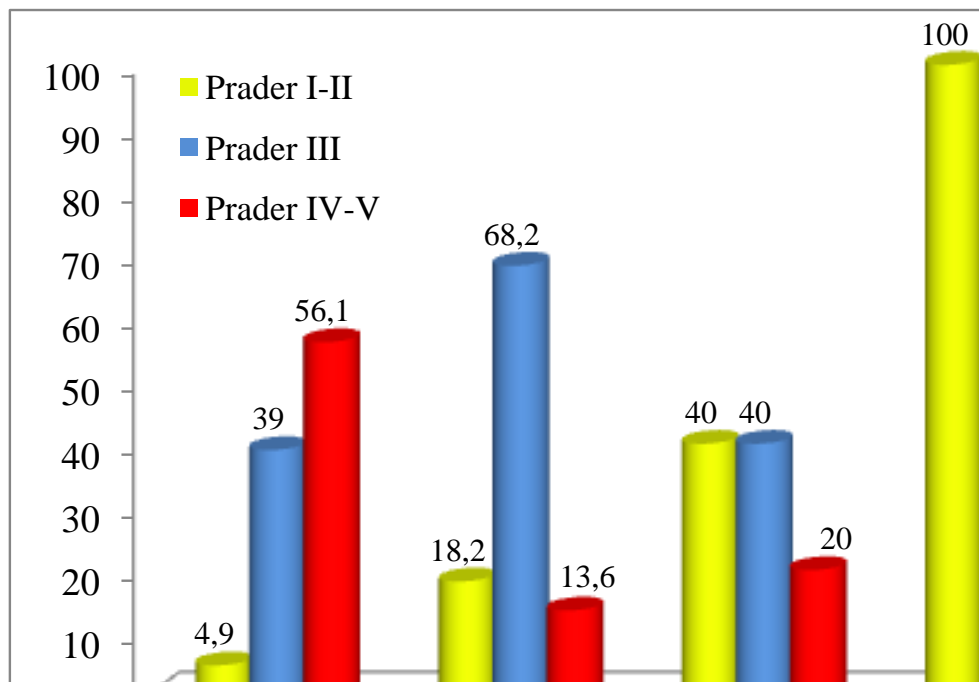
Số TT	Nhóm kiểu gen	Kiểu gen	Giới, Tuổi	Diễn biến lâm sàng
6	A	Del/I2g	Nữ, 24 giờ	Prader III, da xạm, chưa mất nước và muối lúc chẩn đoán (Na 137; K 4,4; Cl 106). Mất muối lúc 2 tuần tuổi (Na 122; K > 5,5; Cl 90); 17-OHP 406,2 ng/ml; testosterone 52 nmol/l; progesterone 152 nmol/l.
7	D	p.M1I/I2g	Nữ, 24 giờ	Prader III; 17-OHP 233,4 ng/ml; testosterone 78,54 nmol/l. Suy thượng thận cấp lúc 16 tháng (Na 124; K 6,6; Cl 94 mmol/l).
8	0	p.R356W/ p.R356W	Nữ, 24 giờ	Prader IV, xạm da. 17-OHP 433,75 ng/ml; testosterone 60,7 nmol/l. Mất muối lúc 43 ngày tuổi (Na 129; K 5,2; Cl 97 mmol/l).
9	0	Del/Del	Nữ, 24 giờ	Prader III-IV, xạm da toàn thân, chưa mất muối lúc chẩn đoán (Na 140,2; K 5; Cl 110 mmol/l); 17-OHP 96,1 ng/ml. Mất muối lúc 2,5 tháng (Na 126; K 5,4; Cl 95 mmol/l).
10	D	I2g+p.T123I / I2g+p.T123I	Nữ, 24 giờ	Prader III, chưa mất muối lúc chẩn đoán (Na 138; K 4,51; Cl 103). 17-OHP 26,8 ng/ml. Mất muối lúc 12 ngày tuổi (Na 116; K 6,32; Cl 86 mmol/l).
11	0	p.R356W/ p.R356W	Nữ, 3 ngày	Prader III, chưa mất nước và mất muối khi chẩn đoán (Na 145; K 4,0; Cl 112 mmol/l); 17-OHP 79,7 ng/ml; testosterone 47,5 nmol/l; progesterone 190 nmol/l. Suy thượng thận cấp lúc 2 tuần tuổi (Na 120; K 6,7; Cl 93 mmol/l).
12	A	I2g/I2g	Nữ, 3 ngày	Prader II, chưa có mất muối khi chẩn đoán (Na 136; K 5,3; Cl 103 mmol/l); 17-OHP 961 ng/ml; testosterone 9,2 nmol/l. Mất muối lúc 1,5 và 3 tháng tuổi (Na 127; K 5,7; Cl 96 mmol/l).
13	0	Del/Del	Nam, 3 ngày	Xạm da, chưa mất muối khi chẩn đoán (Na 134; K 3,55; Cl 103); 17-OHP 20,9 ng/ml. Mất muối lúc 6 ngày tuổi (Na 124,3; K 3,5; Cl 94,7 mmol/l).

Số TT	Nhóm kiểu gen	Kiểu gen	Giới, Tuổi	Diễn biến lâm sàng
14	0	exon 1-3 del/ exon 1-3 del	Nữ, 4 ngày	Prader IV; chưa mất muối khi chẩn đoán (Na 142; K 4,8; Cl 108); 17-OHP 301 ng/ml; testosterone 24,2 nmol/l. Suy thượng thận cấp lúc 3 tháng tuổi (nôn nhiều, mất nước, Na 130; K 5,1; Cl 100 mmol/l).

Nhận xét: 14/14 bệnh nhân có kiểu gen nhóm “null” và “A” được chẩn đoán và điều trị < 5 ngày tuổi khi chưa có triệu chứng mất muối, nhưng trong quá trình theo dõi điều trị đều xuất hiện mất muối và suy thượng thận cấp.

3.2.9. Tương quan giữa mức độ nặng nam hóa Prader với kiểu gen

Mức độ nặng của nam hóa ở trẻ gái theo phân loại Prader của các nhóm kiểu gen khác nhau được trình bày ở biểu đồ 3.6



Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ (%) của các mức độ nam hóa theo phân loại Prader của từng nhóm kiểu gen khác nhau

Nhận xét: Nhóm kiểu gen nặng có tỷ lệ mức độ nam hóa Prader nặng cao hơn ($p = 0,0001$). Nhóm kiểu gen “null” có tỷ lệ các bệnh nhân nam hóa nặng (Prader IV-V và Prader III) cao nhất. Nhóm A có tỷ lệ các ca nam hóa Prader III cao nhất (68,2%). Nhóm kiểu gen B có tỷ Prader I-II (40%) và III (40%).

3.2.10. Tương quan giữa mức độ mất muối và tăng kali với kiểu gen

Các giá trị trung bình, tối đa, tối thiểu, độ lệch và trung vị của nồng độ Na^+ , K^+ và Cl^- huyết thanh của các nhóm kiểu gen được trình bày tại bảng 3.11.

Bảng 3.11. Nồng độ điện giải đồ huyết thanh của các nhóm kiểu gen

Điện giải đồ	Các tham số	Kiểu gen “null”	Kiểu gen A	Kiểu gen B	Kiểu gen C
Na^+ (mmol/l)	n	89	52	26	4
	Trung vị (Min-Max)	117 (93 - 133)	117,5 (97 - 133)	137 (132 - 143)	135 (131 - 136)
	Trung bình \pm SD	116,3 \pm 9,9	117,2 \pm 9,9	137,1 \pm 2,9	134,3 \pm 2,2
K^+ (mmol/l)	n	86	52	26	4
	Trung vị (Min-Max)	6,2 (3,4 - 10,8)	6,0 (4,6 - 8,9)	4,0 (3,2 - 5,3)	4,3 (3,6 - 4,6)
	Trung bình \pm SD	6,3 \pm 1,3	6,2 \pm 1,1	4,1 \pm 0,5	4,2 \pm 0,4
Cl^- (mmol/l)	n	86	52	26	4
	Trung vị (Min-Max)	91 (66 - 108)	91 (68 - 109)	105,0 (97 - 111)	101,5 (100 - 105)
	Trung bình \pm SD	90,6 \pm 9,2	90,9 \pm 9,2	104,2 \pm 3,2	102 \pm 2,2

Ghi chú: giá trị tham chiếu Na^+ 134-143; K^+ 3,5-5,0; Cl^- 97-110 mmol/l

Nhận xét: Nồng độ Na^+ huyết thanh ở các bệnh nhân có kiểu gen nhóm “null” thấp hơn so với nhóm B ($p = 0,0001$) và nhóm C ($p = 0,001$); của nhóm A thấp hơn nhóm B ($p = 0,0001$) và nhóm C ($p = 0,003$). (*test KRUSKAL WALLIS*).

Nồng độ K^+ huyết thanh ở các bệnh nhân có kiểu gen nhóm “null” cao hơn so với nhóm B ($p = 0,0001$) và nhóm C ($p = 0,002$); của nhóm A cao hơn nhóm B ($p = 0,0001$) và nhóm C ($p = 0,006$) (*test ANOVA*).

Nồng độ Cl^- huyết thanh ở các bệnh nhân có kiểu gen nhóm “null” thấp hơn so với nhóm B ($p = 0,0001$) và nhóm C ($p = 0,05$); của nhóm kiểu gen A thấp hơn nhóm B ($p = 0,0001$) (*test KRUSKAL WALLIS*).

3.2.11. Tương quan giữa mức độ tăng của nồng độ trong huyết thanh của 17-OHP, testosterone và progesterone với kiểu gen

Các giá trị trung bình, tối đa, tối thiểu, trung vị của nồng độ các steroid huyết thanh ở mỗi kiểu gen được trình bày tại bảng 3.12 và biểu đồ 3.7.

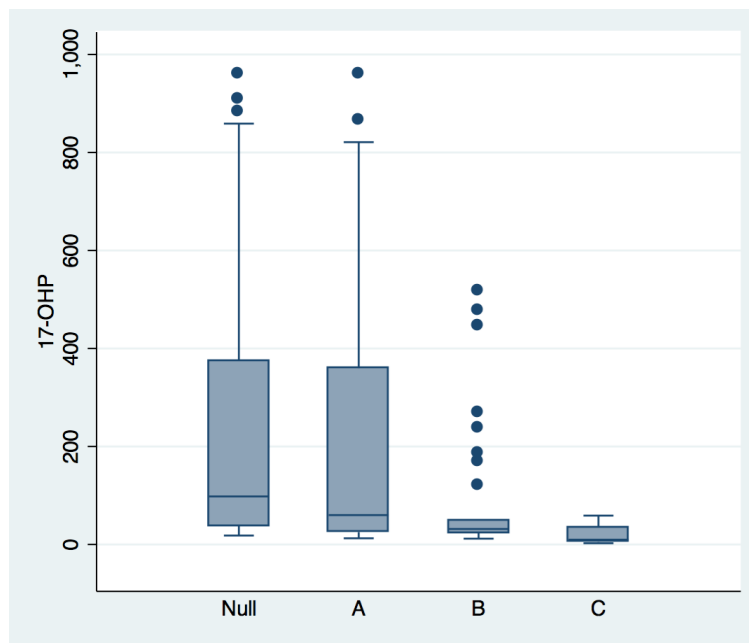
Bảng 3.12. Nồng độ trong huyết thanh của 17-OHP, testosterone và progesterone của các nhóm kiểu gen khác nhau

Steroid	Các tham số	Nhóm kiểu gen null ‘0’	Nhóm kiểu gen A	Nhóm kiểu gen B	Nhóm kiểu gen C
17-OHP (ng/ml)	n	87	54	33	4
	Trung vị (Giới hạn)	115,5 (18,3 - 9638)	64,5 (12,7 - 1717)	31,7 (11,9 - 516,6)	9,8 (2,6 - 59)
	Trung bình \pm SD	417,6 \pm 1086,9	264,1 \pm 371,6	94,8 \pm 140,0	20,3 \pm 26,1
T (nmol/l)	n	77	43	24	1
	Trung vị (Giới hạn)	17 (1,3 - 111)	13,7 (0,9 - 384)	5,0 (0,65 - 23,4)	0,87
	Trung bình \pm SD	24,6 \pm 23,7	34,6 \pm 65,6	8,2 \pm 6,5	0,87
	n	18	21	6	

P (nmol/l)	Trung vị (Giới hạn)	83,7 (6,8 - 411)	55 (4,2 - 190,8)	27,1 (2,7 - 51,3)	
	Trung bình ± SD	112,6 ± 98,3	87,7 ± 72,1	27,3 ± 16,0	

Ghi chú: T (testosterone); P (progesterone)

Nhận xét: có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của nồng độ 17-OHP; testosterone và progesterone huyết thanh của các bệnh nhân có các nhóm kiểu gen ‘null’, A, B và C với giá trị *p* tương ứng đối với mỗi steroid là 0,0001; 0,0001 và 0,05 (test KRUSKAL WALLIS).



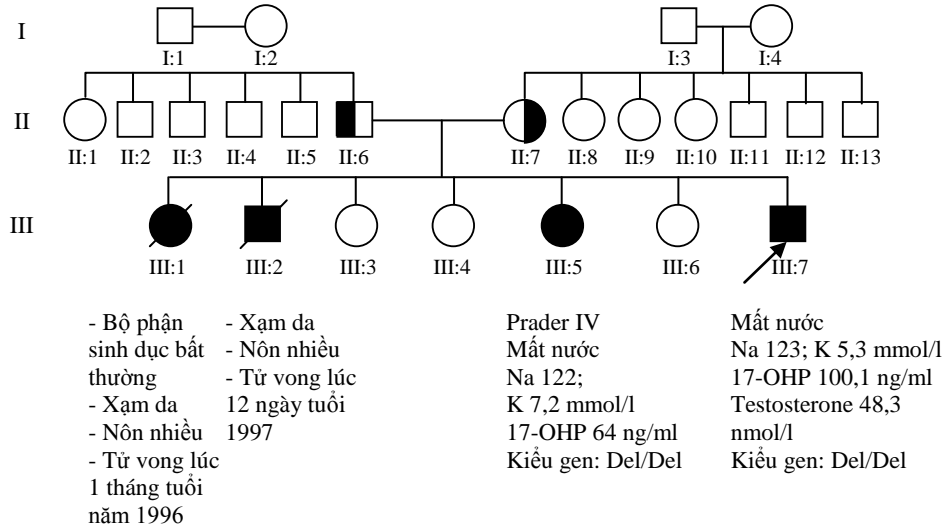
Biểu đồ 3.7. Nồng độ 17-OHP huyết thanh của các bệnh nhân có các nhóm kiểu gen khác nhau.

Trục hoành là các nhóm kiểu gen ‘null’, A, B và C; trục tung là nồng độ 17-OHP huyết thanh (ng/ml)

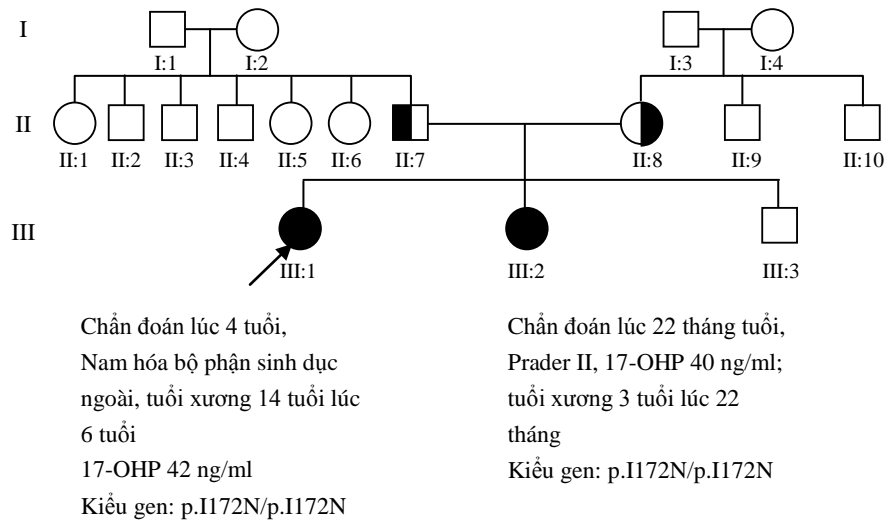
Nhận xét: Nồng độ 17-OHP cao hơn ở các nhóm bệnh nhân có kiểu gen đột biến nặng (‘null’ và A) so với các bệnh nhân có kiểu gen đột biến nhẹ hơn (B và C).

3.2.12. Minh họa phả hệ và ảnh của các bệnh nhân nghiên cứu

3.2.12.1. Phả hệ gia đình của bệnh nhân TSTTBS



Hình 3.13. Phả hệ gia đình có 4 con mắc thể cổ điển MM do đột biến đồng hợp tử xóa đoạn toàn bộ gen *CYP21A2*



Hình 3.14. Phả hệ gia đình có 2 con mắc thể NHĐT do đột biến đồng hợp tử p.I172N/p.I172N

3.2.12.2. Một số hình ảnh kiểu hình của các bệnh nhân nữ thể cổ điển MM và kiểu gen của các bệnh nhân



Hình 3.15. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 192 có kiểu gen xóa đoạn đồng hợp tử toàn bộ gen *CYP21A2* (Del/Del).

Chẩn đoán lúc 1 ngày tuổi, xạm da, nam hóa Prader IV, mất muối lúc 2,5 tháng (Na 126; K 5,4; Cl 95 mmol/l); 17-OHP huyết thanh = 96,1 ng/ml.



Hình 3.16. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 167 có kiểu gen dị hợp tử kép xóa đoạn toàn bộ gen *CYP21A2* và đột biến phổ biến nhóm A (I2g).

Chẩn đoán lúc 16 ngày tuổi; mơ hồ giới tính (Prader IV); mất nước; mất muối; tăng kali máu (Na 119; K 8,0; Cl 89,8 mmol/l); nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng rất cao (1222,3 ng/ml); testosterone huyết thanh = 26,6 nmol/l.



Hình 3.17. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 132 có kiểu gen đồng hợp tử nhóm “null” p.R356W/p.R356W.

Chẩn đoán lúc 17 ngày tuổi, xạm da, mơ hồ giới tính (Prader III), mất nước, mất muối, tăng kali (Na 122; K 6,1; Cl 94 mmol/l); 17-OHP huyết thanh tăng (213,3 ng/ml); testosterone huyết thanh tăng rất cao (94,7 nmol/l).



Hình 3.18. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 160 có kiểu gen dị hợp tử kép một allele xóa đoạn toàn bộ gen *CYP21A2* và một allele đột biến điểm nặng và hiếm gặp (Del/p.R426C).

Chẩn đoán lúc 8 ngày tuổi, xạm da, nam hóa (Prader IV-V), mất muối và tăng kali máu (Na 133; K 6,4 và Cl 105 mmol/l); nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng rất cao (909,2 ng/ml); testosterone tăng (25 nmol/l).



Hình 3.19. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ số 119 có kiểu gen mang 3 đột biến khác nhau (nhóm A kết hợp với nhóm “null”): I2g/p.Q318X+p.R356W.

Chẩn đoán lúc 22 giờ tuổi vì mơ hồ giới tính (Prader IV), xạm da toàn thân và bộ phận sinh dục ngoài, diễn biến có xuất hiện mất muối, tăng kali máu lúc 5 tháng tuổi (Na 122; K 6,9; Cl 92 mmol/l).



Hình 3.20. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM ở bệnh nhân nữ số 131 có kiểu gen phức tạp nhóm “null” (p.L307FfsX6/p.L307FfsX6+p.Q318X).

Chẩn đoán lúc 44 ngày tuổi, mất nước nặng, mất muối (Na 104; K 5,4 mmol/l); 17-OHP tăng (59,9 g/ml).

3.2.12.3. Hình ảnh minh họa kiểu hình thể cổ điển MM ở trẻ trai và các kiểu gen của các bệnh nhân



Hình 3.21. Kiểu hình thể MM của bệnh nhân nam số 173 có kiểu gen dị hợp tử kép một allele xóa đoạn toàn bộ gen *CYP21A2* (nhóm “null”) và một allele đột biến phổ biến nhóm A: Del/I2g.

Chẩn đoán lúc 8 ngày tuổi, xạm da (môi, bộ phận sinh dục ngoài), nôn ngày thứ 7, li bì, bỏ bú, mất muối và kali huyết thanh tăng rất cao (Na 129; K 8,9; Cl 109 mmol/l); 17-OHP huyết thanh tăng rất cao (864,6 ng/ml), testosterone tăng rất cao (74,2 nmol/l).



Hình 3.22. Kiểu hình thể MM của bệnh nhân nam số 177 có kiểu gen dị hợp tử kép hai đột biến hiếm và nặng p.R483PfsX40/p.R426C.

Chẩn đoán lúc 13 ngày tuổi, xạm da, nôn, mất nước, mất muối và tăng kali (Na 122; K 6,2; Cl 91 mmol/l). Nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng rất cao (1852,2 ng/ml); testosterone 15,94 nmol/l; cortisol 64,6 nmol/l.



Hình 3.23. Kiểu hình lúc 5,4 tuổi có dậy thì sớm của bệnh nhân nam số 149 có kiểu gen đồng hợp tử đột biến nhóm “null” là p.R356W/p.R356W.

Tiền sử gia đình có chị gái ruột là bệnh nhân số 95 (chẩn đoán lúc 2 tháng tuổi, Prader IV). Xạm da nặng (môi, núm vú), nôn nặng ở tuổi bú mẹ, nhiều lần phải cấp cứu vì mất nước, nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng cao (114 ng/ml), testosterone 7,8 nmol/l.

3.2.12.4. Minh họa kiểu hình của bệnh nhân nữ thể cổ điển NHĐT và kiểu gen của các bệnh nhân



Hình 3.24. Kiểu hình NHĐT của bệnh nhân nữ số 165 có kiểu gen đột biến đồng hợp tử nhóm B là p.I172N/p.I172N.

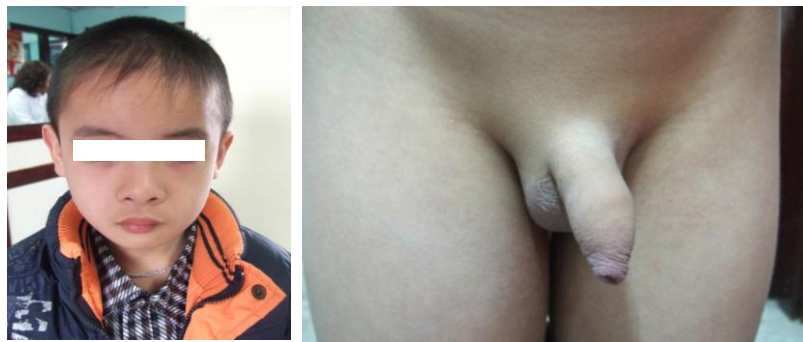
Chẩn đoán lúc 6,5 tuổi; nam hóa nhẹ bộ phận sinh dục ngoài (Prader II); mọc lông mu sớm (P2); tuổi xương 9 tuổi; 17-OHP huyết thanh trước và sau kích thích ACTH (tăng rất cao) tương ứng là 18,53 ng/ml; 1005,2 ng/ml .



Hình 3.25. Kiểu hình thể cổ điển NHĐT của bệnh nhân nữ số 172 có kiểu gen chỉ phát hiện được 1 allele đột biến trên intron 2 (I2g).

Chẩn đoán lúc 4 tuổi vì nam hóa nhẹ bộ phận sinh dục ngoài (Prader II); trứng cá, lông mu (P2), tuổi xương 9 tuổi; điện giải đồ huyết thanh bình thường (Na 135; K 3,8; Cl 105 mmol/l); nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng rất cao (trước kích thích ACTH là 632,4 ng/ml và sau kích thích ACTH là 1717,0 ng/ml).

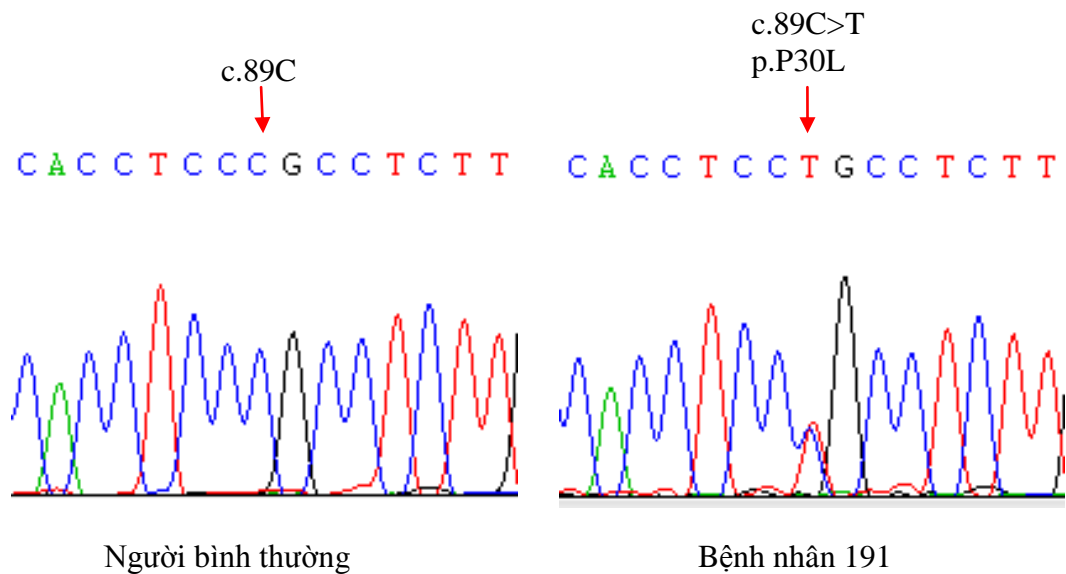
3.2.12.5. Minh họa kiểu hình của bệnh nhân nam có kiểu hình NHĐT và kiểu gen của bệnh nhân



Hình 3.26. Kiểu hình NHĐT của bệnh nhân nam số 158 có kiểu gen dị hợp tử kép một allele xóa đoạn toàn bộ gen *CYP21A2* và một allele khác là đột biến nhóm B (Del/p.I172N).

Chẩn đoán lúc 4,5 tuổi, dậy thì sớm giả (lớn nhanh, cao 119 cm tức +3SD so với biểu đồ tăng trưởng của tổ chức y tế thế giới, dương vật dài 6 cm, thể tích tinh hoàn 2 ml, tuổi xương 8 tuổi); điện giải đồ bình thường (Na 140; K 4,1; Cl 108 mmol/l); nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng cao (269,6 ng/ml).

3.2.12.6. Minh họa kiểu gen và kiểu hình của bệnh nhân thể không cổ điển



Hình 3.27. Kiểu gen, kiểu hình của bệnh nhân nữ số 191 mắc thể không cổ điển có mang allele đột biến p.P30L và một allele đột biến mới lặp đoạn (p.P459_L464dup/p.P30L+p.P459_L464dup).

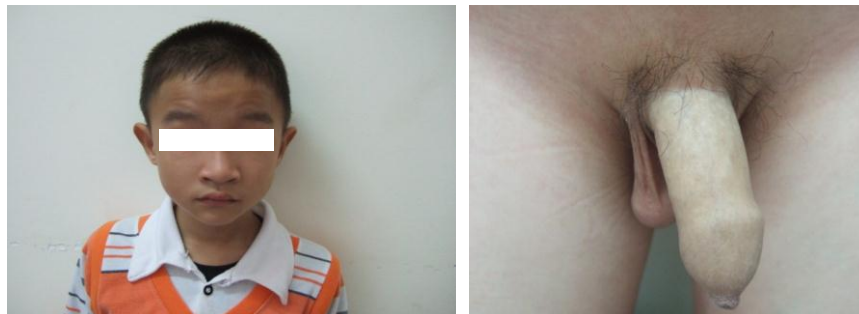
Kiểu hình: chẩn đoán lúc 19 tháng, nam hóa nhẹ (Prader II), tuổi xương tương đương tuổi thực, điện giải đồ huyết thanh bình thường (Na 131; K 4,6; Cl 100 mmol/l); nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng nhẹ (59 ng/ml).

3.2.12.7. Minh họa kiểu hình của các bệnh nhân có kiểu gen và kiểu hình không phù hợp



Hình 3.28. Kiểu hình nam hóa của bệnh nhân nữ số 189 mắc thể cổ điển NHĐT có kiểu gen nhóm “null” (không phù hợp với kiểu hình), kiểu gen mang đột biến dị hợp tử kép: cluster 6 (p.I236N+p.V237E+p.M239K)/p.L307FfsX6.

Chẩn đoán lúc 5 tuổi, ngoại hình giống trẻ trai, Prader III-IV, điện giải đồ huyết thanh bình thường (Na 142; K 3,7; Cl 106 mmol/l); nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng nhẹ (43,3 ng/ml).



Hình 3.29. Kiểu hình NHĐT của bệnh nhân nam số 150 có kiểu gen không phù hợp với kiểu hình là đột biến đồng hợp tử nhóm A (I2g/I2g).

Chẩn đoán lúc 4,5 tuổi với các triệu chứng dậy thì sớm giả: lớn nhanh (cao 123 cm tức +3SD so với biểu đồ tăng trưởng của tổ chức y tế thế giới), trướng cá, giọng ồm, mọc lông mu sớm (P2-3); dương vật 6 cm; thể tích tinh hoàn 3 ml hai bên). Nồng độ 17-OHP huyết thanh tăng cao (821 ng/ml); testosterone 11,47 nmol/l. ACTH tăng (20,7 pg/ml). Tuổi xương 11 tuổi.

Chương 4

BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, 212 bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH đã được phân tích phân tử và đã phát hiện được đột biến của gen *CYP21A2* ở 210 (99%) bệnh nhân trong đó có 8 cặp anh chị em ruột mắc bệnh, do đó các bệnh nhân chỉ điểm (proband) bao gồm 202 bệnh nhân. Nghiên cứu này cung cấp dữ liệu về đột biến gen *CYP21A2*, tương quan kiểu gen – kiểu hình trên số lượng bệnh nhân Việt nam lớn nhất cho tới thời điểm hiện nay. Hai bệnh nhân (2/212; 0,9%) không phát hiện được đột biến gen *CYP21A2* có triệu chứng lâm sàng và hóa sinh điển hình của thể cổ điển MM thiếu 21-OH: trẻ trai, chẩn đoán lúc 34 ngày tuổi, mất nước, mất muối nặng (Na 116; K 8,9; Cl 80 mmol/l), 17-OHP huyết thanh tăng cao 209,4 ng/ml; bệnh nhân khác là trẻ gái, chẩn đoán lúc 21 ngày tuổi, Prader IV, mất nước, mất muối (Na 107; K 8,7; Cl 79 mmol/l), 17-OHP huyết thanh tăng rất cao 2213,7 ng/ml). Số lượng nhất định các bệnh nhân thiếu 21-OH nhưng không phát hiện được đột biến trên gen *CYP21A2* cũng được ghi nhận trong nghiên cứu ở bệnh nhân Đức (1/155; 0,6%) [57] và bệnh nhân Ma-lai-xi-a (2/97; 2,1%) [154].

Trong số 212 bệnh nhân nghiên cứu thì hầu hết là thể cổ điển (205 bệnh nhân; 96,7%). Thể cổ điển MM chiếm tỷ lệ 78,5% và cổ điển NHĐT chiếm tỷ lệ thấp hơn 21,5% các bệnh nhân thể cổ điển. Giới tính đối với từng thể lâm sàng chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với thể cổ điển MM (nam 86; nữ 75), nhưng sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với thể NHĐT (nam 8; nữ 36). Các trẻ gái được chẩn đoán sớm hơn các trẻ trai và tỷ lệ suy thượng thận cấp ở trẻ gái tại thời điểm chẩn đoán cũng thấp hơn trẻ trai đối với thể MM (bảng 3.1). Điều này có thể lý giải là ở thể cổ điển MM và NHĐT thì chẩn đoán dễ dàng hơn ở trẻ gái vì có bất thường bộ phận sinh dục ngoài sau sinh và thường là nguyên nhân đến khám và chẩn đoán. Trong khi

đó các biểu hiện MM ở trẻ trai không đặc hiệu và dậy thì sớm ở trẻ trai thể NHĐT cũng xuất hiện muộn hơn.

4.1. Các đột biến và bản đồ đột biến gen *CYP21A2* ở các bệnh nhân nghiên cứu

Biểu đồ 3.1 cho thấy phân bố tần suất theo các dạng đột biến của gen *CYP21A2* bao gồm: xóa đoạn lớn (34,48%), đột biến sai nghĩa (27,34%), đột biến vô nghĩa (3,7%), intron/promoter (29,31%), lệch khung dịch mã (4,68%) và lặp đoạn (0,69%). Như vậy, 202 bệnh nhân TSTTBS từ 202 gia đình riêng rẽ mang nhiều dạng đột biến gây bệnh khác nhau. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với dữ liệu đột biến gen người trên thế giới (Human Gene Mutation Database - HGMD) (<http://www.hgmd.org>), cập nhật đến 2/2016 thì có 285 đột biến (229 đã được báo cáo) của gen *CYP21A2*. Phân bố dạng đột biến của các đột biến này như sau: sai nghĩa/vô nghĩa (152 đột biến); splicing (12 đột biến); regulatory (1 đột biến); mất đoạn nhỏ (16 đột biến); thêm đoạn nhỏ (12 đột biến); small indel (3 đột biến); xóa đoạn lớn (9 đột biến); thêm đoạn lớn/lặp đoạn lớn (3 đột biến) và phức tạp (21 đột biến) [149].

Đột biến của gen *CYP21A2* phát sinh do hậu quả của hoán vị nhỏ từ giả gen *CYP21A1P* hoặc do trao đổi chéo không cân xứng ở nhiễm sắc thể 6. Các đột biến phát hiện được ở các bệnh nhân nghiên cứu bao gồm: i/ nhóm các đột biến phổ biến: các đột biến xóa đoạn lớn của gen (mất hoàn toàn hoặc xóa đoạn lớn một phần của gen) (34,48%); và các đột biến điểm khác nhau trong đó 13 đột biến phổ biến có nguồn gốc từ giả gen (tổng cộng là 58,85%) với tỷ lệ gặp cao nhất đến thấp nhất bao gồm: I2g (28,57%); p.R356W (12,31%); p.I172N (10,59%); p.Q318X (2,95%); p.L307FfsX6 (2,21%); p.V281L (0,74%); hoán vị gen vùng promoter (g.-113G>A; g.-110T>C; g.-103A>G) (0,74%); p.P30L (0,49%); cluster 6 (p.I236N; p.V237E; p.M239K) (0,25%); ii/ nhóm 7 đột biến hiếm gặp khác nhau đã được báo cáo trong y văn của gen

CYP21A2 cũng được phát hiện trong số các bệnh nhân nghiên cứu bao gồm: p.R426C (1,72%); p.R483PfsX58 (1,23%); p.E246GfsX11 (0,74%); p.M1I (0,25%); p.W19X (0,25%); p.H62L (0,25%); c.1447_1448insC (p.R483PfsX40) (0,25%); iii/ hơn nữa, trong nghiên cứu này chúng tôi cũng phát hiện được 6 đột biến mới chưa từng được báo cáo ở gen *CYP21A2* khi đối chiếu với các nguồn dữ liệu đột biến gen người (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=CYP21A2>) [149]; uỷ ban danh pháp allele Cytochrome P450 người (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>) và dữ liệu từ “1000 genomes” tại “MutationTaster” (<http://www.mutationtaster.org>) [150]. Các đột biến mới này bao gồm: hai đột biến vô nghĩa là p.S125X (0,25%) và p.I112X) (0,25%); một đột biến lặp đoạn c.1375_1392dupCTGCCCTCCCTGCAGCCC (p.P459_L464dup) (0,49%); một đột biến thêm đoạn nhỏ c.del1054-1261insCGGCA (p.V352RfsX103) (0,25%) và hai biến đổi chưa chứng minh được hậu quả trên protein đột biến là p.T123I (0,49%) và p.P401L (0,25%) (bảng 3.2).

Tổng số các đột biến xóa đoạn lớn và các đột biến điểm có nguồn gốc từ giả gen chiếm tỷ lệ 93,33% và các đột biến hiếm phát sinh tại *CYP21A2* chiếm 6,67% (bảng 3.2). Kết quả này cũng góp phần khẳng định rằng tái tổ hợp giữa *CYP21A2* và *CYP21A1P* chiếm tỷ lệ chủ yếu gây nên thiếu hụt 21-OH. Sự phân bố về tỷ lệ các đột biến này phù hợp với hầu hết các nghiên cứu trên nhiều chủng tộc khác nhau. Một dữ liệu lớn đã được báo cáo về đột biến gen *CYP21A2* trên 6400 allele nghiên cứu từ 3200 bệnh nhân TSTTBS cho thấy các đột biến hiếm được phát hiện ở 340 trong số 6400 allele (6%) [151]. Nghiên cứu của Wang R và cộng sự (2016) trên 230 bệnh nhân thiếu 21-OH người Trung Quốc cho thấy tổng cộng các allele đột biến điểm có nguồn gốc từ giả gen chiếm 67,6%; và cao hơn trong nghiên cứu của chúng tôi (58,85%) [152]. Các tác giả này cũng phát hiện được 17 đột biến hiếm xuất phát từ gen

chức năng và chiếm tỷ lệ 7,0% và phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi (6,67%). De Carvalho DF và cộng sự (2016) phát hiện tỷ lệ đột biến điểm cao hơn (86,7%) ở người Bra-xin khi nghiên cứu 856 allele đột biến, trong khi đó tỷ lệ xóa đoạn lớn chỉ chiếm 9% các allele đột biến và các đột biến điểm hiếm chiếm tỷ lệ 4,4%. Sự khác biệt lớn về tỷ lệ đột biến xóa đoạn này có thể giải thích là trong nghiên cứu của các tác giả thì thể không cổ điển chiếm tỷ lệ lớn (206/480 bệnh nhân có kiểu hình thể không cổ điển) [88]. Nghiên cứu của Gidlof và cộng sự (2013) trên 800 allele đột biến của các bệnh nhân thiếu 21-OH ở Thụy Điển cho thấy có 512/800 (64%) allele đột biến có nguồn gốc từ giả gen. Các tác giả cũng phát hiện được 23 đột biến hiếm không có nguồn gốc từ giả gen trong đó tần suất của các allele rất hiếm (22/23 đột biến khác nhau có tần suất allele < 0,5%), 23 đột biến này xuất hiện ở 36 allele và chiếm 4,5% tổng số các allele đột biến [153].

Vị trí của các đột biến trên bản đồ gen *CYP21A2* (bảng 3.2 và hình 3.12) phát hiện được ở các bệnh nhân nghiên cứu phân bố ở 8/10 exon (trừ exon 2 và 5), intron 2 và vùng promoter: 3 đột biến vùng promoter; 4 đột biến ở exon 1; đột biến phổ biến ở intron 2; 3 đột biến mới ở exon 3; 1 đột biến ở exon 4; một nhóm 3 đột biến ở exon 6 (cluster 6); 3 đột biến ở exon 7; 3 đột biến ở exon 8 bao gồm 1 đột biến mới; 1 đột biến mới ở exon 9 và 4 đột biến trong đó có 1 đột biến mới ở exon 10. Như vậy là các đột biến ở nhóm bệnh nhân nghiên cứu của chúng tôi phân tán ở hầu hết các exon của gen *CYP21A2* và phân bố ở intron 2 và vùng promoter. Tổng cộng 15 đột biến điểm đã được báo cáo trong y văn có nguồn gốc từ giả gen được hoán vị sang gen chức năng bao gồm: 4 đột biến vùng promoter; 1 trên intron 2 và 10 đột biến ở vùng mã hóa protein [69]; thì nhóm bệnh nhân nghiên cứu của chúng tôi có 13/15 đột biến có nguồn gốc từ giả gen được phát hiện bao gồm: 3 đột biến vùng promoter; 1 đột biến ở intron 2 và 9 đột biến ở vùng mã hóa protein (hình 3.12).

Nghiên cứu về phân bố vị trí các đột biến trên gen *CYP21A2* của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Wang R và cộng sự (2016) trên 230 bệnh nhân TSTTBS người Trung Quốc. Các tác giả nhận thấy các đột biến điểm ở vùng mã hóa của gen *CYP21A2* phân bố trên hầu hết các exon trừ exon 5 và 9 [152]. Với cỡ mẫu phân tích đủ lớn và tương tự nhau ở nghiên cứu của chúng tôi và của Wang và cộng sự thì có thể khẳng định: đột biến tự phát sinh từ gen *CYP21A2* hiếm xảy ra hơn ở exon 5 ở chủng tộc người Việt Nam và Trung Quốc.

4.1.1. Đột biến xóa đoạn lớn của gen CYP21A2 ở các bệnh nhân nghiên cứu

Bảng 3.2 liệt kê các dạng đột biến khác nhau trong đó có các đột biến xóa đoạn lớn khác nhau phát hiện được ở các bệnh nhân nghiên cứu. Các dạng xóa đoạn này được phát hiện bởi kỹ thuật MLPA bao gồm: mất toàn bộ gen (Del), exon 1 del, exon 1-2 del, exon 1-3 del, exon 1-6 del, exon 1-8 del, exon 4-6 del và exon 8 del. Xóa đoạn toàn bộ gen *CYP21A2* chiếm tỷ lệ cao nhất (25,37%) các allele xóa đoạn lớn, sau đến xóa đoạn từ exon 1-3 (5,67%). Tổng cộng tần suất các đột biến xóa đoạn lớn là 140 và chiếm tỷ lệ 34,48% trong tất cả các đột biến. Như vậy, tỷ lệ cao nhất đột biến xóa đoạn lớn trong số các allele đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với rất nhiều các nghiên cứu trên các chủng tộc khác nhau (bảng 4.1).

Chúng tôi cũng xác định được xóa đoạn đồng hợp tử gặp ở 45 bệnh nhân; 2 bệnh nhân có 2 allele đột biến xóa đoạn khác nhau (exon 1-6 del/exon 4-6 del); 51 bệnh nhân có 1 allele xóa đoạn toàn bộ gen và allele khác là các đột biến điểm hoặc xóa đoạn nhỏ (bảng 3.3). Xóa đoạn đơn độc của 1 exon rất hiếm gặp ở bệnh nhân TSTTBS. Nghiên cứu của Wang R và cộng sự (2016) sử dụng kỹ thuật MLPA ở các bệnh nhân Trung Quốc đã phát hiện được xóa đoạn exon 1-7 hoặc exon 1-8 của gen *CYP21A2* của 1 allele ở 6 bệnh nhân

TSTTBS [152]. Nghiên cứu của Balraj P và cộng sự (2013) trên 97 bệnh nhân TSTTBS ở Malaysia phát hiện 29 bệnh nhân có xóa đoạn exon 1-3 (exon 1-3 del), xóa đoạn exon 1-6 (exon 1-6 del) và xóa đoạn exon 1-8 (exon 1-8 del) ở gen *CYP21A2* với phân bố cụ thể kiểu gen đột biến xóa đoạn như sau: exon 1-6 del/exon 1-6 del (1 bệnh nhân); exon 1-3 del/exon 1-3 del (1 bệnh nhân); exon 1-3 del/exon 1-6 del (1 bệnh nhân); exon 1-6 del/p.R356W (9 bệnh nhân); I2g/exon 1-3 del (6 bệnh nhân); I2g/exon 1-6 del (1 bệnh nhân); I2g/exon 1-8 del (3 bệnh nhân); cluster E6/exon 1-8 del (1 bệnh nhân); p.P30L/exon 1-3 del (1 bệnh nhân); exon 1-8 del/? (1 bệnh nhân). Các tác giả cũng phát hiện 14 bệnh nhân có xóa đoạn lớn 30 kb ở 1 allele [154]. Grischuk Y và cộng sự (2006) báo cáo bệnh nhân người Nga có xóa đoạn exon 1-6 của gen *CYP21A2* và có nguồn gốc từ mẹ [155].

Tỷ lệ xóa đoạn lớn trong các allele đột biến ở bệnh nhân thiếu 21-OH của nhiều chủng tộc khác nhau được trình bày ở bảng 4.1. Xóa đoạn lớn chiếm tỷ lệ cao thậm chí lên đến 43,2% ở các nước châu Âu bao gồm: Phần Lan [156], Đan Mạch [157], Áo [158], Anh [159], Đức [57], Thụy Điển [153], Hà Lan [58], các nước Đông Âu [160]; các nước Mỹ [161] và Úc [162]. Tỷ lệ thấp hơn các đột biến xóa đoạn lớn gặp ở các nước châu Á như Hàn Quốc [105], Trung Quốc [152], Nhật Bản [163], Ma-lai-xi-a [154]. Sự khác nhau này có thể do cỡ mẫu nghiên cứu khác nhau và có thể có yếu tố chủng tộc.

4.1.2. Các đột biến điểm phổ biến có nguồn gốc từ *CYP21A1P* ở các bệnh nhân nghiên cứu

Các đột biến điểm phổ biến nhất trong nghiên cứu của chúng tôi là: I2g (28,57%); p.R356W (12,31%); p.I172N (10,59%) (bảng 3.2). Như vậy, đột biến điểm phổ biến nhất trong số các bệnh nhân nghiên cứu của chúng tôi cũng như trên nhiều chủng tộc khác nhau là đột biến ở intron 2 (I2g) (bảng 4.1).

Kết quả các đột biến điểm phổ biến ở nhóm bệnh nhân của chúng tôi thấp hơn với nghiên cứu của Lee HH và cộng sự (2008) [164]. Trong nghiên cứu này các tác giả đã phân tích đột biến gen *CYP21A2* cho số lượng 200 bệnh nhân Trung Quốc – Đài Loan, gần tương tự như số lượng nghiên cứu của chúng tôi, và đã thu được kết quả phân bố với tỷ lệ cao hơn của các đột biến phổ biến có nguồn gốc từ giả gen: I2g (34%); p.I172N (23,5%); p.R356W (11,8%); p.Q318X (6,3%). Tổng cộng ba đột biến phổ biến (I2g, p.I172N và p.R356W) trong nghiên cứu của các tác giả này là 69,3% trong khi tỷ lệ này trong nghiên cứu của chúng tôi là 51,47% (Bảng 4.1). Krone và cộng sự (2000) đã nghiên cứu trên 155 bệnh nhân thiếu 21-OH tại Đức và thu được tổng cộng các allele đột biến đối với 3 đột biến này là 54,5% [57].

Hơn nữa, tỷ lệ cao đột biến I2g trên bệnh nhân Việt Nam cũng phù hợp với nghiên cứu trên 1507 gia đình thiếu 21-OH của New MI và cộng sự (2013). Đây cũng là một trong hai nghiên cứu trên số lượng bệnh nhân đa chủng tộc lớn nhất bị thiếu 21-OH trên thế giới cho đến nay. Trong nghiên cứu này, các tác giả phát hiện đột biến ở I2g chiếm tỷ lệ 22,9% [69].

Các đột biến phổ biến từ giả gen nhưng gặp với tỷ lệ thấp nhất trong nghiên cứu của chúng tôi bao gồm p.P30L (0,49%) và cluster 6: p.I236N; p.V237E ; p.M239K (0,25%). Phân bố này cũng tương tự ở nghiên cứu trên 1507 gia đình của New MI và cộng sự [69]. Chúng tôi không phát hiện được bệnh nhân nào mang đột biến xóa đoạn 8 bp ở exon 3 (c.329_336delGAGACTAC; p.G110fs) của *CYP21A2*. Tác giả New MI và nhiều nghiên cứu khác cũng nhận thấy đột biến ở exon 3 này chiếm tỷ lệ thấp nhất (2,1%) cùng với cluster 6 (Bảng 4.1). Các nghiên cứu của Balraj P và cộng sự trên 97 bệnh nhân Ma-lai-xi-a [154], Choi JH và cộng sự trên 72 bệnh nhân Hàn Quốc [105], Asanuma A và cộng sự trên 34 bệnh nhân Nhật Bản [163] cũng không phát hiện được bệnh nhân nào mang đột biến mất 8 bp

ở exon 3. Như vậy có thể thấy đột biến mất 8 bp trên exon 3 là hiếm trên chủng tộc châu Á.

Nghiên cứu của New MI và cộng sự trên các chủng tộc người Mỹ nguồn gốc châu Âu, người Mỹ nguồn gốc Bồ Đào Nha, Tây Ban Nha, người Mỹ gốc châu Phi, Trung đông, người Do Thái, Ấn Độ, một số lượng nhỏ các bệnh nhân gốc châu Á khác và các chủng tộc khác [69]. Trong nghiên cứu của chúng tôi thì các đột biến p.R356W (12,31%) và p.I172N (10,59%) chiếm tỷ lệ cao hơn nghiên cứu trên 1507 gia đình của các tác giả này. Tardy V và cộng sự (2009) đề cập đến dữ liệu thu được từ việc phân tích số lượng lớn 6400 allele của 3200 bệnh nhân thiếu 21-OH và tỷ lệ các đột biến điểm như sau: I2g (30%); p.I172N (17%) và p.Q318X (7%) trong số các bệnh nhân thể cổ điển [151]. Đột biến p.R356W ở các chủng tộc châu Âu, châu Mỹ và Trung Quốc đại lục thấp hơn nhiều (0,8 đến 8,4%) so với một số chủng tộc châu Á khác như: Việt Nam (12,31%); Ma-lai-xi-a (22%); Ấn Độ (20%); Singapore (19,2%); Nhật Bản (17,6%); Đài Loan (11,8%) (bảng 4.1) [154],[163],[164],[165],[166].

Đột biến p.V281L có nguồn gốc từ giả gen gặp tỷ lệ thấp trong nghiên cứu của chúng tôi (0,74%). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên các chủng tộc Trung Quốc (0,2 - 0,3%) [152], thậm chí không gặp ở các nghiên cứu ở bệnh nhân người Nhật Bản, Hàn Quốc, Ma-lai-xi-a và Tuy-ni-di [169],[49],[154],[105]. Đây là đột biến phổ biến nhất ở thể không cổ điển của thiếu 21-OH và xuất hiện với tần số cao ở các bệnh nhân người Hy Lạp, Pháp, Á Căn Đình (Argentina), Áo, Ý, Tây Ban Nha, Thổ Nhĩ Kỳ, Bồ Đào Nha và Bra-xin [102],[127],[148],[151],[158],[167],[168],[170],[171] và trong nghiên cứu của New MI và cộng sự (2013) ở các bệnh nhân đa chủng tộc [69]. Sự khác biệt này là do các bệnh nhân thể không cổ điển có tỷ lệ thấp hơn ở các chủng tộc châu Á.

Bảng 4.1: Tần suất của các đột biến trong các nghiên cứu khác nhau

Các đột biến	Xóa đoạn lớn (%)	p.P30L (%)	I2g (%)	E3Δ8bp	p.I172N	E6	p.V281L	p.L307FfsX6	p.Q318X	p.R356W	Số bệnh nhân (n)	Tác giả
Việt Nam	34,5	0,49	28,6	0	10,6	0,3	0,7	2,2	2,9	12,3	202	Nghiên cứu này
Trung Quốc	19,6	0,2	35	4,3	14,3	1,3	0,2	1,7	4,6	5,9	230	Wang R [152]
Đài Loan	9,5		34	0,3	23,5	0,3	0,3	1,8	6,3	11,8	200	Lee HH [164]
Nhật Bản	11,8	1,5	26,5		11,8	1,5			8,8	17,6	34	Asanuma A [163]
Hàn Quốc	31,3		28,5	0	15,3	1,4		1,4	2,8	9,0	72	Choi JH [105]
Ma-lai-xi-a	22,6	1,03	21,3	0	5,3				5,3	22	97	Balraj P [154]
Đa chủng tộc	20,0	2,6	22,9	2,1	8,2	2,1	23,9		3,5	3,6	1507	New MI [69]
Mỹ	30,5	0,8	23,4	0,5	12,6	1,1	12,6	0,3	3,3	3,6	182	Finkelstein GP [161]
Bra-xin	9,0	0,6	21,1	1,8	7,5	1,2	26,6	2,2	6,1	5,4	480	Carvalho D [88]
Argentinean	11,2	0,7	20,6	0,8	8,2	2,0	26,2		6,7	4,2	454	Marino R [148]
Đông Âu	30,6	3,7	31,2	1,0	14,5	0,3	3,4	1,6	2,6	2,4	432	Dolzan V [160]
Thụy Điển	27,5	2,6	27,3	0	16,9	0,9	7,8	0,8	3,9	3,1	490	Gidlof S [153]
Hà Lan	31,9	0,3	28,1	4,3	12,4	3,0	2,2	0,3	35	8,4	198	Stikkelbroeck [58]

Các đột biến	Xóa đoạn lớn (%)	p.P30L (%)	I2g (%)	E3Δ8bp	p.I172N	E6	p.V281L	p.L307FfsX6	p.Q318X	p.R356W	Số bệnh nhân (n)	Tác giả
Đức	27,4	2,6	30,3	1,6	19,7	1,0	2,9	0,3	4,8	4,5	155	Krone N [57]
Anh	30,7	2,9	24,5	1,6	14,4	0,33	7,2		2,9	4,9	153	Krone N [159]
Tây Ban Nha	5,6	1,5	6	1,1	2,3	1,1	63,2	1,5	2,3	0,8	138	Loidi L [167]
Pháp	22,9		20,5	2,7	8,9	5	16,7	1,2	3,9		129	Barbat B [168]
Úc	35,5	1,7	30,6	2,5	10,3		7,9		4,6		121	Huynh T [162]
Áo	35,4	3,2	22,8		15,8	1,9	12	0	2,5	3,2	79	Baumgartner-Parzer SM [158]
Đan Mạch	36		33,8		10,3	1,5	4,4	0,7	8,8	2,2	68	Ohlsson G [157]
Ý	18,4	2,6	21,1	1,8	4,4	1,8	24,6		4,4	1,8	57	Balsamo A [127]
Phần Lan	43,2		11,8		26,7		2,9		2		51	Levo A [156]
Hy Lạp	7,8	3,1	21,9		3,1		54,7		3,1		32	Skordis [102]

Trong nghiên cứu của chúng tôi, đột biến p.P30L trên exon 1 được phát hiện ở 1 bệnh nhân nữ thể không cổ điển có kiểu gen P30L+p.P459_L464dup/p.P459_L464dup và một bệnh nhân nữ thể cổ điển MM kết hợp với đột biến I2g và hoán vị gen vùng promoter (I2G/I2G+Promoter+p.P30L). Marino R và cộng sự (2011) phát hiện được đột biến này ở 15 trong số 866 allele đột biến và chỉ có 6 allele (40%) có đột biến này ở dạng thay đổi ở 1 nucleotid; ở 7 allele khác (46,7%) thì đột biến này là một phần của hoán vị lớn của gen hoặc gen ở trạng thái kết hợp *CYP21A1P/CYP21A2* với vị trí nối giữa 2 gen này nằm phía trước intron 2 (Prom*CYP21A1P*; p.P30L). Ở 2 allele (13,3%) còn lại thì p.P30L kết hợp với các đột biến khác (p.P30L; p.V281L) và (p.P30L; I2g; p.Q318X) [148]. Dolzan V và cộng sự (2005) nhận thấy trong số 43 allele mang đột biến p.P30L thì có 60,5% chỉ mang mỗi đột biến này, trong khi p.P30L và vùng promoter hoặc kết hợp với đột biến thứ 3 xuất hiện ở 17 allele riêng rẽ (39,5%) và chiếm tổng cộng 2,4% tất cả các allele nghiên cứu [160]. Đột biến p.P30L được mô tả cả ở bệnh nhân NHĐT, không cổ điển và cả các bệnh nhân MM [160],[172].

Chúng tôi cũng phát hiện được 3 đột biến vùng promoter (g.-113G>A; g.-110T>C; g.-103A>G) ở 3 bệnh nhân. Một bệnh nhân kết hợp với đột biến I2g và có kiểu hình MM; 1 bệnh nhân kết hợp với đột biến I2g và p.P30L có kiểu hình MM và 1 bệnh nhân khác kết hợp với đột biến p.I172N và có kiểu hình NHĐT (bảng 3.2 và 3.3; biểu đồ 3.3 và 3.4). Nghiên cứu của Marino R và cộng sự (2011) trên 454 bệnh nhân thiếu 21-OH ở Á Căn Đình phát hiện đột biến promoter chiếm tỷ lệ 0,7% các allele đột biến [148]. Các nghiên cứu đột biến ở vùng không dịch mã (noncoding region) của gen *CYP21A2* cho thấy: các đột biến vùng này có thể ảnh hưởng đến sự không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình. Các đột biến có nguồn gốc từ giả gen ở vùng promoter bao

gồm: g.-126C>T; g.-113G>A; g.-110T>C và g.-103A>G làm giảm hoạt độ enzym còn 20% [173],[174]. Nghiên cứu của Dolzan và cộng sự (2003) cho thấy đột biến promoter có nguồn gốc từ giả gen kết hợp với đột biến I2g gây thể mất muối [160]. Nghiên cứu của L'Allemand D và cộng sự (2010) cho thấy: các đột biến promoter và đột biến p.P30L gây kiểu hình NHĐT và không cổ điển vì trong trường hợp này có thể có hoán vị lớn của gen từ giả gen của vùng promoter với cả exon 1 [172]. Nghiên cứu của Dolzan V và cộng sự (2005) ở Trung Âu cho thấy đột biến ở vùng promoter có nguồn gốc từ giả gen ở 3 allele bệnh nhân người Crech; 1 allele bệnh nhân Hung-ga-ri, ở 3 allele bệnh nhân Slovak và tổng cộng chiếm 1% các allele đột biến [160].

4.1.3. Các đột biến hiếm phát sinh tại gen CYP21A2 và không do hoán vị gen ở các bệnh nhân nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp chúng tôi đã phát hiện được 7 đột biến hiếm của gen *CYP21A2* mà đã được báo cáo và được cập nhật ở dữ liệu đột biến gen ở người bao gồm: c.3G>A (p.M1I); c.56G>A (p.W19X); c.185A>T (p.H62L); c.737delA (p.E246GfsX11); c.1276C>T (p.R426C); c.1447_1448delGGinsC (p.R483PfsX58), và c.1447_1448insC (p.R483PfsX40). Tần suất của các allele đột biến theo thứ tự cao nhất đến hiếm gặp nhất bao gồm: c.1276C>T (1,72%); c.1447_1448delGGinsC (1,23%); c.737delA (0,74%); các đột biến khác gặp trên 1 allele và chiếm tỷ lệ 0,25% cho mỗi đột biến (bảng 3.2). Các đột biến hiếm này được phát hiện được ở 13 bệnh nhân nghiên cứu (bảng 3.3).

Đột biến điểm trên exon 1 (c.3G>A; p.M1I) được phát hiện trên 1 bệnh nhân nghiên cứu có kiểu hình MM ở dạng dị hợp tử kép với đột biến I2g (bệnh nhân thứ 7 tại bảng 3.10). Đột biến này được mô tả lần đầu tiên bởi Usui T và cộng sự (2004) trên 1 bệnh nhân người Nhật có kiểu gen hoàn toàn

giống bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi là I2g/p.M1I và kiểu hình mất muối (Na 111; K 9,2 mmol/l) và 17-OHP 475 ng/ml [175].

Đột biến vô nghĩa c.56G>A (p.W19X) được phát hiện ở 1 bệnh nhân MM trong nhóm nghiên cứu và có kiểu gen dị hợp tử kép với allele đột biến khác là xóa đoạn lớn. Allele mang đột biến p.W19X của bệnh nhân này có nguồn gốc từ bố và allele mang đột biến xóa đoạn lớn có nguồn gốc từ mẹ. Bệnh nhân nữ này được chẩn đoán lúc 7 ngày tuổi với các triệu chứng xạm da; mơ hồ giới tính (Prader III); 17-OHP tăng rất cao 619,5 ng/ml; testosterone 19,3 nmol/l; suy thượng thận cấp lúc 2 tháng tuổi (Na 116; K 5,8 và Cl 89 mmol/l). Đột biến này được mô tả lần đầu bởi Pinto G (2002) ở bệnh nhân nam 10 ngày tuổi kiểu hình MM và kiểu gen kết hợp với đột biến xóa đoạn lớn như bệnh nhân của chúng tôi. Đột biến này cũng được mô tả bởi Kharrat M và cộng sự (2004) trên 1 trẻ gái gốc Tuy-ni-di và có nam hóa Prader III, allele đột biến thứ khác của bệnh nhân này không được xác định [49]. Maud Bidet và cộng sự (2009) báo cáo 1 bệnh nhân thể không cổ điển mang đột biến dị hợp tử kép p.W19X và p.V281L [25]. De Carvalho và cộng sự (2016) cũng báo cáo 2 bệnh nhân thể MM mang allele đột biến p.W19X, bệnh nhân thứ nhất có kiểu gen hoàn toàn giống bệnh nhân của chúng tôi là p.W19X/Del; bệnh nhân khác cũng có kiểu hình MM và kiểu gen ngoài allele đột biến p.W19X thì còn hai đột biến khác (I2g/p.W19X/p.V281L) [88]. New MI và cộng sự (2013) cũng báo cáo bệnh nhân nữ kiểu hình MM gốc Tây Ban Nha mang đột biến p.W19X (p.R356W/p.W19X); và 1 bệnh nhân nam gốc Samoan có kiểu hình MM và có kiểu gen p.W19X/I2g [69]. Marino R và cộng sự (2011) cũng phát hiện đột biến p.W19X ở 1 bệnh nhân thể MM ở dạng dị hợp tử kép p.W19X/p.R356W [148].

Đột biến điểm c.185A>T (p.H62L) trên exon 1 của gen *CYP21A2* được phát hiện trên một bệnh nhân nữ có kiểu gen Del+p.H62L/p.Q318X trong đó

các đột biến xóa đoạn lớn và p.H62L có nguồn gốc từ bố và đột biến p.Q318X có nguồn gốc từ mẹ. Bệnh nhân này không xác định được kiểu hình lâm sàng vì ngạt nặng sau đẻ và gia đình xin thôi điều trị lúc 6 ngày tuổi (bệnh nhân số thứ tự 1, bảng 3.8). Bà mẹ đang mang thai lần 2 và kết quả chẩn đoán trước sinh cho thai nhi cũng có cùng kiểu gen như cháu đầu. Đột biến p.H62L lần đầu được mô tả bởi Pinto G và cộng sự (2003) ở trẻ trai 6,8 tuổi, mọc lông sinh dục sớm và có nồng độ 17-OHP trước và sau kích thích bằng ACTH tương ứng là 92,1 và 92,8 ng/ml; bệnh nhân này có kiểu gen là p.P30L+p.H62L/p.P30L+p.H62L [176]. Soardi FC và cộng sự (2008) đã thông báo 3 bệnh nhân mang đột biến p.H62L: bệnh nhân thứ nhất là trẻ gái người Norwegian, chẩn đoán lúc 6 tuổi với các triệu chứng dậy thì sớm ngoại biên, tăng tuổi xương và có kiểu gen là p.H62L+p.P453S/I2g; bệnh nhân thứ 2 là trẻ trai, người Thụy Điển, chẩn đoán lúc 11 tuổi với các triệu chứng dậy thì sớm từ lúc 4 tuổi, kết thúc dậy thì lúc 10 tuổi với chiều cao 160 cm, 17-OHP 47,5 ng/ml; kiểu gen là p.H62L+p.P453S/p.L307FfsX6; bệnh nhân thứ 3 là trẻ gái Bra-xin, chẩn đoán lúc 6 tháng tuổi có kiểu hình MM (Na 119; K 5,3 mmol/l), Prader IV và có kiểu gen phức tạp: p.L307FfsX6/p.P34L+p.H62L+I2g+c.329_336delGAGACTAC. Hơn nữa, trong nghiên cứu này, các tác giả đã nghiên cứu chức năng protein đột biến p.H62L *in vitro* và nhận thấy hoạt độ enzym giảm còn 44 và 21% tương ứng đối với cơ chất là 17-OHP và progesterone. Như vậy đây là đột biến nhẹ gây nên kiểu hình thể không cổ điển [177]. Đặc biệt là Menassa R và cộng sự (2008) khi nghiên cứu về đột biến p.H62L ở 13 bệnh nhân mang đột biến này đã có nhận xét rằng: đây là đột biến phổ biến nhất trong số 60 đột biến mới phát hiện được ở 2900 bệnh nhân thiếu 21-OH tính đến thời điểm 2008. Về mặt kiểu hình, bệnh nhân mang duy nhất đột biến này (đồng hợp tử) có kiểu hình không cổ điển, trong khi các bệnh nhân có kết hợp đột biến này với đột biến nhẹ có kiểu hình

NHĐT. Các tác giả lần nữa khẳng định rằng đây là đột biến nhẹ dựa trên nghiên cứu biểu hiện gen *in vitro*, kết quả chỉ ra rằng hoạt độ enzym còn 29,2% và 66,5% tương ứng đối với cơ chất là 17-OHP và progesterone. Nghiên cứu về cấu trúc không gian ba chiều của protein *CYP21A2* cho thấy H62 nằm ở vị trí tay nối bề mặt và giải thích cho các nghiên cứu về chức năng enzym *in vitro* [178].

Đột biến mất 1 nucleotid c.737delA (p.E246GfsX11) trên exon 7 của gen *CYP21A2* phát hiện được ở 2 bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi: bệnh nhân thứ nhất là trẻ gái, kiểu gen đồng hợp tử p.E246GfsX11/p.E246GfsX11, trẻ có nhiều cơn suy thượng thận cấp từ lúc 1 tháng tuổi, nam hóa bộ phận sinh dục ngoài (Prader IV), u vỏ thượng thận lúc 13 tuổi (bệnh nhân thứ 3, bảng 3.9). Bệnh nhân thứ 2 dị hợp tử kép p.E246GfsX11/Del là trẻ gái và được chẩn đoán lúc 16 ngày tuổi có kiểu hình MM. Đột biến này được mô tả lần đầu bởi Koyama S và cộng sự (2002) ở 1 bệnh nhân kiểu hình MM và có kiểu gen đồng hợp tử đột biến p.E246GfsX11 [169]. Đột biến này gây lệch khung dịch mã và đưa đến tổng hợp protein cắt vì gây tạo nên một mã ngừng ở exon 7. Đột biến được dự báo gây kết thúc sớm của phân tử mRNA trước vùng liên kết với HEME của chuỗi polypeptide P450 và dẫn đến mất hoàn toàn hoạt độ enzym. Đây là lý do gây kiểu hình MM trong nhóm bệnh nhân nghiên cứu cũng như các bệnh nhân được mô tả trong y văn.

Đột biến điểm c.1276C>T (p.R426C) trên exon 10 được phát hiện ở 6 bệnh nhân nghiên cứu và có tần số là 1,72%: 1 bệnh nhân kiểu hình MM có kiểu gen đồng hợp tử p.R426C/p.R426C là trẻ trai, chẩn đoán lúc 23 ngày tuổi; 1 trẻ gái có kiểu gen là p.R426C/Del và được chẩn đoán lúc 8 ngày tuổi vì nam hóa bộ phận sinh dục ngoài nặng (Prader IV), xạm da toàn thân, K 6,4 mmol/l và 17-OHP tăng rất cao 909,2 ng/ml; 2 bệnh nhân kiểu hình NHĐT có

kiểu gen dị hợp tử kép p.R426C/p.I172N là 1 trẻ trai được chẩn đoán lúc 8 tuổi vì các triệu chứng của dậy thì sớm ngoại biên, 1 trẻ gái được chẩn đoán lúc 5 tuổi vì các triệu chứng của nam hóa; 1 trẻ trai kiểu hình MM có kiểu gen dị hợp tử kép trong đó đột biến p.R426C có nguồn gốc từ bố và p.R483PfsX40 có nguồn gốc từ mẹ (hình 3.22); bệnh nhân thứ 6 có kiểu hình NHĐT chẩn đoán lúc 7 tuổi và chỉ phát hiện được duy nhất đột biến p.R426C. Đột biến p.R426C được mô tả lần đầu bởi Grischuk Y (2006) ở một bệnh nhân nữ người Nga ở dạng dị hợp tử kép p.R426C/p.I172N, bệnh nhân này có nam hóa nặng bộ phận sinh dục ngoài (Prader IV) và được coi như trẻ trai, trẻ được chẩn đoán lúc 6 tuổi với các triệu chứng khác là mọc lông sinh dục và tuổi xương 13 tuổi. Đặc biệt, trong nghiên cứu này các tác giả đã công bố kết quả nghiên cứu chức năng enzym đột biến *in vitro* và chứng minh đây là đột biến nặng vì mất hoàn toàn hoạt độ enzym [155]. New MI và cộng sự (2013) mô tả 1 bệnh nhân nữ gốc Đô-mi-ni-ca-na kiểu hình MM và có kiểu gen là p.R426C/Del [69]. Finkielstain và cộng sự (2011) phát hiện đột biến p.R426C ở 1 bệnh nhân kiểu hình MM có kiểu gen dị hợp tử kép với xóa đoạn lớn [161]. Qua kết quả nghiên cứu của chúng tôi và các bệnh nhân của các tác giả có thể chứng minh cho kết quả nghiên cứu về biểu hiện gen *in vitro* là: đột biến p.R426C là đột biến nặng và sẽ gây ra kiểu hình MM ở dạng kiểu gen đồng hợp tử hoặc kết hợp với đột biến xóa đoạn lớn hoặc đột biến nặng khác. Arginine ở vị trí R426 được phát hiện ở CYP450s của động vật có vú và là 1 trong 4 acid amin điều phối HEME propionate, do vậy mà khi cysteine thay thế vào vị trí thiết yếu này sẽ gây mất hoàn toàn hoạt độ enzym.

Đột biến c.1447_1448delGGinsC (p.R483PfsX58) trên exon 10 được phát hiện trên 2 bệnh nhân (1 trẻ trai, 1 trẻ gái) trong nhóm nghiên cứu ở dạng đồng hợp tử và có kiểu hình MM, và được chẩn đoán lúc 33 và 37 ngày tuổi tương ứng; 2 bệnh nhân khác (trẻ trai chẩn đoán lúc 5 tuổi; trẻ gái chẩn đoán

lúc 2 tuổi) có kiểu hình NHĐT, kiểu gen dị hợp tử đột biến p.R483PfsX58 và không phát hiện được allele đột biến khác. Đột biến này được công bố lần đầu bởi Wedell A và cộng sự (1992) ở một bệnh nhân 3 tuần tuổi ở Thụy Điển có kiểu hình MM và kiểu gen dị hợp tử kép p.R483PfsX58/p.R356W [8]. New MI và cộng sự phát hiện đột biến p.R483PfsX58 ở 6 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử kép bao gồm: bệnh nhân nữ gốc Grenada kiểu hình MM có kiểu gen là p.R483PfsX58/p.F306V; 2 bệnh nhân nữ gốc Đô-mi-ni-ca-na và gốc Băng-la-det (Bangladesh) tương ứng kiểu hình thể không cổ điển có kiểu gen là p.R483PfsX58/p.V281L; 2 bệnh nhân nữ gốc Tây Ban Nha kiểu hình MM có kiểu gen tương ứng là p.R483PfsX58/p.Q318X và p.R483PfsX58/p.P482inC và 1 bệnh nhân nữ gốc Croatia kiểu hình MM có kiểu gen là p.R483PfsX58/p.R426H [69]. Đột biến này chiếm 1,23% các đột biến trong nhóm bệnh nhân Việt Nam và tương tự với tỷ lệ 1,5% trong nghiên cứu của Marino R và cộng sự (2011) trên 454 bệnh nhân thiếu 21-OH ở Á Căn Đình [148]. Dolzan V và cộng sự (2005) phát hiện đột biến này trên 6 allele bệnh nhân người Crech và chiếm 0,9% tổng số các allele đột biến ở 476 bệnh nhân ở các nước Trung Âu [160]. Gidlof S và cộng sự (2013) nghiên cứu 800 allele đột biến gây thiếu 21-OH cũng phát hiện 11 allele (1,4%) mang đột biến này [153]. Như vậy, đột biến hiếm p.R483PfsX58 gặp ở 4 bệnh nhân Việt Nam và cũng đã được phát hiện ở một số chủng tộc khác nhau qua các nghiên cứu kiểu gen trên số lượng lớn bệnh nhân thiếu 21-OH.

Đột biến thêm 1 nucleotid c.1447_1448insC (p.R483PfsX40) cũng ở exon 10 được phát hiện ở trẻ trai trong nhóm nghiên cứu có kiểu gen dị hợp tử kép với đột biến hiếm p.R426C (hình 3.22). Đột biến này được mô tả lần đầu bởi Kharrat M và cộng sự (2004) trên bệnh nhân nữ người Tuy-ni-di bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp, bệnh nhân này có biểu hiện nam hóa nặng bộ phận sinh dục ngoài Prader IV, nồng độ 17-OHP 36 ng/ml và có kiểu gen dị

hợp tử với I2g [49]. Finkielstain và cộng sự (2011) phát hiện đột biến p.R483PfsX40 ở dạng dị hợp tử kép với đột biến xóa đoạn lớn ở 1 bệnh nhân kiểu hình MM [161]. Balraj P và cộng sự (2013) phát hiện đột biến p.R483PfsX40 ở dạng dị hợp tử kép với đột biến xóa đoạn toàn bộ gen ở 2 bệnh nhân kiểu hình NHĐT [154].

Như vậy, giải trình tự gen trực tiếp ngoài giúp xác định các đột biến phổ biến còn giúp phát hiện các đột biến hiếm gặp phát sinh ở gen chức năng *CYP21A2*. Các đột biến này hiếm gặp cả về mặt phân bố ở các chủng tộc khác nhau cả về mặt tần suất. 7 đột biến hiếm gặp đã được công bố trên y văn và được phát hiện ở nhóm bệnh nhân Việt Nam cho thấy sự đa dạng về kiểu gen của các bệnh nhân TSTTBS, sự đa dạng kiểu gen này góp phần quy định kiểu hình lâm sàng ở các mức độ nặng khác nhau của bệnh.

4.1.4. Các đột biến mới của gen *CYP21A2* ở các bệnh nhân nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, với kỹ thuật giải trình tự trực tiếp chúng tôi cũng phát hiện được 6 đột biến mới và chiếm tổng cộng 2% các đột biến. Các đột biến mới bao gồm 2 đột biến vô nghĩa đều ở exon 3: c.336C>G (p.I112X) và c.374C>G (p.S125X); 1 đột biến thêm đoạn nhỏ trên exon 8 là c.del1054-1261insCGGCA (p.V352RfsX103); 1 đột biến lặp đoạn 18 nucleotid trên exon 10 của gen *CYP21A2* là c.1375_1392dupCTGCCCTCCCTGCAGCCC (p.P459_L464dup); hai biến đổi điểm ở exon 3 và exon 9 tương ứng là: c.368C>T (p.T123I) và c.1202C>T (p.P401L). Mặc dù chưa nghiên cứu *in vitro* về hậu quả của các biến đổi này đối với protein đột biến, nhưng trên cơ sở của MutationTaster thì 2 đột biến vô nghĩa p.I112X và p.S125X gây ra ngừng phiên mã sớm và dẫn đến tổng hợp protein cụt và gây thiếu hụt hoạt độ enzym; trong khi đột biến thêm đoạn nhỏ sẽ làm lệch khung dịch mã. Như vậy, các đột biến này sẽ ảnh hưởng đến chức năng của enzym.

Các đột biến mới xuất phát từ gen chức năng *CYP21A2* chiếm tỷ lệ nhỏ của các allele đột biến ở nhiều nghiên cứu khác nhau: Finkielstain G.P và cộng sự (2010) nghiên cứu trên 213 bệnh nhân thiếu 21-OH cũng phát hiện được 6 đột biến mới chiếm 1,6% các allele đột biến [161]. Nghiên cứu của Choi và cộng sự trên 72 bệnh nhân Hàn Quốc (2012) cũng phát hiện 2 đột biến mới là p.S371G và c.489del [105]. Wang R và cộng sự bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp cũng phát hiện được 9 đột biến mới của 8 allele (vì có cluster bao gồm 2 đột biến mới trên cùng allele) trong tổng số 460 allele đột biến (1,7%) [152]. Nghiên cứu của Krone và cộng sự (2000) cũng phát hiện 5 đột biến chưa được báo cáo tính đến thời điểm các tác giả công bố và tỷ lệ cao hơn nghiên cứu của chúng tôi là 3,2% các allele đột biến [57]. Nghiên cứu của Wedell A và cộng sự (1994) trên 127 bệnh nhân Thụy Điển cho thấy tỷ lệ mang các allele đột biến mới cũng cao hơn chúng tôi là 3,9% [7].

4.2. Kiểu gen của các bệnh nhân thiếu 21-OH

Bảng 3.3 cho thấy 55 kiểu gen khác nhau ở các bệnh nhân nghiên cứu và phổ biến nhất là các kiểu gen I2g/I2g (31/202; 15,35%), Del/Del (29/202; 14,36%) và Del/I2g (22/202; 10,89%). Tỷ lệ cao (49/55) các kiểu gen khác nhau mà có ít nhất một đột biến là xóa đoạn lớn và/hoặc đột biến điểm phổ biến có nguồn gốc từ giả gen; 37/55 kiểu gen khác nhau trong đó tất cả các allele đều hoặc là xóa đoạn lớn và/hoặc kết hợp với đột biến có nguồn gốc từ giả gen. Kết quả cũng cho thấy sự đa dạng của kiểu gen ở các bệnh nhân trong nghiên cứu này. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của New MI và cộng sự là có tới 45 kiểu gen khác nhau mà trong đó có 9 đột biến phổ biến ở một hoặc cả hai allele đột biến không phân biệt nguồn gốc từ bố hay mẹ [69].

Hơn nữa, nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy phân bố về số lượng đột biến ở 202 bệnh nhân như sau: 102 bệnh nhân (50,5%) có kiểu gen đồng

hợp tử; 74 bệnh nhân (36,7%) có kiểu gen dị hợp tử kép; 12 bệnh nhân (5,9%) có hơn hai đột biến; và 13 bệnh nhân (6,4%) chỉ phát hiện được 1 đột biến dạng dị hợp tử và không phát hiện được allele đột biến kia. Kết quả của chúng tôi về phân bố các bệnh nhân đồng hợp tử và dị hợp tử kép không phù hợp với nghiên cứu của Finkielstain GP và cộng sự (2011). Các tác giả này nhận thấy có 79% các ca là dị hợp tử kép [161]. Nghiên cứu trên các bệnh nhân Hàn Quốc cho thấy đột biến đồng hợp tử chiếm tỷ lệ 43,1% và dị hợp tử kép chiếm 56,9% [105]. De Carvalho DF và cộng sự nghiên cứu trên 480 bệnh nhân Bra-xin thu được tỷ lệ kiểu gen dị hợp tử kép là 65,3% [88]. Chúng tôi giả thiết cho sự khác nhau này là do trong nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ cao các ca thể cổ điển MM nên dẫn đến tỷ lệ cao các ca có đồng hợp tử đột biến xóa đoạn lớn. Yếu tố chủng tộc có thể góp phần vào sự khác biệt này. Tỷ lệ cao các ca đồng hợp tử của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu trên bệnh nhân người Hy Lạp (66% các bệnh nhân đồng hợp tử) [102].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 102/202 bệnh nhân đồng hợp tử xuất hiện ở 13 kiểu gen khác nhau với tỷ lệ lớn nhất các bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử với các kiểu gen: I2g/I2g (31/102; 30,4%); Del/Del (29/102; 28,4%); exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/102; 10,8%); và p.I172N/p.I172N (9/102; 8,8%) và p.R356W/p.R356W (13/202; 6,4%) (bảng 3.3). Nghiên cứu của Choi và cộng sự trên 72 bệnh nhân Hàn Quốc [105] cũng cho thấy kiểu gen đồng hợp tử cao nhất là I2g/I2g (11/31; 35,5%) và xóa đoạn lớn (11/31; 35,5%); p.I172N/p.I172N (3/31; 9,7%) và p.R356W/p.R356W (2/31; 6,5%). Nghiên cứu của Wang R và cộng sự (2016) cũng phát hiện được 68 kiểu gen khác nhau ở 230 bệnh nhân thiếu 21-OH người Trung Quốc trong đó các kiểu gen phổ biến nhất là I2g/I2g (11,7%); I2g/Del (12,1%); I2g/p.I172N (9,1%); Del/Del (6,1%) và Del/p.I172N (5,2%) [152].

Các nghiên cứu cũng cho thấy có sự khác nhau về chủng tộc đối với kiểu gen của TSTTBS và một số kiểu gen gặp với tỷ lệ cao hơn ở một vài nhóm chủng tộc đặc biệt, chẳng hạn, kiểu gen I2g/I2g gặp nhiều hơn ở chủng tộc Trung Đông. Đây cũng là kiểu gen có tỷ lệ cao trong nghiên cứu của chúng tôi (31/202 bệnh nhân; 15,35%).

Chúng tôi đã đề cập về sự phức tạp của việc phân tích đột biến gen *CYP21A2*, Wedell và cộng sự (1994) cũng nhận thấy các bệnh nhân có hơn hai đột biến được phát hiện là do có sự tồn tại nhiều đột biến trên cùng 1 allele, cũng như do sự hiện diện của nhiễm sắc thể mà trên đó có hơn một trình tự của *CYP21A2* [7]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy rằng ở 12/202 (5,9%) bệnh nhân có kiểu gen gồm hơn 2 đột biến (bảng 3.8) thì 7/12 bệnh nhân có đột biến p.Q318X và 5/12 bệnh nhân có mang đột biến p.R356W. Nghiên cứu của Finkielstain GP và cộng sự (2010) nhận thấy có 5/182 bệnh nhân (2,7%) có lặp đoạn của *CYP21A2*. Các tác giả cũng nhận thấy đột biến p.Q318X được phát hiện ở 4 trong số 6 bố/mẹ bệnh nhân mang lặp đoạn *CYP21A2*. Các bố/mẹ này mang đột biến p.Q318X nằm trên allele lặp đoạn và có 1 gen *CYP21A2* bình thường [161]. Nghiên cứu của Kleinle S và cộng sự (2009) cho thấy đột biến nặng p.Q318X kết hợp với các halotype lặp đoạn của gen *CYP21A2* [39]. Krone và cộng sự (2000) nghiên cứu trên 155 bệnh nhân vùng miền nam nước Đức nhận thấy có 2 đột biến trên cùng 1 allele xuất hiện ở 5 allele từ 4 bệnh nhân trong đó: 3 allele đột biến là p.I172N+p.L307FfsX6; 1 allele đột biến là p.I172N+p.R356W và 1 allele đột biến là p.V281L+p.R356W [57]. Marino R và cộng sự (2011) nghiên cứu 866 allele từ 454 bệnh nhân thiếu 21-OH và phát hiện được 35 allele đột biến (4%) có mang hơn 1 đột biến gây bệnh [148]. Koppens PF và cộng sự (2002) báo cáo lặp đoạn *CYP21A2* ở 6 trong số 365 nhiễm sắc thể [179]. Nghiên cứu của Gidlof S và cộng sự (2013) trên 800 allele đột biến ở các bệnh nhân thiếu

21-OH cũng phát hiện được 30/800 allele (3,8%) mang hơn 2 đột biến, trong đó phổ biến nhất là allele mang kết hợp 2 đột biến p.Q318X+p.R356W (5 allele hay 0,6%); 4 allele (0,5%) mang hai gen trên 1 nhiễm sắc thể và mang 2 đột biến I2g và p.Q318X; cá biệt có 2 allele mang 8 đột biến khác nhau trên mỗi allele bao gồm 3 đột biến của Cluster 6 (p.I172N+cluster E6+p.V281L+p.L307FfsX6+p.Q318X+ p.R356W); 3 allele mang 6 đột biến khác nhau bao gồm 3 đột biến của cluster 6 trên mỗi alen (pI172N+Cluster E6+p.L307FfsX6+p.Q318X); điều thú vị là 17/30 (56,7%) allele phức tạp có hơn 2 đột biến này có mang đột biến p.Q318X và 8/30 (26,7%) allele phức tạp mang đột biến p.R356W [153]. Nghiên cứu của De Carvalho và cộng sự (2016) trên 856 allele đột biến của gen *CYP21A2* phát hiện có 6% các allele mang ít nhất 2 hoặc hơn đột biến điểm [88]. Dolzan V và cộng sự (2005) nhận thấy tỷ lệ cao nhất có tới 15,5% các allele mang hơn hai đột biến trong số các bệnh nhân Slovenia, ở các bệnh nhân này thì nghiên cứu halotype đã được thực hiện để khẳng định sự phân ly của các đột biến trong gia đình [160].

Trong nghiên cứu này chúng tôi chưa xác định được tình trạng người lành mang gen (carrier) cho tất cả các bố/mẹ của toàn bộ các bệnh nhân, và do vậy chúng tôi chưa thể khẳng định được cụ thể nguồn gốc các allele đột biến từ bố/mẹ của tất cả các bệnh nhân. Nghiên cứu của Finkielstain GP và cộng sự (2011) cho thấy có 2/213 bệnh nhân từ 182 gia đình có mang đột biến mới không có nguồn gốc từ bố/mẹ (*de novo mutation*) [161]. Speiser PW và cộng sự (2003) cũng nhận xét rằng đột biến mới của *CYP21A2* (*de novo germline mutation*) chiếm khoảng 1-2% các allele đột biến gây thiếu 21-OH [16]. Marino R và cộng sự (2011) phát hiện đột biến mới (*de novo mutation*) ở 0,7% các allele đột biến [148].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ phát hiện được 1 đột biến ở 13 bệnh nhân (bảng 3.3) cho dù đã giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa, vùng gắn nối

exon-intron và promoter của gen *CYP21A2*; và phân tích MLPA. Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh của 13 bệnh nhân này đều điển hình của thiếu 21-OH. Krone và cộng sự (2000) khi nghiên cứu 155 bệnh nhân cũng nhận thấy có 2 bệnh nhân chỉ phát hiện được 1 allele đột biến: 1 bệnh nhân có 1 đột biến xóa đoạn lớn và bệnh nhân khác có 1 allele đột biến p.I172N. Các bệnh nhân đều có đầy đủ các tiêu chuẩn lâm sàng và hóa sinh của TSTTBS thiếu 21-OH. Thậm chí các tác giả đã giải trình tự trực tiếp toàn bộ exon, intron và vùng promoter tới bp -450 của gen *CYP21A2* nhưng cũng không giải thích được lý do chỉ có 1 allele đột biến được phát hiện [57]. Wilson RC và cộng sự (1995) cũng báo cáo một gia đình mà chỉ một allele đột biến được phát hiện, các tác giả đã giải trình tự đến nucleotid -400 của vùng promoter nhưng vẫn không phát hiện được thêm allele đột biến nào [180]. Nghiên cứu của Balraj P và cộng sự (2013) trên 97 bệnh nhân chủng tộc Malay ở Ma-lai-xi-a, các tác giả sử dụng kết hợp các kỹ thuật “PCR-restriction fragment length polymorphism” (RFLP), giải trình tự, Southern blot, MLPA nhưng có tới 6/97 bệnh nhân (6,2%) chỉ phát hiện được 1 allele đột biến [154]. Một số các nghiên cứu khác cũng cho thấy có tỷ lệ khác nhau các allele không phát hiện được đột biến như nghiên cứu trên các bệnh nhân Bra-xin (4,3%) [88]; Á Căn Đình (11,9%) [148]; Thổ Nhĩ Kỳ (0,9%) [171]; Tây Ban Nha (9,3%) [123] và Đức (1,3%) [159].

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng các kỹ thuật PCR, MLPA, và giải trình tự trực tiếp để phát hiện các đột biến của gen *CYP21A2*. Sử dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự trực tiếp của gen không phải luôn luôn phát hiện được các đột biến xóa đoạn và lặp đoạn của gen trong trường hợp có sự hiện diện của 1 bản sao bình thường của gen, ngoại trừ trường hợp cả hai allele xóa đoạn hoàn toàn. Đặc biệt PCR không có khả năng phát hiện các bất thường ở những bệnh nhân có hoán vị lớn của gen *CYP21A2* và *CYP21A1P*.

Tuy nhiên, với MLPA chúng ta có thể phát hiện các xóa đoạn, lặp đoạn dị hợp tử [181].

TSTTBS do thiếu 21-OH là một trong các bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường phổ biến, nhưng chẩn đoán phân tử thì lại phức tạp nhất trong số các bệnh di truyền đơn gen. Trong nghiên cứu này với số lượng bệnh nhân đủ lớn chúng tôi cũng nhận thấy sự phức tạp đó. Sự phức tạp này bao gồm việc phát hiện ra các đột biến mới và hiếm chưa từng được báo cáo, sự xuất hiện các kiểu gen ít gặp. Chúng tôi đã giải trình tự gen *CYP21A2* cho tất cả các bệnh nhân thiếu 21-OH sau khi đã loại trừ xóa đoạn lớn đồng hợp tử bằng MLPA, và đây là một tiếp cận mới khi phân tích đột biến gen *CYP21A2*. Nhiều nghiên cứu trước đó ngay cả trên thế giới thì giải trình tự chỉ được tiến hành ở các bệnh nhân có biểu hiện lâm sàng và xét nghiệm hormon là TSTTBS, nhưng sau khi sàng lọc các đột biến phổ biến không xác định được kiểu gen, hoặc giải trình tự chỉ được tiến hành cho các bệnh nhân không phù hợp giữa kiểu gen - kiểu hình.

4.3. Tương quan kiểu gen - kiểu hình

4.3.1. Kiểu hình của các bệnh nhân thiếu 21-OH

Trong nghiên cứu này, kiểu hình của các bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH được phân tích và phân nhóm: 161 bệnh nhân có kiểu hình MM, 44 bệnh nhân kiểu hình NHĐT và 4 bệnh nhân kiểu hình thể không cổ điển. Các bệnh nhân kiểu hình không cổ điển chiếm tỷ lệ thấp. kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu ở nhiều chủng tộc châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc; các tác giả không ghi nhận bệnh nhân nào mắc thể không cổ điển trong các nghiên cứu bao gồm 72 bệnh nhân Hàn Quốc và 230 bệnh nhân Trung Quốc. Krone và cộng sự (2000) nghiên cứu phân tích phân tử cho 155 gia đình thì thể cổ điển MM chiếm 59,4% (92/155); thể NHĐT chiếm 33,5% (52/155) và không cổ điển 7,1% (11/155) [57]. Các nghiên cứu ở các chủng tộc khác thì thể

không cổ điển chiếm tỷ lệ cao hơn nhiều như: 63,2% các bệnh nhân Tây Ban Nha [167]; 54,7% các bệnh nhân Hy Lạp [102] và 24,6% các bệnh nhân Ý [127]. De Carvalho và cộng sự (2016) phân tích phân tử cho 480 bệnh nhân TSTTBS thì kiểu hình thể không cổ điển chiếm 42,9% và thể cổ điển chiếm 57,1% [88]. Marino R và cộng sự (2011) cũng nghiên cứu phân tử cho 454 bệnh nhân TSTTBS trong đó kiểu hình thể không cổ điển chiếm tỷ lệ 47,8% và cổ điển chiếm 52,2% [148]. Dolzan V và cộng sự (2005) đã công bố kết quả phân tích phân tử và lâm sàng cho 348 bệnh nhân ở các nước Trung Âu bao gồm: Áo, Cộng hòa Séc, Hungary, Slovakia và Slovenia và nhận thấy 63,5% các bệnh nhân có kiểu hình MM; 26,4% có kiểu hình NHĐT và 10,1% có kiểu hình không cổ điển [160]. Nghiên cứu hồi cứu số liệu 100 năm tại Thụy Điển cho thấy trong tổng số 606 bệnh nhân thiếu 21-OH thì thể cổ điển chiếm 75,4% (457/606); thể không cổ điển là 12,7% (77/606) và chưa rõ kiểu hình là 11,9% (72/606). Trong số 457 bệnh nhân kiểu hình thể cổ điển thì MM chiếm 61,1% (279/457 thể cổ điển) [153]. Sự khác nhau về phân bố kiểu hình có thể do yếu tố chủng tộc, hơn nữa các bệnh nhân mắc thể không cổ điển xuất hiện các triệu chứng lâm sàng muộn và đến với các cơ sở y tế người lớn thay vì đến khám và điều trị tại các bệnh viện trẻ em.

4.3.2. Tương quan kiểu gen - kiểu hình của thiếu 21-OH ở các bệnh nhân nghiên cứu

Nghiên cứu của chúng tôi cung cấp dữ liệu phân tử với số lượng lớn nhất bệnh nhân Việt Nam mắc TSTTBS thiếu 21-OH cho đến thời điểm hiện nay, và cũng đủ lớn so với các nghiên cứu trên thế giới (bảng 4.1). Đặc biệt ngoài cung cấp dữ liệu về các đột biến, phân bố các đột biến về mặt tỷ lệ, phân bố vị trí các đột biến trên bản đồ gen *CYP21A2* thì còn cung cấp dữ liệu về tương quan kiểu gen - kiểu hình của các bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH.

Trước hết, chúng tôi nhận thấy rằng kiểu gen của một số đột biến có thể gây nên các kiểu hình khác nhau, chẳng hạn: đột biến trên intron 2 (I2g) kết hợp với kiểu hình MM nhưng một số bệnh nhân lại có kiểu hình NHĐT (bảng 3.3 và 3.6; biểu đồ 3.3 và 3.5). Đột biến I2g (g.655A/C>G) hoạt hóa vị trí đón nhận (acceptor site) ở chiều ngược 3' và dẫn đến sai lệch quá trình gắn nối. Đôi khi đột biến này kết hợp với thể NHĐT có lẽ do quá trình gắn nối được sửa chữa ở số lượng nhỏ của quá trình dịch mã. 1 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử p.R356W/p.R356W cũng có kiểu hình NHĐT (bảng 3.3 và 3.6; biểu đồ 3.2 và 3.5). Ngược lại đột biến trên exon 4 (p.I172N) thường gây ra kiểu hình là thể NHĐT nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi có 2 bệnh nhân mang kiểu hình thể MM (bảng 3.3 và 3.6; biểu đồ 3.4 và 3.5).

Trong số các bệnh nhân nghiên cứu có kiểu hình là thể MM thì các kiểu gen có tỷ lệ cao nhất là: Del/Del (29/153; 18,9%); I2g/I2g (27/153; 17,6%) và Del/I2g (22/153; 14,4%). Ngược lại, trong số các bệnh nhân nghiên cứu có kiểu hình là thể NHĐT thì kiểu gen phổ biến nhất là Del/p.I172N (10/42; 23,8%); p.I172N/p.I172N (8/42; 19,1%) và I2g/p.I172N (4/42; 9,5%). Kiểu gen của kiểu hình thể không cổ điển là: p.V281L/p.L307FfsX6 (3/4 bệnh nhân) và p.P30L+p.P459_L464dup/p.P459_L464dup (1/4 bệnh nhân). Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu về tương quan kiểu gen - kiểu hình trên số lượng lớn là 606 bệnh nhân đa chủng tộc mắc thể MM, các kiểu gen phổ biến nhất của kiểu hình MM là I2g/I2g (23,6%), sau đó đến Del/Del (19,1%) và Del/I2g (18,2%). Đối với thể NHĐT thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu trên 187 bệnh nhân đa chủng tộc mắc thể NHĐT, kiểu gen phổ biến nhất của kiểu hình NHĐT là Del/p.I172N (28,3%); I2g/p.I172N (19,3%) và p.I172N/p.I172N (11,2%). Đối với thể không cổ điển, mặc dù cỡ mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi thực sự hạn chế ở 4 bệnh nhân nhưng có tới 3 bệnh nhân có kiểu gen là p.V281L/p.L307FfsX6 và

bệnh nhân còn lại có kiểu gen là p.P30L+p.P459_L464dup/p.P459_L464dup (hình 3.27). Nghiên cứu của New MI và cộng sự trên cỡ mẫu rất lớn là 545 bệnh nhân thể không cổ điển thì kiểu gen phổ biến nhất là p.V281L/p.V281L (38,5%); I2g/p.V281L (19,8%) và Del/p.V281L (17,4%) [69].

Một điểm thú vị là trong số các đột biến điểm thì nghiên cứu phân tích trên *silico* cho thấy các dự báo kiểu hình đối với các kiểu gen có đột biến p.I172N là thể NHĐT, đột biến p.V281L là thể không cổ điển, và được khẳng định bằng theo dõi lâu dài diễn biến lâm sàng. Tiếp theo thì nghiên cứu sử dụng mô hình điện toán cũng dự báo là đột biến trên exon 4 (p.I172N) gây mất bao kỵ nước của enzym và gây bệnh thể NHĐT [117]. Các dự báo này được khẳng định bởi các nghiên cứu về biểu hiện gen *in vitro* và đã cho thấy rằng đột biến p.I172N gây giảm hoạt độ 21-OH còn 2% so với bình thường [65]. Trong nghiên cứu của chúng tôi thì kiểu hình NHĐT xuất hiện ở 94,1% (32/34) các bệnh nhân có kiểu gen trong đó có ít nhất 1 allele đột biến p.I172N và xuất hiện ở 100% (17/17) các bệnh nhân có 1 đột biến là p.I172N và đột biến khác thuộc nhóm đột biến nặng (nhóm “null”) (bảng 3.4); 2 bệnh nhân (5,9%) biểu hiện kiểu hình MM và có kiểu gen tương ứng là p.I172N/p.I172N và I2g+p.I172N/p.I172N. Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh của 2 bệnh nhân này được mô tả chi tiết tại bảng 3.6 (bệnh nhân thứ 4 và 5). Tỷ lệ mang kiểu hình là NHĐT lại thấp hơn (76%) trong nghiên cứu của New MI và cộng sự trên 182 bệnh nhân có ít nhất một đột biến là p.I172N, và có tới 23% các bệnh nhân mang ít nhất một đột biến p.I172N có kiểu hình là MM chứng tỏ có thiếu hụt sản xuất aldosterone. Các nghiên cứu khác trên những bệnh nhân người Đức [57], Hà Lan [58], Á Căn Đình [148], Hàn Quốc [105] và Trung Quốc [152] đều cho thấy đột biến p.I172N không những quy định kiểu hình NHĐT mà còn có kiểu hình thể MM. Nghiên cứu trên các bệnh nhân Mỹ cho thấy trong số 46 bệnh nhân có kiểu gen có ít nhất một

allele đột biến là p.I172N và allele khác là đột biến nặng thì có 39/46 (84,8%) bệnh nhân có kiểu hình NHĐT; 5/46 (10,9%) bệnh nhân có kiểu hình MM; và thậm chí còn có 2 bệnh nhân có kiểu hình không cổ điển với kiểu gen là p.I172N/I2g và p.I172N/p.I172N [161]. Các tác giả lý giải sự không phù hợp kiểu gen - kiểu hình này là do giảm biểu hiện của gen ở các enzym 21-OH đột biến, phát sinh từ sự khác nhau tinh vi trong quá trình điều hòa phiên mã hoặc quá trình dịch mã của các protein khác.

Kiểu gen có ít nhất 1 đột biến là I2g (bảng 3.3 và 3.4; biểu đồ 3.3 và 3.5) có kiểu hình là MM ở 62/74 (83,8%) và kiểu hình NHĐT ở 10/74 (13,5%) bệnh nhân. Trong số 10 bệnh nhân NHĐT thì 4/10 có kiểu gen I2g/p.I172N. Phân bố này cũng được nhận thấy ở nghiên cứu trên đa chủng tộc: chỉ 220/280 (78,6%) các bệnh nhân mang ít nhất 1 allele đột biến I2g có kiểu hình MM và có tới 57/280 (20,4%) bệnh nhân là có kiểu NHĐT [69]. Tỷ lệ nhất định của các bệnh nhân có kiểu gen mang ít nhất 1 allele đột biến I2g và allele còn lại là đột biến nhóm “null” nhưng có kiểu hình NHĐT cũng được ghi nhận ở các bệnh nhân người Mỹ (6/71; 8,5%) [161], Hàn Quốc (1/26; 2,8%) [105], Trung Quốc (10/95; 10,5%) [152]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 2/29 bệnh nhân đồng hợp tử I2g/I2g (bảng 3.4) có kiểu hình NHĐT. Các bệnh nhân đồng hợp tử I2g/I2g có kiểu hình NHĐT cũng được ghi nhận ở các nghiên cứu trên bệnh nhân người Mỹ da trắng (1/9 bệnh nhân) [161], Trung Âu (5/67) [160] và Trung Quốc (4 bệnh nhân) [152]. Marino R và cộng sự (2011) nhận thấy có 2 anh em ruột có cùng kiểu gen I2g/I2g nhưng có kiểu hình khác nhau là MM và NHĐT [148]. Cơ chế của sự khác nhau về kiểu hình lâm sàng đối với một đột biến đơn độc chiếm ưu thế vẫn chưa rõ, có một khả năng là một tỷ lệ nhỏ bệnh nhân sản xuất được một lượng nhỏ enzym do các gán nội bình thường và giúp làm giảm mức độ nặng của lâm sàng.

Một trong những kiểu gen phổ biến trong nghiên cứu của chúng tôi là các bệnh nhân có ít nhất một đột biến nặng phổ biến p.R356W (35/202; 17,3%) (bảng 3.3). Kiểu gen có đột biến này gây nên thể lâm sàng MM trong hầu hết các bệnh nhân (31/35; 88,6%). Các bệnh nhân có ít nhất một đột biến p.R356W nhưng lại có kiểu hình NHĐT bao gồm 2 bệnh nhân có kết hợp với đột biến p.I172N (hình 3.4); 1 bệnh nhân kết hợp với đột biến mới p.P401L (bảng 3.5), và đặc biệt có 1 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử p.R356W/p.R356W, đó là bệnh nhân nam, chẩn đoán lúc 4,5 tuổi với các triệu chứng dậy thì sớm giả, điện giải đồ bình thường, 17-OHP tăng cao 725 ng/ml (bảng 3.6, bệnh nhân thứ 7). Wang R và cộng sự (2016) cũng báo cáo 1 bệnh nhân nữ được chẩn đoán lúc 1,6 tuổi và có kiểu gen đồng hợp tử đột biến p.R356W nhưng có kiểu hình NHĐT [152]. Đột biến p.R356W dẫn đến phá vỡ sự kết nối H (H-bonding) với axit amin glutamine ở vị trí 389 (Q389) và gây tăng xung đột cấu trúc không gian, thay đổi cấu trúc không gian ba chiều của enzym, làm thay đổi liên kết HEME và phá hủy hoạt độ enzym [117].

Kiểu gen có đột biến p.P30L thường được nhận thấy ở kiểu hình thể không cổ điển vì đột biến này chỉ gây mất 40-70% hoạt độ enzym qua nghiên cứu *in vitro* [61]. Điều này cũng được nhận thấy trong nghiên cứu của chúng tôi ở 1 bệnh nhân nữ mang đột biến p.P30L kết hợp với đột biến mới lặp đoạn (hình 3.29). Bệnh nhân khác trong nghiên cứu của chúng tôi mang đột biến p.P30L có kiểu hình MM và có kiểu gen phức tạp do hoán vị gen (g.-113G>A + g.-110T>C + g.-103A>G+I2g+p.P30L/I2g) (bảng 3.6). Nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân đa chủng tộc có tới 23/74 (31%) bệnh nhân mang đột biến p.P30L có kiểu hình là thể cổ điển [69].

Như vậy, có sự khác nhau về kiểu hình ở một số lượng đáng kể các bệnh nhân có cùng kiểu gen trong bệnh TSTTBS thiếu 21-OH và được ghi nhận ở tất cả các nghiên cứu trên thế giới. Chin D và cộng sự (1998) nhận

thấy kiểu hình khác nhau thậm chí ở cùng anh chị em ruột [182]. Thực trạng này cho thấy có thể có vai trò của các yếu tố làm thay đổi dịch mã và tác dụng của 21-OH. Speiser PW và cộng sự (1991) nhận thấy trên thực tế có những bệnh nhân tự thuyên giảm một phần TSTTBS và như vậy còn các yếu tố khác gen *CYP21A2* và có vai trò nhất định gây nên sự thay đổi này [183]. Sự không phù hợp kiểu gen - kiểu hình có thể do hoặc là hoạt độ hydroxylase ngoài thượng thận hoặc các yếu tố khác đã làm thay đổi tổng hợp và tác dụng của steroid. Rice DA và cộng sự (1990); Donohoue PA và cộng sự (1992) đã đặt ra khả năng về vai trò quan trọng của promoter đối với quá trình phiên mã của gen *CYP21A2* và điều hòa sự biểu hiện gen của protein 21-OH [184],[185]. Thêm nữa, nhiều receptor khác nhau hoặc ái lực gắn với androgen, cortisol, hoặc aldosterone rất có thể có vai trò gây ra sự khác nhau về kiểu hình này. Krone và cộng sự (2000) giả thiết rằng còn có vai trò hoạt động của các yếu tố phiên mã và sự biểu hiện của các protein vận chuyển ở từng cá thể [57].

Chúng tôi cũng nhận thấy trong các bệnh nhân nghiên cứu có các kiểu gen mà chỉ gây nên thể MM là khi có sự kết hợp bất kể các đột biến phổ biến sau đây: Del, p.L307FfsX6, p.Q318X. Nghiên cứu của New MI và cộng sự cho thấy sự kết hợp của bất kể các đột biến sau đây Del, E3Δ8bp, E6 (p.I236N, p.V237E và p.M239K), p.Q318X và p.R356W hầu hết sẽ có kiểu hình là thể MM [69]. Đột biến p.I236N và p.V237E dẫn đến phá hủy gần hoàn toàn hoạt độ enzym *in vitro*. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, đột biến này chỉ gặp 1 allele kèm theo với đột biến nặng ở nhóm “null” là p.L307FfsX6 trên một bệnh nhân nữ có kiểu hình NHĐT (bảng 3.6, bệnh nhân thứ 6 và hình 3.28). Chúng tôi chưa có lý giải được lý do của sự không phù hợp lớn giữa kiểu gen và kiểu hình ở bệnh nhân này.

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 4 bệnh nhân mắc thể không cổ điển trong đó có 1 bệnh nhân nữ có kiểu gen là p.P30L+L458_P463dup/L458_P463dup và kiểu hình nam hóa nhẹ (Prader II)

(hình 3.29). Nghiên cứu của De Carvalho DF và cộng sự (2016) trên cỡ mẫu lớn gồm 206 bệnh nhân thể không cổ điển được khẳng định bằng kiểu gen, với tỷ lệ nữ/nam là 6,7/1,0 cho thấy có tới 8% bệnh nhân nữ được chẩn đoán có phì đại nhẹ âm vật (Prader I) [88]. Các bệnh nhân thể không cổ điển khác trong nghiên cứu của chúng tôi đều là trẻ trai và cả 3 bệnh nhân đều có kiểu gen là p.V281L/p.L307FfsX6. Cả 3 trẻ này đều được chẩn đoán nhờ sàng lọc các trẻ trai có xạm da vùng bìu. Theo dõi diễn biến lâm sàng sau theo dõi từ 2 đến 12 năm nhận thấy diễn biến phù hợp với thể không cổ điển thiếu 21-OH. Nghiên cứu của Gidlof S và cộng sự (2013) trên các bệnh nhân TSTTBS người Thụy Điển cũng xác định được 38 trẻ bú mẹ mắc thể không cổ điển thiếu 21-OH, trong đó 24 trẻ không phát hiện được qua sàng lọc sơ sinh và chỉ 14 trẻ (37%) có kết quả sàng lọc sơ sinh dương tính [153]. Nghiên cứu dự báo trên *silicon*, đột biến p.V281L gây giảm hoạt độ enzym một phần do sự xung đột cấu trúc không gian gây nên bởi chiều dài của chuỗi polypeptid tăng lên là do leucine được thay thế cho valine [117]. Tuy nhiên nghiên cứu trên 506 bệnh nhân có mang ít nhất 1 allele đột biến là p.V281L thì có 497 bệnh nhân (98,2%) là có kiểu hình lâm sàng thể không cổ điển nhưng cũng có 3 bệnh nhân (0,6%) mắc thể NHĐT thậm chí có 6 bệnh nhân (1,2%) là mắc thể MM [69]. Các tác giả nhận định rằng tương quan kiểu gen - kiểu hình hay tương quan giữa cấu trúc protein đột biến và kiểu hình ở bệnh nhân TSTTBS không luôn luôn đúng. Nguyên nhân của kiểu hình thể MM ở đột biến chỉ gây giảm 50% hoạt độ enzym này vẫn còn chưa rõ.

4.3.3. Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân TSTTBS có u vỏ thượng thận

Trong nghiên cứu của chúng tôi, u vỏ thượng thận xuất hiện trên 3 bệnh nhân đã được chẩn đoán TSTTBS; còn 1 bệnh nhân chẩn đoán ban đầu là u vỏ thượng thận sau đó mới được khẳng định TSTTBS thiếu 21-OH (bảng 3.9). Trong 4 bệnh nhân u vỏ thượng thận này thì 3 bệnh nhân có kiểu gen

đồng hợp tử và 1 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử kép nhưng đều thuộc nhóm “null”. Các nghiên cứu trên bệnh nhân TSTTBS ở các nước khác nhau cũng cho thấy tỷ lệ cao các bệnh nhân thiếu 21-OH có xuất hiện u vỏ thượng thận: Jaresch S và cộng sự (1992) cho thấy có trên 80% các bệnh nhân đồng hợp tử và 45% các bệnh nhân dị hợp tử kép có khối u thượng thận, mặc dù các tác giả nhận thấy không có mối tương quan giữa kích thước khối u và nồng độ 17-OHP huyết thanh. Nếu khối u vỏ thượng thận tình cờ được phát hiện thì nên tiến hành các xét nghiệm để loại trừ TSTTBS [186]. Falhammar H và cộng sự (2016) đã phân tích dữ liệu từ 36 xuất bản về khối u vỏ thượng thận liên quan đến TSTTBS và nhận thấy rằng: sàng lọc hóa sinh cho các bệnh nhân u vỏ thượng thận thì kết quả 58/990 (5,9%) có chẩn đoán xác định TSTTBS. Các tác giả kết luận: phân tích đột biến gen *CYP21A2* có lẽ là phương pháp thích hợp để chẩn đoán TSTTBS ở các bệnh nhân u vỏ thượng thận [187].

4.3.4. Tương quan giữa kiểu gen và mức độ nam hóa Prader ở trẻ gái

Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng ở nhóm kiểu gen “null” thì có tỷ lệ cao các bệnh nhân nữ bị nam hóa nặng (Prader IV-V là 56,1% và Prader III là 39%); ở nhóm kiểu gen A thì Prader III có tỷ lệ cao (68,2%); trong khi đó ở nhóm kiểu gen B thì Prader I-II và III có tỷ lệ cao (40%) (biểu đồ 3.6). Các dữ liệu về mối tương quan giữa các nhóm kiểu gen với mức độ nặng của nam hóa bộ phận sinh dục ngoài cho kết quả khác nhau [7],[111],[159]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của De Carvalha và cộng sự (2016) trên các bệnh nhân Bra-xin: mức độ nam hóa nặng gặp nhiều ở các kiểu gen nhóm “null” và A hơn là ở nhóm kiểu gen B. Tuy nhiên các nghiên cứu đều thấy có khoảng giao động lớn trùng nhau về mức độ nặng của nam hóa giữa các nhóm kiểu gen. Do vậy, kiểu gen không thể được sử dụng như yếu tố dự báo cho mức độ nặng của nam hóa [88].

4.3.5. Tương quan giữa kiểu gen và nồng độ 17-OHP huyết thanh

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê của nồng độ 17-OHP; testosterone và progesterone huyết thanh của các bệnh nhân có các nhóm kiểu gen “null”; A và B trong đó kiểu gen nặng có mức tăng 17-OHP huyết thanh cao hơn (bảng 3.12 và biểu đồ 3.7). De Carvalha F và cộng sự (2016) cũng nhận thấy có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê của nồng độ 17-OHP giữa các nhóm kiểu gen [88]. Tuy nhiên, có sự chông chéo lớn về nồng độ 17-OHP của các nhóm kiểu gen cũng được ghi nhận [57]. Hơn nữa, các tác giả Nordenstrom A và cộng sự (1999) cũng nhận thấy mức tăng 17-OHP ở trẻ đủ tháng phản ánh mức độ nặng của bệnh theo các nhóm kiểu gen [188].

4.4. Giá trị của phân tích đột biến gen *CYP21A2* trong thực hành lâm sàng

4.4.1. Dự báo kiểu hình dựa trên kiểu gen

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về giá trị dự báo dương tính của kiểu gen với kiểu hình (ppv) ở các nhóm kiểu gen “null”, “A”, “B” và C tương ứng là 99,8%; 96,5%; 90,6% và 100% (bảng 3.4). 88 trong số 90 bệnh nhân có kiểu gen nhóm “null” (với các đột biến gây mất toàn bộ hoạt độ enzym) có kiểu hình thực tế là thể MM, trong khi đó có 2 bệnh nhân có kiểu hình NHĐT. Ở nhóm kiểu gen A (dự báo kiểu hình MM) thì 55/57 bệnh nhân có kiểu hình thực tế là MM trong khi có 2/57 bệnh nhân NHĐT. 29/32 bệnh nhân ở nhóm B (dự báo kiểu hình NHĐT) đều có kiểu hình phù hợp với dự báo, trong khi đó 3 bệnh nhân có kiểu hình MM. Ở nhóm “C” thì tất cả 4 bệnh nhân đều có kiểu hình không cổ điển. Như vậy giá trị dự báo dương tính ở các nhóm kiểu gen đều cao trong đó giá trị dự báo dương tính kiểu hình MM của kiểu gen nhóm “null” cao hơn kiểu gen nhóm “A”.

Như vậy, nhìn chung có thể dự báo mức độ nặng của bệnh dựa trên kiểu gen đối với các thể MM và NHĐT, điều này đặc biệt quan trọng trong việc quyết định liệu pháp hormon thay thế đối với các bệnh nhân được chẩn đoán nhờ sàng lọc sơ sinh, hoặc được chẩn đoán sớm khi chưa có triệu chứng lâm sàng của mất muối. Nhận định này cũng được củng cố thông qua theo dõi diễn biến lâm sàng của 14 bệnh nhân thể cổ điển MM được chẩn đoán < 5 ngày tuổi khi chưa có triệu chứng mất muối trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.10).

Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nhiều nghiên cứu về giá trị dự báo dương tính đối với thể MM, nhưng cao hơn nhiều nghiên cứu khác ở thể NHĐT, còn đối với thể không cổ điển vì cỡ mẫu còn nhỏ và cần tiếp tục có các nghiên cứu khác trong tương lai. Nhìn chung các nghiên cứu công bố trên y văn đều nhận định là giá trị dự báo dương tính cao đối với thể MM và thể không cổ điển, còn đối với thể NHĐT thì kiểu hình có sự khác nhau lớn và giá trị dự báo dương tính kém hơn [57],[58],[109] (bảng 4.2).

Bảng 4.2: Giá trị dự báo kiểu hình dương tính của các nhóm kiểu gen khác nhau ở một số nghiên cứu

Nhóm đột biến	“null”	A	B	C
Thể lâm sàng	Mất muối		Nam hóa đơn thuần	Không cổ điển
Nghiên cứu này. 2016	99,8%	96,5%	90,6%	100%
de Carvalho DF và cs. 2016 [88]	88%	70%	98%	100%
Wang R và cs. 2016 [152]	88,9%	89,4%	88,9%	
Balraj P và cs (2013) [154]	95,7%	90,9%	66,7%	
Choi và cs. 2012 [105]	100%	96,2%	94,1%	
Rabbani B và cs. 2012 [103]	92,3%	85,7%	100%	
Marino R và cs. 2011 [148]	100%	83,8%	87,2%	100%
Balsamo và cs. 2010 [93]	100%	91,5%	83,7%	86,4%

Finkielstain và cs. 2011 [161]	88,9%	91,5%	85,1%	97,8%
Speiser và cs. 1992 [109]	96%	85%	73%	63%
Krone và cs. 2000 [57]	100%	90%	74%	65%
Stikkelbroeck và cs. 2003 [58]	97%	96%	53%	100%

Trong thực hành lâm sàng dự báo kiểu hình cần lưu ý đến các trường hợp ngoại lệ. Trong nghiên cứu của chúng tôi có tổng cộng 7 bệnh nhân không phù hợp giữa kiểu gen - kiểu hình, trong đó có 3 bệnh nhân có kiểu gen nhóm B nhưng có kiểu hình MM và 4 bệnh nhân còn lại trong đó 2 bệnh nhân thuộc nhóm kiểu gen “null” và 2 bệnh nhân nhóm kiểu gen “A” nhưng lại có kiểu hình là thể NHĐT (bảng 3.6). Một khả năng nữa để lý giải cho nguyên nhân không phù hợp này là: sự khác nhau về mặt di truyền của các gen khác là *CYP2C19* và *CYP3A4*, đây là các gen biểu hiện ở gan và đã được chứng minh là có khả năng điều chỉnh sự cân bằng muối ở các bệnh nhân TSTTBS có thiếu hụt mineralocorticoid, hoặc có một sự kết hợp của các yếu tố chưa được biết có khả năng thay đổi tác dụng của steroid, hay có các yếu tố ngoài thượng thận không bị tổn thương có thể gây thay đổi kiểu hình của thiếu 21-OH và gây khó khăn cho dự báo mức độ nặng của kiểu hình thiếu 21-OH [189]. Thực tế lâm sàng cho thấy có sự liên tục và đôi khi khó có gianh giới về mức độ nặng của bệnh, thậm chí trong cùng một dưới nhóm thì có một khả năng là một số bệnh nhân không rõ ràng thuộc nhóm kiểu hình nào.

4.4.2. Dự báo kiểu hình ở các bệnh nhân được chẩn đoán sớm khi chưa có triệu chứng lâm sàng và trong điều trị trước sinh

Sàng lọc sơ sinh cho bệnh TSTTBS được tiến hành lần đầu năm 1977 như một chương trình thí điểm tại Alaska, Mỹ [153],[190]. Từ đó, toàn bộ các tiểu bang của Mỹ và rất nhiều nước khác nhau đã triển khai sàng lọc sơ sinh đối với TSTTBS [11]. Mục đích của sàng lọc sơ sinh là phòng suy thượng

thận cấp mất muối và tử vong ở cả hai giới cũng như rút ngắn thời gian chẩn đoán ở trẻ gái có mơ hồ giới tính. Trong chương trình sàng lọc sơ sinh TSTTBS thì nghiên cứu về phân tử mang lại lợi ích đặc biệt, giúp chẩn đoán chính xác, tránh cho bệnh nhân phải điều trị và theo dõi không cần thiết. Đối với các trường hợp không có triệu chứng có kèm theo tăng 17-OHP dai dẳng, phân tích phân tử giúp khẳng định chẩn đoán và chẩn đoán loại trừ, dự báo kiểu hình trước khi xuất hiện triệu chứng. Khi sàng lọc sơ sinh kết hợp với khả năng phân tích đột biến gen *CYP21A2* cho phép các nhà lâm sàng rút ngắn thời gian đánh giá kiểu hình, chứ không chờ đợi các biểu hiện mất muối trên lâm sàng để quyết định điều trị, điều này ngăn ngừa tổn thương thần kinh trung ương do mất muối nặng hoặc tử vong do mất muối, giảm thể tích tuần hoàn và sốc.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng các kỹ thuật di truyền phân tử hiện đại, nhanh, chính xác và tin cậy trong chẩn đoán phân tử thiếu 21-OH để xác định các đột biến điểm và tái cấu trúc trong gen *CYP21A2*. Kết quả về tương quan kiểu gen - kiểu hình sẽ hỗ trợ chẩn đoán và điều trị cho chương trình sàng lọc sơ sinh cũng như các bệnh nhân được chẩn đoán sớm những ngày đầu sau sinh. Kết quả xét nghiệm sinh hóa đo nồng độ 17-OHP máu sử dụng trong sàng lọc sơ sinh và chẩn đoán sớm không thể phân biệt được giữa thể MM và NHĐT. Xác định kiểu gen sử dụng DNA được chiết tách từ máu ngoại vi của sơ sinh hoặc từ giọt máu thấm trên đĩa giấy thấm của chương trình sàng lọc sơ sinh sẽ cho phép xếp loại và dự báo kiểu hình [127],[128],[129],[130]. Dữ liệu của chúng tôi cũng góp phần vào thực hành tư vấn di truyền, đặc biệt trong tình huống cả bố và mẹ đều dị hợp tử được khẳng định sau khi đã xác định được kiểu gen của con và muốn biết khả năng sinh ra trẻ TSTTBS với kiểu hình cụ thể. Từ các dữ liệu về kiểu gen của bệnh nhân chỉ điểm sẽ giúp xác định dị hợp tử ở bố và mẹ, dữ liệu sẽ được sử dụng

phục vụ chẩn đoán và điều trị trước sinh cũng như chẩn đoán tiền làm tổ trong bệnh TSTTBS.

Các dữ liệu này đặc biệt quan trọng đối với các trường hợp chẩn đoán trước sinh cho TSTTBS, trong trường hợp này, DNA thu được từ dịch ối hoặc gai rau sẽ được sử dụng để xác định kiểu gen cho thai nhi. Các dữ liệu đề cập trong nghiên cứu này sẽ được sử dụng và cho phép dự báo trước kiểu hình của thai nhi. Trong trường hợp thai nhi gái thì cho phép đưa ra quyết định về điều trị trước sinh. Trong thời gian tiến hành nghiên cứu, chúng tôi cũng thành công trong việc sử dụng kết quả kiểu gen đồng hợp tử nhóm “null” (exon 1-3 del/exon 1-3 del) của một bệnh nhân chỉ điểm thể MM để dự báo kiểu hình và điều trị trước sinh cho 1 thai nhi gái khi người mẹ mang thai lần tiếp theo. Thai nhi gái được điều trị trước sinh bằng cách người mẹ uống dexamethasone từ tuần thứ 8 của thai kỳ và kéo dài đến lúc sinh đủ 40 tuần thai do kiểu gen của thai nhi cũng mang đột biến đồng hợp tử giống anh trai. Kết quả điều trị trước sinh là trẻ gái mắc TSTTBS thiếu 21-OH nhưng bộ phận sinh dục ngoài của nữ bình thường khi sinh. Trẻ được điều trị hormon thay thế ngay sau sinh, nhưng cũng xuất hiện mất muối 1 lần khi có nhiễm trùng và kiểu hình phù hợp hoàn toàn với kiểu gen [141].

Tóm lại, chúng tôi đã phát hiện các đột biến xóa đoạn lớn, các đột biến phổ biến do hoán vị nhỏ của gen, các đột biến do hoán vị lớn của gen (nhiều hơn 2 đột biến trên 1 bệnh nhân) và các đột biến hiếm xuất phát từ gen chức năng trong đó có 6 đột biến mới. Các đột biến điểm phân bố khắp từ vùng promoter, các exon (trừ exon 2 và 5) và intron 2 của gen *CYP21A2*. Mối tương quan chặt chẽ giữa kiểu gen - kiểu hình cũng được ghi nhận cho dù còn 1 tỷ lệ nhỏ các bệnh nhân không phù hợp kiểu gen - kiểu hình. Do vậy, điều quan trọng là cần coi trọng chẩn đoán phân tử chính xác và theo dõi lâm sàng lâu dài đối với các bệnh nhân thiếu 21-OH là rất cần thiết.

KẾT LUẬN

Bằng việc áp dụng kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen trực tiếp để phát hiện đột biến gen *CYP21A2* và phân tích mối tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình trên bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Phát hiện đột biến gen *CYP21A2* và mô tả bản đồ đột biến gen *CYP21A2*

Tỷ lệ phát hiện được đột biến gen *CYP21A2* là 99% (202/204 bệnh nhân chỉ điểm). Đã phát hiện được 8 đột biến xóa đoạn lớn, 13 đột biến điểm phổ biến và 13 đột biến hiếm trong đó có 6 đột biến mới của gen *CYP21A2*. Các đột biến gặp với tần số cao bao gồm: xóa đoạn lớn toàn bộ/một phần của gen (34,5%); I2g (28,6%); p.R356W (12,3%) và p.I172N (10,6%).

Các đột biến phân bố tại các vùng không mã hóa (promoter, intron 2) và 8/10 exon (trừ exon 2 và 5) của gen *CYP21A2*. Tỷ lệ xuất hiện các đột biến cao nhất gặp ở intron 2 (28,6%); exon 8 (15,5%) và exon 4 (10,6%).

55 kiểu gen khác nhau đã được xác định ở các bệnh nhân nghiên cứu: 50,5% bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử; 37,2% bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử kép; 5,9% bệnh nhân có kiểu gen gồm hơn 2 đột biến. Các kiểu gen phổ biến bao gồm: I2g/I2g (15,4%); Del/Del (14,4%) và Del/I2g (10,9%).

2. Tương quan kiểu gen - kiểu hình

Giá trị dự báo dương tính kiểu hình dựa trên kết quả kiểu gen đều cao ở tất cả các nhóm kiểu gen: nhóm kiểu gen “null” (99,8%); nhóm kiểu gen A (96,5%); nhóm kiểu gen B (90,6%) và nhóm kiểu gen C (100%).

Kiểu gen phổ biến nhất của kiểu hình thể cổ điển MM: Del/Del (18,9%); I2g/I2g (17,6%) và Del/I2g (14,4%). Kiểu gen phổ biến của kiểu hình thể NHĐT: Del/p.I172N (23,8%); p.I172N/p.I172N (19,1%) và I2g/p.I172N

(9,5%). Kiểu gen phổ biến của kiểu hình thể không cổ điển: p.V281L/p.L307FfsX6 (3/4 bệnh nhân).

Kiểu gen I2g/I2g; p.I172N/p.I172N và p.R356W/p.R356W gây nên cả hai kiểu hình MM và NHĐT.

Tỷ lệ cao của mức độ nam hóa Prader nặng (III; IV-V) gặp ở các bệnh nhân nữ có kiểu gen nhóm “null” và A. Nồng độ của 17-OHP; testosterone và progesterone huyết thanh tăng cao hơn ở các bệnh nhân có kiểu gen nặng so với các bệnh nhân có kiểu gen nhẹ hơn.

KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

1. Kiến nghị

1.1. Chỉ định phân tích đột biến gen *CYP21A2* cho các bệnh nhân thiếu 21-OH được chẩn đoán sớm qua sàng lọc sơ sinh hoặc sàng lọc lâm sàng, hóa sinh;

1.2. Chỉ định điều trị mineralocorticoid thay thế sớm cho các bệnh nhân có chẩn đoán và đã biết kiểu gen trong gia đình là thuộc nhóm “null” và A;

1.3. Thận trọng khi tư vấn di truyền, dự báo kiểu hình trong chẩn đoán và điều trị trước sinh, đặc biệt lưu ý với một số kiểu gen như I2g/I2g; p.I172N/p.I172N; p.R356W/p.R356W.

2. Hướng nghiên cứu tiếp theo

2.1. Tiếp tục chỉ định và tiến hành phân tích đột biến gen *CYP21A2* cho các bệnh nhân là con đầu mắc TSTTBS thiếu 21-OH, chẩn đoán hormon không rõ ràng, chưa xác định được kiểu hình;

2.2. Phân tích đột biến gen *CYP21A2* cho bố và mẹ các bệnh nhân đã biết kiểu gen để khẳng định người lành mang gen và sự phân ly các allele đột biến;

2.3. Nghiên cứu tương quan kiểu gen với kết quả điều trị bao gồm: chiều cao cuối cùng, sinh sản của bệnh nhân tuổi trưởng thành, chất lượng sống, kết quả điều trị ngoại khoa, các bệnh kèm theo ở tuổi trưởng thành (béo phì, tim mạch, chuyển hóa lipid, glucose, canxi, xương.);

2.4. Nghiên cứu chức năng protein đột biến đối với các đột biến mới đã được phát hiện.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ VỀ NỘI DUNG LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

1. Registry of congenital adrenal hyperplasia in Vietnam. Hormone research in pediatrics. 2011; 76(suppl 2): 300.
2. Tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu 21-hydroxylase và u vỏ thượng thận. Tạp chí y học Việt nam. 2011; 383(2): 21-25.
3. Đột biến gen *CYP21A2* và mối tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình của bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu 21-hydroxylase. Tạp chí nghiên cứu y học. 2012; 80(3): 1-8.
4. Adrenocortical tumor in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. International Journal of Pediatric Endocrinology 2015, 2015(Suppl 1):P51. doi:10.1186/1687-9856-2015-S1-P51
5. Phenotype & genotype of congenital adrenal hyperplasia due to mutation in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene: a report of two Vietnamese families. International Journal of Pediatric Endocrinology 2015, 2015(Suppl 1):P50. doi:10.1186/1687-9856-2015-S1-P50.
6. Registry of congenital adrenal hyperplasia at the north pediatric referral centre of Vietnam during 15 years. Annals of translational medicine. 2015; 3(S2): S48.
7. Phát hiện đột biến xóa đoạn gen *CYP21A2* gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase. Tạp chí nghiên cứu y học. 2016; 99(1): 8-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. New M.I (2011). Ancient history of congenital adrenal hyperplasia. *Endocrine Development*, 20, 202-211.
2. Delle Piane L, Rinaudo P.F, Miller W.L (2015). 150 years of congenital adrenal hyperplasia: translation and commentary of De Crecchio's classic paper from 1865. *Endocrinology*, 156(4), 1210-1217.
3. Turcu A.F, Auchus R.J (2015). The next 150 years of congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 153, 63-71.
4. Grumbach M.M, Shaw E.B (1998). Further studies on the treatment of congenital adrenal hyperplasia with cortisone: IV. Effect of cortisone and compound B in infants with disturbed electrolyte metabolism, by John F. Crigler Jr, MD, Samuel H. Silverman, MD, and Lawson Wilkins, MD, *Pediatrics*, 1952;10:397-413. *Pediatrics*, 102(1 Pt 2), 215-221.
5. Engel F.L, Owen J.A, Wester T.B (1957). 9-alpha-Fluorohydrocortisone-induced hypertension in a male infant with adrenogenitalism, and in 6 adults with Addison's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(2), 272-279.
6. Dupont B, Oberfield S.E, Smithwick E.M et al (1977). Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Lancet (London, England)*, 2(8052-8053), 1309-1312.
7. Wedell A, Thilén A, Ritzén E.M et al (1994). Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78(5), 1145-1152.

8. Wedell A, Ritzén E.M, Haglund-Stengler B et al (1992). Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 7232-7236.
9. Krone N, Arlt W (2009). Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 23(2), 181-192.
10. Miller W.L, Auchus R.J (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81-151.
11. Speiser P.W, Azziz R, Baskin L.S et al (2010). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(9), 4133-4160.
12. Higashijima M, Nawata H, Kato K et al (1987). Studies on lipoprotein and adrenal steroidogenesis: I. Roles of low density lipoprotein- and high density lipoprotein-cholesterol in steroid production in cultured human adrenocortical cells. *Endocrinologia Japonica*, 34(5), 635-645.
13. Miller W.L (2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1771(6), 663-676.
14. Parker K.L, Schimmer B.P (1995). Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitamins and Hormones*, 51, 339-370.
15. Yau M, Khattab A, New M.I (2016). Prenatal Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 45(2), 267-281.

16. Speiser P.W, White P.C (2003). Congenital adrenal hyperplasia. *The New England Journal of Medicine*, 349(8), 776-788.
17. White P.C, Speiser P.W (2000). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews*, 21(3), 245-291.
18. Merke D.P, Bornstein S.R (2005). Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet (London, England)*, 365(9477), 2125-2136.
19. Pallan P.S, Wang C, Lei L et al (2015). Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase: structure of the enzyme progesterone substrate complex and rate-limiting C-H bond cleavage. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(21), 13128-13143.
20. Dacou-Voutetakis C, Dracopoulou M (1999). High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarche. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(5), 1570-1574.
21. Parsa, A. A., & New, M. I. (2017). Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 165(Pt A):2-11.
22. Voutilainen R, Jääskeläinen J (2015). Premature adrenarche: etiology, clinical findings, and consequences. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 145, 226-236.
23. Kashimada K, Ono M, Onishi T et al (2008). Clinical course of patients with nonclassical 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) diagnosed in infancy and childhood. *Endocrine Journal*, 55(2), 397-404.
24. Knowles R.L, Khalid J.M, Oerton J.M et al (2014). Late clinical presentation of congenital adrenal hyperplasia in older children: findings from national paediatric surveillance. *Archives of Disease in Childhood*, 99(1), 30-34.

25. Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier M.B et al (2009). Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(5), 1570-1578.
26. Pang S, Clark A, Neto E.C et al (1993). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. *Screening*, 2(2), 105-139.
27. Perry R, Kecha O, Paquette J et al (2005). Primary adrenal insufficiency in children: twenty years experience at the Sainte-Justine Hospital, Montreal. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(6), 3243-3250.
28. Nimkarn S, Gangishetti P.K, Yau M et al (1993), updated (2016). 21-Hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. In Pagon R.A, Adam M.P, Ardinger H.H et al (Eds.), *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>
29. Pang S.Y, Wallace M.A, Hofman L et al (1988). Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics*, 81(6), 866-874.
30. Therrell B.L (2001). Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(1), 15-30.
31. Speiser P.W, Dupont B, Rubinstein P et al (1985). High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 37(4), 650-667.

32. Choi J-H, Kim G-H, Yoo H-W (2016). Recent advances in biochemical and molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 21(1), 1-6.
33. Lee H-H, Lee Y-J, Chao M-C (2010). Comparing the Southern blot method and polymerase chain reaction product analysis for chimeric RCCX detection in CYP21A2 deficiency. *Analytical Biochemistry*, 399(2), 293-298.
34. Blanchong C.A, Zhou B, Rupert K.L et al (2000). Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(12), 2183-2196.
35. Lee H-H (2013). Variants of the CYP21A2 and CYP21A1P genes in congenital adrenal hyperplasia. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 418, 37-44.
36. Kharrat M, Riahi A, Maazoul F et al (2011). Detection of a frequent duplicated CYP21A2 gene carrying a Q318X mutation in a general population with quantitative PCR methods. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 20(2), 123-127.
37. Parajes S, Quinteiro C, Domínguez F et al (2008). High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *PloS One*, 3(5), e2138.
38. Tsai L-P, Cheng C-F, Chuang S-H et al (2011). Analysis of the CYP21A1P pseudogene: indication of mutational diversity and CYP21A2-like and duplicated CYP21A2 genes. *Analytical Biochemistry*, 413(2), 133-141.

39. Kleinle S, Lang R, Fischer G.F et al (2009). Duplications of the functional CYP21A2 gene are primarily restricted to Q318X alleles: evidence for a founder effect. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(10), 3954-3958.
40. White P.C, New M.I, Dupont B (1986). Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(14), 5111-5115.
41. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M et al (1986). Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), 2841-2845.
42. Carroll M.C, Campbell R.D, Porter R.R (1985). Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(2), 521-525.
43. White P.C, Grossberger D, Onufer B.J et al (1985). Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(4), 1089-1093.
44. Rodrigues N.R, Dunham I, Yu C.Y et al (1987). Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *The EMBO journal*, 6(6), 1653-1661.

45. Matteson K.J, Phillips J.A, Miller W.L et al (1987). P450XXI (steroid 21-hydroxylase) gene deletions are not found in family studies of congenital adrenal hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(16), 5858-5862.
46. Harada F, Kimura A, Iwanaga T et al (1987). Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(22), 8091-8094.
47. Olney R.C, Mougey E.B, Wang J et al (2002). Using real-time, quantitative PCR for rapid genotyping of the steroid 21-hydroxylase gene in a north Florida population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(2), 735-741.
48. Tukul T, Uyguner O, Wei J.Q et al (2003). A novel semiquantitative polymerase chain reaction/enzyme digestion-based method for detection of large scale deletions/conversions of the CYP21 gene and mutation screening in Turkish families with 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(12), 5893-5897.
49. Kharrat M, Tardy V, M'Rad R et al (2004). Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(1), 368-374.
50. Mornet E, Créte P, Kuttenn F et al (1991). Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 48(1), 79-88.

51. Ghanem N, Lobaccaro J.M, Buresi C et al (1990). Defective, deleted or converted CYP21B gene and negative association with a rare restriction fragment length polymorphism allele of the factor B gene in congenital adrenal hyperplasia. *Human Genetics*, 86(2), 117-125.
52. Haglund-Stengler B, Martin Ritzén E, Gustafsson J et al (1991). Haplotypes of the steroid 21-hydroxylase gene region encoding mild steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19), 8352-8356.
53. Tajima T, Fujieda K, Nakayama K et al (1993). Molecular analysis of patient and carrier genes with congenital steroid 21-hydroxylase deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(5), 2182-2190.
54. Araújo R.S, Mendonca B.B, Barbosa A.S et al (2007). Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(10), 4028-4034.
55. Tusié-Luna M.T, White P.C (1995). Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), 10796-10800.
56. Lee H.H (2001). CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Genetics*, 59(5), 293-301.
57. Krone N, Braun A, Roscher A.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 and Metabolism*, 85(3), 1059-1065.

58. Stikkelbroeck N.M.M.L, Hoefsloot L.H, de Wijs I.J 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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(8), 3852-3859.
59. Wedell A (2011). Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Development*, 20, 80-87.
60. White P.C, New M.I, Dupont B (1984). HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(23), 7505-7509.
61. 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 (Baltimore, Md.)*, 5(5), 685-692.
62. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A et al (1991). Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Biochemistry*, 109(4), 638-644.
63. White P.C, Tusie-Luna M.T, New M.I et al (1994). Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21). *Human Mutation*, 3(4), 373-378.
64. Amor M, Parker K.L, Globerman H et al (1988). Mutation in the CYP21B gene (Ile-172----Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(5), 1600-1604.

65. Tusie-Luna M.T, Traktman P, White P.C (1990). Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(34), 20916-20922.
66. Speiser P.W, New M.I, White P.C (1988). Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. *The New England Journal of Medicine*, 319(1), 19-23.
67. Globerman H, Amor M, Parker K.L et al (1988). Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(1), 139-144.
68. Chiou S.H, Hu M.C, Chung B.C (1990). A missense mutation at Ile172---Asn or Arg356----Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(6), 3549-3552.
69. New M.I, Abraham M, Gonzalez B et al (2013). Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), 2611-2616.
70. Higashi Y, Tanae A, Inoue H et al (1988). Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450(C21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 42(1), 17-25.
71. Kohn B, Day D, Alemzadeh R et al (1995). Splicing mutation in CYP21 associated with delayed presentation of salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. *American Journal of Medical Genetics*, 57(3), 450-454.
72. Day D.J, Speiser P.W, Schulze E et al (1996). Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Human Molecular Genetics*, 5(12), 2039-2048.

73. Tajima T, Fujieda K, Nakae J et al (1998). Mutations of the CYP21 gene in nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency in Japan. *Endocrine Journal*, 45(4), 493-497.
74. Monier S, Van Luc P, Kreibich G et al (1988). Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Cell Biology*, 107(2), 457-470.
75. Blanché H, Vexiau P, Clauin S et al (1997). Exhaustive screening of the 21-hydroxylase gene in a population of hyperandrogenic women. *Human Genetics*, 101(1), 56-60.
76. Dumić M, Brkljacić L, Speiser P.W et al (1990). An update on the frequency of nonclassic deficiency of adrenal 21-hydroxylase in the Yugoslav population. *Acta Endocrinologica*, 122(6), 703-710.
77. Wu D.A, Chung B.C (1991). Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(2), 519-523.
78. Lajic S, Levo A, Nikoshkov A et al (1997). A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Human Genetics*, 99(6), 704-709.
79. Krone N, Roscher A.A, Schwarz H.P et al (1998). Comprehensive analytical strategy for mutation screening in 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Chemistry*, 44(10), 2075-2082.
80. Koppens P.F.J, Hoogenboezem T, Degenhart H.J (2002). Carriership of a defective tenascin-X gene in steroid 21-hydroxylase deficiency patients: TNXB -TNXA hybrids in apparent large-scale gene conversions. *Human Molecular Genetics*, 11(21), 2581-2590.

81. White P.C, Vitek A, Dupont B et al (1988). Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), 4436-4440.
82. Morel Y, André J, Uring-Lambert B et al (1989). Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(2), 527-536.
83. Parajes S, Quinterio C, Domínguez F et al (2007). A simple and robust quantitative PCR assay to determine CYP21A2 gene dose in the diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Chemistry*, 53(9), 1577-1584.
84. Lee H-H, Lee Y-J, Chan P et al (2004). Use of PCR-based amplification analysis as a substitute for the southern blot method for CYP21 deletion detection in congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Chemistry*, 50(6), 1074-1076.
85. Keen-Kim D, Redman J.B, Alanes R.U et al (2005). Validation and clinical application of a locus-specific polymerase chain reaction- and minisequencing-based assay for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 7(2), 236-246.
86. Koppens P.F.J, Degenhart H.J (2003). PCR-based detection of CYP21 deletions. *Clinical Chemistry*, 49(9), 1555-1556-1557.
87. Schouten J.P, McElgunn C.J, Waaijer R et al (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12), e57.

88. de Carvalho D.F, Miranda M.C, Gomes L.G et al (2016). Molecular *CYP21A2* diagnosis in 480 Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction. *European Journal of Endocrinology/ European Federation of Endocrine Societies*, 175(2), 107-116.
89. Domic K.K, Grubic Z, Yuen T et al (2017). Molecular genetic analysis in 93 patients and 193 family members with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 165(Pt A):51-56.
90. Ma D, Chen Y, Sun Y et al (2014). Molecular analysis of the *CYP21A2* gene in Chinese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Biochem*, 47(6), 455-63.
91. Hong G, Park H.D, Choi R et al (2015). *CYP21A2* mutation analysis in Korean patients with congenital adrenal hyperplasia using complementary methods: sequencing after long-range PCR and restriction fragment length polymorphism analysis with multiple ligation-dependent probe amplification assay. *Annals of Laboratory Medicine*, 35(5), 535-539.
92. Concolino P, Mello E, Toscano V 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. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 402(1-2), 164-170.
93. Balsamo A, Baldazzi L, Menabò S et al (2010). Impact of molecular genetics on congenital adrenal hyperplasia management. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 4(4-5), 233-248.

94. Ezquieta B, Varela J.M, Jariego C et al (1996). Nonisotopic detection of point mutations in CYP21B gene in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Chemistry*, 42(7), 1108-1110.
95. Wedell A, Luthman H (1993). Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Human Molecular Genetics*, 2(5), 499-504.
96. Day D.J, Speiser P.W, White P.C et al (1995). Detection of steroid 21-hydroxylase alleles using gene-specific PCR and a multiplexed ligation detection reaction. *Genomics*, 29(1), 152-162.
97. Krone N, Braun A, Weinert S et al (2002). Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase gene as a rapid strategy to confirm congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Chemistry*, 48(6 Pt 1), 818-825.
98. Kösel S, Burggraf S, Fingerhut R et al (2005). Rapid second-tier molecular genetic analysis for congenital adrenal hyperplasia attributable to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Chemistry*, 51(2), 298-304.
99. Barbaro M, Lajic S, Baldazzi L et al (2004). Functional analysis of two recurrent amino acid substitutions in the CYP21 gene from Italian patients with congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(5), 2402-2407.
100. Tsai L-P, Cheng C-F, Hsieh J-P et al (2009). Application of the DHPLC method for mutational detection of the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 410(1-2), 48-53.
101. Vrzalová Z, Hrubá Z, St'ahlová Hrabincová E et al (2010). Identification of CYP21A2 mutant alleles in Czech patients with 21-hydroxylase deficiency. *International Journal of Molecular Medicine*, 26(4), 595-603.

102. Skordis N, Kyriakou A, Tardy V et al (2011). Molecular defects of the *CYP21A2* gene in Greek-Cypriot patients with congenital adrenal hyperplasia. *Hormone Research in Paediatrics*, 75(3), 180-186.
103. Rabbani B, Mahdieh N, Ashtiani M.T.H et al (2012). Mutation analysis of the *CYP21A2* gene in the Iranian population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(2), 82-90.
104. Cavarzere P, Vincenzi M, Teofoli F et al (2013). Genotype in the diagnosis of 21-hydroxylase deficiency: who should undergo *CYP21A2* analysis? *Journal of Endocrinological Investigation*, 36(11), 1083-1089.
105. Choi J-H, Jin H-Y, Lee B.H et al (2012). Clinical phenotype and mutation spectrum of the *CYP21A2* gene in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 120(1), 23-27.
106. Nerموen I, Brønstad I, Fougner K.J et al (2012). Genetic, anthropometric and metabolic features of adult Norwegian patients with 21-hydroxylase deficiency. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 167(4), 507-516.
107. Kirac D, Guney A.I, Akcay T et al (2014). The frequency and the effects of 21-hydroxylase gene defects in congenital adrenal hyperplasia patients. *Annals of Human Genetics*, 78(6), 399-409.
108. Ellard S, Patrinos G.P, Oetting W.S (2013). Clinical applications of next-generation sequencing: the 2013 human genome variation society scientific meeting. *Human Mutation*, 34(11), 1583-1587.
109. Speiser P.W, Dupont J, Zhu D et al (1992). Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(2), 584-595.

110. Jääskeläinen J, Levo A, Voutilainen R et al (1997). Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(10), 3293-3297.
111. Welzel M, Schwarz, H-P, Hedderich J et al (2010). No correlation between androgen receptor CAG and GGN repeat length and the degree of genital virilization in females with 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(5), 2443-2450.
112. Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A et al (2006). Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 84(6), 521-528.
113. Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M et al (2006). Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(11), 2946-2964.
114. Riepe F.G, Hiort O, Grötzinger J et al (2008). Functional and structural consequences of a novel point mutation in the *CYP21A2* gene causing congenital adrenal hyperplasia: potential relevance of helix C for P450 oxidoreductase-21-hydroxylase interaction. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(7), 2891-2895.
115. Dubey S, Idicula-Thomas S, Anwaruddin M et al (2009). A novel 9-bp insertion detected in steroid 21-hydroxylase gene (*CYP21A2*): prediction of its structural and functional implications by computational methods. *Journal of Biomedical Science*, 16, 3.
116. Pallan P.S, Lei L, Wang C et al (2015). Research Resource: Correlating Human Cytochrome P450 21A2 Crystal Structure and Phenotypes of Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 29(9), 1375-1384.

117. Haider S, Islam B, D'Atri V et al (2013). Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), 2605-2610.
118. Bachega T.A, Billerbeck A.E, Marcondes J.A et al (2000). Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Endocrinology*, 52(5), 601-607.
119. L'Allemand D, Tardy V, Grüters A et al (2000). How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(12), 4562-4567.
120. Charmandari E, Eisenhofer G, Mehlinger S.L et al (2002). Adrenomedullary function may predict phenotype and genotype in classic 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(7), 3031-3037.
121. Demirci C, Witchel S.F (2008). Congenital adrenal hyperplasia. *Dermatologic Therapy*, 21(5), 340-353.
122. Wedell A, Stengler B, Luthman H (1994). Characterization of mutations on the rare duplicated C4/CYP21 haplotype in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Human Genetics*, 94(1), 50-54.
123. Ezquieta B, Cueva E, Varela J et al (2002). Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 91(8), 892-898.

124. Baumgartner-Parzer S.M, Fischer G, Vierhapper H (2007). Predisposition for de novo gene aberrations in the offspring of mothers with a duplicated CYP21A2 gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(3), 1164-1167.
125. Minutti C.Z, Lacey J.M, Magera M.J et al (2004). Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(8), 3687-3693.
126. Janzen N, Peter M, Sander S et al (2007). Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(7), 2581-2589.
127. Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L et al (2000). CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. *Clinical Endocrinology*, 53(1), 117-125.
128. Sarafoglou K, Lorentz C.P, Otten N et al (2012). Molecular testing in congenital adrenal hyperplasia due to 21 α -hydroxylase deficiency in the era of newborn screening. *Clinical Genetics*, 82(1), 64-70.
129. Silveira E.L, Elnecape R.H, dos Santos E.P et al (2009). Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Genetics*, 76(6), 503-510.
130. Malikova J, Votava F, Vrzalova Z et al (2012). Genetic analysis of the CYP21A2 gene in neonatal dried blood spots from children with transiently elevated 17-hydroxyprogesterone. *Clinical Endocrinology*, 77(2), 187-194.

131. Forest M.G, Tardy V, Nicolino M et al (2005). 21-Hydroxylase deficiency: an exemplary model of the contribution of molecular biology in the understanding and management of the disease. *Annales D'endocrinologie*, 66(3), 225-232.
132. David M, Forest M.G (1984). Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia resulting from 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Pediatrics*, 105(5), 799-803.
133. New M.I, Tong Y.K, Yuen T et al (2014). Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(6), E1022-1030.
134. Khattab A, Yuen T, Sun L et al (2016). Noninvasive Prenatal Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrine Development*, 30, 37-41.
135. Tardy-Guidollet V, Menassa R, Costa J-M et al (2014). New management strategy of pregnancies at risk of congenital adrenal hyperplasia using fetal sex determination in maternal serum: French cohort of 258 cases (2002-2011). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(4), 1180-1188.
136. Ma D, Ge H, Li X et al (2014). Haplotype-based approach for noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma DNA sequencing. *Gene*, 544(2), 252-258.
137. Võ Kim Huệ, Nguyễn Thu Nhạn, Nguyễn Thị Phượng và cộng sự (2000). Nghiên cứu chẩn đoán bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thiếu 21-hydroxylase ở trẻ em. *Nhi khoa*, 285-293.
138. Thái Thiên Nam, Nguyễn Thị Phượng, 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*, 10, 500-505.

139. Trần Kiêm Hào Nguyễn Thị Phương, Võ Thị Thương Lan (2006). Ứng dụng kỹ thuật PCR phát hiện một số đột biến gen CYP21 gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu 21-hydroxylase. *Nhi khoa*, 14, 184-188.
140. Nguyễn Thị Phương Mai, Lý Thanh Hà, Nguyễn Mai Hương và cộng sự (2008). Xét nghiệm di truyền trong chẩn đoán trước sinh bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh. *Tạp chí NCYH*, 57(4), 259-264.
141. Vũ Chí Dũng và cộng sự (2016). Ca bệnh điều trị trước sinh và người nữ mắc tăng sản thượng thận bẩm sinh sinh con bình thường. *Kỷ yếu đào tạo liên tục cập nhật về nội tiết nhi. Hội nội tiết nhi khoa châu Á - Thái Bình Dương*.
142. Vũ Chí Dũng, Nguyễn Phú Đạt (2011). Tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu 21-Hydroxylase và u vỏ thượng thận. *Y học Việt Nam*, 383(1), 21-25.
143. Nguyen H.H, Nguyen T.H, Vu C.D et al (2012). Novel homozygous p.Y395X mutation in the *CYP11B1* gene found in a Vietnamese patient with 11 β -hydroxylase deficiency. *Gene*, 509(2), 295-7
144. Nguyen T.P.M, Nguyen T.H, Ngo D.N, Vu C.D et al (2015). A novel homozygous mutation IVS6+5G>T in *CYP11B1* gene in a Vietnamese patient with 11 β -hydroxylase deficiency. *Gene*, 565(2), 291-294.
145. Dung V.C, Mai N.P, Hoang N.H et al (2015). Phenotype of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2015(1), 1-1.
146. Dung V.C, Thao B.P, Khanh N.N et al (2015). Phenotype & genotype of congenital adrenal hyperplasia due to mutation in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene: a report of two Vietnamese families. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2015(1), 1-2.

147. Dung V.C, Thao B.P, Ngoc C.T.B (2015). Updated registry of congenital adrenal hyperplasia at the north pediatric referral centre of Vietnam. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2015(1), 1-1.
148. Marino R, Ramirez P, Galeano J 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. *Clinical Endocrinology*, 75(4), 427-435.
149. HGMD® home page. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
150. MutationTaster. <http://www.mutationtaster.org/>
151. Tardy V, Menassa R, Sulmont V et al (2010). Phenotype-Genotype Correlations of 13 Rare CYP21A2 Mutations Detected in 46 Patients Affected with 21-Hydroxylase Deficiency and in One Carrier. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(3), 1288-1300.
152. Wang R, Yu Y, Ye J et al (2016). 21-hydroxylase deficiency-induced congenital adrenal hyperplasia in 230 Chinese patients: Genotype-phenotype correlation and identification of nine novel mutations. *Steroids*, 108, 47-55.
153. Gidlöf S, Falhammar H, Thilén A et al (2013). One hundred years of congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a retrospective, population-based cohort study. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 1(1), 35-42.
154. Balraj P, Lim P.G, Sidek H et al (2013). Mutational characterization of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Malaysia. *Journal of Endocrinological Investigation*, 36(6), 366-374.
155. Grischuk Y, Rubtsov P, Riepe F.G et al (2006). Four novel missense mutations in the CYP21A2 gene detected in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia: identification, functional characterization, and structural analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(12), 4976-4980.

156. Levo A, Partanen J (1997). Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles. *Human Genetics*, 99(4), 488-497.
157. Ohlsson G, Müller J, Skakkebaek N.E et al (1999). Steroid 21-hydroxylase deficiency: Mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and in vitro expression analysis. *Human Mutation*, 13(6), 482-486.
158. Baumgartner-Parzer S.M, Schulze E, Waldhäusl W et al (2001). Mutational Spectrum of the Steroid 21-Hydroxylase Gene in Austria: Identification of a Novel Missense Mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10), 4771-4775.
159. Krone N, Rose I.T, Willis D.S et al (2013). Genotype-phenotype correlation in 153 adult patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: analysis of the United Kingdom Congenital adrenal Hyperplasia Adult Study Executive (CaHASE) cohort. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(2), E346-354.
160. Dolž V, Sólyom J, Fekete G et al (2005). Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *European Journal of Endocrinology*, 153(1), 99-106.
161. Finkelstein G.P, Chen W, Mehta S.P et al (2011). Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(1), E161-172.
162. Huynh T, McGown I, Cowley D et al (2009). The clinical and biochemical spectrum of congenital adrenal hyperplasia secondary to 21-hydroxylase deficiency. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 30(2), 75-86.

163. Asanuma A, Ohura T, Ogawa E et al (1999). Molecular analysis of Japanese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Human Genetics*, 44(5), 312-317.
164. Lee H-H, Lee Y-J, Wang Y-M et al (2008). Low frequency of the CYP21A2 deletion in ethnic Chinese (Taiwanese) patients with 21-hydroxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93(4), 450-457.
165. Marumudi E, Sharma A, Kulshreshtha B et al (2012). Molecular genetic analysis of CYP21A2 gene in patients with congenital adrenal hyperplasia. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(3), 384-388.
166. Loke K.Y, Lee Y.S, Lee W.W et al (2001). Molecular analysis of CYP-21 mutations for congenital adrenal hyperplasia in Singapore. *Hormone Research*, 55(4), 179-184.
167. Loidi L, Quinteiro C, Parajes S et al (2006). High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. *Clinical Endocrinology*, 64(3), 330-336.
168. Barbat B, Bogoyo A, Raux-Demay M-C et al (1995). Screening of CYP21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Human Mutation*, 5(2), 126-130.
169. Koyama S, Toyoura T, Saisho S et al (2002). Genetic analysis of Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency: identification of a patient with a new mutation of a homozygous deletion of adenine at codon 246 and patients without demonstrable mutations within the structural gene for CYP21. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(6), 2668-2673.

170. Dain L.B, Buzzalino N.D, Oneto A et al (2002). Classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency: a molecular study of Argentine patients. *Clinical Endocrinology*, 56(2), 239-245.
171. Friães A, Rêgo A.T, Aragüés J.M et al (2006). *CYP21A2* mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88(1), 58-65.
172. Araujo R.S, Billerbeck A.E.C, Madureira G et al (2005). Substitutions in the *CYP21A2* promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clinical Endocrinology*, 62(2), 132-136.
173. Bristow J, Gitelman S.E, Tee M.K et al (1993). Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A “pseudogene”. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12919-12924.
174. Chang S.F, Chung B.C (1995). Difference in transcriptional activity of two homologous *CYP21A* genes. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 9(10), 1330-1336.
175. Usui T, Nishisho K, Kaji M et al (2004). Three novel mutations in Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency. *Hormone Research*, 61(3), 126-132.
176. Pinto G, Tardy V, Trivin C et al (2003). Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(6), 2624-2633.
177. Soardi F.C, Barbaro M, Lau I.F et al (2008). Inhibition of *CYP21A2* enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(6), 2416-2420.

178. Menassa R, Tardy V, Despert F et al (2008). p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(5), 1901-1908.
179. Koppens P.F.J, Hoogenboezem T, Degenhart H.J (2002). Duplication of the CYP21A2 gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. *Human Genetics*, 111(4-5), 405-410.
180. Wilson R.C, Mercado A.B, Cheng K.C et al (1995). Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80(8), 2322-2329.
181. Torresani T, Biason-Lauber A (2007). Congenital adrenal hyperplasia: diagnostic advances. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(4), 563-575.
182. Chin D, Speiser P.W, Imperato-McGinley J et al (1998). Study of a kindred with classic congenital adrenal hyperplasia: diagnostic challenge due to phenotypic variance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(6), 1940-1945.
183. Speiser P.W, Agdere L, Ueshiba H et al (1991). Aldosterone synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. *The New England Journal of Medicine*, 324(3), 145-149.
184. Rice D.A, Kronenberg M.S, Mouw A.R et al (1990). Multiple regulatory elements determine adrenocortical expression of steroid 21-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(14), 8052-8058.
185. Donohoue P.A, Collins M.M (1992). The human complement C4B/steroid 21-hydroxylase (*CYP21*) and complement C4A/21-hydroxylase pseudogene (*CYP21P*) intergenic sequences: comparison and identification of possible regulatory elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 186(1), 256-262.

186. Jaresch S, Kornely E, Kley H.K et al (1992). Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 74(3), 685-689.
187. Falhammar H, Torpy D.J (2016). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency presenting as adrenal incidentaloma: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine Practice: Official Journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 22(6), 736-752.
188. Nordenström A, Thilén A, Hagenfeldt L et al (1999). Genotyping Is a Valuable Diagnostic Complement to Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(5), 1505-1509.
189. Gomes L.G, Huang N, Agrawal V et al (2009). Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(1), 89-95.
190. Pang S, Hotchkiss J, Drash A.L et al (1977). Microfilter paper method for 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay: its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 45(5), 1003-1008.