

ĐẶT VẤN ĐỀ

U nguyên bào võng mạc (Retinoblastoma) là khối u thuộc nhóm u nguyên bào thần kinh (neuroblastoma). Đây là khối u nguyên phát, ác tính ở nội nhãn gặp ở trẻ em sau sinh, với tỷ lệ chiếm khoảng 3% trong tất cả các khối u ở trẻ em [1]. Tế bào u phát sinh từ tế bào tiền thân của tế bào nón trên võng mạc [2]. Phần lớn trường hợp xảy ra ở một bên mắt, có khoảng 25 – 30% trường hợp là bị cả hai bên. Với tỷ lệ là 1/15000 hay 1/18000 trẻ sơ sinh còn sống [3],[4],[5],[6].

Bệnh u nguyên bào võng mạc (UNBVM) do đột biến gen RB1 trên NST 13 gây nên, đây là gen ức chế khối u đầu tiên được phát hiện và nghiên cứu, gen đột biến gây mất chức năng cả hai alen làm ProteinRB mất chức năng và tế bào võng mạc tăng sinh không kiểm soát tạo khối u gây ra các triệu chứng lâm sàng đa dạng ở mắt, các triệu chứng của khối u nội nhãn này ngày càng tiến triển nặng dần nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời sẽ xâm lấn và di căn gây tử vong cho bệnh nhân [7],[8],[9],[10]. Đã hơn 200 năm kể từ khi James Wardrop mô tả bệnh u nguyên bào võng mạc, ngày nay là một bệnh có thể điều trị được với tỉ lệ sống sót hơn 95% ở các nước phát triển [11]. UNBVM gây tử vong với tỷ lệ từ 40% đến 70% ở các nước đang phát triển [12],[13]. Hầu hết các ca tử vong do UNBVM xảy ra ở Châu Á và Châu Phi. Chẩn đoán sớm, điều trị kịp thời là yếu tố quyết định sự sống còn của trẻ, giúp cứu vãn thị lực, bảo tồn mắt bị bệnh [11],[14],[15] và tỷ lệ sống từ 88% đến hơn 95% các trường hợp bị bệnh [5],[16]. UNBVM xuất hiện bao gồm ở cả hai dạng di truyền và không di truyền. Hiện nay để chẩn đoán xác định bệnh dựa vào các triệu chứng lâm sàng khi soi đáy mắt kết hợp với chẩn đoán hình ảnh, chỉ làm xét nghiệm giải phẫu bệnh khi cắt bỏ nhãn cầu ở bệnh giai đoạn muộn.

Y học hiện đại đã có những bước tiến vượt bậc trong những thập gần đây, sau khi các nhà Khoa học giải mã bộ gen người, cơ chế bệnh sinh dần dần được nghiên cứu sâu và làm sáng tỏ ở mức độ phân tử, tạo tiền đề cho việc tìm nguyên nhân gây bệnh, chẩn đoán chính xác và điều trị can thiệp trúng đích nhằm giải quyết tận gốc căn nguyên của bệnh. Năm 1993 Kary Mullis phát minh ra kỹ thuật PCR và được trao giải Nobel về Hóa học, từ đó kỹ thuật khuếch đại chuỗi nhanh chóng được phát triển và ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sinh học phân tử.

Những tiến bộ của ngành sinh học phân tử đã sàng lọc phát hiện đột biến gen RB1 trên bệnh nhân và gia đình bệnh nhân giúp chẩn đoán sớm, phát hiện người lành mang gen và chẩn đoán trước sinh nhằm ngăn ngừa và giảm tỷ lệ mắc bệnh. Bên cạnh đó, xác định mối liên quan đột biến gen RB1 với các đặc điểm lâm sàng sẽ giúp cho tiên lượng bệnh và có liệu trình điều trị chính xác và hiệu quả hơn cũng như phòng bệnh cho các thành viên gia đình và dòng họ. Trên thế giới đã có rất nhiều nghiên cứu về xác định đột biến gen RB1 và mối liên quan với lâm sàng bệnh UNBVM. Ở Việt Nam các nghiên cứu trên bệnh UNBVM trước đây chỉ mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, điều trị tại mắt. Trong vài năm trở lại đây nghiên cứu về phát hiện đột biến gen RB1 đã bắt đầu được triển khai, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào phân tích mối liên quan giữa kiểu gen với lâm sàng bệnh UNBVM để tiên lượng, liệu trình điều trị chính xác, hiệu quả cũng như phòng bệnh, tư vấn di truyền, do đó đề tài: ***“Nghiên cứu đột biến gen RB1 và mối liên quan đến đặc điểm lâm sàng trên bệnh nhân U nguyên bào võng mạc”*** được thực hiện với 2 mục tiêu:

1. Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân u nguyên bào võng mạc.
2. Phân tích đột biến gen RB1 và mối liên quan đến đặc điểm lâm sàng trên bệnh nhân u nguyên bào võng mạc.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đặc điểm bệnh u nguyên bào võng mạc

1.1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh UNBVM

Năm 1597, Peter Pawius người Hà Lan lần đầu tiên mô tả về một khối u nội nhãn, một khối u ác tính xâm lấn vào hốc mắt, vùng thái dương và nội sọ.

Năm 1809, James Wardrop người Scotland mô tả bệnh cảnh lâm sàng đầy đủ của bệnh và cho rằng khối u phát sinh từ võng mạc, dựa trên nghiên cứu mô bệnh học phát hiện sự xâm lấn của khối u tới thần kinh thị và vào trong não và sau đó ông mô tả sự di căn của khối u này đến các cơ quan khác nhau của cơ thể.

Flexner vào năm 1891 và Wintersteiner vào năm 1897 báo cáo sự giống nhau của các tế bào khối u hình hoa hồng với các tế bào cảm thụ ánh sáng của võng mạc trưởng thành. Ngày nay sự hình thành tế bào này đã được gọi là biến dạng Flexner Wintersteiner.

Năm 1920 Verhoeff đề xuất tên bệnh “U nguyên bào võng mạc”, thuật ngữ này đã được thông qua bởi Hiệp hội Nhân khoa Hoa Kỳ năm 1926.

Năm 2005 một hệ thống phân loại mới áp dụng trên toàn thế giới gọi là ICRB, mục đích giúp ích cho hóa trị liệu toàn thân kết hợp và liệu pháp điều trị tại chỗ, ICRB trở thành hệ thống phân loại tiêu chuẩn [17],[18],[19].

Năm 1971 Knudson đề xuất một giả thuyết “two hit” cho sự phát triển của bệnh u nguyên bào võng mạc. Theo thuyết này cần phải có 2 lần đột biến để phát triển thành bệnh. Trong thể bệnh do di truyền: đột biến đầu tiên là đột biến dòng tế bào gốc và được tìm thấy trong tất cả các tế bào của người bị ảnh hưởng. Đột biến thứ hai xảy ra trong một tế bào võng mạc duy nhất trong quá trình biệt hóa, dẫn đến sự phát triển không thể kiểm soát của các tế bào võng mạc và gây nên bệnh UNBVM. Ở bệnh không do di truyền thì cả hai lần đột

biến xuất hiện trong tế bào võng mạc trong quá trình biệt hóa. Hai sự kiện đột biến độc lập sau sinh sẽ kéo dài hơn, giải thích tại sao các khối u võng mạc thể không di truyền (rối rác) xảy ra ở lứa tuổi lớn hơn bệnh nhân bị bệnh do di truyền.

Fung và cộng sự (1987) trong 16 mẫu của 40 BN UNBVM nghiên cứu nhận thấy sự thay đổi trong cấu trúc gen RB1 đã được nhận diện, bao gồm: trong một số trường hợp, xóa đoạn đồng hợp tử tương ứng với giảm khả năng phiên mã. Một trường hợp u xương ác tính cũng có xóa đoạn đồng hợp tử với sự giảm khả năng phiên mã. Các điểm nóng “hot spot” có thể bị xóa được xác định trong các locus trên gen RB1. Trong số những khối u không có thay đổi về cấu trúc, có hoặc không có sự phiên mã RB1 hoặc có biểu hiện bất thường của phiên mã RB1 [20].

Bookstein và cs (1988) đã xác định ít nhất có 20 exon của gen RB1 và tạm thời đánh số chúng. Làm sáng tỏ mất đoạn exon 2-6 của DNA từ 1 alen RB1, cũng như làm sáng tỏ những đột biến xóa các exon khác, giải thích nguồn gốc của sự giảm phiên mã RB mRNA [21].

Dunn và cộng sự (1989) sử dụng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại và giải trình tự các alen đột biến. Đột biến đã được xác định ở 15 trong số 21 mẫu khối u UNBVM; trong đó có 8 khối u xác định chính xác đột biến trong trình tự các nucleotide. Có 4 đột biến ở dòng tế bào gốc bao gồm một đột biến xóa nhỏ hoặc đột biến lặp lại, trong khi 3 đột biến soma là đột biến điểm dẫn tới những biến đổi tại vị trí ghép nối và mất của một exon [22].

Bằng kỹ thuật PCR, Dryja và cộng sự (1989) đã chứng minh sự thay đổi nucleotide duy nhất trong khối u của 7 bệnh nhân bị UNBVM (không có tiền sử gia đình của bệnh). 4 bệnh nhân trong số này, đột biến chỉ thấy ở các tế bào khối u, và 3 trong đó liên quan đến tế bào soma bình thường cũng như các tế bào khối u nhưng không tìm thấy trong cha hoặc mẹ. Do đó, các đại diện 3

đột biến tế bào gốc mới (3 đột biến còn lại). Tất cả 3 đột biến đã chuyển C thành T trong chuỗi mã hóa trong gen UNBVM, 5 đột biến xảy ra trong exon 21-24 khu vực mà chỉ chiếm 15% của chuỗi mã hóa của gen RB1. Người ta đã tìm thấy rằng các protein bất thường từ các axit amin được mã hoá bởi các exon đã bị mất đoạn [23].

Ở Việt Nam

Đã có rất nhiều các nghiên cứu đã và được tiến hành trong thời gian gần đây về bệnh UNBVM cung cấp nhiều thông tin phục vụ cho chẩn đoán sớm ở mức độ sinh học phân tử.

Tại Việt Nam, những năm gần đây đã có những nghiên cứu của một số tác giả về đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng, cũng như điều trị đối với bệnh UNBVM ở bệnh nhi tại Bệnh viện Mắt Trung Ương của nhóm tác giả Lê Thúy Quỳnh, Nguyễn Minh Châu, Trần Thu Hương năm 2010 – 2012. Phạm Bảo Nghĩa năm 2013. Số liệu và các thông tin về gen liên quan tới bệnh UNBVM còn hạn chế. Hiện nay Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein tại Trường Đại học Y Hà Nội đã và đang nghiên cứu về bệnh học phân tử liên quan tới UNBVM như: xác định đột biến gen, phát hiện người lành mang gen bệnh giúp cho công tác chẩn đoán, điều trị bệnh và tư vấn di truyền.

1.1.2. Dịch tễ bệnh UNBVM

UNBVM là một trong những bệnh có tỷ lệ sống sót cao nhất trong số tất cả các bệnh ung thư ở trẻ em. Tại Hoa Kỳ tỷ lệ sống sót của bệnh nhân UNBVM là hơn 93%, [5],[16],[12].

Năm 2009 MacCarthy báo cáo tỷ lệ sống sót sau 5 năm ở trẻ UNBVM thể một mắt ở Anh tăng từ 85% (giai đoạn 1963-1967) lên 97% (giai đoạn 1998-2002). Tỷ lệ tương đương đối với các trường hợp bệnh hai mắt là 88% và 100%. Các tác giả cho rằng chủ yếu là do việc đưa hóa trị liệu toàn thân

vào điều trị bổ xung có kết quả tốt và chẩn đoán sớm ngày càng được cải thiện có thể góp phần tăng tỷ lệ sống [9].

Năm 2009 Kivela báo cáo về tác động trên toàn thế giới của bệnh UNBVM, tác giả ước tính 7,202-8,102 trẻ em bị UNBVM hàng năm trên khắp thế giới. Mặc dù các báo cáo cho thấy tỷ lệ mắc khác nhau ở các nước tuy nhiên khá đồng đều giữa các quần thể [11].

Mac Carthy và cộng sự phân tích tỉ lệ mắc bệnh từ năm 1963-2002, tỷ lệ mắc bệnh tăng lên khoảng 2,5% mỗi năm. Tỷ lệ mắc tăng lên từ 5,8/triệu người (giai đoạn 1963-1982) lên 9,5/ triệu người (giai đoạn 1983-2002) Nghiên cứu này thấy xu hướng ngày càng tăng của u nguyên bào võng mạc được cho là do các yếu tố môi trường không rõ [9].

Tại Hoa Kỳ Broaddus và cộng sự báo cáo tỉ lệ mắc bệnh u nguyên bào võng mạc trong giai đoạn 30 năm từ năm 1975-2004 là 11,8 ca bệnh/ triệu trẻ em trong độ tuổi 0-4 và tỷ lệ này vẫn ổn định trong 30 năm nghiên cứu [16].

Trên toàn thế giới với 7,202 - 8,102 trẻ được chẩn đoán u nguyên bào võng mạc mỗi năm, nhưng có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ sống sót dựa trên sự phát triển kinh tế của đất nước đó và khả năng tiếp cận để chẩn đoán sớm hoặc tình trạng chăm sóc y tế. Cụ thể: tỷ lệ tử vong do UNBVM: Châu Phi (70%), Châu Á không có Nhật Bản (38%), Nhật Bản (3%), Châu Âu (5%), Bắc Mỹ (3%), Châu Mỹ La tinh (20%) và Châu Đại Dương (10%) [11]. Kivela tính toán rằng nếu cả thế giới có thể đạt tỷ lệ sống sót tương tự đến Châu Âu, Bắc Mỹ hay Nhật Bản, tỷ lệ tử vong toàn cầu từ bệnh (khoảng 42%) sẽ giảm từ 3.001-3.376 còn khoảng 400 bệnh nhân tử vong mỗi năm [11], [16].

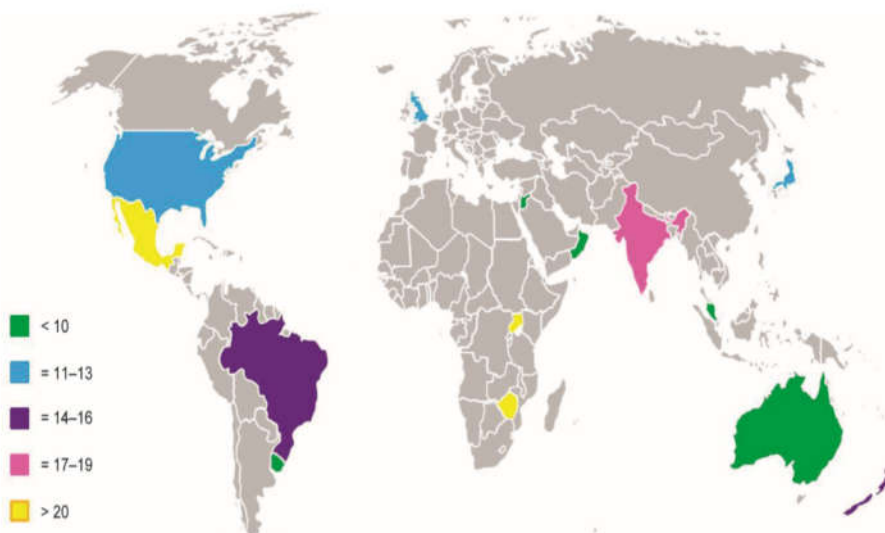
1.1.2.1. UNBVM ở các nước phát triển

Chantada và cộng sự báo cáo số ca mắc UNBVM ở các quốc gia phát triển (như Hoa Kỳ, Anh, Nhật, Úc) là 700 trường hợp mỗi năm với tỷ lệ sống

sốt > 95%. Tỷ lệ sống sót này không bao gồm tử vong do ung thư thứ phát hoặc ung thư ba vị trí ở thể bệnh do di truyền. Tại Hoa Kỳ, ung thư thứ phát là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu đối với trẻ em bị UNBVM ở trẻ > 5 tuổi [13],[16].

1.1.2.2. Bệnh UNBVM ở các nước đang phát triển

Đối với các nước có đông dân số như Trung Quốc, tỷ lệ mắc vẫn chưa được báo cáo, nhưng ước tính có 1.100 trường hợp mắc bệnh mỗi năm [24]. Tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân UNBVM cao ở Châu Á (không kể Nhật Bản) ở mức 39% và ở Châu Phi 70% [12]. Nguyên nhân quan trọng nhất gây tử vong cao ở các nước đang phát triển là được chẩn đoán và điều trị muộn, bệnh có liên quan đến nhiều yếu tố văn hoá và kinh tế xã hội. Một yếu tố nữa là sự tuân thủ điều trị kém và vấn đề theo dõi và chăm sóc y tế [13].



Tỷ lệ phân bố bệnh tính trên 1 triệu dân

Hình 1.1. Phân bố UNBVM ở các nước trên thế giới

(Nguồn: Retinoblastoma [25])

1.1.3. Đặc điểm lâm sàng UNBVM

1.1.3.1. Biểu hiện lâm sàng

Dấu hiệu xuất hiện sớm và phổ biến nhất của UNBVM là ánh đồng tử trắng, dấu hiệu ánh đồng tử trắng hay còn gọi ánh mắt mèo. Phần lớn bệnh được phát hiện đầu tiên là nhờ bố mẹ bệnh nhân nên dấu hiệu này rất quan trọng cho các bậc phụ huynh phát hiện ra dấu hiệu ánh mắt mèo và đưa con mình đi khám.

Lý do thứ hai trẻ bị UNBVM đến khám là lác trong hay lác ngoài. Lác cũng là lý do làm cho khi chụp ảnh thấy đồng tử hai mắt khác nhau dấu hiệu này chiếm khoảng 20% số trường hợp. Bởi vậy trẻ em có dấu hiệu lác thì phải tra giãn đồng tử để khám đáy mắt để chẩn đoán chi tiết, chính xác các tổn thương.

Các dấu hiệu khác gồm có mắt đau nhức và đỏ (do glôcôm), có thể lồi mắt do bệnh nhân được gia đình cho đi khám muộn.

Ở các nước phát triển là ánh đồng tử trắng [26], [24], [27], [28]. Đa số trẻ bị UNBVM không có tiền sử gia đình rõ rệt, đến khám vì ánh đồng tử trắng (kinh điển gọi là ánh mắt mèo) là dấu hiệu hay gặp nhất chiếm 60- 80%. Trong một nghiên cứu lớn trên 1.265 bệnh nhân UNBVM từ năm 1960- 1990 ở Mỹ dấu hiệu xuất hiện phổ biến nhất là ánh đồng tử trắng là 56%, lác 24% và thị lực kém 8% [29]. Trong một báo cáo tương tự của 56 bệnh nhân Đài Loan các triệu chứng xuất hiện phổ biến nhất là ánh đồng tử trắng là 71%, đau đỏ mắt 18%, và lác là 14% [26]. Trong 470 bệnh nhân UNBVM ở Trung Quốc ánh đồng tử trắng là 73% bệnh nhân [24]. Trong một báo cáo 139 bệnh nhân UNBVM ở Thụy Sĩ từ năm 1963 đến năm 2004 các biểu hiện phổ biến nhất là ánh đồng tử trắng ở 48% và lác ở 20% [28]. Không có bất kỳ mối tương quan nào được tìm thấy giữa giới tính, chủng tộc hay sự sống còn, mặc dù dấu hiệu hiện tại đã chứng minh tương quan với kích thước khối u và vị trí. **Ánh đồng tử trắng có liên quan đến bệnh tiến triển hơn, trong khi lác có liên quan đến sự tham gia của tế bào hoàng điểm do khối u.** Thông thường cha mẹ nhận thấy

mắt trẻ bất thường và có dấu hiệu này qua ánh sáng đèn hay chụp ảnh cho bé. Thường các bác sĩ và gia đình không coi đó là nghiêm trọng và đó là lý do trẻ được chẩn đoán muộn. Hiện nay có nhiều chương trình giáo dục cha mẹ nhận biết ánh đồng tử trắng. Có khi nhờ chụp ảnh mà phát hiện ra dấu hiệu này. Tuy nhiên có những nguyên nhân khác gây ra ánh đồng tử trắng trên ảnh chụp như đục thủy tinh thể bẩm sinh, tồn lưu sợi myelin, khuyết gai thị và cận thị nặng.

Ở nhiều nước đang phát triển trẻ đến khám muộn vì lỗi mắt do u đã xuất ngoại như viêm tổ chức hóc mắt do hoại tử khối u, giãn đồng tử một bên, dị sắc móng mắt, xuất huyết tiền phòng, mù tiền phòng, viêm màng bồ đào và rung giật nhãn cầu do khối u ở vùng hoàng điểm hai mắt.

Ngược lại những bệnh nhân UNBVM ở những nước kém phát triển được chẩn đoán muộn hơn và giai đoạn khối u tiến triển hơn. Trong một nghiên cứu tiến hành trên 25 bệnh nhân ở Sudan với tuổi trung bình khi chẩn đoán là 36 tháng, với các triệu chứng biểu hiện gặp nhiều nhất là lỗi mắt và xuất ngoại ở 14 trường hợp (56%) và ánh đồng tử trắng ở 8 trường hợp (32%) [30]. Nigeria có 85% số bệnh nhân lỗi mắt [31]. Trong một nghiên cứu của Nepal, 10 trong số 30 (33%) các trường hợp lỗi mắt [32]. Trong nghiên cứu của Mali ở tây bắc châu Phi triệu chứng chính xuất hiện ở 55 trường hợp là lỗi mắt (55%) và tuổi trung bình khi chẩn đoán là 4 tuổi [33]. Các khối u ở vùng trung tâm đáy mắt có xu hướng gây mất thị lực. Ở trẻ em có tiền sử gia đình mắc UNBVM thường phát hiện ở giai đoạn sớm hơn do được sàng lọc những bệnh nhân này.

Trẻ trong gia đình có người đã bị UNBVM cần được khám sàng lọc trước khi các triệu chứng và dấu hiệu xuất hiện trừ khi xét nghiệm gen loại trừ alen đột biến ở trẻ đó. Với phần lớn các gia đình, có thể phát hiện đột biến RB1 ở người mắc bệnh đầu tiên, kiểm tra xem có đột biến đó ở các bà con không, xác định những người mang alen đột biến, chẩn đoán và điều trị sớm khi u còn nhỏ bằng lade hay hóa trị liệu để bảo tồn thị lực.

1.1.3.2. Chẩn đoán phân biệt

Có nhiều bệnh mắt lành tính rất dễ bị nhầm lẫn với ung thư võng mạc đòi hỏi cẩn thận khi khai thác bệnh sử và thăm khám.

- Bệnh hay bị nhầm nhất là bệnh Coats. Đây là tình trạng rối loạn tính thấm mạch máu vô căn, xuất hiện ở trẻ lớn tuổi hơn (4-5 tuổi). Xuất tiết võng mạc màu vàng và giãn mạch máu võng mạc. Ở giai đoạn muộn, xuất tiết nhiều giống khối u và glôcôm tân mạch xuất hiện đòi hỏi phải khoét bỏ nhãn cầu. Chẩn đoán phân biệt có thể sử dụng chụp mạch, siêu âm và chụp MRI.

- Tồn lưu mạch máu dịch kính và dịch kính nguyên thủy thường xảy ra ở một bên mắt, ánh đồng tử trắng, đục thủy tinh thể và thường là mắt kém phát triển (trục nhãn cầu ngắn). Tua thể mi bị kéo dài. Siêu âm thấy cuống mạch có nguồn gốc từ đĩa thị và trục nhãn cầu ngắn.

- Bệnh võng mạc trẻ đẻ non giai đoạn muộn có nhiều tân mạch gây bong võng mạc và ánh đồng tử trắng. Nhãn cầu thường teo nhỏ có kèm theo rung giật nhãn cầu khi mắt mất mất chức năng. Tiền sử đẻ non, cân nặng thấp khi sinh và không được sàng lọc để chẩn đoán điều trị kịp thời.

- Các bệnh lý võng mạc dịch kính do nhiễm trùng như viêm võng mạc herpes, CMV, toxoplasma và giun toxocara cũng cần xem xét. Khám đáy mắt, làm các xét nghiệm vi sinh và miễn dịch.

- Các dị dạng bẩm sinh như khuyết hắc võng mạc, đục thủy tinh thể và tách lớp võng mạc.

- Bệnh Norries là bệnh liên kết nhiễm sắc thể X có khối u hậu cực 2 mắt do Gordon Norriei, một bác sĩ mắt người Đan mạch mô tả năm 1927. Bệnh hay ở trẻ nam, xuất hiện ở cả 2 mắt sau khi sinh, võng mạc phát triển bất thường tạo nên ánh đồng tử trắng và có khối u ở gai thị. Trẻ bị điếc, co giật. Nhãn cầu nhỏ, đục thủy tinh thể, móng mắt đổi màu và xuất huyết dịch kính.

Nữ mang gen bệnh và truyền cho con trai của mình. Những khối u tế bào hình sao võng mạc thường kèm theo u xơ thần kinh.

Không thể áp dụng chọc hút hay sinh thiết u vì làm tăng khả năng u khuếch tán ra ngoài nhãn cầu và di căn làm cho vấn đề chẩn đoán chủ yếu dựa vào đặc điểm lâm sàng, chẩn đoán cận lâm sàng và xét nghiệm di truyền.

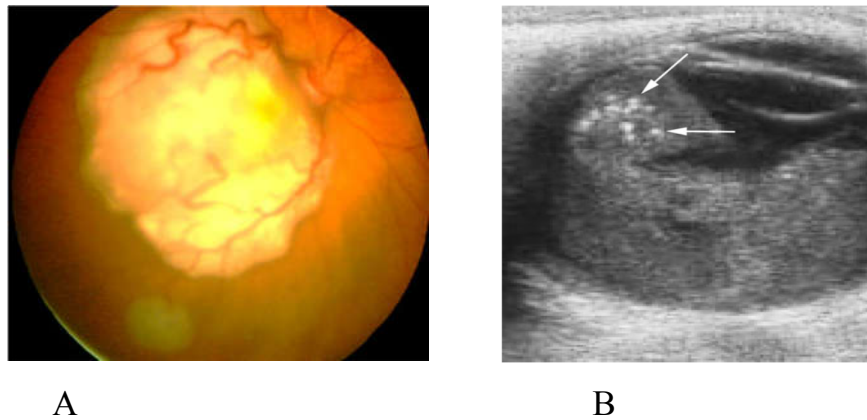
1.1.4. Cận lâm sàng

1.1.4.1. Siêu âm

Siêu âm là phương pháp chẩn đoán hình ảnh không xâm lấn, đơn giản, nhanh chóng và tiết kiệm cho phép phát hiện dễ dàng khối u và dịch trong nhãn cầu, các tổn thương được tìm thấy trong hơn 95% UNBVM được đánh giá bằng siêu âm A và B, có tác dụng với các cấu trúc nằm không quá sâu hay có chứa nhiều dịch như nhãn cầu. Siêu âm có thể áp dụng không cần gây mê trẻ em. Trên siêu âm, khối không đều, có âm vang mạnh hơn dịch kính và có những chấn can xi hóa. Nghiên cứu cho thấy can xi hóa xuất hiện ở 95% khối u. Can xi hóa giúp phân biệt khối u võng mạc với các tổn thương khác ở trẻ nhỏ. Siêu âm có thể thấy bong võng mạc và đặc biệt có thể phân biệt u phát triển vào trong dịch kính hay ra ngoài vào khoang dưới võng mạc. Siêu âm có độ phân giải kém nên không thể phát hiện hiện tượng thâm nhiễm hắc mạc hay thị thần kinh. Vết can xi nếu lớn cũng gây trở ngại cho việc đánh giá đĩa thị. Tuy nhiên siêu âm UBM có thể giúp chẩn đoán khối u xâm nhập bán phần trước nhãn cầu [25],[34],[35],[36].

1.1.4.2. Chụp cắt lớp vi tính (CT- Scanner)

Chụp cắt lớp vi tính cung cấp các chi tiết các mô mềm và xương hốc mắt và có vai trò chẩn đoán xác định UNBVM. Chụp cắt lớp vi tính chỉ có tác dụng xác định hiện tượng can xi hóa mà không thể xác định thâm nhiễm hắc mạc, củng mạc hay thị thần kinh. Khối u có độ sáng hơn dịch kính, khi chụp cắt lớp có thể đánh giá kích thước khối u, số lượng khối u.



Hình 1.2. UNBVM (A) và hình ảnh siêu âm khối u nội nhãn (B)

Nguồn: Retinoblastoma [25]

Ngày nay mọi trung tâm u bướu trên thế giới đều thống nhất rằng u nguyên bào võng mạc đặc biệt là thể di truyền rất dễ bị u ác tính thứ phát (sarcoma xương, mô mềm...) nếu lạm dụng tia X. Chụp cộng hưởng từ (MRI) đã dần thay thế chụp cắt lớp vi tính. Với cấu hình máy mới xác định diện < 5 mm phù hợp với khám mắt. Nhưng những hạn chế của chụp cộng hưởng từ có thể kể là khó phát hiện hiện tượng can xi hóa [25],[34],[35],[37].

1.1.4.3. Chụp cộng hưởng từ (MRI)

Hình ảnh chụp cộng hưởng từ dựa trên hiện tượng vật lý được gọi là hiệu ứng cộng hưởng hạt nhân trên các hạt nhân nguyên tử, chủ yếu là các nguyên tử hydro của các phân tử nước trong mô của người. Hình ảnh chụp cộng hưởng từ của bệnh nhân được thu được bằng cách tạo ra các tín hiệu điện từ các moment lưỡng cực của hạt nhân H1 sau đó chuyển đổi các tín hiệu này thành các hình ảnh cắt ngang. Mặc dù có chụp cắt lớp vi tính nhưng chụp cộng hưởng từ cung cấp độ tương phản mô rất tốt. Khả năng có độ tương phản ở các mô rõ rệt và sự vắng mặt của bức xạ ion hóa làm cho chụp cộng

hưởng từ trở thành một phương pháp đặc biệt phù hợp cho trẻ em bị bệnh u nguyên bào võng mạc [38], [39], [40].

Bệnh u nguyên bào võng mạc biểu hiện tăng tín hiệu đối với dịch kính trên các hình ảnh T1 và giảm tín hiệu trên T2. Các điểm nhỏ của các nốt vôi hóa xuất hiện như các điểm với cường độ tín hiệu tốt nhất nhìn thấy trên T2.

- Chụp cộng hưởng từ được dùng rộng rãi ở các trung tâm lớn, các đặc điểm UNBVM trên phim chụp cộng hưởng từ là:

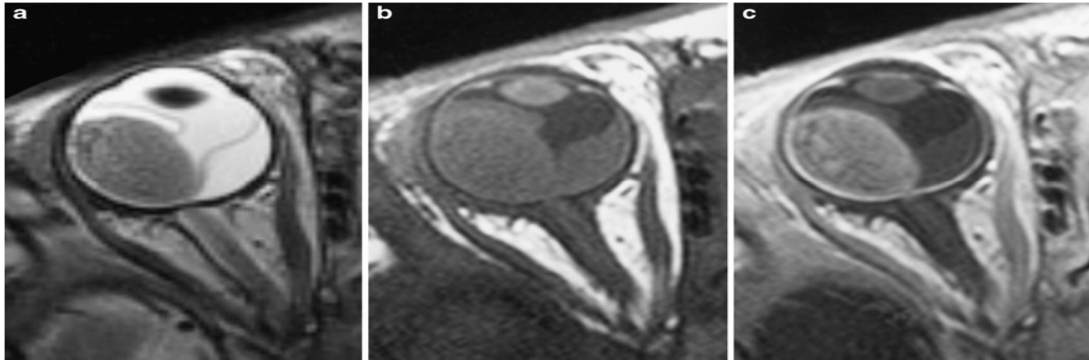
+ Trên những hình sau tiêm đối quang từ: khối u cho hình ảnh không đồng nhất ở mức vừa phải tùy thuộc vào hoại tử khối u. Hình ảnh can xi hóa giảm đáng kể giảm tín hiệu và dịch dưới võng mạc không tăng. Chụp cộng hưởng từ với tiêm đối quang từ là kỹ thuật hữu ích nhất trong phân biệt u nguyên bào võng mạc và bong võng mạc toàn bộ không gây ra bởi khối u. Sau khi điều trị bảo tồn nhãn cầu sự hiện diện của can xi hóa cũ và vết sẹo võng mạc hoặc dịch dưới võng mạc có thể dự đoán u tái phát hoặc bệnh còn chưa thoái triển hết. Các nghiên cứu khác nhau cho thấy sự thiếu tương quan giữa các kết quả chụp cộng hưởng từ độ phân giải cao và giải phẫu bệnh về sự xâm lấn thần kinh thị cũng như giới hạn của xâm lấn thần kinh thị trước và sau lá sàng [41].

***.Khối u xâm lấn ra ngoài võng mạc**

- *Thâm nhiễm thị thần kinh*: Đây là dấu hiệu quan trọng giúp cho thái độ xử trí khối u khi cắt bỏ nhãn cầu

- *Thâm nhiễm hắc mạc*: Đây là dấu hiệu nguy cơ cần lưu ý. Thâm nhiễm có thể cả bề dày hắc mạc hay chỉ ngay dưới màng Bruch.

- *Thâm nhiễm củng mạc và u xuất ngoại*: Trên phim T1, củng mạc tối nằm giữa hắc mạc và các tổ chức hốc mắt.

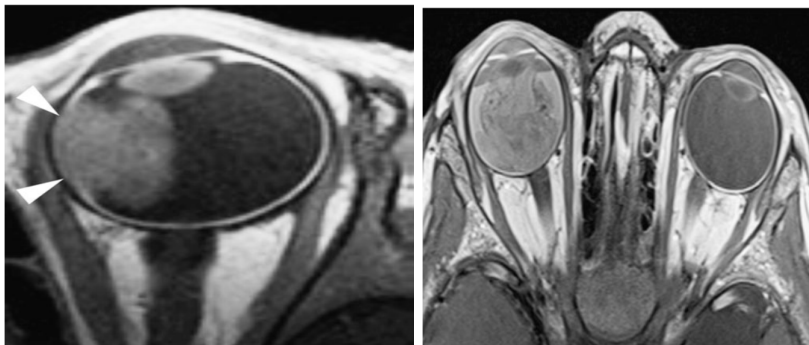


Hình 1.3: UNBVM với MRI (Nguồn: Retinoblastoma [25])

a. Trên hình ảnh T2: Dịch kính sáng, khối u tối, có hình ảnh bong võng mạc.

b. Trên hình ảnh T1: Dịch kính tối, u sáng hơn.

c. Trên hình ảnh T1: có tiêm đối quang từ thấy hắc mạc và khối u tăng tín hiệu, những vùng tín hiệu thấp là canxi hóa nhưng có thể nhầm với xuất huyết



Hình 1.4: U xâm lấn hắc mạc và không xâm lấn hắc mạc



Hình 1.5: U phát triển vào buồng dịch kính. Nguồn: Retinoblastoma [25]

U phát tán vào trong dịch kính: Hiện tượng u xâm nhập dịch kính biểu hiện bằng hình ảnh dịch kính không thuần nhất trên phim T1 hay T2. Tuy nhiên hiện tượng này có thể xác định khi khám lâm sàng.

1.1.4.4. Chụp ảnh đáy mắt kỹ thuật số (RET- Cam)

Ret-cam là một hệ thống máy ảnh góc rộng để chụp ảnh võng mạc và bán phần trước. Với Ret-cam có thể thấy các khối u nhỏ che một phần mạch máu hắc mạc hay thấy tế bào u dịch kính rõ ràng hơn là khám bằng máy soi đáy mắt gián tiếp. Do chụp ảnh lưu nên có thể theo dõi u có phát triển hay thoái triển. Ret- cam còn cho thấy hình ảnh tiền phòng và góc tiền phòng.

1.1.4.5. Chụp mạch huỳnh quang (có thể phối hợp với Ret-cam) cho thấy hệ thống mạch máu của khối u còn hoạt tính, có thể thấy u tái phát sau lade, hình ảnh cho thấy có một mạng lưới mạch máu võng mạc nổi bật ở thì động mạch với sự rò rỉ trong thì tĩnh mạch và sự bắt màu muộn của khối u võng mạc. Đôi khi lade hay lạnh đông gây ra tình trạng thiếu máu võng mạc cần phải điều trị vì nguy cơ sinh ra tân mạch.

1.1.4.6. Siêu âm đèn khe: hình ảnh cho thấy khối u ở chu biên hay mặt sau móng mắt, thủy tinh thể. Những tổn thương này không thể phát hiện với siêu âm, soi đáy mắt hay Ret- cam. Quan trọng là phát hiện khối u xâm lấn bán phần trước để chỉ định khoét bỏ nhãn cầu vì hiện không có biện pháp điều trị tại chỗ với các loại tổn thương này.

1.1.5. Chẩn đoán

1.1.5.1. Chẩn đoán xác định

*** Lâm sàng**

- ***Lý do trẻ đi khám bệnh:*** ánh đồng tử trắng hoặc lác hay gập

- ***Khám đáy mắt:*** khám trẻ nghi ngờ mắc UNBVM cần phải soi đáy mắt cho trẻ khi đã tra giãn đồng tử. U có màu trắng vàng nằm trên võng mạc hay nhô vào buồng dịch kính với các mạch máu giãn không đều trên bề mặt và

xâm nhập vào trong khối u, có thể có xuất huyết trên bề mặt u. Các đám tế bào trong dịch kính là dấu hiệu đặc trưng của UNBVM, các đám tế bào này nằm rải rác hay tập trung lại thành đám các hạt trắng ngà với kích thước to nhỏ khác nhau. Mô tả khối u theo kích thước là so với đường kính gai thị, vị trí nằm ở các vùng quanh gai thị, sát hoàng điểm không, nằm ở góc phần tư nào, gần các nhánh mạch trung tâm võng mạc thái dương, mũi trên hay dưới, u ở chu biên hay không, bao nhiêu khối.

*** *Chẩn đoán hình ảnh***

- Siêu âm có ý nghĩa chẩn đoán do phát hiện can xi hóa và kiểm tra xem mắt lành có u không?

- Chụp cộng hưởng từ có giá trị chẩn đoán và xác định loại trừ khối u ban nơi và u xâm lấn thị thần kinh.

- Không có chụp cộng hưởng từ thì có thể dùng chụp cắt lớp vi tính (hạn chế để tránh ung thư thứ phát), tuy nhiên tùy vào điều kiện của bệnh viện hay trung tâm mà có thể chọn chụp cộng hưởng từ hay chụp cắt lớp vi tính.

Khám gây mê

- Để đánh giá toàn diện UNBVM bao gồm khám tiền phòng, soi đáy mắt, cần phải gây mê.

- Vấn đề chụp ảnh đáy mắt để chẩn đoán, theo dõi điều trị UNBVM.

1.2. Phân loại u nguyên bào võng mạc

Từ lâu các nhà nghiên cứu đã nhận thấy cần phải có một phân loại khối u nhất quán để lên kế hoạch điều trị, tiên lượng, đánh giá và so sánh hiệu quả và đặt kế hoạch thử nghiệm lâm sàng. Để có một phân loại tốt, phải phản ánh được thực tế lâm sàng, có thể thay đổi được khi có thêm thông tin mới. Không chỉ phân loại khối u dựa trên ý kiến của một bác sĩ chuyên khoa sâu mà phải dựa trên sự phối hợp và làm việc theo nhóm giữa các bác sĩ Giải phẫu bệnh,

Bác sĩ Ung bướu nhi, Bác sĩ Nhãn khoa. Với các khối u đặc ở trẻ em, trừ u nguyên bào võng mạc, mục tiêu chính là trẻ sống sót chứ không phải là hiệu quả điều trị hay tác dụng phụ của thuốc.

* *Những nét riêng của u nguyên bào võng mạc*: U nguyên bào võng mạc không giống như các khối u ác tính khác ở trẻ em do các lý do:

- Có hai mục đích cuối để đánh giá kết quả điều trị: Bảo tồn thị lực và bệnh nhân sống sót.

- Không có bệnh phẩm sinh thiết để khẳng định chẩn đoán và phân loại u nội nhãn mà chỉ làm giải phẫu bệnh khi đã khoét bỏ nhãn cầu.

- Bác sĩ mắt là người đầu tiên và là người theo dõi chính, trong khi những người điều trị chính lại là bác sĩ Ung bướu nhi và dựa vào Giải phẫu bệnh, nếu bác sĩ Mắt không hỗ trợ họ không thể đánh giá, phân loại và điều trị

Cho nên nếu áp dụng cách phân loại như những u ác tính trẻ em khác thì không được chấp thuận rộng rãi.

* ***Phân loại quốc tế UTNBVM (International Classification Retinoblastoma - ICRB)***

Tại hội nghị quốc tế về UNBVM ở Paris tháng 3 năm 2003, Ủy ban về UNBVM đã đề ra một hệ thống phân loại khác. Sau đó các chuyên gia về UNBVM ở châu Mỹ, Âu và Nam Phi đã chỉnh sửa để thành một phân loại chính thức. Phân loại này kết hợp phân giai đoạn lâm sàng và giải phẫu bệnh và có một điểm chung là khả năng sống sót của bệnh nhân bị u võng mạc. Bệnh nhân được phân loại theo diện rộng của bệnh, có xuất ngoại ở mức vi thể hay đại thể và có di căn không, sử dụng chữ số La mã để phân loại.

* ***Phân giai đoạn quốc tế***

Giai đoạn 0: Chưa có mắt nào bị khoét bỏ.

Giai đoạn I: bệnh nhân đã có ít nhất 1 mắt đã bị khoét bỏ được chẩn đoán giải phẫu bệnh là ung thư nguyên bào võng mạc.

Giai đoạn II: Bệnh nhân đã được khoét bỏ nhãn cầu, giải phẫu bệnh thấy có thể bào u ở đầu cắt thị thần kinh và còn sót tế bào u (vi thể) trong hốc mắt.

Giai đoạn III: Những bệnh nhân có biểu hiện u xâm lấn hốc mắt và nổi hạch.

Giai đoạn IV: Dành cho u đã di căn. U di căn não tỷ lệ tử vong cao.

*** Phân nhóm theo quốc tế**

Cơ sở khoa học

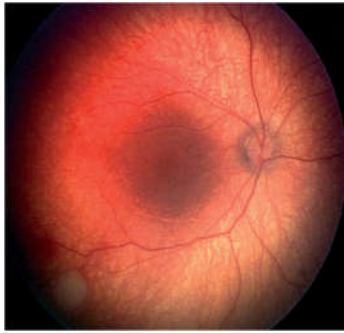
Năm 2003, Murphree đề ra phân loại ABC tại hội nghị về UNBVM ở Paris. Sau đó Gallie (Toronto, Canada) đã thiết lập một website nhằm kiểm tra ứng dụng của phân loại ABC từ các nơi trên thế giới. Sử dụng cùng một quy trình do hội đồng quy định, hơn 20 trung tâm trên 6 châu lục đã hồi cứu hơn 2000 bệnh nhân và phân loại lại theo hệ thống ABC. Phương thức điều trị và kết quả được ghi lại. Sau đó tác giả Murphree đã thu thập các số liệu và công bố một phân loại quốc tế không mang tên tác giả để tôn trọng những người đã tham gia.

U được xếp nhóm theo mức độ lan rộng của khối u nội nhãn. Việc phân nhóm cũng dựa trên tiến triển tự nhiên của bệnh và khả năng bảo tồn nhãn cầu, mỗi nhóm có nhiều yếu tố xem xét.

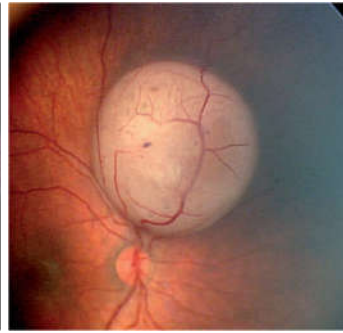
Yếu tố chủ đạo xác định nguy cơ mất mắt là diện phân tán hay xâm lấn của u trong mắt. Theo phân loại này, dịch dưới võng mạc hay tế bào u phát tán trong dịch kính được coi là có ý nghĩa đối với bảo tồn nhãn cầu. Tế bào u khuếch tán vào dịch kính có thể phát hiện trên lâm sàng. Dịch dưới võng mạc có khi khám lâm sàng không phát hiện ra nhưng phải coi là có nếu có đám tế

bào u dưới võng mạc. Khi u lan rộng dưới võng mạc sẽ hình thành mảng hay tế bào u dưới võng mạc [18].

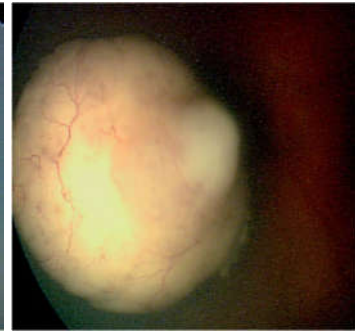
Nhóm A: Khối u $\leq 3\text{mm}$, u nhỏ và có bờ tròn nét, u cách hoàng điểm 3 mm và cách đĩa thị 1,5 mm. Không có phân tán tế bào u nội nhãn. Tiên lượng rất tốt. (Hình 1.6)



Hình 1.6. Nhóm A



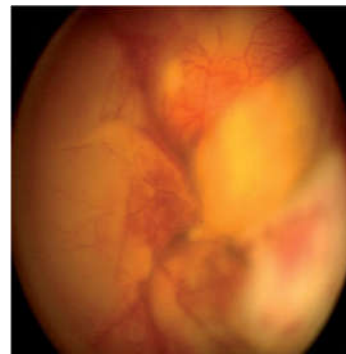
Hình 1.7. Nhóm B



Hình 1.8. Nhóm C



Hình 1.9. Nhóm D



Hình 1.10. Nhóm E

Nhóm B: Khối U $> 3\text{ mm}$ hoặc

- U nằm ngoài hoàng điểm $\leq 3\text{ mm}$ từ hoàng điểm
- U nằm ngoài đĩa thị và $\leq 1,5\text{ mm}$ tính từ đĩa thị
- Dịch dưới võng mạc $\leq 3\text{ mm}$ tính từ viền khối u

Tất cả các khối u đã vượt qua nhóm A nhưng chưa có phân tán tế bào u vào dịch kính hay có dịch dưới võng mạc (Hình 1.7). U trong nhóm B có thể lớn hơn, có hình dạng không đều hay có nốt - giai đoạn tiền phân tán tế bào u. U trong nhóm B không nhất thiết phải tuân thủ các vị trí nhất định như nhóm

A. Đa số u có kích thước lớn đều có một viền dịch dưới võng mạc bao quanh nhưng viền dịch này không vượt qua nền khối u 5 mm. Không có reo rắc tế bào u vào buồng dịch kính

Nhóm C: Các khối u đã vượt qua nhóm A và B, tiếp theo là reo rắc tế bào u vào dịch kính hay dịch dưới võng mạc hoặc cả hai ≤ 3 mm tính từ khối u, bề mặt khối u có nhiều nốt hơn. Các nốt tế bào khuếch tán thường nhỏ và ít. Dịch dưới võng mạc chỉ khu trú ở góc 1/4. Có dịch dưới võng mạc và reo rắc tế bào u vào dịch kính khu trú (Hình 1.8)

Nhóm D: Reo rắc tế bào u vào dịch dưới võng mạc hay dịch kính hoặc cả hai nhiều hơn và lớn hơn. Dịch dưới võng mạc chiếm quá góc 1/4 thậm chí có thể bong võng mạc toàn bộ. U dưới võng mạc hay u xuất ngoại xuất hiện. Reo rắc tế bào u trong dịch kính không chỉ ở bề mặt u mà khuếch tán toàn bộ dịch kính. (Hình 1.9)

Nhóm E: Khối u lớn đã tiến triển qua các giai đoạn nói trên và gây phá hủy cấu trúc nhãn cầu: Glacom tân mạch, xuất huyết nội nhãn nhiều, thâm máu giác mạc, hoại tử u kèm theo phản ứng viêm tổ chức hốc mắt, teo nhãn cầu, u ở dịch kính trước, tế bào u reo rắc tiền phòng, u tiếp xúc thủy tinh thể, u thâm nhiễm tỏa lan. Không có khả năng bảo tồn nhãn cầu khi có glacom tân mạch, xuất huyết nội nhãn nhiều, hoại tử u và phản ứng tổ chức hốc mắt, u chạm vào mặt sau thủy tinh thể. (Hình 1.10)

*** Ứng dụng lâm sàng của phân loại quốc tế**

Phân loại quốc tế mới có thể khó áp dụng với các bác sĩ Nhãn khoa. Chú ý phân nhóm dựa vào khám lâm sàng và phân giai đoạn dựa vào kết quả giải phẫu bệnh. Để điều trị khỏi bệnh ung thư cần cân đối vấn đề điều trị tối ưu và hiệu quả điều trị với các tai biến do điều trị. Cần có một phân loại mức độ nặng hay diện rộng của khối u để phù hợp với một biện pháp điều trị cụ thể, tất cả phải dựa trên bằng chứng hiện có.

Trước đây có phân loại Reese Ellsworth để dự đoán tiên lượng UNBVM sau tia xạ. Nhưng sau đó xạ trị bị chống chỉ định nên phân loại quốc tế về UNBVM ra đời để đánh giá kết quả của các phương pháp điều trị bệnh mới như lade, hóa trị liệu toàn thân

- Nhóm A: U nhỏ không đe dọa thị lực, điều trị tại chỗ là cách duy nhất nhưng cần phải làm nhiều lần.

- Nhóm B: U có kích thước trung bình hay u gần đĩa thị và hoàng điểm, cần củng cố trước bằng hóa trị liệu trước khi điều trị tại chỗ.

- Nhóm C: Khối u lớn có tế bào u reo rắc vào dịch kính điều trị bằng hóa chất trước khi điều trị khu trú.

- Nhóm D: Khối u lớn lan vào dịch kính hay dưới võng mạc điều trị bằng hóa chất trước khi điều trị khu trú.

- Nhóm E: Các đặc điểm nguy cơ cao như u chạm mặt sau thủy tinh thể, gl ô mắt, thể mi, xuất huyết tiền phòng, u xâm lấn hắc mạc, thị thần kinh phát hiện bằng MRI nên khoét bỏ nhãn cầu ngay.

1.3. Giải phẫu bệnh

Mắt được điều trị khoét bỏ sẽ làm giải phẫu bệnh để xác định UNBVM có yếu tố nguy cơ hay không, có biệt hóa hay không.

1.3.1. Đại thể: u được phân thành 3 nhóm gồm

- U hướng nội (endophytic) phát triển từ võng mạc vào dịch kính và phân tán các mảnh u nhỏ.

- U hướng ngoại (exophytic) phát triển về phía hắc mạc qua khoang dưới võng mạc gây bong võng mạc.

- U hỗn hợp bao gồm cả hướng nội và hướng ngoại.

1.3.2. Vi thể

Phần lớn khối u có nhiều lớp hoặc nhiều tế bào không biệt hóa, tuy nhiên ở nhiều nơi u biệt hóa thành hình ảnh hoa hồng Flexner- Wintersteiner, hình

ảnh hoa hồng được tạo bởi các tế bào hình trụ vây xung quanh một ống rỗng. Những hình ảnh hoa hồng chưa hoàn chỉnh được gọi là hoa hồng Homer-Wright, ít phổ biến hơn hoa hồng Flexner- Wintersteiner và chúng được tìm thấy trong một loạt các khối u nguyên bào thần kinh khác ngoài u nguyên bào võng mạc. Hình ảnh hoa hồng Horner Wright là hình ảnh các tế bào hình trụ không bao quanh một ống rỗng mà tế bào chất của các tế bào này tiếp tục kéo dài và tập trung ở trung tâm, các nhân tế bào xếp thành vòng với trung tâm là bào chất có những sợi nhỏ [42],[43].

Nếu không được điều trị u nguyên bào phát triển trong mắt, phá hủy các cấu trúc bên trong nhãn cầu, u xâm lấn thị thần kinh và hắc mạc rồi theo đường máu và bạch mạch tế bào u đi ra kết mạc, mi mắt và di căn xa. Đa số các dấu hiệu lâm sàng không dự đoán được u nguyên bào võng mạc di căn nhưng giải phẫu bệnh có thể dự đoán được nguy cơ này và phát hiện được các mức độ xâm lấn ra ngoài nhãn cầu. Các nghiên cứu đã cho thấy mối liên quan giữa một số dấu hiệu giải phẫu bệnh và yếu tố tiên lượng. Các yếu tố có nguy cơ cao là có tế bào u xâm lấn thị thần kinh sau lá sàng, còn sót tế bào u ở vị trí cắt thị thần kinh và tế bào u lan qua củng mạc vào hốc mắt. Các yếu tố nguy cơ cao phụ thêm khác như xâm lấn tiền phòng, u có kích thước lớn và khuếch tán vào dịch kính, tân mạch mống mắt và glacom.

Phân tích các đặc điểm giải phẫu bệnh gồm mức độ xâm nhập của tế bào u vào các thành phần của nhãn cầu, sự biệt hóa, hướng phát triển, hiện tượng canxi hóa và hoại tử u cũng như đánh giá u có tình trạng nguy cơ cao, tình trạng biệt hóa của khối u có hay không, hướng phát triển của khối u., hiện tượng canxi hóa và hoại tử của khối u cũng như đánh giá tình trạng nguy cơ cao của khối u. Sự biệt hóa của khối u được chia làm hai nhóm: không biệt hóa và biệt hóa dựa trên sự xuất hiện có hay không có hình ảnh hoa hồng Flexner- Wintersteiner.

Xâm nhập hắc mạc được định nghĩa là sự hiện diện của một hay nhiều đám tế bào u vào hắc mạc và đẩy hoặc xâm nhập vào màng giới hạn. Xâm nhập hắc mạc được chia thành ba nhóm bao gồm không xâm nhập, xâm nhập thành đám < 3mm đường kính tối đa và chưa xâm lấn củng mạc, xâm nhập toàn bộ hắc mạc (hơn 3mm đường kính tối đa và đến lớp trong của củng mạc). Xâm nhập thị thần kinh được chia thành năm nhóm gồm: không xâm nhập, xâm nhập trước lá sàng, xâm nhập tại lá sàng, sau lá sàng và xâm nhập tại diện cắt thị thần kinh. Xâm nhập củng mạc được chia ba nhóm: không xâm nhập, xâm nhập một phần và toàn bộ củng mạc. Xâm bán phần trước bao gồm: xâm nhập tiền phòng, móng mắt, thể mi.

1.3.3. Các yếu tố nguy cơ cao gây di căn được xác định bao gồm

- Xâm nhập bán phần trước: Tiền phòng, móng mắt, thể mi
- Xâm nhập toàn bộ hắc mạc ($\geq 3\text{mm}$)
- Xâm nhập thị thần kinh sau lá sàng
- Xâm nhập hắc mạc từng đám và xâm nhập thị thần kinh mức trước lá sàng/lá sàng
- Xâm nhập củng mạc/ ra ngoài củng mạc.
- Xâm nhập hóc mắt

1.3.4. Phân giai đoạn Giải phẫu bệnh theo pTNM 7th AJCC/UICC: để đánh giá có hay không yếu tố nguy cơ cao để quyết định điều trị hóa chất hay không, tiên lượng điều trị.

- PTx: Không đánh giá được u nguyên phát
- pT0: không có dấu hiệu của u nguyên phát
- pT1: U giới hạn trong nội nhãn, không xâm nhập hắc mạc và Thị thần kinh
- pT2: U xâm lấn tối thiểu thị thần kinh và/hoặc hắc mạc
- + pT2a: u xâm nhập đầu thị thần kinh nhưng chưa qua lá sàng hoặc u xâm lấn tối thiểu hắc mạc < 3mm.

+ pT2b: u xâm nhập đầu thị thần kinh nhưng chưa qua lá sàng và xâm lấn tối thiểu hắc mạc < 3 mm.

- pT3: U xâm lấn rõ vào thị thần kinh và/ hoặc hắc mạc.

+ pT3a: U xâm nhập vào thị thần kinh vượt qua lá sàng nhưng chưa tới diện cắt hoặc u xâm nhập hắc mạc thành từng đám > 3mm.

+ pT3b: U xâm nhập thị thần kinh vượt qua lá sàng nhưng chưa tới diện cắt và u xâm nhập hắc mạc thành từng đám >3mm.

- pT4: U xâm lấn tới diện cắt hoặc xuất ngoại nhãn cầu ở bất kỳ vị trí nào

+ pT4a: U xâm lấn tới diện cắt thị thần kinh nhưng chưa xuất ngoại nhãn cầu

+pT4b: U xâm lấn tới diện cắt thị thần kinh và xuất ngoại nhãn cầu.

1.4. Bệnh học phân tử và cơ chế bệnh sinh u nguyên bào võng mạc

1.4.1. Vị trí và cấu trúc và chức năng của gen *RB1*

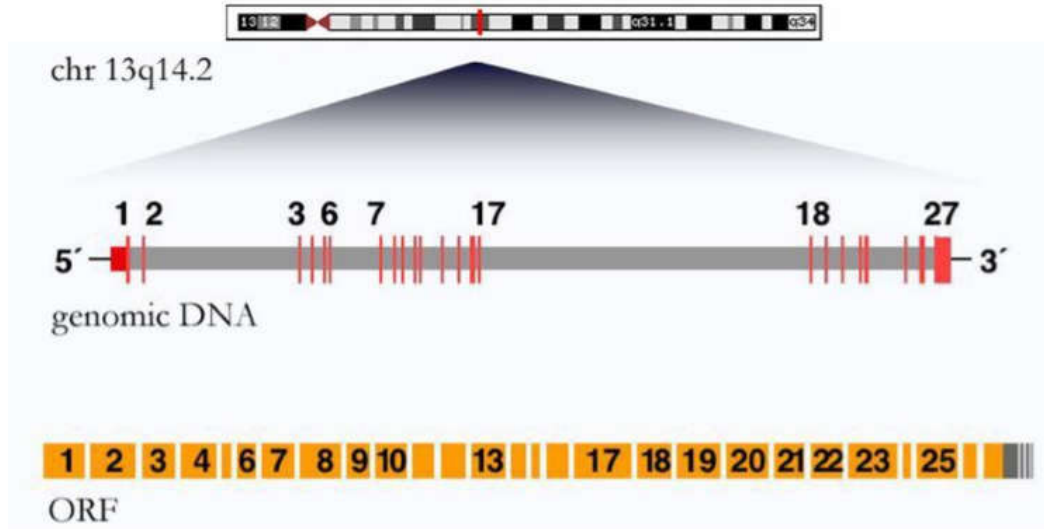
Các nhà Khoa học đã xác định được gen *RB1* vào năm 1986, là gen ức chế khối u đầu tiên được phát hiện. Cho đến nay cấu trúc gen, cơ chế bệnh học phân tử đã được nghiên cứu đầy đủ và rõ ràng.

Gen *RB1* nằm ở nhánh dài nhiễm sắc thể 13, vùng 1, băng 4, băng phụ 2, ký hiệu: 13q14.2, gen gồm 178.240 cặp base (từ cặp base 48.303.747 tới 48.481.986), có tổng cộng 27 exon và 26 intron. Gen *RB1* mã hóa cho proteinRB (pRB). Các exon mã hóa các vùng A/B của protein pRB, trung gian tương tác với các yếu tố phiên mã E2F và DP. Vùng promoter của gen *RB1* thiếu hụt vị trí gắn TATA hoặc CAAT, và được thay thế bởi vị trí gắn cho yếu tố phiên mã Sp1 và ATF. Vùng 5' của gen và đảo CpG thường xuyên không được methyl hóa.

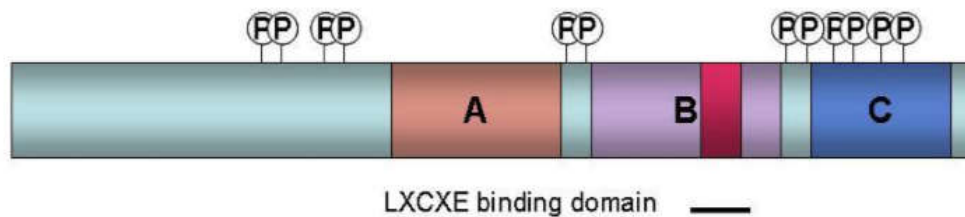
1.4.2. Protein *RB*

ProteinRB gồm 928 acid amin, pRB này có 4 vùng (domain) [4], [7], [8], [44], [45], [46]. Các liên quan kiểu gen – kiểu hình có ý nghĩa rất quan trọng vì chúng có thể giúp tiên đoán tác động của đột biến gen trên bệnh nhân.

Gen *RB1* mã hóa cho proteinRB, pRB bao gồm 928 acid amin: ProteinRB được chia thành 4 vùng:



Hình 1.11. Các vùng trên Gen *RB1*, các Exon trên gen *RB1*



Hình 1.12. Các vùng trên proteinRB

- Vùng N (N-Terminus): vùng N cũng không có cấu trúc đặc biệt; mặc dù các đột biến được tìm thấy trong bệnh UNBVM [47].

- Vùng C (C- Terminus): vùng C rất quan trọng đối với sự ức chế tăng trưởng tế bào, và chứa thông tin di truyền của nhân tế bào (nuclear localization signal: NLS) và liên kết các Cyclin, rất quan trọng đối với phosphoryl hóa pRB. Vùng C-terminal hoạt động gắn kết DNA không đặc hiệu và liên kết với Oncoproteins C- ABl và MDM229. Các đột biến xảy ra ở miền C gây UNBVM thâm nhập cao [47].

- Vùng A/B (A/B Domain) cách nhau bởi một vùng đệm): trên gen RB1 có hai vùng A/B là vùng mã hóa pRB có tính bảo tồn cao trong gia đình, tạo nên vị trí để gắn protein với các trình tự axit amin liên ứng LxCxE (x là bất kì axit amin nào). Tùy thuộc vào tình trạng phosphoryl hóa ở nhiều Serine và Threonine ở các vùng khác nhau của proteinRB, miền A/B có thể liên kết với các yếu tố phiên mã E2F, HDACs và các protein khác chứa peptit LxCxE. Miền này là cần thiết cho các chức năng sinh học như quy định về sự tăng trưởng và sự khác biệt của các hoạt động, các phản ứng hóa sinh bao gồm điều chỉnh hoạt động phiên mã và sự tương tác của virus với tế bào. Miền A/B cùng nhau phải tạo ra một chức năng ức chế phiên mã. Kết cấu tinh thể dưới tia X cho thấy rằng miền A tạo thành một giàn đỡ hỗ trợ cho miền B đảm bảo việc mã hóa và sự ổn định hợp lý trong quá trình mã hoá. Đột biến ảnh hưởng đến miền A/B kết quả là hình thành khối u. Sự toàn vẹn về cấu trúc của miền này rất quan trọng đối với chức năng pRB [48], [49].

Dữ liệu cho thấy pRB có thể là một bộ điều chỉnh chu trình tế bào chung. chức năng ức chế khối u pRB ban đầu được cho là chủ yếu do khả năng của nó để bắt giữ các tế bào trong G1 bằng cách ức chế hoạt động của các yếu tố phiên mã E2F. Hiện nay người ta tin rằng pRB có nhiều vai trò tế bào ngoài việc phục vụ như một trạm kiểm soát G1 bao gồm kiểm soát sự khác biệt tế bào trong quá trình phát triển phôi thai và trong mô người trưởng thành, điều chỉnh sự chết theo chu kỳ của tế bào (Apoptosis), duy trì giữ chu kỳ tế bào vĩnh viễn và bảo tồn sự không ổn định về nhiễm sắc thể.

1.4.3. Chức năng gen RB1

ProteinRB có vai trò rất quan trọng đối với sự điều khiển chu kỳ tế bào và quá trình biệt hóa tế bào, tham gia vào sự chuyển pha G1/S bằng cách ức chế yếu tố phiên mã E2F cần thiết cho sự khởi đầu của pha S. Sự bất hoạt của RB1 có tác động lớn nhất đến một quần thể nhỏ các tế bào tiền thân của tế bào

nón trong quá trình phát triển võng mạc. Sự xuất hiện của protein RB có vai trò rất lớn trong việc hạn chế phân chia và tăng sinh tế bào. Hoạt động điều chỉnh của pRB là kết quả từ khả năng gắn kết và ức chế chức năng của các yếu tố phiên mã E2F kích hoạt các gen liên quan đến phân chia tế bào. pRB liên kết với các yếu tố phiên mã E2F thông qua vùng A/B, vùng chức năng quan trọng và mục tiêu để không kích hoạt các đột biến gây các khối u nguyên bào võng mạc và các loại ung thư khác. Sau sự phosphoryl hóa của nó bằng các kinase phụ thuộc Cyclin, pRB tách ra từ phức hợp E2F. Ngừng hoạt động của pRB do các đột biến gen *RB1* dẫn đến sự tăng lên không kiểm soát của tế bào và hình thành, phát triển khối u [47].

1.4.4. Cơ chế bệnh sinh

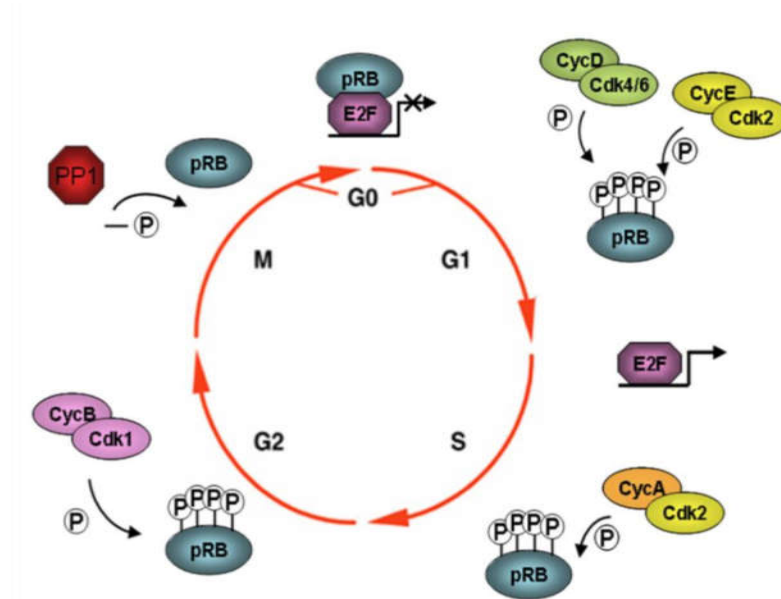
Protein RB sau khi dịch mã được hoàn thiện bằng sự phosphoryl hóa. Phosphoryl hóa pRB là một chu trình điều hòa tế bào và tiến hành bởi các enzym phụ thuộc Cyclin. (Cyclin-dependent kinases: CDKs), là những enzym gắn và được hoạt hóa bởi Cyclin. Vùng C tận cùng của pRB chứa các vùng gắn với phức hợp Cyclin- Cdk. pRB được phosphoryl ở pha chuyển đổi G1 đến S bởi các phức hợp Cdk4/6, CyclinD hoặc Cdk2 và CyclinE. Protein này tăng cường phosphoryl hóa ở các vị trí khác nhau, như giai đoạn trung gian tế bào, đầu tiên được phosphoryl bởi Cdk2- CyclinA từ pha S tới G2, sau đó Cdk2-CyclinB ở pha M.

Sự khử phosphoryl của pRB thực hiện qua trung gian Phosphoprotein phosphatase1 (PP1), tạo ra một pRB có tỉ lệ phosphoryl thấp, có mặt trong pha G0 và G1 tạo nên phức hợp pRB và các yếu tố phiên mã E2F, ức chế E2F để điều chỉnh chu kỳ tế bào, làm tế bào nhân lên theo chu trình và không tạo thành khối u.

Tình trạng Phosphoryl hóa ảnh hưởng đến sự liên kết giữa pRB và các yếu tố phiên mã E2F, các yếu tố phiên mã E2F hoạt hóa các gen tham gia vào

quá trình chuyển đổi pha G1-S, do đó chúng thúc đẩy sự tiến triển chu kỳ tế bào. Khi pRB bị phosphoryl hóa liên tục do mất chức năng, nó mất đi khả năng gắn với các protein E2F, cho phép các yếu tố phiên mã E2F hoạt hóa các gen kiểm soát chu kỳ tế bào. Như vậy trong UNBVM, đột biến gen RB1 dẫn tới pRB không còn chức năng hoặc vắng mặt sẽ dẫn tới hậu quả hoạt động của các protein E2F và sự kích thích liên tục của chu kỳ tế bào, làm tế bào phát triển không kiểm soát và hình thành khối u.

Ngoài ra chức năng của pRB bao gồm quá trình chết theo chu trình của tế bào và sự biệt hóa tế bào, và thường thông qua sự tương tác của pRB với những “đối tác” trung gian đa dạng và phong phú để kích hoạt các chức năng trên. Làm mất chức năng tế bào chết theo chu kỳ hoặc sự biệt hóa bình thường được điều khiển bởi *RB1* cũng có thể là một yếu tố quan trọng hình thành nên UNBVM.



Hình 1.13. Cơ chế bệnh sinh UNBVM

1.4.5. Đột biến gen *RB1* gây bệnh u nguyên bào võng mạc

Cho đến nay các nhà trên thế giới đã xác định được hơn một trăm đột biến khác nhau trên gen *RBI* gây bệnh UNBVM, các đột biến phổ biến khác nhau giữa các vùng quốc gia và các chủng tộc.

Bất hoạt hoàn toàn gen *RBI* ở người gây bệnh UNBVM, phát hiện ra đột biến gen *RBI* là một bước ngoặt quan trọng trong tìm hiểu quá trình tiến triển UNBVM cũng như những nhiều loại ung thư khác nhau. Đưa đến sự hiểu biết toàn diện về cơ chế bệnh sinh, cấu trúc của gen *RBI* đã được mô tả. Các đột biến ở cả hai alen của gen *RBI* gây nên sự phát triển của khối u [17]. Trong khi một đột biến de novo hoặc đột biến dòng tế bào gốc gây nên khối u võng mạc hai bên, các đột biến soma trong cả hai alen trên tế bào võng mạc chiếm tới 85% khối u ở một mắt [50]. Hầu hết các đột biến gen *RBI* là đột biến điểm (thay thế nucleotid, thêm hay xóa nucleotid, và các đột biến phối hợp). Những loại này có thể được phân loại thành các đột biến mất đoạn gây cắt ngắn protein RB, không mất đoạn và đột biến vùng promoter [51].

Xóa đoạn ở các exon 13- 17 với tần xuất thường xuyên hơn trong rất nhiều loại khối u khác nhau, bao gồm cả UNBVM, ung thư vú, sarcome xương và hiện diện như một “điểm nóng”.

1.4.6. Di truyền trong bệnh UNBVM.

Giả thuyết “two hit” của Knudson được đưa ra năm 1971 sau quá trình nghiên cứu và theo dõi các đặc điểm lâm sàng của bệnh. Giả thuyết cho rằng UNBVM hình thành cần có hai lần gây đột biến gen.

- Ở thể bệnh do di truyền: lần đột biến đầu tiên (đột biến dòng tế bào gốc) là đột biến xảy ra trên các exon của gen *RBI*, lần đột biến thứ 2 (đột biến tại tế bào võng mạc chưa biệt hóa) dẫn đến sự hình thành khối u. Cơ chế bệnh sinh này được giải thích tốt nhất bằng việc khảo sát sự di truyền của UNBVM. Trong thể do di truyền khối u được di truyền từ cha hoặc mẹ là người mang một alen đột biến của gen RB1. Sự hiện diện của một bản sao của

gen đột biến thông qua tế bào gốc có tỷ lệ gấp 1.000 lần đột biến tự phát tại tế bào đích. Hình thức này đa dạng vì một bản sao của gen *RBI* có đột biến tế bào gốc có mặt trong tất cả các tế bào và đột biến thứ 2 có thể xảy ra trong một số tế bào võng mạc đang biệt hóa trong quá trình hình thành. Đột biến gen *RBI* trong tế bào gốc cũng có thể dẫn đến bệnh nhân có khối u ác tính thứ phát như sụn khớp (osteosarcoma). UNBVM một mắt có liên quan đến đột biến của cả hai bản sao của gen *RBI* trong tế bào võng mạc đang phát triển.

- Ở thể bệnh không do di truyền: tế bào võng mạc chưa biệt hóa phải trải qua hai lần đột biến mới tạo thành khối u nguyên bào võng mạc hay còn gọi là đột biến tế bào soma (đột biến trên 2 alen của cùng một gen *RBI*).

- Đột biến “de novo” có thể xảy ra trước khi thụ thai hoặc sau khi thụ thai. Các đột biến này xảy ra chủ yếu trong quá trình sinh tinh và sự trưởng thành của noãn và dẫn đến đột biến tế bào gốc và gây bệnh thể hai bên mắt [52], [53]. Ngược lại, các đột biến xảy ra ở giai đoạn đầu phát triển phôi thai có thể dẫn đến bệnh thể khảm có thể ảnh hưởng tới các cơ quan và mô khác nhau, bao gồm võng mạc, tế bào lympho hoặc thậm chí là tuyến sinh dục. Các đột biến thể khảm có thể được phát hiện trong DNA của tế bào lympho bằng cách sử dụng giải trình tự Sanger tùy thuộc vào mức độ khảm [53], [54], [55]. Việc phát hiện các đột biến thể khảm là thách thức và khó khăn Giải trình tự Sanger là tiêu chuẩn vàng để sàng lọc phát hiện đột biến gen *RBI* cho phép phát hiện các đột biến trong vùng điều khiển và trong trình tự mã hóa trên các exon. Tuy nhiên, tỷ lệ phát hiện thể khảm theo trình tự Sanger là khá cao [50], [56]. Trước đây phương pháp AS-PCR đã được sử dụng để phát hiện hiệu quả 11 đột biến vô nghĩa trên các vị trí CpG trong gen *RBI* có mặt ở mức dưới 15% của alen bình thường Phương pháp này làm tăng độ nhạy để phát hiện đột biến khảm và dựa trên công nghệ này, tần số đột biến khảm mầm được ước tính là ~ 5,5% ở hai bên và ~ 3,8% ở bệnh nhân một bên mắt bị bệnh.

Tuy nhiên, phương pháp này được chỉ giới hạn trong mục tiêu tìm 11 đột biến cụ thể và không thể mở rộng sang các đột biến khác trên gen *RBI* [56].

Bất kể các đột biến ban đầu là do di truyền hay do tự phát sinh trên tế bào của võng mạc chưa biệt hóa, các tế bào võng mạc chỉ trở thành u ác tính khi bị mất bản sao bình thường của gen *RBI* gây nên pRB mất chức năng.

- 6% bệnh nhân có tiền sử gia đình rõ ràng (trong gia đình có người bị mắc bệnh). Bệnh được di truyền trội với độ thâm nhập thấp, vào khoảng 60 đến 95%. Loại này do di truyền và có các đặc điểm:

+ Biểu hiện sớm: khi trẻ được vài tháng tuổi (thậm chí vài ngày tuổi) đến một tuổi trở ra

+ Thường bị cả hai mắt.

+ Có thể bị một loại ung thư khác đi kèm.

- Còn lại 94% là u đơn phát lẻ tẻ, gia đình không có người bị bệnh. Những trường hợp đơn phát này là do gen đột biến tự nhiên. Trong số này có khoảng 80% được cho là do đột biến tế bào soma, bệnh nhân không có khả năng truyền lại gen bệnh cho con cháu. Còn 20% kia được cho là do đột biến dòng tế bào gốc, bệnh nhân có khả năng truyền lại gen bệnh cho con cháu.

Một tỷ lệ nhỏ khoảng 5% bệnh nhân bị UNBVM còn mang thêm những dị hình dị tật khác như chậm phát triển trí tuệ, thừa ngón tay ngón chân, không có lỗ hậu môn, kém tăng trưởng. Những bệnh nhân này thường bị khiếm khuyết đoạn một phần nhánh dài nhiễm sắc thể 13 bao gồm cả dải q14.

Trên thực tế rất khó xác định và phân biệt hai loại này mặc dù có sự trợ giúp của các kỹ thuật về gen. Y học ghi nhận 60% UNBVM một bên thường không có tính di truyền trong gia đình. UNBVM hai mắt chiếm 40% trường hợp và khoảng 30% có yếu tố di truyền với sự đột biến dòng tế bào gốc của gen *RBI*. Tổn thương mắt bên kia thường xuất hiện vài tháng, một năm sau khởi bệnh mắt bên này. Mười phần trăm bệnh nhân thừa hưởng một đột biến gen *RBI* từ một người mẹ bị bệnh.

1.5. Các phương pháp phát hiện đột biến gen *RBI*

Để phát hiện các đột biến gen *RBI* các nhà nghiên cứu thường khuyến cáo phối hợp nhiều phương pháp xét nghiệm sinh học phân tử. Tuy nhiên còn phụ thuộc vào trang thiết bị máy móc, kỹ thuật và tài chính. Trên thế giới phương pháp hay được sử dụng nhiều nhất là giải trình tự DNA.

Bảng 1.1. Các phương pháp xác định đột biến gen *RBI*

Giải trình tự trực tiếp DNA	Xác định khoảng 70% đến 75% tất cả các đột biến trên gen <i>RBI</i> [57]
Kỹ thuật khuếch đại đầu dò đa môi dựa vào phản ứng nối (MLPA)	Để xác định việc xóa hoặc sắp xếp lại của 1 hoặc một số exon, phát hiện 15- 16% trong tất cả các trường hợp đột biến gen <i>RBI</i> [50] Phát hiện đột biến lặp đoạn và mất đoạn gen
Cytogenetic Karyotype Microarray	Xác định các đột biến chuyển đoạn nhiễm sắc thể hoặc mất đoạn nhiễm sắc thể
Giải trình tự RNA (Sequence analysis of RNA)	Để xác định các đột biến ở vị trí khớp nối intron- exon mà không thể phát hiện được trên giải trình tự DNA
Phân tích Methyl hóa vùng điều khiển của gen <i>RBI</i> (<i>RBI</i> - promoter hypermethylation analysis)	Để phát hiện đột biến gen <i>RBI</i> trong khối u; phân tích methyl hóa vùng điều khiển tìm thấy 10%- 12% đột biến gen <i>RBI</i> ở thể bệnh không do di truyền
Single- site mutation analysis: Phân tích đột biến tại vị trí đã được tìm ra	Để kiểm tra sự xuất hiện đột biến trong gia đình người bệnh mà đột biến này đã được xác định trên bệnh nhân
Phân tích liên kết: Linkage analysis	Để theo dõi gen đột biến trong các gia đình Phân tích thông thường từ 2 người trở lên khi đột biến không thể được phát hiện bằng phân tích thông thường.

1.5.1. Đột biến gen *RBI* gây bệnh *UNBVM*

Cho đến nay các nhà khoa học trên thế giới đã xác định trên 3000 đột biến khác nhau trên gen *RB1* gây bệnh UNBVM ở cả thể bệnh hai mắt và thể bệnh một mắt. Các đột biến với tỷ lệ khác nhau giữa các vùng và quốc gia.

Có nhiều kiểu đột biến gen *RB1* có thể gây ra UNBVM và các loại ung thư khác, 20% số trường hợp có mất đoạn lớn hơn 1kb, 30% có mất đoạn nhỏ hơn hay lặp đoạn và khoảng 45% có đột biến điểm. Đột biến thấy có ở 25/27 exon và ở vùng điều khiển (promoter). Cho đến năm 2005 đã có 932 báo cáo phát hiện đột biến gen *RB1* trên toàn thế giới. Nghiên cứu cũng cho thấy proteinRB thường bị bất hoạt khi có đột biến mất đoạn và đột biến vô nghĩa. Một ngân hàng cơ sở dữ liệu (RBGMdb) đã được xây dựng với 932 báo cáo đột biến gen RB1, các đột biến này đã được phân tích với các kết quả sau [58].

Một đặc điểm quan trọng của UNBVM thể hai mắt bị bệnh là đặc trưng bởi tỷ lệ mắc bệnh thể rải rác rất cao. Gần 80% của các trường hợp bệnh thể hai mắt bị bệnh mắc mới được chẩn đoán là thể rải rác (sporadic) không có tiền sử gia đình và được gây ra bởi đột biến “de novo” trên gen RB1. Trong trường hợp bệnh bị ở một bên mắt là gần 87% trường hợp là thể sporadic và không mang đột biến tế bào gốc [59].

- ProteinRB thường bị mất chức năng hoàn toàn bởi các đột biến vô nghĩa và đột biến lệch khung dịch mã gây nên do đột biến tạo mã kết thúc sớm làm proteinRB bị cắt ngắn cấu trúc so với bình thường. Trong khi sự đột biến sai nghĩa không ảnh hưởng cấu trúc proteinRB mà chỉ gây bất hoạt chức năng của proteinRB và gây bất hoạt trong hầu hết các bệnh di truyền.

- Phân tích các đột biến *RB1* theo nguồn gốc chủng tộc hay quốc gia gốc của bệnh nhân xác định hai nhóm, trong đó tỷ lệ đột biến vô nghĩa và đột biến vị trí nối cho thấy sự khác biệt vô cùng quan trọng và gợi ý sự liên quan của các nguồn gốc dân tộc.

- Hầu hết các đột biến được báo cáo ở các gia đình có tỷ lệ xâm nhập thấp đều nằm trong ba nhóm:

+ Các đột biến ở vùng điều khiển promoter dẫn đến sự biểu hiện bệnh thường thấp.

+ Đột biến vô nghĩa và đột biến lệch khung dịch mã làm mất đoạn proteinRB, làm cho chiều dài proteinRB bị cắt ngắn, ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng proteinRB gây bệnh UNBVM.

+ Đột biến ở khớp nối dẫn đến giảm sự nối mRNA bình thường hoặc sự nối thay thế liên quan đến các alen ung thư hoặc giảm chức năng.

1.5.2. Các dạng đột biến gen *RB1*

Các nhà khoa học đã chia ra làm nhiều dạng đột biến khác nhau nhưng cơ bản là ba nhóm đột biến gây bệnh:

- Đột biến ở vùng điều khiển promoter

- Đột biến gây ảnh hưởng đến cấu trúc gen *RB1* (gây cắt ngắn chiều dài ProteinRB): đột biến vô nghĩa, đột biến lệch khung dịch mã, đột biến xóa,

- Đột biến gây ảnh hưởng mRNA gây ảnh hưởng cấu trúc proteinRB: đột biến tại vị trí nối intron- exon.

- Đột biến không gây ảnh hưởng cấu trúc gen *RB1* (không gây cắt ngắn chiều dài ProteinRB mà chỉ ảnh hưởng chức năng): đột biến sai nghĩa.

Các nhà nghiên cứu trên toàn thế giới đã phát hiện các đột biến *RB1* nằm trên toàn bộ chiều dài gen *RB1* và có 17 đột biến hay gặp nhất và tập trung tại các vị trí có tỷ lệ cao, bao gồm các đột biến sau:

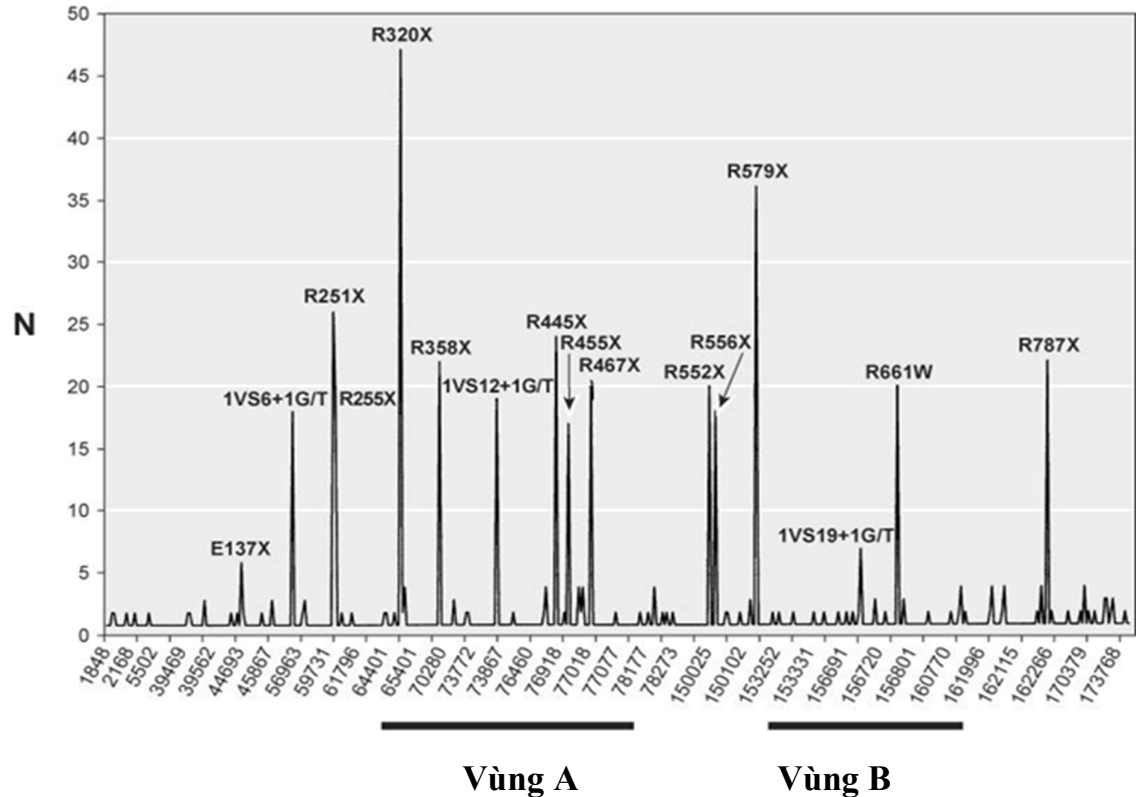
- 12 đột biến vô nghĩa: p.Glu137X, p.Arg251X, p.Arg255X, p.Arg320X, p.Arg358X, p.Arg445X, p.Arg455X, p.Arg467X, p.Arg552X, p.Arg556X, p.Arg579X, p.Arg787X.

- 3 đột biến ở vị trí nối intron- exon: c.607+1G>T, c.1215+1G>T, 1VS19+ 1G>T.

- 2 đột biến sai nghĩa: p.Arg661Trp, p.Arg656Trp.

- Ngoài ra còn có các đột biến khác nằm trên toàn bộ gen *RBI*.

Những kết quả này đã được xác nhận và khẳng định các nghiên cứu trước đó với các đột biến điểm và tỷ lệ gặp nhiều ở các nghiên cứu [44].



Hình 1.14. Phân bố các đột biến hay gặp trên thế giới

Hầu hết các đột biến hay gặp do thay thế vị trí nucleotid C sang T, trong 11 đột biến vô nghĩa hay gặp nhất thì thay đổi vị trí này đều dẫn đến bộ ba mã hóa Arginine CGA chuyển thành mã kết thúc sớm nằm trên các exon 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18 và 23, không có đột biến nào được tìm thấy trong bộ ba mã hóa CGA này nằm ở exon 1 và 27. Đột biến vô nghĩa còn lại hay gặp trong là đột biến p.Glu137X [58].

*** Đột biến vô nghĩa hay gặp:**

Đột biến vô nghĩa gặp ở nhiều vị trí trên gen *RBI* trong đó tại các vị trí sau là gặp nhiều nhất ở các nghiên cứu trên toàn thế giới

- **Đột biến *p.Arg320X***: trên exon 10 do thay thế vị trí nucleotid C thành T ở vị 958 trên trình tự cDNA dẫn đến bộ ba thứ 320 CGA mã hóa Arginine chuyển thành mã kết thúc sớm, đột biến này gặp nhiều nhất trên toàn thế giới và chủ yếu gặp nhiều ở bệnh nhân Châu Âu sau đó các nghiên cứu ở châu Á : các nghiên cứu của: Lohmann [60], Richter [50], Cowel [61], Yilma [62], Klutz [63], Sippel [54], Houdayer [64], Alonso [65], Nichols [66]. Ít gặp hơn ở châu Á: Kiran [67], [68], Choy [69], châu Phi [70],

- **Đột biến *p.Arg579X***: trên exon 18 có đột biến gặp nhiều thứ 2 là, đột biến này cũng do thay thế nucleotid C thành T ở vị trí 1753 trên trình tự cDNA dẫn đến bộ ba thứ 579 CGA mã hóa Arginine tạo mã kết thúc sớm TGA. Đột biến này chủ yếu gặp ở Châu Âu: Lohmann [71], Richter [50], Houdayer [64], Nichols [66], Alonso [65], Babenko [72], Taylor [73], Abouziied [74].

- **Đột biến *p.Arg251X***: trên exon 8, gặp nhiều nhất trên bệnh nhân Châu Âu, các nghiên cứu của: Lohmann [71], Richter [50], Cowel [75], Yilma [62], Klutz [63], Nichols [66]. Babenko [72], Sippel [54], Taylor [73], Houdayer [64]. Hiếm gặp ở châu Á và châu Phi: Choy [69], Seo [76], Abouzeid [74].

- **Đột biến *p.Arg255X***: trên exon 8 cũng chủ yếu gặp nhiều trên bệnh nhân Châu Âu: các tác giả đã công bố như: Blanquet, Lohmann, Richter, Cowel, Klutz, Alonso, Nichols, Houdayer. Ít gặp ở châu Á như của tác giả đã báo cáo: Seo [76], Tomar [68]

- **Đột biến p.Arg445X**: trên exon 14 đã được công bố trên các nghiên cứu của các tác giả: Lohmann, Richter, Yilma, Klutz, Houdayer..

- **Đột biến p.Arg455X**: trên exon 14, đã được công bố trên các nghiên cứu của các tác giả Châu Âu như: Lohmann, Houdayer, Nichols, một số tác giả ở châu Á như Tomar [68], Choy..

- **Đột biến Arg552X, Arg556**: trên exon 17, chủ yếu hay gặp ở các bệnh nhân Châu Âu

- **Đột biến Arg787X**: trên exon 23 gặp ở nhiều nước trên thế giới

* Đột biến sai nghĩa: hai đột biến sai nghĩa hay gặp nhất trên trong các nghiên cứu trên toàn thế giới đều nằm trên exon 20, bao gồm

+ **Đột biến p.Arg661Trp**: Nichols, Richter, Lohmann, Richter, Tomar [68]

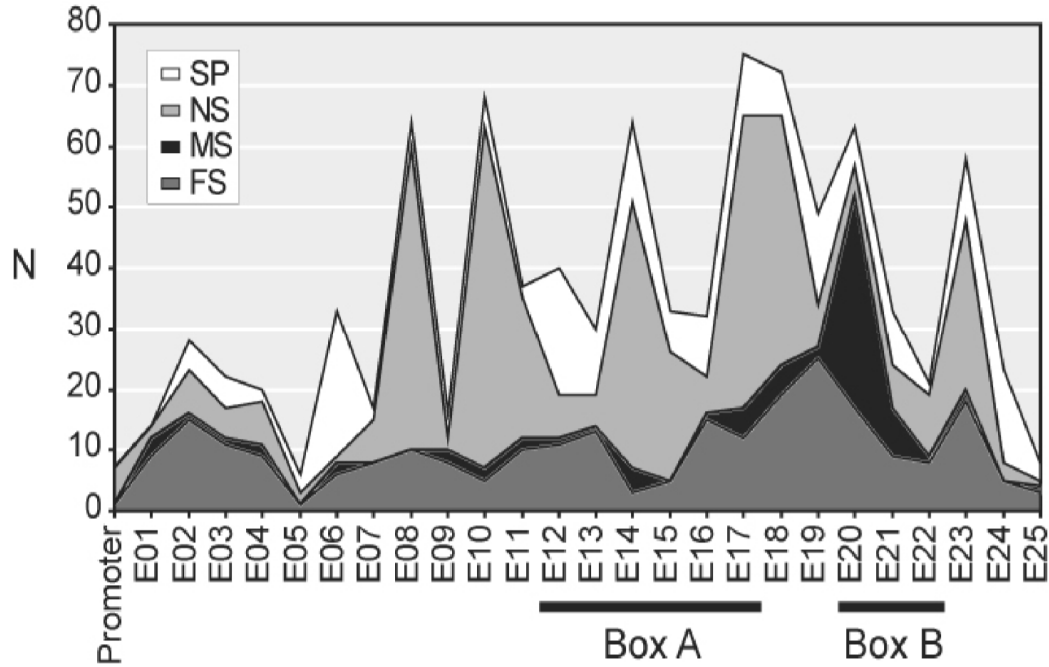
+ **Đột biến p.Arg656Trp**: nhiều tác giả đã báo cáo

Cả hai đột biến sai nghĩa hay gặp này đều nằm trong vùng A/B của proteinRB

* Đột biến tại vị trí nối intron- exon: có ba đột biến hay gặp đều do đột biến thay thế nucleotide G thành T, đây là nucleotid đầu tiên trên intron 6, 12 và 19 [50]

1.5.3. Sự phân bố các đột biến trên gen RB1

- Gần 40% các đột biến gen *RB1* được gặp ở nhiều nước trên thế giới và tập trung ở 16 vị trí trên gen *RB1*, gây ra 12 đột biến vô nghĩa, 2 đột biến sai nghĩa và ba đột biến tại vị trí nối exon- intron, thường hay gặp nhất ở các exon 9, 10, 14, 17, 18, 20 và 23. Các đột biến còn lại được phân bố dọc theo toàn bộ chiều dài gen *RB1*.



Hình 1.15. Sự phân bố các dạng đột biến hay gặp trên các vùng của gen *RB1*

*** Ghi chú:**

SP (Splicing): đột biến tại vị trí nối exon- intron

NS (Nonsense): đột biến vô nghĩa

MS (Missense): đột biến sai nghĩa

FS (Frame- shift): đột biến lệch khung dịch mã

Sự phân bố các đột biến được ghi trong dữ liệu RBDdb theo dạng đột biến và ở các quốc gia. Ở một số nước Nam Mỹ (Argentina, Brazil, Colombia, Cuba và Ecuador) cũng như ở Nga, Vương quốc Anh và Đức có tỷ lệ đột biến vô nghĩa cao hơn đột biến ở vị trí nối intron- exon.

Ngược lại tại Mỹ, Pháp và Tây Ban Nha đột biến vô nghĩa có tỷ lệ thấp hơn đột biến ở vị trí nối intron- exon. Sự khác biệt về tỷ lệ của đột biến vô nghĩa và đột biến vị trí nối intron- exon là rất quan trọng nói lên sự khác biệt về chủng tộc. Vì 80% các đột biến vô nghĩa trên gen *RB1* (trong RBGMdb) là do thay đổi vị trí nucleotid từ C thành T [58].

1.5.4. Tỷ lệ phát hiện đột biến trên gen RB1

Bảng 1.2. Tỷ lệ phát hiện đột biến trên gen RB1 ở các bệnh nhân UNBVM được báo cáo từ các quốc gia khác nhau

Quốc gia	Tác giả/ Năm công bố	Phương pháp nghiên cứu	Cỡ mẫu	Tỷ lệ đột biến
Đức	Lohmann D (1996) [60]	SSCP, giải trình tự	71	72%
Tây Ban Nha	Alonso J (2001) [65]	Giải trình tự, RT-PCR	43	67%
Trung Quốc	Choy K (2002) [69]	MS- PCR, SSCP	42	19%
Nhật Bản	Sugano [77] 2004	SSCP, DHPLC, FISH	51	39%
Pháp	Houdayer (2004) [64]	DHPLC, QMPSF	192	46%
Argentina	Dalamón V (2004) [78]	Giải trình tự	21	24%
Tây Ban Nha, Colombia, Cuba	Alonso J (2005) [79]	Giải trình tự, Microsatellite	107	50%
Bắc Mỹ	Nichols KE (2005) [66]	Giải trình tự, RT- PCR, QSBA, LOH	180	50%
Ý	Sampieri (2006) [48]	SSCP, giải trình tự, RT- PCR	35	37%
Mexico	Macias M (2008) [80]	SSCP- giải trình tự	48	19%
Châu Âu, Bắc Mỹ, châu Á	Rushlow D (2009) [56]	QM-PCR, giải trình tự, AS-PCR	1020	49%
Thụy Sĩ	Abouzeid H (2009) [74]	DHPLC, giải trình tự	65	45%

Ấn Độ	Parsam VL (2009) [81]	QM-PCR RFLP, FG, giải trình tự	74	66%
New Zealand	Pradhan MA (2010) [82]	Giải trình tự, MLPA, FISH	20	50%
Maroc	Abidi (2011) [83]	PCR, Giải trình tự	41	24.39%
Tuynidi	Jeridi (2015) [84]	Giải trình tự, MLPA, PCR	37	81%
Malaysia	Mohd Khalid (2015) [85]	Giải trình tự, PCR, MLPA	19	52.6%
Israel.	Frenkel (2016) [86]	Giải trình tự, AS- PCR, MLPA	164	90,8%
Singapor	Swati Tomar (2017) [68]	Giải trình tự, MLPA, MS- PCR, QM- PCR Microsatellite	59	84,7%

Ghi chú:

- DHPLC: Phương pháp sắc ký lỏng biến tính cao áp bán tự động để phát hiện các đột biến điểm.
- Quantitative- Multiplex PCR (QM- PCR): Định lượng đa môi PCR.
- Quantitative Multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF): PCR đa định lượng của các đoạn huỳnh quang ngắn mục đích sàng lọc sắp xếp lại gen.
- Methylation Specific- PCR: MS- PCR.
- Allele Specific- PCR: AS-PCR.
- Reverse Transcriptase- PCR (RT- PCR): sao chép ngược.
- Single-strand conformational polymorphism (SSCP): đa hình chuỗi đơn
- Quantitative Southern Blot Analysis (QSBA): lai phân tử Southern Blot
- Heteroduplex Analysis: HDA.

Tỷ lệ đột biến ở các quốc gia khác nhau hoặc từng nhóm bệnh nhân cùng chủng tộc có khác nhau do cách chọn mẫu và phối hợp các phương pháp xét nghiệm xác định đột biến gen *RBI*. Khi phối hợp nhiều phương pháp xét nghiệm thì tỷ lệ phát hiện đột biến tăng lên.

1.6. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và đột biến gen *RBI* trên bệnh nhân UNBVM

1.6.1. Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen *RBI*

Các nghiên cứu thống kê lớn trên thế giới thì tuổi trung bình khi chẩn đoán phát hiện bệnh u nguyên bào võng mạc thể hai mắt bị bệnh và thể một mắt bị bệnh trong DBRB là 12,5 và 24,8 tháng, và sự khác biệt này rất quan trọng ($P = 0,006$).

Một nghiên cứu tổng kết các báo cáo của các tác giả đã báo cáo trước đó cho thấy đột biến vị trí nối intron- exon có thể liên quan đến kiểu hình bệnh khởi phát chậm. Cơ sở sinh học phân tử của kiểu hình này có thể liên quan các đột biến vị trí nối intron - exon xâm nhập thấp.

Theo tác giả Lohmann và cộng sự năm 1996 đã nghiên cứu trên 119 bệnh nhân để xác định mối liên quan giữa đột biến và biểu hiện lâm sàng, một số đặc điểm kiểu hình, bao gồm tuổi chẩn đoán, số lượng khối u ở mỗi bệnh nhân, và sự xuất hiện khối u thứ phát và vị trí của khối u thứ phát và tiền sử gia đình. Tác giả đã không tìm thấy mối liên quan giữa các đột biến gây kết thúc sớm của chuỗi mã hóa (gây ra bởi các đột biến vô nghĩa hoặc lệch khung dịch mã) và biểu hiện của bất kỳ triệu chứng lâm sàng nào [60].

Nghiên cứu của Choy và cộng sự trên nhóm bệnh nhân Trung Quốc không tìm thấy có mối liên quan về đặc điểm lâm sàng và đột biến gen *RBI* [69].

Nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân Ấn Độ của tác giả Ata-ur-Rasheed và cộng sự cũng không thấy mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và đột biến gen *RBI* [87].

1.6.2. Mối liên quan giữa đột biến gen và mức độ nghiêm trọng của bệnh

Các tác giả trên toàn thế giới đã xác định rằng có đến 90% các đột biến *RBI* dòng tế bào gốc mang di truyền trội trên NST thường, bị bệnh ở hai mắt và có thể nhiều khối u. Ở những bệnh nhân này, xét nghiệm sinh học phân tử xác định các đột biến lệch khung dịch mã hoặc vô nghĩa trên gen *RBI* được dự đoán sẽ ảnh hưởng toàn bộ đến cấu trúc và chức năng của pRB.

Nghiên cứu của tác giả Albrecht và cộng sự năm 2005 không tìm thấy mối liên quan nào giữa đột biến gây kết thúc sớm chuỗi mã hóa với tuổi phát hiện bệnh khi chẩn đoán lần đầu cũng như mức độ nghiêm trọng của bệnh và yếu tố nguy cơ cao khi làm xét nghiệm giải phẫu bệnh trên mắt bị cắt bỏ [88].

Trong khi Qi và cộng sự năm 2005 cũng không phát hiện mối liên quan giữa các đột biến cắt ngắn proteinRB và vị trí đột biến với mức độ nghiêm trọng của bệnh. Trong nghiên cứu của Joseph và cộng sự năm 2006, cũng không thấy có mối liên quan đáng kể nào giữa các đột biến gây cắt ngắn proteinRB trong các đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã và các mức độ nghiêm trọng của bệnh như mối liên quan với tuổi phát hiện bệnh sớm hay muộn, phân nhóm mắt bị bệnh theo quốc tế như mắt nhóm D, E là những mắt giai đoạn muộn, hay mối liên quan với yếu tố nguy cơ cao khi làm xét nghiệm giải phẫu bệnh trên mắt bị cắt bỏ [51].

Trong nghiên cứu của He và cộng sự năm 2014 [89] tất cả các đột biến được phân loại làm dạng đột biến có tạo mã kết thúc sớm hay không, kết quả làm cho proteinRB có bị ảnh hưởng tới cấu trúc hay không. Bản sao từ các alen của gen *RBI* có đột biến gây tạo mã kết thúc sớm dẫn đến proteinRB bị cắt ngắn. Do đó, đột biến gây cắt ngắn cấu trúc pRB là đột biến tương đối nghiêm trọng hơn đột biến không gây ảnh hưởng cấu trúc pRB. Theo tác giả He và cộng sự trong số 31 bệnh nhân có đột biến gây cắt ngắn cấu trúc pRB

có 96,8% bệnh nhân có bệnh ở hai mắt, trong khi chỉ có 66,7% số bệnh nhân có đột biến không gây cắt ngắn pRB có thể bệnh hai mắt. Với đặc điểm lâm sàng thì thể bệnh hai mắt nghiêm trọng hơn thể bệnh ở một mắt. U nguyên bào võng mạc khởi phát sớm với tuổi trung bình khi chẩn đoán là 10,7 tháng gặp ở dạng đột biến gây cắt ngắn cấu trúc pRB nhiều hơn so với đột biến không gây cắt ngắn với tuổi trung bình khi chẩn đoán là 13,5 tháng.

Những kết quả này phù hợp với các báo cáo từ Canada và Ấn Độ [50], [90]

Hai tác giả này cũng xác nhận rằng các đột biến gây cắt ngắn cấu trúc pRB có xu hướng lâm sàng nghiêm trọng hơn như khởi phát sớm và thể bệnh gặp ở hai mắt. Tuy nhiên theo phân loại quốc tế ICRB, một trong những phân loại lâm sàng phục vụ cho điều trị thì không tìm thấy mối liên quan với đột biến gen *RBI*. Tác giả thấy nhóm E là giai đoạn chẩn đoán gặp nhiều nhất trong nghiên cứu nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các bệnh nhân có đột biến gây cắt ngắn pRB và đột biến không gây cắt ngắn pRB. Tác giả cho rằng việc phân loại theo quốc tế của khối u ở giai đoạn muộn này liên quan nhiều đến việc tiếp cận chẩn đoán muộn hơn do dạng đột biến gây nên. Các trường hợp không tìm thấy đột biến gen *RBI* có dấu hiệu lâm sàng nghiêm trọng với 33,3% khối u xuất ngoại. Các khối u tiến triển ở các bệnh nhân không do di truyền được các tác giả giải thích bằng hai giả thuyết.

Đầu tiên, hầu hết các trường hợp di truyền là thể bệnh hai mắt và sự phát triển của khối u nguyên bào võng mạc ở hai mắt không hoàn toàn đồng bộ, mắt bệnh được phát hiện đầu tiên ở thể bệnh hai bên sẽ chẩn đoán sớm bệnh ở mắt còn lại. Thứ hai, quá trình tiến triển của khối u nguyên bào võng mạc có thể có một số khác nhau nhất định giữa bệnh nhân có và không có đột biến gen *RBI* dòng tế bào gốc, dẫn đến sự phát triển khối u nhanh hơn.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu gồm 43 bệnh nhân được chẩn đoán xác định UNBVM với các dấu hiệu lâm sàng, cận lâm sàng sau khi khám:

- Khám mắt toàn diện từ triệu chứng chủ quan, khám từ bán phần trước đến soi đáy mắt.

- Soi đáy mắt: Sau khi tra giãn đồng tử, có thể dưới gây tê tại phòng khám hay dưới gây mê, đánh giá vị trí, kích thước khối u, số lượng khối u, màu sắc khối u, khám cả hai mắt, các đặc điểm của khối u thay đổi theo giai đoạn của bệnh.

* **Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân:** Theo tác giả Ramasubramanian và Shields [25]. Các khối u với kích thước, vị trí, màu sắc thuộc một trong các tiêu chí sau đây (ở hai mắt khác nhau hay trong một mắt có thể có hơn một khối u)

+ Các khối u nhỏ 1- 3mm: hình tròn hoặc bầu dục nằm trên võng mạc, có màu xám hoặc trắng xám, bờ khối u rõ, không ảnh hưởng đến mạch máu võng mạc, nằm bất kỳ vị trí nào trên võng mạc.

+ Khối u đường kính từ 4–5 mm: màu sắc trắng đục hoặc màu vàng đục hơn với các mạch máu võng mạc xung quanh khối u và trên bề mặt khối u bắt đầu thay đổi.

+ Khối u từ 6- 10 mm, khối u tiến triển to hơn, khối u màu trắng đục do canxi hóa, u phát triển làm động mạch trung tâm võng mạc giãn và gây tổn thương tĩnh mạch trung tâm võng mạc gây thoát tế bào hoặc dịch, có thể thấy các phần của khối u trải qua hoại tử do thiếu máu cục bộ hoặc tự phát.

+ Khối u lớn > 10mm bắt đầu phát triển vào buồng dịch kính có thể thấy bong võng mạc nhưng hay gặp nhất là khối u phát triển ra ngoài võng mạc.

+ Khối u to và tiến triển chiếm gần hết hoặc toàn bộ buồng dịch kính, có thể phối hợp bong võng mạc, phân tán tế bào u vào buồng dịch kính hay dịch dưới võng mạc, khối u to gây biến dạng nhãn cầu (giãn lồi củng mạc, lồi mắt..).

+ Khối u nhỏ có thể xuất hiện reo rắc tế bào u dịch kính hoặc reo rắc tế bào u dịch dưới võng mạc chỉ xung quang khối u mà không phát tán xa.

+ Các triệu chứng chủ quan: giảm thị lực, đau đỏ mắt, kích thích, chảy nước mắt, tăng nhãn áp.

+ Khám bán phần trước: phù giác mạc, tân mạch giác mạc, giả mủ tiền phòng, xuất huyết tiền phòng, tân mạch mống mắt, phản xạ đồng tử mất, giãn đồng tử tự nhiên, dị sắc mống mắt.. đây là những triệu chứng u xâm lấn bán phần trước hay xuất ngoại.

- Chẩn đoán hình ảnh như siêu âm mắt, chụp cắt lớp vi tính, chụp cộng hưởng từ có hình ảnh khối u nội nhãn và hình ảnh can xi hóa trong khối u.

Tất cả các bệnh nhân khi soi đáy mắt có khối u mô tả như trên sẽ được chẩn đoán xác định u nguyên bào võng mạc, phân loại quốc tế và đưa vào nghiên cứu.

*** Tiêu chuẩn loại trừ**

Bệnh nhân và gia đình không đồng ý tham gia nghiên cứu này.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

- Bệnh viện Mắt Trung ương, Bệnh viện Nhi Trung ương nơi chẩn đoán và điều trị, theo dõi sau điều trị bệnh UNBVM.

- Trung tâm Nghiên cứu Gen- Protein Trường Đại học Y Hà Nội, nơi xét nghiệm xác định và tiến hành các kỹ thuật di truyền phân tử.

2.3. Thời gian nghiên cứu

Thời gian từ tháng 10 năm 2014 đến tháng 10 năm 2016.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu: mô tả cắt ngang.

Mỗi bệnh nhân nghiên cứu sẽ có một hồ sơ nghiên cứu bao gồm: các thông tin hành chính của bệnh nhân, các thông tin về bệnh tật (triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, chẩn đoán, kết quả phân tích đột biến gen, điều trị ban đầu), tiền sử bản thân và gia đình.

2.4.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

UNBVM là bệnh do đột biến gen *RBI* và có thể di truyền cho thế hệ sau bởi vậy nên lấy cỡ mẫu thuận tiện

2.4.3. Các nội dung nghiên cứu

2.4.3.1. Nội dung nghiên cứu cho mục tiêu 1:

- Các đặc điểm về bệnh nhân và gia đình bệnh nhân: tuổi, giới, tiền sử gia đình (bố, mẹ, anh chị em có mắc bệnh UNBVM không, thể một, hai mắt và điều trị).

- Các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân: tuổi phát hiện bệnh, lý do đi khám bệnh, các triệu chứng khi khám mắt: bán phần trước, móng mắt, thể thủy tinh.

- Các triệu chứng khi so đáy mắt: vị trí, kích thước, số lượng, màu sắc khối u, có tế bào phân tán vào dịch kính, phân tán tế bào u vào dịch dưới võng mạc.

- Các dấu hiệu chẩn đoán hình ảnh: siêu âm nhãn khoa, CT- Scan, MRI: đánh giá kích thước khối u, can xi hóa, xâm lấn ra ngoài võng mạc, xuất ngoại, u trên não, u di căn.

- Giải phẫu bệnh: chỉ khối u giai đoạn muộn đã được điều trị cắt bỏ nhãn cầu: đánh giá yếu tố nguy cơ cao gây di căn.

2.4.3.2. Nội dung nghiên cứu cho mục tiêu 2:

- Xác định các đột biến trên gen *RBI* bằng giải trình tự gen.

- Phân bố đột biến trên các vùng gen *RBI*.
- Các dạng đột biến, thể đột biến, số lượng đột biến gen *RBI* trên bệnh nhân.
- Đánh giá mức độ nặng của bệnh: chia làm 3 mức độ theo phân loại mức độ bệnh nghiêm trọng của Qi- Joseph [51].

* **Mức độ nặng**: có một hoặc phối hợp nhiều yếu tố sau:

- + Bệnh nhân bị bệnh cả hai mắt có tuổi phát hiện bệnh < 12 tháng hoặc bệnh ở một mắt có tuổi phát hiện bệnh < 24 tháng và bệnh ở nhóm D, E.
- + Có yếu tố nguy cơ cao khi làm xét nghiệm giải phẫu bệnh.
- + Bệnh cảnh lâm sàng tiến triển nặng (glocom, tân mạch mống mắt, xâm lấn bán phần trước, giãn lồi củng mạc...).
- + Cắt bỏ cả hai nhãn cầu.

* **Mức độ nhẹ** : có một hoặc phối hợp yếu tố sau

- + Bệnh nhân bị bệnh một mắt và có tiền sử gia đình
- + Bệnh nhân bị cả hai mắt có tuổi phát hiện bệnh >12 tháng và bệnh ở nhóm A, B.

* **Mức độ trung bình**

- + Không đủ tiêu chí đánh giá mức độ nặng hoặc mức độ nhẹ khi chẩn đoán, có thể xem xét hội chẩn lại và theo dõi.

- Phân tích mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh, mức độ nặng của bệnh với đột biến trên gen *RBI*.

- Phân tích mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh, thể bệnh một hay hai mắt, mức độ nặng của bệnh với các dạng đột biến.

2.5. Các bước tiến hành nghiên cứu

2.5.1. Hỏi bệnh và khám bệnh

- Tất cả bệnh nhân được hỏi và khám bệnh theo mẫu bệnh án thống nhất, có thể hỏi cứu bệnh án hay sổ y bạ của những lần khám và điều trị trước (phụ lục).

Phần hỏi bệnh

- Các thông tin hành chính chung: tuổi, giới, địa chỉ, ngày vào viện, lý do vào viện.

- Quá trình bị bệnh: thời gian phát hiện dấu hiệu đầu tiên như ánh đồng tử trắng hay lác, đau đỏ mắt khi nào, trước khi đi khám bệnh bao lâu, diễn biến của các triệu chứng như đau đỏ mắt, lồi mắt, sưng nề.

- Bệnh nhân đã được khám và điều trị ở đâu với chẩn đoán gì, điều trị phương pháp gì, trong bao nhiêu lâu?

- Tiền sử gia đình như bố, mẹ, anh chị em có bị bệnh mắt hay bệnh UNBVM hay không, chẩn đoán và điều trị ?

Phần khám bệnh

- Toàn thân phát hiện dấu hiệu thần kinh trung ương (nếu có)

- Khám mắt từ bán phần trước ra sau

+ Có lồi mắt không

+ Cương tụ, sưng nề mi- kết mạc

+ Tình trạng giác mạc trong hay phù nề, tân mạch, sẹo.

+ Tiền phòng: có xuất huyết tiền phòng, giả mủ tiền phòng, độ nông sâu

+ Mống mắt, đồng tử: màu sắc, phản xạ, giãn tự nhiên không?

+ Tình trạng thể thủy tinh trong hay đục, dính mống vào thể thủy tinh?, xuất tiết trên bề mặt thể thủy tinh và màu sắc của xuất tiết.

- Soi đáy mắt sau khi tra giãn đồng tử và có thể khám dưới phòng khám hoặc dưới gây mê:

+ Dịch kính: có xuất huyết, mủ, tế bào u phân tán vào dịch kính? bao nhiêu cung phần tư?, tình trạng khối u chiếm bao nhiêu phần của buồng dịch kính?, dịch quanh khối u.

+ Đáy mắt: tình trạng u trên bề mặt võng mạc, màu sắc, kích thước khối u, vị trí nằm cung phần tư nào, cách gai thị- hoàng điểm bao nhiêu đường kính gai thị để xác định khi phân loại, phân nhóm u, bong võng mạc không? Dịch dưới võng mạc? Tế bào u dưới võng mạc ?

- Tình trạng nhãn cầu: lồi mắt?, vận nhãn, giãn lồi củng mạc.

2.5.2. Chẩn đoán hình ảnh

- Siêu âm, CT Scan: được tiến hành tại Bệnh viện Mắt Trung ương.
- Chụp cộng hưởng từ sọ não- hốc mắt: tiến hành tại Bệnh viện Nhi trung ương.

2.5.3. Giải phẫu bệnh

Chỉ khi điều trị cắt bỏ nhãn cầu và lấy nhãn cầu làm mô bệnh học ở khối u giai đoạn muộn.

- Xác định tình trạng u biệt hóa hay không .
- Can xi hóa, hoại tử u không ?
- Xác định u xâm lấn bán phần trước (tiền phòng/góc tiền phòng, móng mắt, thể mi), u xâm lấn hắc mạc, u xâm lấn thị thần kinh các mức độ khác nhau, u xâm lấn củng mạc, u xâm lấn hốc mắt.

2.5.4. Chẩn đoán

2.5.4.1. Chẩn đoán xác định

- Lý do khám bệnh: ánh đồng tử trắng, lác, đau đỏ.
- Khám mắt và soi đáy mắt: đánh giá chính xác tình trạng khối u nội nhãn để chẩn đoán xác định, phân nhóm theo quốc tế.
- Chẩn đoán hình ảnh có sẵn tại bệnh viện: siêu âm, CT, MRI
- Giải phẫu bệnh: chẩn đoán có yếu tố nguy cơ cao hay không chỉ ở những bệnh nhân có khối u giai đoạn muộn: nhóm D, E.

2.5.4.2. Chẩn đoán thể bệnh

- Thể mắt bệnh: bệnh một hay bệnh cả hai mắt
- Phân loại và phân nhóm theo quốc tế
- Có tiền sử gia đình
- Khám u xâm lấn hốc mắt hay di căn không?

2.5.5. Quy trình phân tích đột biến gen RB1

2.5.5.1. Quy trình lấy mẫu

- Khi bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định bệnh nhân bị UNBVM thì bệnh nhân sẽ được lấy máu tĩnh mạch ngoại vi: 2- 3 ml bảo quản trong ống chống đông EDTA với hàm lượng 1,5mg/ml, đảm bảo vô trùng tuyệt đối và bảo quản lạnh.

- Gửi về phòng xét nghiệm của Trung tâm Gen- Protein thuộc Trường Đại học Y Hà Nội phân tích sinh học phân tử tìm đột biến gen RB1.

2.5.5.2. Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi

- Các mẫu DNA được tách chiết từ máu ngoại vi theo phương pháp Phenol/chloroform.

- Nguyên tắc cơ bản bao gồm các bước: Loại hồng cầu và phá vỡ màng tế bào → Phá vỡ màng nhân → Loại protein → Tủa DNA → Rửa tủa → Hòa tan DNA.

Quy trình cụ thể:

- Máu tươi chống đông EDTA cần tách trong vòng 24 giờ.

- Cho 0,5 mL máu tươi toàn phần chống đông bằng EDTA vào ống Eppendorf 1,5 mL, thêm vào 0,5 mL dung dịch Lysis buffer rồi ủ trên đá trong 10 phút.

- Ly tâm 8000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ dịch nổi và thu cặn. quá trình này được lặp lại 3 lần.

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

- Cho 0,5 mL Lysis buffer; 12,5 µL SDS 10%; 10 µL proteinase K, sau đó ủ 2h ở 56°C.

- Cho 0,5 mL 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 ở giữa là cặn tế bào, lớp dưới cùng là dịch chiết. Hút lấy phần dịch chứa DNA trên cùng.

- Cho 0,5 mL chloroform: isoamyl, ly tâm mẫu ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C , hút lấy phần dịch trên cùng.

- Tủa DNA bằng 1 mL cồn tuyệt đối, cho thêm 50 μ L sodium acetat, để lạnh ở -20 °C trong 4 giờ.

- Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4 °C , đổ dịch nổi phía trên, thu tủa.

- Rửa tủa bằng ethanol 70% , tủa DNA được hòa tan bằng 50 ml nước tinh khiết TE.

- DNA tách chiết sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 160/280 nm và điện di trên gel agarose 0,8%.

2.5.5.3. Kỹ thuật PCR (khuếch đại chuỗi) 27 exon của gen RB1

Sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại toàn bộ 27 exon của gen RB1, trình tự cặp môi và quy trình phát hiện gen được thực hiện theo nghiên cứu của Tạ Thành Văn và cộng sự tại Trung tâm Gen- Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Các thành phần của phản ứng trong bảng 2.1 và chu trình nhiệt trong bảng 2.3.

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR

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

Bảng 2.2. Chu trình nhiệt phản ứng PCR như sau

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	94°C - 5 phút		
2 – 34	94°C - 30 giây	55°C - 30 giây	72°C - 30 phút
35			72°C - 5 phút
Bảo quản ở 10°C			

Kiểm tra đột biến trên gel agarose 1,5%. Khuếch đại lại đoạn DNA đó với PCR ống chứng âm để loại trừ khả năng nhiễm và chứng dương để so sánh.

2.5.5.4. Giải trình tự gen

Sản phẩm PCR sẽ được tinh sạch và giải trình tự gen trực tiếp để xác định đột biến trên gen RB1

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

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

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

- Tiến hành pha master mix theo bảng sau:

Bảng 2.3. Thành phần của phản ứng Sequencing

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

+ Giai đoạn 2: Chạy PCR Sequencing

- Sau khi chuẩn bị master mix cho phản ứng xong, ly tâm nhanh các ống PCR để toàn bộ dịch dính trên thành và nắp ống xuống dưới và làm tan bọt.

- Xếp các ống master mix vào máy PCR

- Chọn chương trình nhiệt đã được cài đặt sẵn trong máy theo chu trình đã được tối ưu hóa.

- Kiểm tra lại toàn bộ chu trình nhiệt:

Bảng 2.4. Chu trình nhiệt của phản ứng Sequencing

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

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

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

2.5.5.5. Phương pháp phân tích kết quả

- So sánh trình tự gen của bệnh nhân với trình tự gen chuẩn của Gen Bank (National center for biotechnology information, NCBI) *NG_009009.1* bằng phần mềm CLC.

- So sánh trình tự các acid amin của bệnh nhân với trình tự acid amin chuẩn của Genebank *NP_000312.2* bằng phần mềm Blast của NCBI.

2.6. Xử lý kết quả

Các số liệu được nhập bằng phần mềm SPSS 16.0. Tất cả số liệu và kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê y học, phân tích thống kê mô tả, so sánh, tính các giá trị trung bình, tỷ lệ phần trăm (%), phân tích một số mối tương quan.

2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

- Đề tài tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu Y học. Bệnh nhân và gia đình hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu: có sự chấp thuận của bố mẹ bệnh nhân.

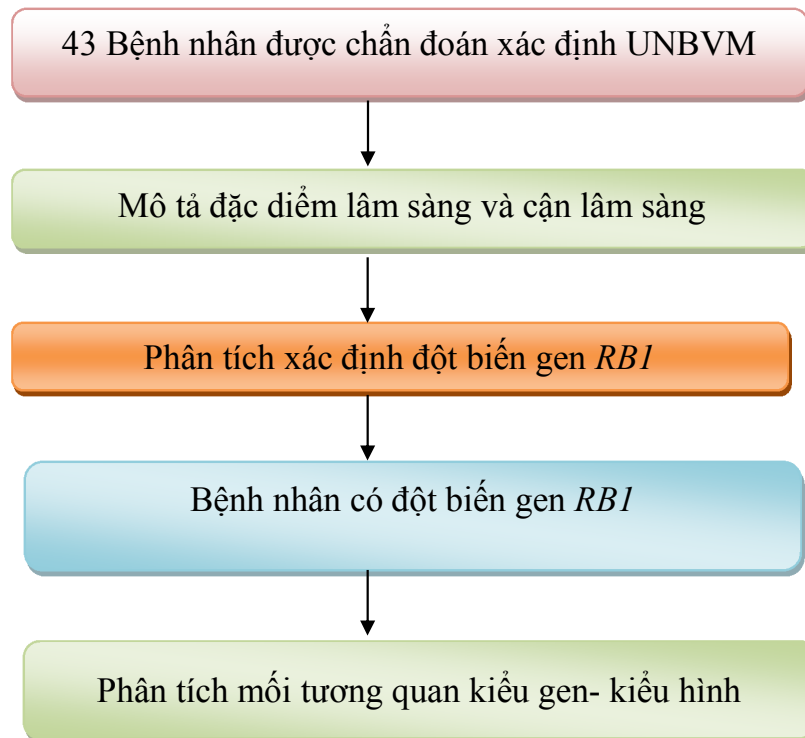
- Bệnh nhân và gia đình có thể rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia tiếp. Gia đình bệnh nhân sẽ được thông báo kết quả xác định vị trí đột biến gen thông qua bác sĩ điều trị, đồng thời được giải thích và tư vấn di truyền, về kết quả và tiên lượng, theo dõi điều trị.

- Bệnh nhân có trách nhiệm cung cấp đầy đủ các thông tin liên quan đến tình hình bệnh tật của mình và các thông tin này sẽ được đảm bảo bí mật.

- Các xét nghiệm phân tích gen chỉ thực hiện khi có sự đồng ý của bố mẹ bệnh nhân.

- Nghiên cứu được tiến hành hoàn toàn vì mục đích khoa học, không vì bất kỳ mục đích nào khác.

2.8. QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU



CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng

3.1.1. Đặc điểm lâm sàng

3.1.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi phát hiện bệnh

Tuổi phát hiện bệnh là tuổi bệnh nhân đi khám và được chẩn đoán xác định UNBVM được tính bằng số tháng.

Bảng 3.1. Phân bố tuổi đi khám bệnh lần đầu

Tuổi khi khám	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
< 6 tháng	11	25,58
Từ 6 đến 12 tháng	10	23,25
Từ 13 đến 24 tháng	12	27,91
Từ 25 đến 36 tháng	08	18,60
> 36 tháng	02	4,65
Tổng	43	100

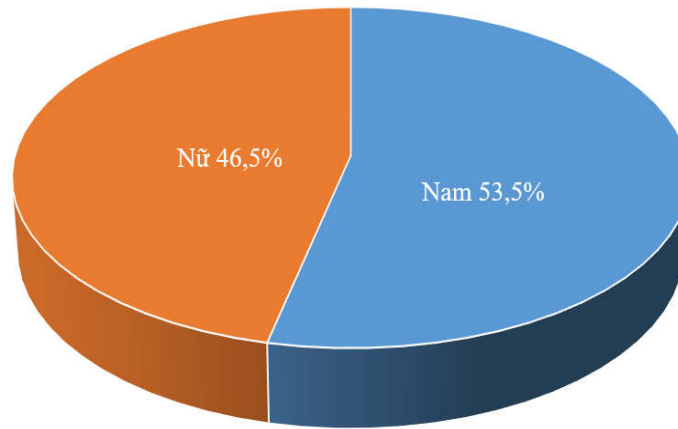
Nhận xét: Tuổi phát hiện bệnh là tuổi lúc bệnh nhân đi khám bệnh và được chẩn đoán xác định UNBVM hay gặp nhất là lứa từ 6- 24 tháng ở cả hai giới, tỷ lệ trên 36 tháng ít gặp hơn. Tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân nghiên cứu là 13 tháng ($15,47 \pm 11,92$ tháng), bệnh nhân nhỏ nhất là 2 tháng, lớn nhất là 84 tháng

Tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân nam là $20,3 \pm 18,2$ tháng, tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân nữ $13,2 \pm 12$ tháng ($p > 0,05$)

3.1.1.2. Phân bố bệnh nhân theo giới

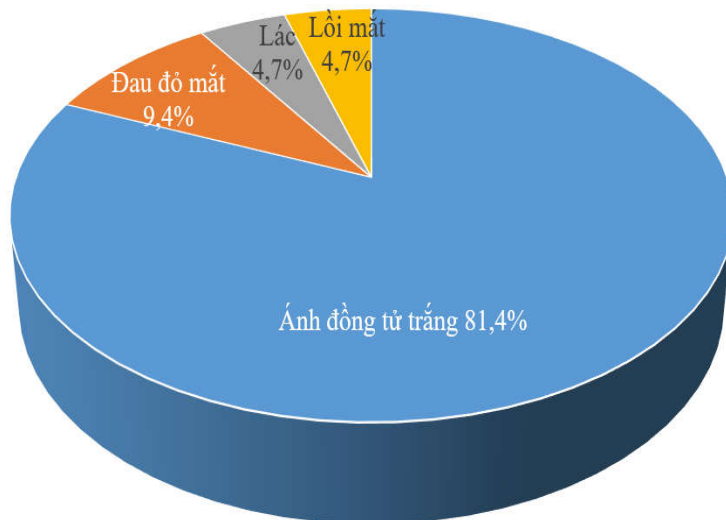
Số bệnh nhân nam là 23 (53,5%), số bệnh nhân nữ là 20 (46,5%)

Số bệnh nhân nam bị đột biến gen *RBI* là 11/23 (47,8%), số bệnh nhân nữ là 13/20 (65%) phát hiện đột biến gen *RBI*.



Hình 3.1. Tỷ lệ mắc bệnh theo giới

3.1.1.3. Lý do bệnh nhân đi khám bệnh



Hình 3.2. Tỷ lệ lý do bệnh nhân đi khám

Lý do đi khám hay gặp nhất ở bệnh nhân UNBMV là dấu hiệu ánh đồng tử trắng có 35 bệnh nhân (81,4%), có 4 bệnh nhân đau đỏ mắt (9,3%), có 2 bệnh nhân lác (4,7%), 2 bệnh nhân lồi mắt (4,7%). Trong nhóm bệnh nhân mắt bị bệnh ở cả hai mắt đi khám với lý do ánh đồng tử trắng là 100%, còn bệnh nhân với lý do đi khám vì lác đều thấy ở thể mắt bị bệnh một bên

3.1.1.4. Thể bệnh một mắt, hai mắt

Bảng 3.2. Tỷ lệ phân bố thể bệnh theo giới

Giới	Hai mắt bị bệnh		Một mắt bị bệnh		Tổng	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Nam	13	30,3	10	23,2	23	53,5
Nữ	16	37,2	4	9,3	20	46,5
Tổng	29	67,4	14	32,6	43	100

Nhận xét: Có 29 (67,4%) bệnh nhân bị bệnh ở cả hai mắt và 14 (32,6%) bệnh nhân bị bệnh ở một bên mắt. Trong đó số bệnh nhân bị bệnh một mắt có 10 bệnh nhân nam và 4 bệnh nhân nữ. Số bệnh nhân bị bệnh ở hai mắt có 13 bệnh nhân nam (56,5%) và 16 bệnh nhân nữ (43,5%).

3.1.1.5. Tiền sử gia đình

Trong nghiên cứu có 08 bệnh nhân có tiền sử gia đình rõ ràng còn lại là không có tiền sử gia đình.

Bảng 3.3. Tiền sử gia đình bị bệnh

STT	MÃ BN	Các trường hợp bị bệnh	Thể bệnh	Đột biến Gen RB1
1	RB5	Mẹ bệnh nhân	2M	Có
2	RB19	Anh trai T2 (2M)	2M	Không
3	RB26	Anh trai (2M)	MP	Không
4	RB54	Bố bệnh nhân (MT)	2M	Có
5	RB57	Mẹ bệnh nhân	2M	Có
6	RB61	Mẹ (2M), em gái (2M)	2M	Có
7	RB62	Bố (MP), em trai (2M)	2M	Có
8	RB78	Bố (MT), 2 anh trai sinh đôi (2M)	2M	Có

Nhận xét: Trong 43 BN thì có 8 BN có tiền sử gia đình bị bệnh rõ ràng (chiếm 18,6%). Trong đó có 2 BN chỉ có anh trai ruột và bệnh nhân bị bệnh, khi làm xét nghiệm xác định đột biến gen RB1 kết quả là không tìm thấy đột biến. 6 bệnh nhân còn lại đều có bố hoặc mẹ bị bệnh và đều thể hai mắt, kèm theo có anh chị em ruột bị bệnh, tất cả các bệnh nhân này đều tìm thấy có đột biến gen RB1.

*** Triệu chứng lâm sàng chủ quan**

Bảng 3.4. Triệu chứng lâm sàng chủ quan

Triệu chứng lâm sàng	Số mắt bệnh	Tỷ lệ % (n= 72)
Giảm thị lực	8	11,1
Tăng nhãn áp	5	6,9
Đau nhức mắt	5	6,9
Chói mắt	6	8,3
Chảy nước mắt	7	9,7
Sợ ánh sáng	5	6,9

Nhận xét: tất cả triệu chứng lâm sàng chủ quan đều là ở trên những mắt bệnh đến khám muộn khi đã có dấu hiệu xuất ngoại, hoặc trẻ lớn hơn 3 tuổi

* *Triệu chứng lâm sàng khi khám bán phần trước nhãn cầu*

Bảng 3.5. Triệu chứng lâm sàng

Triệu chứng lâm sàng	Số mắt bệnh	Tỷ lệ % (n= 72)
Sung nề mi	4	5,5
Cương tụ- sung nề kết mạc	5	6,9
Phù giác mạc	9	12,5
Tân mạch giác mạc	1	1,4
Ngắn máu tiền phòng	3	4,17
Giả mủ tiền phòng	2	2,8
Dị sắc mống mắt	2	2,8
Tân mạch mống mắt	1	1,4
Mắt phản xạ đồng tử	7	9,7
Giãn lồi củng mạc	4	5,5
Đục thể thủy tinh	3	4,2
Lồi mắt	3	4,2
Teo nhãn cầu	2	2,8

Nhận xét: tất cả triệu chứng lâm sàng ở trên đều gặp ở trên những mắt bệnh đến khám muộn khi đã có dấu hiệu xuất ngoại

* **Đặc điểm khối u khi soi đáy mắt gián tiếp****Bảng 3.6. Triệu chứng lâm sàng khi soi đáy mắt**

Dấu hiệu lâm sàng	Số mắt bệnh	Tỷ lệ % (n=72)
Khối u chiếm 1/2 BDK	05	6,9
Khối u chiếm 2/3 BDK	04	5
Khối u chiếm toàn bộ BDK	60	83,3
Xuất huyết dịch kính	3	4,17
Tế bào u phân tán dịch kính	41	57
Dịch dưới võng mạc	03	4,2
Bong võng mạc	1	1,4

BDK: buồng dịch kính

Nhận xét: Khi khám đáy mắt cho bệnh nhân UNBVM sau tra giãn đồng tử thấy khối u chiếm toàn bộ buồng dịch kính ngay phía sau thể thủy tinh là triệu chứng hay gặp nhất là 60 mắt (83,3%), khối u chiếm 1/2 và 2/3 buồng dịch kính gặp ở 5 mắt (6,9%) và 4 mắt (5%). Hình ảnh tế bào u phân tán vào buồng dịch kính gặp ở 41 mắt (chiếm 57%). Các dấu hiệu nặng nề khác như xuất huyết dịch kính, dịch dưới võng mạc, bong võng mạc ít gặp hơn.

Phân bố số lượng khối u trên BN UNBVM

Tất cả nhóm bệnh nhân thể bệnh một mắt chỉ phát hiện thấy có duy nhất một khối u trong nội nhãn

Nhóm bệnh nhân hai mắt thì số lượng khối u nhiều hơn, có khi mắt có giai đoạn nhẹ hơn có từ 1- 2 khối u thậm chí có mắt còn có 4-5 khối u trên bề mặt võng mạc, mắt còn lại thường thấy ở giai đoạn D, E thì chỉ nhìn thấy một khối u to trong buồng dịch kính có thể chiếm từ 1/2 đến toàn bộ nội nhãn.

Bảng 3.7. Phân nhóm UNBVM theo quốc tế (ICR)

Nhóm	Mắt bệnh	Tỷ lệ % (n= 72)
A	08	11,1
B	14	19,4
C	05	6,9
D	34	47,2
E	11	15,3
Tổng	72	100

Nhận xét: Theo phân nhóm Quốc tế (ICRB) thì tỷ lệ mắt bệnh hay gặp nhất là nhóm D, E điều đó chứng tỏ bệnh nhân vẫn đi khám bệnh muộn, điều này ảnh hưởng đến thị lực và kết quả điều trị.

3.1.2. Triệu chứng chẩn đoán hình ảnh

3.1.2.1. Siêu âm nhãn khoa

Bảng 3.8. Kết quả siêu âm nhãn khoa

Triệu chứng	Số mắt bệnh	Tỷ lệ% n= 47
Can xi hóa	45	95,7
Bong võng mạc	1	2,1

Nhận xét: Can xi hóa là dấu hiệu hay gặp và đặc hiệu trên BN UNBVM, là dấu hiệu phân biệt với các tổn thương khác trong mắt. Trên siêu âm A, B chỉ có thể tính kích thước khối u chiếm bao nhiêu phần của buồng dịch kính (BDK) như chiếm toàn bộ hay 1/2 BDK. Trong nghiên cứu thì khối u chiếm trên 1/2 đến toàn bộ BDK là nhiều nhất 54,8%.

3.1.2.2 Chụp CT sọ não - hốc mắt

Bảng 3.9. Kết quả của chụp CT sọ não- hốc mắt

Triệu chứng	Số mắt bệnh	Tỷ lệ% n= 28
Can xi hóa	26	92,8

Nhận xét: Can xi hóa là dấu hiệu gặp nhiều và đặc hiệu trên BN UNBVM khi chụp CT sọ não- hốc mắt, trong nghiên cứu của chúng tôi chiếm 93%, khi khối u to và chiếm chỗ trong buồng dịch kính thì CT có thể đo kích thước theo mm hoặc có thể tính bằng cách chiếm bao nhiêu phần của buồng dịch kính.

3.1.2.2 Chụp MRI sọ não- hốc mắt

Bảng 3.10. Kết quả của chụp MRI sọ não- hốc mắt

Triệu chứng	Số mắt bệnh	Tỷ lệ% n = 28
Can xi hóa	26	91,2
U xâm lấn TTK	1	2,94
U xâm lấn hắc mạc	3	8,8
U xâm lấn hốc mắt- củng mạc	1	2,94

Nhận xét: Trên MRI có lát cắt 5 mm thì rất nhiều tổn thương < 5mm khó được phát hiện trên MRI bởi vậy trong nghiên cứu của chúng tôi dấu hiệu chủ yếu vẫn là can xi hóa (chiếm 91,2%), ngoài ra các dấu hiệu u xâm lấn ra ngoài võng mạc rất ít gặp.

3.1.3. Giải phẫu bệnh

Bảng 3.11. Các dấu hiệu trên GPB

Đặc điểm GPB	Mắt bệnh	Tỷ lệ % (n= 38)
Canxi hóa	38	100%
Hoại tử u	36	94,7%
Hướng phát triển		
<i>Vào trong</i>	15	39,5%
<i>Ra ngoài</i>	12	31,6%
<i>Hỗn hợp</i>	11	28,9%
<i>Thâm nhiễm tỏa lan</i>	1	2,6%
U biệt hóa	17	44,7%
U không biệt hóa	21	55,3%
U xâm lấn bán phần trước	8	
<i>Xâm lấn TP- góc TP</i>	7	18,4%
<i>Xâm lấn móng mắt</i>	4	10,5%
<i>Xâm lấn thể mi</i>	3	5,2%
<i>Toàn bộ</i>	3	
U xâm lấn hắc mạc		
<i>< 3mm</i>	21	57,9%
<i>≥ 3mm</i>	10	26,3%
U xâm lấn TTK		
<i>Trước lá sàng</i>	5	10,5%
<i>Ngang lá sàng</i>	11	31,5%
<i>Sau lá sàng, diện cắt ko có u</i>	2	5,2%
<i>Xâm nhập diện cắt TTK</i>	1	2,6%
Xâm lấn củng mạc	0	
Xâm lấn hốc mắt	1	2,6%
Yếu tố nguy cơ cao	16	42,1%
<i>Xâm nhập bán phần trước</i>	8	18,4%
<i>Xâm nhập hắc mạc ≥ 3mm</i>	10	26,3%
<i>Xâm nhập TTK sau lá sàng</i>	3	7,9
<i>Xâm nhập hắc mạc phối hợp TTK trước/ngang lá sàng</i>	18	42,1

Nhận xét: Dấu hiệu canxi hóa và hoại tử u là gặp nhiều nhất trong nhóm bệnh nhân nghiên cứu chiếm 94,7%, có 16 mắt ở 16 BN có yếu tố nguy cơ cao chiếm 37,2%. U xâm lấn hắc mạc ở các mức độ là dấu hiệu gặp nhiều nhất, u xâm lấn bán phần trước ít gặp.

Bảng 3.12. Phân loại giải phẫu bệnh của khối u theo TNM

Phân loại khối u	Mắt bệnh	Tỷ lệ % (n= 38)	
Pt1	6	15,8	
Pt2a	13	34,2	
Pt2	Pt2b	9	23,7
Pt3a	3	7,9	
Pt3	Pt3b	5	13,2
Pt4a	1	2,6	
Pt4	Pt4b	1	2,6
Tổng	38	100	

Nhận xét: Kết quả giải phẫu bệnh phân loại khối u theo TNM thì giai đoạn Pt2 chiếm 22 mắt (57,9% bao gồm cả Pt2a, Pt2b), sau đó đến giai đoạn Pt3 có 8 mắt (21,1%), giai đoạn Pt1 có 15,8%. Giai đoạn Pt4 chỉ có 2 mắt.

3.2. Kết quả phân tích đột biến gen *RB1*

3.2.1. Kết quả tách chiết DNA

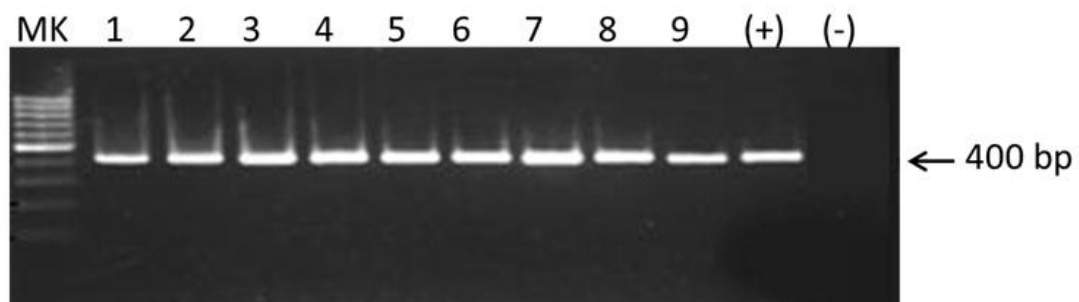
DNA của các bệnh nhân, và nhóm chứng được tách chiết theo quy trình phenol/chloroform. Sau khi tách chiết, các mẫu DNA được kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nano-drop. Tất cả mẫu DNA được tách chiết có độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280nm nằm trong khoảng 1,7÷2,0, nồng độ DNA sau khi tách chiết đạt 50 -100ng/ μ l, đạt yêu cầu để tiến hành phản ứng PCR khuếch đại gen *RB1*.

3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen *RB1*

3.2.2.1. Kết quả chạy PCR khuếch đại các vùng exon của gen *RB1*

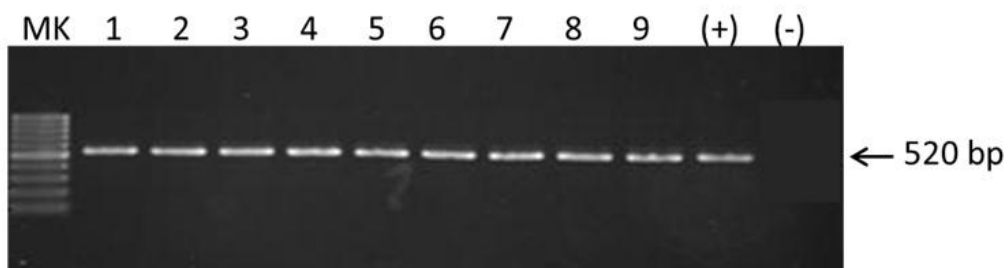
Sử dụng 27 cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại toàn bộ 27 exon của gen *RB1*. Kích thước của các sản phẩm PCR trong khoảng 250÷550 bp. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5%.

Hình ảnh minh họa kết quả PCR khuếch đại exon 3 và exon 8 của gen *RB1*



Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 3 của gen *RB1*.

(+) mẫu đối chứng dương; (-) mẫu chứng âm; (1-9) mẫu bệnh nhân
(MK) Marker Φ 174.



Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 8 (B) của gen *RB1*.

(+) Mẫu đối chứng dương; (-) mẫu chứng âm; (1-9) mẫu bệnh nhân
(MK) Marker Φ 174.

Nhận xét: Sản phẩm PCR thu được chỉ có 1 băng đặc hiệu, rõ nét, không có sản phẩm phụ. Sản phẩm khuếch đại PCR đảm bảo cho phản ứng giải trình tự tiếp theo để phát hiện đột biến điểm.

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

Sản phẩm PCR tiếp tục được giải trình tự gen để phát hiện đột biến. Kết quả cho thấy ở cả DNA của mẫu đối chứng và mẫu bệnh nhân hình ảnh giải trình tự gen rõ ràng. Ở mẫu bệnh nhân phát hiện được một số dạng đột biến. Kết quả cho thấy có 24/43 (58%) trường hợp phát hiện có đột biến gen *RBI*. Trong số các đột biến đã được phát hiện có 10 đột biến đã được công bố trong ngân hàng dữ liệu GeneBank và LOVD: c.2664-10T>A, c.861G>A, c.2211+1G>A, c.265-1G>T, c.1333-2A>G, c.2520+1_2520+4del, p.Trp99X, p.Ile124Argfs*6, p.Val714*, p.Tyr651X. Còn lại có 07 đột biến mới chưa được công bố trên các tài liệu quốc tế: bao gồm 04 đột biến lệch khung dịch mã: p.Thy345Argfs*6, p.Pro232Serfs*8, p.893Glyfs24*, c.1312delT, 03 đột biến sai nghĩa: p.Trp681Cys, p.Phe162Tyr, p.Ser402Thr,

Bảng 3.13. Phân bố đột biến trên gen RB1 của bệnh nhân UNBVM

S TT	Mã BN	Thay đổi nucleotid	Thay đổi c.DNA	Thay đổi proteinRB	Thể đột biến	Exon/intron	Ghi chú
1	RB5	g.59793G>A	c.861G>A	Variant	Dị hợp	Ex8	[91]
2	RB6	g.70318 T>A	c.1204T>A	p.Ser402Thr	Dị hợp	Ex12	New
3	RB8	g.160835G>A	c.2211+1G>A	p.I703_E737del	Dị hợp	In21	[92]
4	RB10	g.174351T>A	c.2664-10T>A	Variant	Đồng hợp	In25	[67],[78], [93],[55],[66]
5	RB11	g.174351T>A	c.2664-10T>A	Variant	Đồng hợp	In25	
6	RB29	g.156775G>T	c.2041G>T	p.Trp681Cys	Dị hợp	Ex20	New
7	RB31	g.70318T>A	c.1204T>A	p.Ser402Thr	Dị hợp	Ex12	New
8	RB50	g.56938-56939insT	c.693-694insT	p.Pro232Serfs*8	Dị hợp	Ex7	New
9	RB51	g.42030T>A	c.485T>A	p.Phe162Tyr	Dị hợp	Ex4	New
10	RB54	g.39478G>A	c.297G>A	p.Trp99X	Dị hợp	Ex3	[94],[69],[72],[73]
11	RB55	g.76428A>G	c.1333-2A>G	altered splicing	Dị hợp	In13	[50]
12	RB57	g.39552_39553delTA	c.371_372del	p.Ile124Argfs*6	Dị hợp	Ex3	[95],[71],[96],[83]
13	RB59	g.39445 G>T	c.265-1G>T	altered splicing	Dị hợp	In2	LOVD
14	RB61	g.170403-170406Del 4TGAG	c.2520+1_2520+4del	DV	Dị hợp	In24	LOVD
15	RB62	g.39552-39553 Del TA	c.371_372del	p.Ile124Argfs*6	Dị hợp	Ex3	[80],[81],[82],[83]
16	RB65	g.153346T>A.	c.1953T>A	p.Tyr651X	Dị hợp	Ex19	[83]
17	RB66	g.174375insT	c.2677insT	p.893Glyfs24*	Dị hợp	E26	New
18	RB69	g.170372DelGA	c.2490_2491del	deletion	Dị hợp	Ex24	New
19	RB70	g.160762DelA	c.2139del	p.Val714*	Dị hợp	Ex21	[64]
20	RB71	g.153346T>A.	c.1953T>A	p.Tyr651X	Dị hợp	Ex19	[83]
21	RB75	g.174351T>A	c.2664-10T>A	Variant	Đồng hợp	In25	LOVD
22	RB76	g.73849delT	c.1312delT	frameshift	Dị hợp	Ex13	New
23	RB78	g.174351T>A	c.2664-10T>A	Variant	Đồng hợp	In25	LOVD
24	RB79	g.64424delCT	c.1033delCT	p.Thy345Argfs*6	Dị hợp	Ex10	New

Chú thích: New: Đột biến mới In: Intron Ex: Exon

LOVD: Leiden open variation database: Tài liệu tham khảo trên ngân hàng dữ liệu gen RB1 và sở dữ liệu rb1-lovd.d-lohmann.de.

Nhận xét: Kết quả từ bảng cho thấy các đột biến được tìm thấy nằm trải dài trên toàn bộ gen RB1. Các dạng đột biến trên các vùng gen khác nhau được công bố trên ngân hàng dữ liệu gen về khả năng gây bệnh cụ thể ở một số đột biến đã được báo cáo trước đó (LOVD):

Có 24 bệnh nhân phát hiện đột biến được phát hiện trong tổng số 43 bệnh nhân (55,8%). 24 bệnh nhân mang đột biến trong đó có đột biến tại Intron 25 là c.2664-10T>A là chiếm tỷ lệ cao nhất sau đó là đột biến p.Ser402Thr, p.Ile124Argfs*6, p.Trp99X, p.Tyr651X, c.1333-2A>G... Các đột biến này được đối chiếu với trình tự chuẩn trên GeneBank và tham khảo cơ sở dữ liệu rbl-lovd.d-lohmann.de, phần mềm Mutation Taster, phần mềm Polyphen-2

Bảng 3.14. Phân bố đột biến và đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân

Mã BN	Đột biến	Thay đổi Protein	Dạng đột biến	Thể đột biến	Chú thích	Tuổi (tháng)	Mắt bệnh	TSGĐ	Nhóm	YTNC	Mức độ nặng
RB5	c.861G>A	Variant	Vị trí nội	Dị hợp	DV	19	2M	Có	A/D	Không	TB
RB6	c.1204T>A	p.Ser402Thr	Sai nghĩa	Dị hợp	New	36	MP	Không	D/0	Không	TB
RB8	c.2211+1 G>A	Variant	Vị trí nội	Dị hợp	DV	12	2M	Không	E/C	Có	Nặng
RB10	c.2664-10T>A	Variant	Vị trí nội	Đồng hợp	DV	10	2M	Không	B/D	Có	Nặng
RB11	c.2664-10T>A	Variant	Vị trí nội	Đồng hợp	DV	28	MT	Không	0/D	Không	TB
RB29	c.2043G>T	p.Trp681Cys	Sai nghĩa	Dị hợp	New	33	MT	Không	0/D	Không	TB
RB31	c.1204T>A	p.Ser402Thr	Sai nghĩa	Dị hợp	New	07	2M	Không	D/A	Không	Nặng
RB50	c.693-694insT	p.Pro232Serfs*8	Lệch khung	Dị hợp	New	34	MT	Không	0/E	Có	Nặng
RB51	c.485T>A	p.Phe162Tyr	Sai nghĩa	Dị hợp	New	20	2M	Không	D/C	Có	Nặng
RB54	c.297G>A	p.Trp99X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	04	2M	Có	D/B	Không	Nặng
RB55	c.1333-2A>G	Variant	Vị trí nội	Dị hợp	DV	15	2M	Có	B/D	Không	TB
RB57	c.371_372del	p.Ile124Argfs*6	Lệch khung	Dị hợp	DV	02	2M	Có	B/A	ND	Nặng
RB59	c.265-1G>T	Variant	Vị trí nội	Dị hợp	DV	02	2M	Không	D/D	Có	Nặng
RB61	c.2520+1_2520+4del	Variant	Xóa	Dị hợp	DV	03	2M	Có	D/B	Không	Nặng
RB62	c.371_372del	p.Ile124Argfs*6	Lệch khung	Dị hợp	DV	15	2M	Có	B/D	Không	TB
RB65	c.1953T>A	p.Tyr651X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	06	2M	Không	A/D	Có	Nặng
RB66	c.2677insT	p.893Glyfs24*	Lệch khung	Dị hợp	New	84	MP	Không	D/0	Không	TB
RB69	c.1204T>A	p.Ser402Thr	Sai nghĩa	Dị hợp	New	04	2M	Không	B/D	Có	Nặng
RB70	c.2139del	p.Val714*	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	02	2M	Không	D/B	Không	Nặng
RB71	c.1953T>A	p.Tyr651X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	16	2M	Không	B/D	Có	Nặng
RB75	c.2664-10T>A	Variant	Vị trí nội	Đồng hợp	DV	02	2M	Không	D/A	ND	Nặng
RB76	c.1312delT	Variant	Lệch khung	Dị hợp	New	05	2M	Không	B/D	Có	Nặng
RB78	c.2664-10T>A	Variant	Vị trí nội	Đồng hợp	New	18	2M	Có	B/D	Không	TB
RB79	c.1033delCT	p.Thy345Argfs*6	Lệch khung	Dị hợp	New	02	2M	Không	E/B	Có	Nặng

Chú thích: DV: Disease Variant (đột biến gây bệnh)
New: Đột biến mới

ND (No Data): không có dữ liệu
TB: trung bình

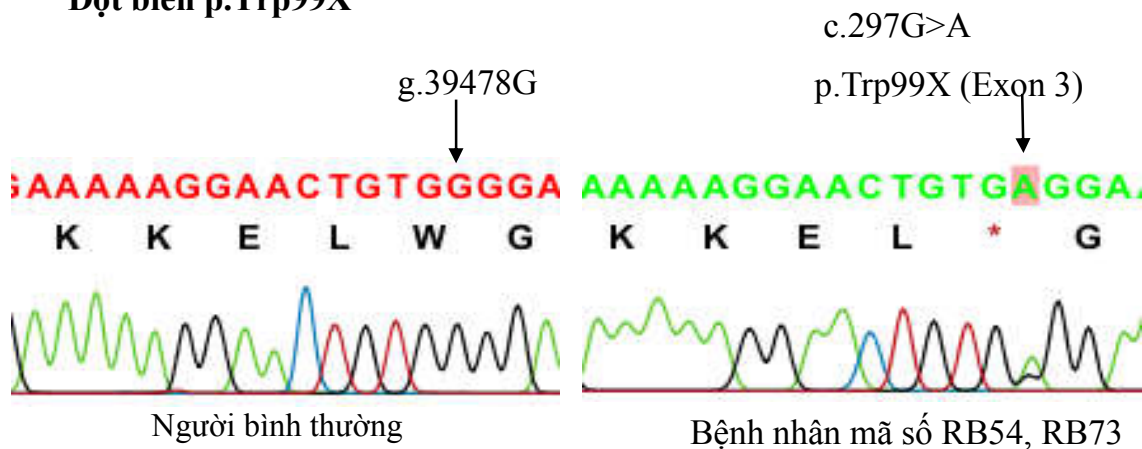
YTNC: yếu tố nguy cơ cao

Nhận xét: Kết quả từ bảng này có 24 bệnh nhân có đột biến gen và các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân có 18 bệnh nhân thể bệnh hai mắt còn lại có 6 bệnh nhân thể bệnh một mắt, có 6 bệnh nhân có yếu tố gia đình và phân nhóm theo quốc tế ở từng mắt bệnh. Giải phẫu bệnh có 10/24 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao di căn khi điều trị khoét bỏ nhãn cầu ít nhất là một mắt.

3.2.3. Các dạng đột biến gen *RB1* trên bệnh nhân UNBVM

3.2.3.1. Bệnh nhân có đột biến vô nghĩa (*nonsense mutation*)

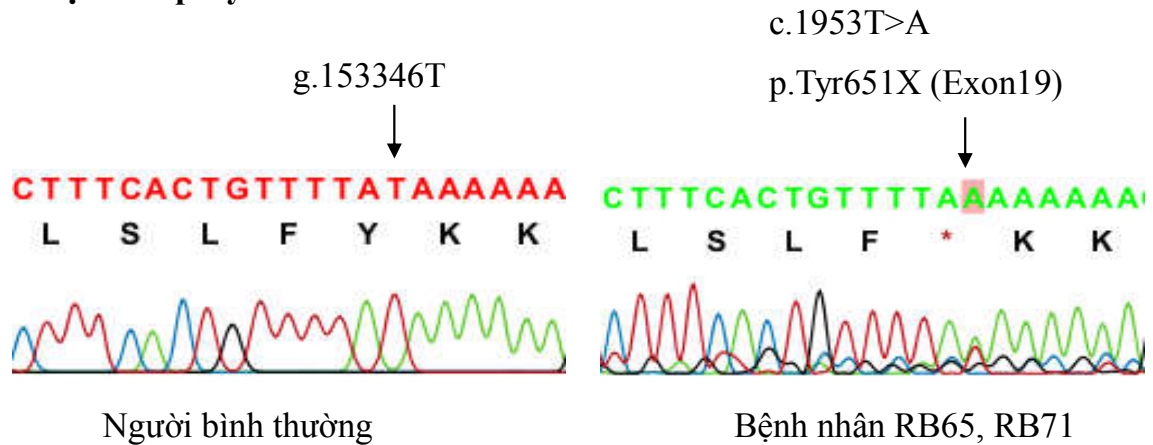
* Đột biến p.Trp99X



Hình 3.5. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB54 và RB73
Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

Nhận xét: Giải trình tự exon 3 của gen *RB1* phát hiện bệnh nhân mã số RB54 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid G thành A ở vị trí 297 trên trình tự cDNA dẫn đến bộ ba thứ 99 TGG mã hóa Triptophan chuyển thành mã kết thúc sớm TGA (X). Bởi vậy đột biến này làm cho pRB thay vì có 928 axit amin thì chỉ còn 99 axit amin, đây là dạng đột biến cấu trúc gây cắt ngắn proteinRB.

*** Đột biến p.Tyr651X**



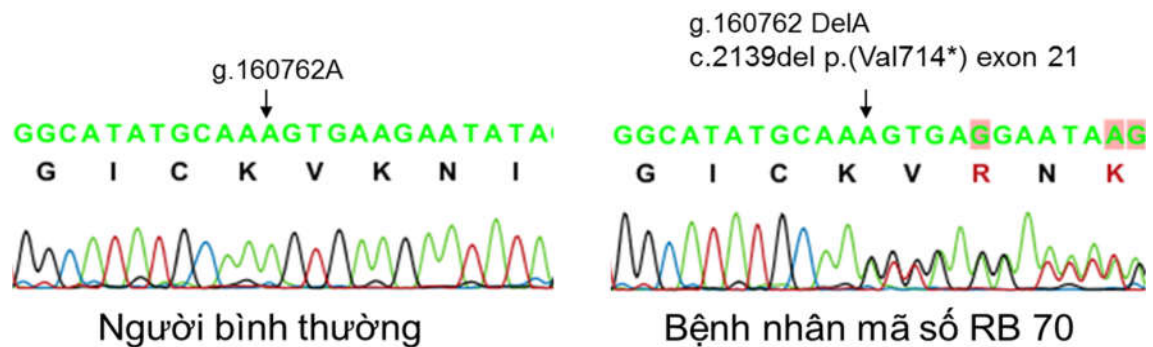
Hình 3.6. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB65 và RB71

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

Nhận xét: Giải trình tự exon 19 của gen *RB1* phát hiện bệnh nhân mã số RB65 và RB71 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid T thành A ở vị trí 1953 trên trình tự cDNA dẫn đến bộ ba thứ 651 TAT mã hóa Tyrosine chuyển thành mã kết thúc sớm TAA (X). Bởi vậy đột biến này làm cho pRB thay vì có 928 axit amin thì chỉ còn 651 axit amin, đây là dạng đột biến cấu trúc gây cắt ngắn proteinRB

3.2.3.2. Đột biến lệch khung dịch mã

*** Đột biến p.Val714***



Hình 3.7. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB70

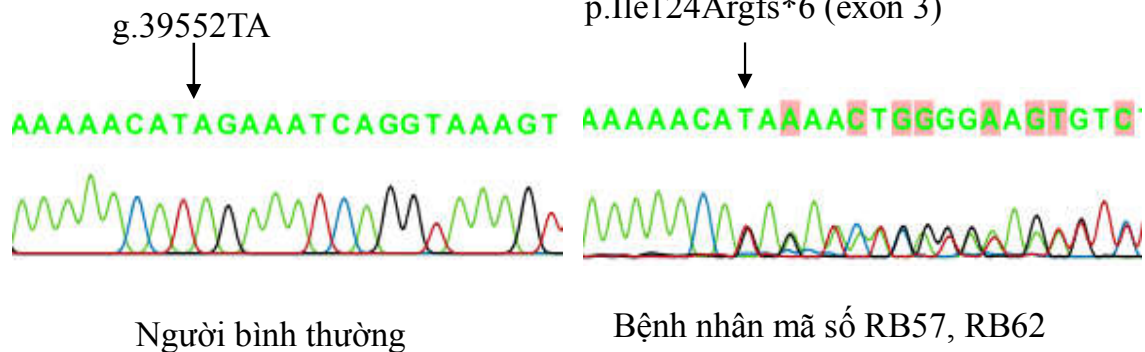
Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí

nucleotid thay đổi.

Nhận xét: Kết quả giải trình tự exon 21 trên gen *RBI* của bệnh nhân mã số RB70 cho thấy bệnh nhân có đột biến mất 1 nucleotid A tại vị trí 160762 làm thay đổi vị trí c.2139 trên trình tự cDNA. Hệ quả của đột biến mất 1 nucleotid này là sự thay đổi khung dịch mã, chuyển mã bộ ba GTG (mã hóa cho axit amin Valine) thành mã bộ ba kết thúc sớm TGA (stop codon). Bởi vậy đột biến này làm cho pRB thay vì có 928 axit amin thì chỉ còn 714 axit amin.

*** Đột biến p.Ile124Argfs*6**

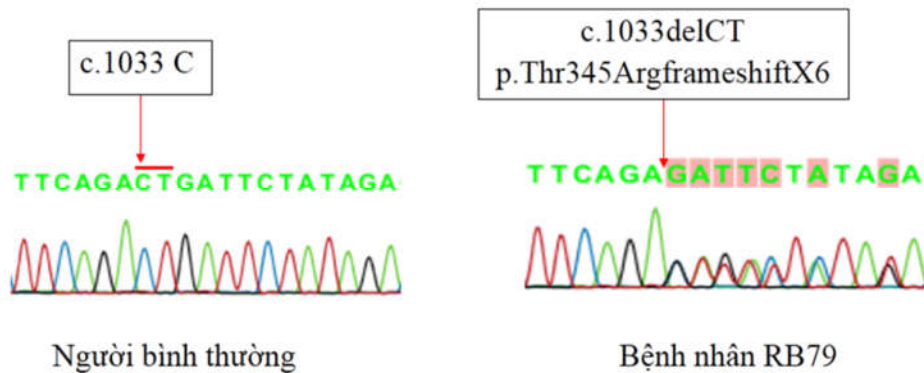
g.39552-39553DelTA
c.371_372del
p.Ile124Argfs*6 (exon 3)

**Hình 3.8. Kết quả giải trình tự gen *RBI* của bệnh nhân mã số RB57 và RB62**

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

Nhận xét: Kết quả giải trình tự exon 3 trên gen *RBI* của bệnh nhân mã số RB57 và RB62 cho thấy bệnh nhân có đột biến xóa mất 2 nucleotid T và A tại vị trí 39552 và 39553 làm thay đổi vị trí 371 và 372 trên trình tự cDNA. Hệ quả của đột biến xóa 2 nucleotid này là sự thay đổi khung dịch mã, biến đổi axit amin thứ 124 từ Isoleuxine thành Argine và tạo mã kết thúc sớm sau 6 codon kế tiếp.

*** Đột biến p.Thr345Argfs*6**

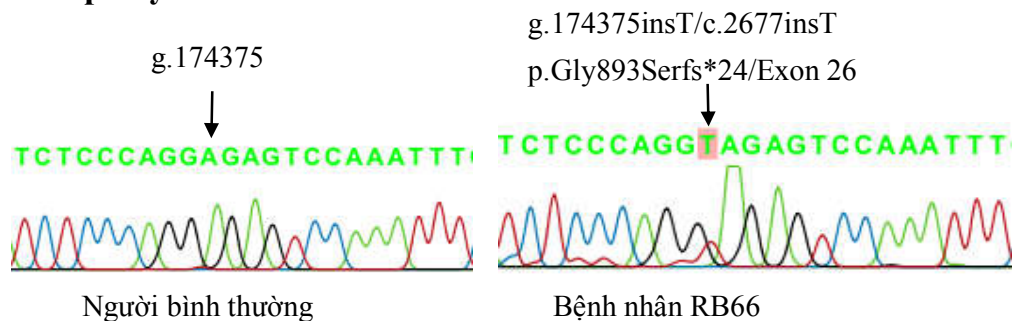


Hình 3.9. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB79

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

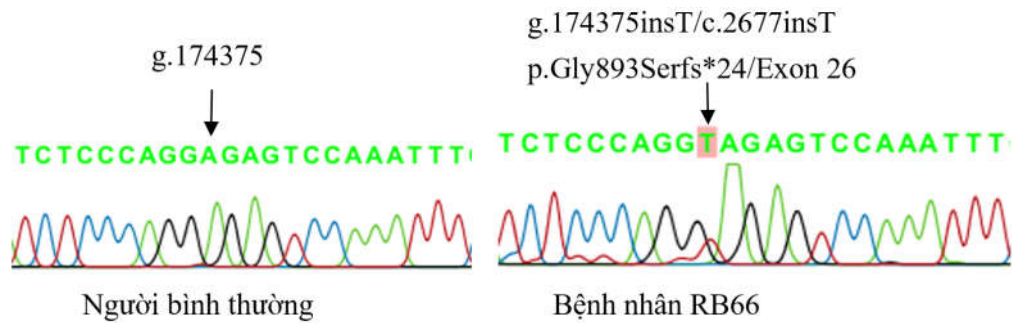
Nhận xét: Kết quả giải trình tự exon 10 trên gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB79 cho thấy bệnh nhân có đột biến xóa 2 nucleotid C và T tại vị trí g.64424 làm thay đổi vị trí 1033 và 1034 trên trình tự cDNA. Hậu quả của đột biến xóa 2 nucleotid này là sự thay đổi khung dịch mã, biến đổi axit amin thứ 345 từ Thyroxin thành Arginine và tạo mã kết thúc sớm sau 6 codon kế tiếp. Đây là đột biến mới chưa được công bố trước đó.

*** Đột biến p.Gly893Serfs*24**



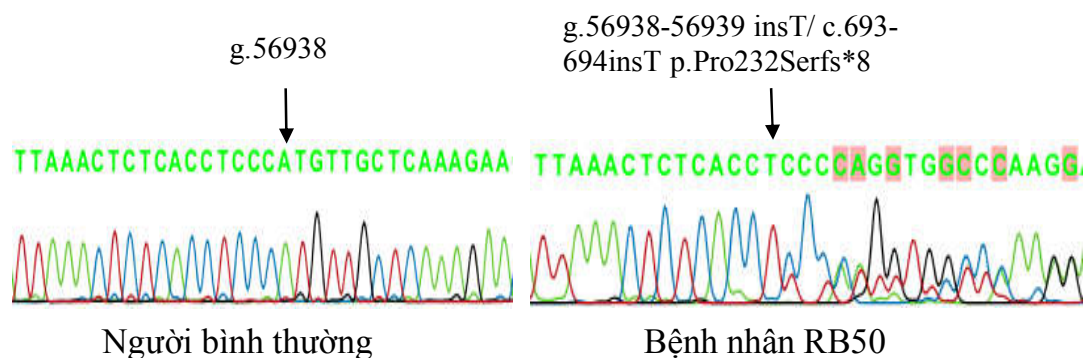
Hình 3.10. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB66

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi



Nhận xét: Kết quả giải trình tự toàn bộ gen *RB1* của bệnh RB66, cho thấy có đột biến dị hợp tử c.2677insT trên Exon 26, là đột biến thêm nucleotide T vào vị trí 2677 trên trình tự cDNA. Hậu quả của đột biến này gây biến đổi axit amin tại vị trí 893 từ Glycin thành Serin và gây lệch khung tạo mã kết thúc sớm tại vị trí axit amin thứ 24 tính từ điểm đột biến. Đây là một đột biến lệch khung dịch mã mới chưa được công bố trước đó

*** Đột biến p.Pro232Serfs*8**



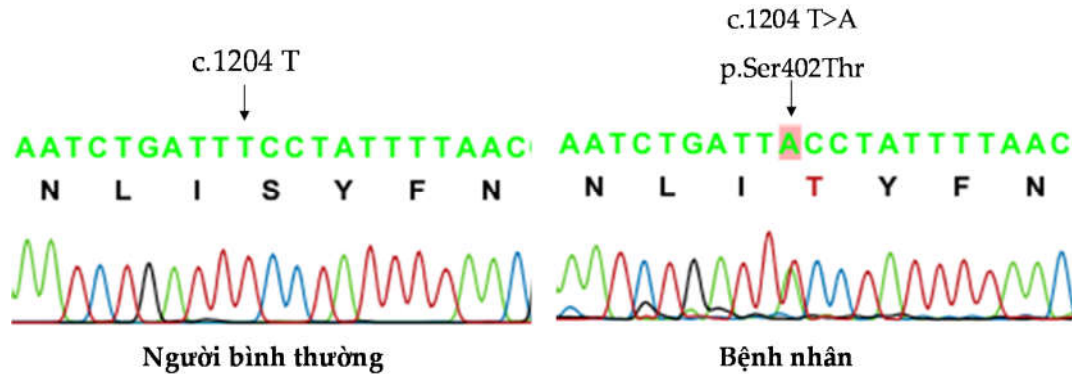
Hình 3.11. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB50

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi

Nhận xét: Kết quả giải trình tự toàn bộ gen *RB1* của bệnh RB50 cho thấy có đột biến dị hợp tử c.693- 694insT trên Exon 7, là đột biến chèn thêm nucleotid T vào giữa vị trí 693- 694 trên trình tự cDNA. Hậu quả của đột biến này gây biến đổi axit amin tại vị trí 232 từ Proline thành Serine và gây lệch khung tạo mã kết thúc sớm tại vị trí axit amin thứ 8 tính từ điểm đột biến. Đây là một đột biến lệch khung dịch mã mới chưa được công bố trước đó.

3.2.3.3. Đột biến sai nghĩa (Missense)

* Đột biến p.Ser402Thr

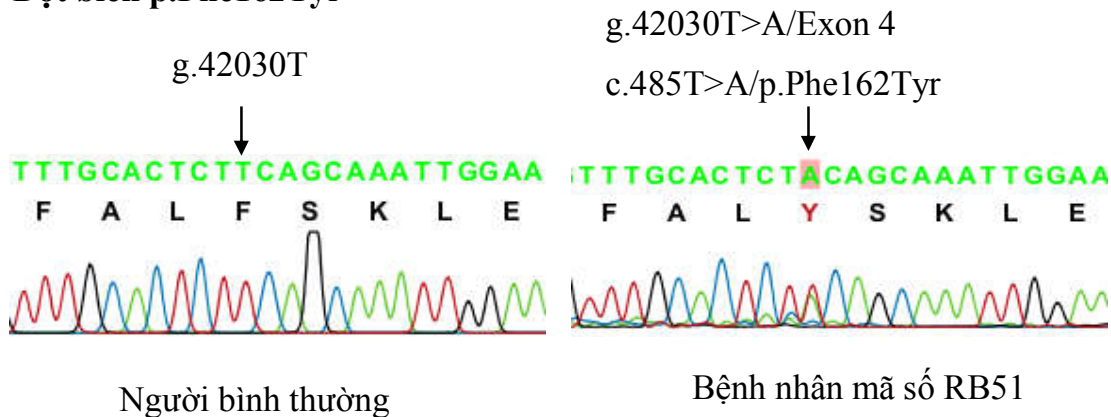


Hình 3.12. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của BN RB6, RB31, RB69

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, nghiên cứu đã phát hiện 03 bệnh nhân mã số RB6, RB31, RB69, có đột biến dị hợp tử do thay đổi nucleotid T thành A tại vị trí c.1204 trên Exon 12. Đột biến này gây biến đổi axit amin tại vị trí 402 từ Serin thành Threonin, đột biến này trên Exon 12 của gen *RB1*.

* Đột biến p.Phe162Tyr



Hình 3.13. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân RB51

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

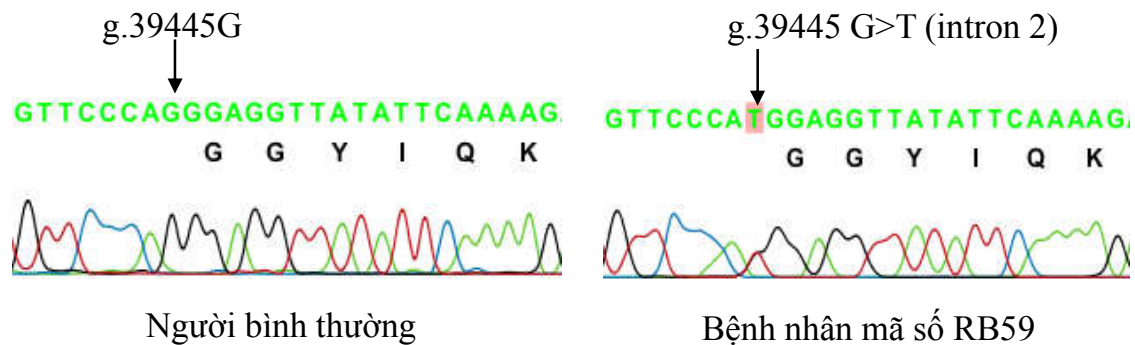
Nhận xét: Giải trình tự gen *RB1* phát hiện bệnh nhân mã số RB51 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid thứ g.42030T>A hay đột biến thay thế nucleotid T thành A ở vị trí c.485 trên trình tự cDNA dẫn đến bộ ba mã hóa chuyển từ Phenylalanine thành Tyrosine.

3.2.3.4. Đột biến tại vị trí nối Exon- Intron (Splice)

* Đột biến c.861G>A trên exon 8

Nhận xét: Giải trình tự gen *RB1* phát hiện bệnh nhân mã số RB5 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid G thành A tại vị trí g.59793 trên exon 8 làm thay đổi vị trí c.861G>A trên trình tự cDNA. Đây là đột biến thay thế nucleotid tại vị trí splicing, ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của proteinRB

* Đột biến c.265- 1G>T trên intron 2 (DV: altered splicing)

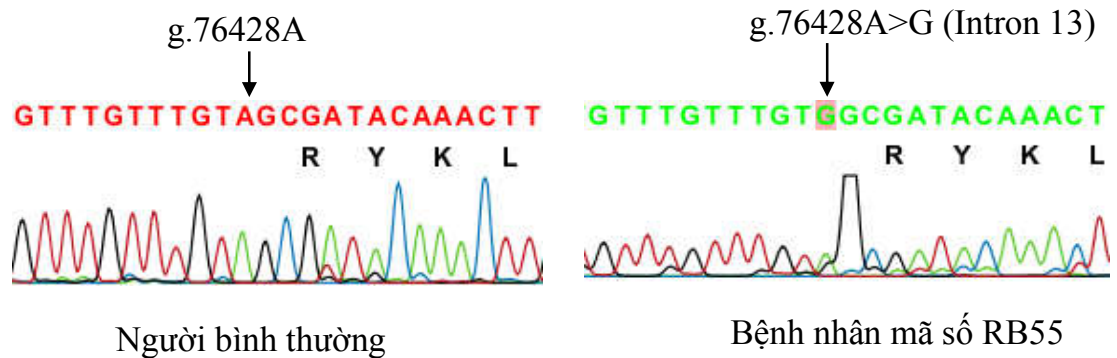


Hình 3.14. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB59

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

Nhận xét: Giải trình tự gen *RB1* phát hiện bệnh nhân mã số RB59 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid G thành T tại vị trí g.39445 ở vùng intron 2, ngay phía trước bộ ba đầu tiên mã hóa cho exon 3 của gen *RB1*. Đây là đột biến thay thế nucleotid tại vị trí splicing, ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của proteinRB. BN RB55 bị đột biến ở intron 2, ngay phía trước vị trí mở đầu exon 3 trên trình tự cDNA.

*** Đột biến c.1333-2A>G trên intron 13**

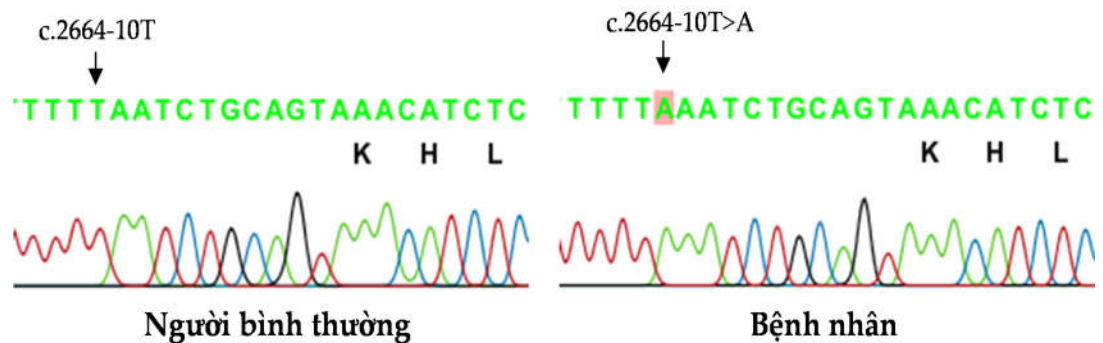


Hình 3.15. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB55

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi

Nhận xét: Giải trình tự gen *RB1* phát hiện bệnh nhân mã số RB55 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid A thành G tại vị trí g.76428 ở vùng intron 13. Đây là đột biến thay thế nucleotid tại vị trí splicing, ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein RB.

*** Đột biến c.2664-10T>A trên intron 25**



Hình 3.16. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của BN RB10, RB11, RB75 và RB78

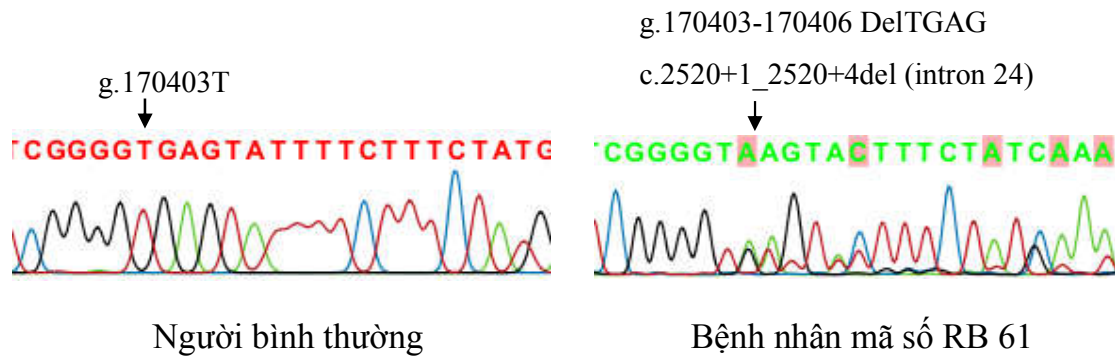
Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi

Nhận xét: Giải trình tự gen *RB1* phát hiện bệnh nhân mã số RB10, RB11, RB75, RB78 có đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid T thành A tại

vị trí g.174351 ở vùng intron 25. Đây là đột biến thay thế nucleotid tại vị trí splicing, ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein RB

3.2.3.5. Đột biến mất nhiều nucleotid (large deletion mutation)

* Đột biến c.2520+1_2520+4del (intron 24)

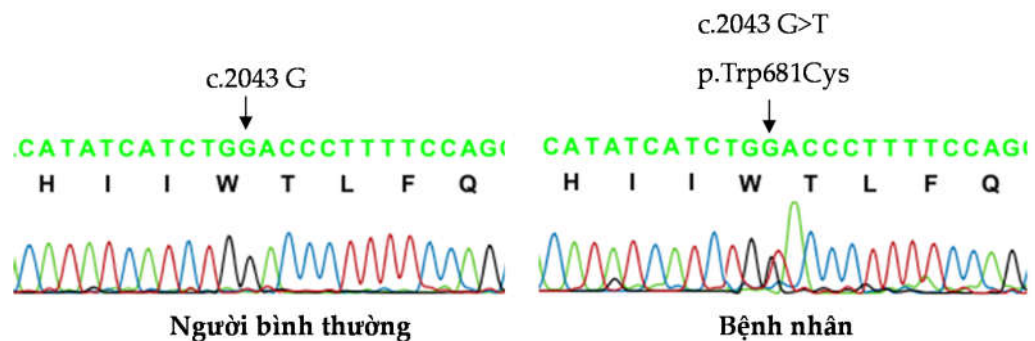


Hình 3.17. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB61

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

Nhận xét: Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB61 cho thấy bệnh nhân có đột biến xóa 4 nucleotid TGAG tại intron 24 (từ vị trí 2520+1 đến 2520+4) trên trình tự cDNA. Đây là dạng đột biến tại vị trí splicing, ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein RB.

* Đột biến p.Trp681Cys (g.15677G>T trên Exon 20)



Hình 3.18. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB29

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi

Nhận xét: Đột biến này được phát hiện khi giải trình tự toàn bộ gen *RB1* của bệnh nhân có mã số RB29, đây là đột biến thay thế nucleotid G bằng T trên vùng exon 20 làm thay đổi axit amin Tryptophan thành Cystein ở vị trí 681 trên proteinRB, đây là vùng mã hóa cho vùng B của proteinRB, vùng có tính chất bảo tồn cao.

* Đột biến c.1312delT trên exon 13

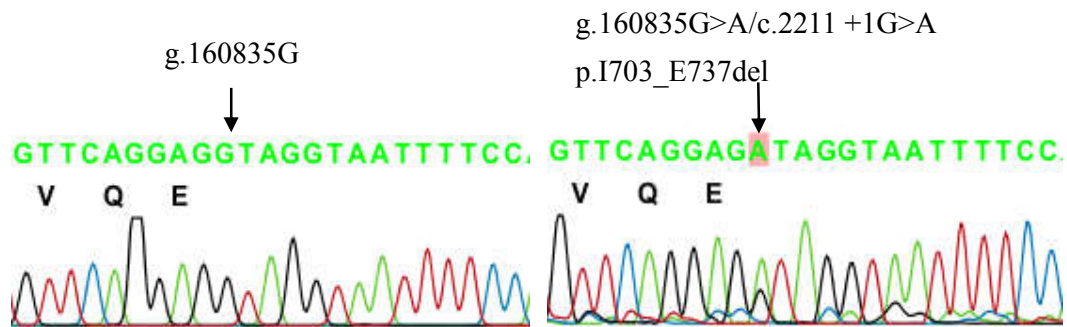


Hình 3.19. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB76

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

Nhận xét: Khi giải trình tự toàn bộ gen *RB1* ở bệnh nhân RB76 phát hiện đột biến dị hợp tử do xóa mất nucleotid T tại vị trí 1312 trên trình tự cDNA và trên vùng exon 13, đây là vùng mã hóa cho vùng A của proteinRB, vùng A/B đều mang tính chất mã hóa và bảo tồn cao của proteinRB, đây là đột biến lệch khung dịch mã và là đột biến mới chưa được báo cáo trước đó

*** Đột biến p.I703_E737del (c.2211+1G>A) ở BN RB8**



Hình 3.20. Kết quả giải trình tự gen *RB1* của bệnh nhân mã số RB8

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

Nhận xét: Khi giải trình tự toàn bộ gen RB trên BN RB8 phát hiện đột biến dị hợp tử c.2211+1G>A trên intron 21 là đột biến thay thế nucleotide G thành A tại vị trí của intron 21 từ đó gây đột biến p.I703_E737del và đột biến được phát hiện trong trường hợp này gây ra việc xóa mất 34 axit amin trong khung chuỗi xoắn kép và do đó bỏ qua exon 21 trên chiều dài gen *RB1*.

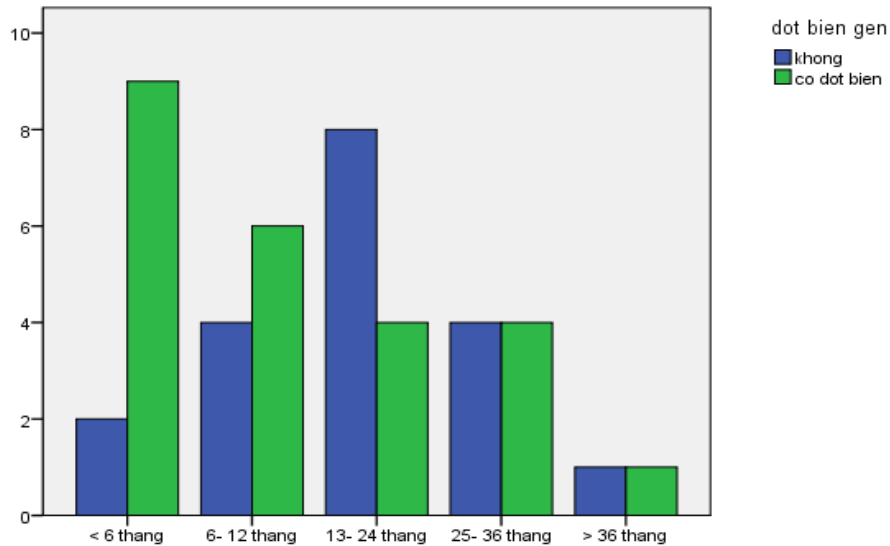
3.3. Mối liên quan giữa đột biến gen *RB1* và đặc điểm lâm sàng của bệnh U nguyên bào võng mạc

3.3.1. Mối liên quan giữa đột biến và đặc điểm lâm sàng ở bệnh nhân UNBVM

Kết quả từ bảng 3.12. Tất cả các bệnh nhân bị đột biến gây cắt ngắn chiều dài protein RB là đột biến vô nghĩa và đột biến lệch khung dịch mã. Protein RB không bị ảnh hưởng tới cấu trúc là các đột biến sai nghĩa.

Chúng tôi tiến hành phân tích mối liên quan giữa đột biến gen *RB1* và đặc điểm lâm sàng như tuổi phát hiện bệnh, mức độ nặng của bệnh, yếu tố nguy cơ cao.

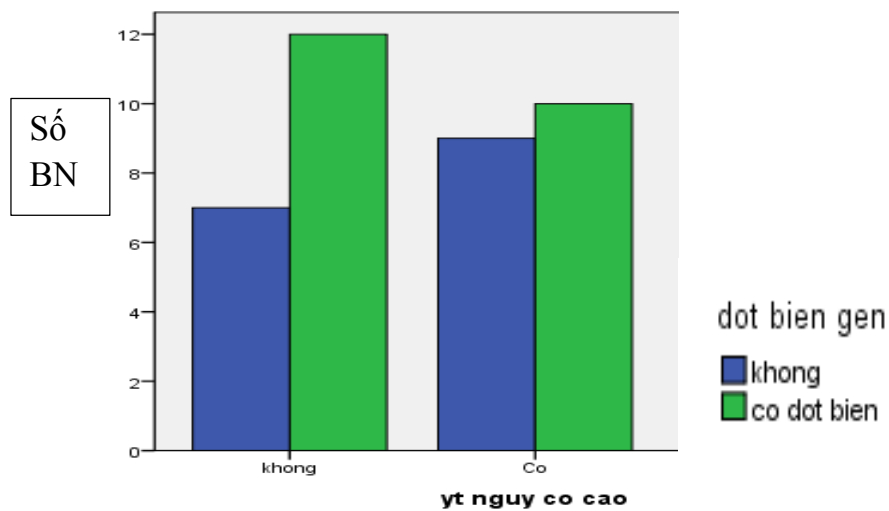
3.3.1.1. Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen *RBI*



Hình 3.14. Phân bố tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen *RBI*

Nhận xét: Tuổi phát hiện bệnh khi đi khám ở lứa tuổi < 6 tháng có số bệnh nhân đột biến gen cao nhất là 9 BN (37,5%) sau đó đến lứa tuổi từ 6 đến 12 tháng có 6 BN (25%) và tỷ lệ thấp nhất là lứa tuổi > 36 tháng chỉ có 1 BN (4,16%). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê $p = 0,224$ ($p > 0,05$)

3.3.1.2. Mối liên quan giữa yếu tố nguy cơ cao và đột biến gen *RBI*



Hình 3.15: Phân bố yếu tố nguy cơ cao và đột biến gen *RBI*

Nhận xét: Trong số 19 BN được xác định có yếu tố nguy cơ cao gây di căn thì có 11 BN có yếu tố nguy cơ cao (chiếm 57,9%) mang đột biến gen *RBI*, cao hơn số BN còn lại không mang đột biến gen *RBI* (8 BN chiếm 42,1%). (hai bệnh nhân không điều trị cắt bỏ nhãn cầu nên không có thông tin giải phẫu bệnh). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

3.3.1.3. *Mối liên quan giữa mức độ nặng của bệnh với đột biến gen RBI*

Bảng 3.15: Liên quan mức độ nặng của bệnh và đột biến gen *Rb1*

Bệnh nhân (Tỷ lệ %)	Mức độ nặng		Tổng
	Nặng	Trung bình	
Đột biến gen <i>RBI</i>	17(39,5)	7(16,3)	24(55,8)
Không có đột biến gen <i>RBI</i>	15(34,9)	4(9,3)	19(44,2)
Tổng	32(74,4)	11(25,6)	43 (100)

Nhận xét: Trong nhóm bệnh nhân có đột biến gen thì bệnh mức độ nặng là 17 bệnh nhân (chiếm 39,5%) cao hơn nhóm bệnh nhân không có đột biến gen với mức độ nặng có 15 bệnh nhân chiếm 34,9%. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.3.2. *Mối liên quan giữa dạng đột biến gen RBI và đặc điểm lâm sàng*

Trong số 43 bệnh nhân được phân tích gen đã phát hiện 24 bệnh nhân có đột biến gen trong đó có đột biến gen đã được công bố trước đó, có đột biến mới chưa được báo cáo. Các bệnh nhân có đột biến vô nghĩa, lệch khung dịch mã tạo mã kết thúc sớm gây ảnh hưởng đến cấu trúc protein RB là làm cho protein cắt ngắn hơn chiều dài bình thường. Nghiên cứu tiến hành phân tích mối liên quan giữa các dạng đột biến và đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của 24 bệnh nhân thành các nhóm có dạng đột biến khác nhau: đột biến vô nghĩa, lệch khung dịch mã, đột biến tại vị trí nối và đột biến sai nghĩa.

3.3.2.1. *Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và dạng đột biến*

Bảng 3.16. Mối liên quan tuổi phát hiện bệnh và dạng đột biến

Dạng đột biến	Số BN (Tỷ lệ %)	Tuổi trung bình khi CD (tháng)	Thể bệnh	
			Một mắt	Hai mắt
Vô nghĩa	3(12,5%)	5,3		03
Lệch khung	7(29,2%)	26,7	02	05
Sai nghĩa	5(20,8%)	19,8	02	03
Vị trí nổi	9(37,5%)	14,1	02	07
Tổng	24(100%)		06	18

Nhận xét: Tuổi trung bình khi chẩn đoán phát hiện bệnh của nhóm bệnh nhân đột biến vô nghĩa thấp nhất và tuổi trung bình khi chẩn đoán ở nhóm bệnh nhân mang đột biến lệch khung dịch mã là cao nhất. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.3.2.2. *Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và các dạng đột biến tạo mã kết thúc sớm (đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã)*

Bảng 3.17. Đặc điểm lâm sàng bệnh nhân UNBVM có đột biến vô nghĩa

S TT	BN	Giới	TSGĐ	Tuổi (Tháng)	Thể bệnh	Nhóm	Yếu tố NCC	Đột biến	Ghi chú
1	RB54	Nữ	Có	4	2M	D, B	Không	p.Trp99X	LOVD
2	RB65	Nam	Không	6	2M	A, D	Không	p.Tyr651X	LOVD
3	RB71	Nữ	Không	6	2M	B, D	Có	p.Tyr651X	LOVD

Nhận xét: Trong nghiên cứu của chúng tôi có 3 BN có đột biến vô nghĩa gây tạo mã kết thúc sớm trong tổng số 24 BN phát hiện đột biến (12,5%). Có 2 BN nữ và 1 BN nam, tất cả 3 BN đều thể bệnh hai mắt (100%), tuổi phát hiện bệnh sớm trước 6 tháng. Chủ yếu mắt bên nặng thuộc nhóm D, mắt còn lại là nhóm A, B. Tiền sử gia đình chỉ có một BN RB54 là có bố bị

bệnh UNBVM thể một mắt đã bỏ nhãn cầu lúc nhỏ đây là trường hợp di truyền rõ ràng. Có một bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao. Có hai đột biến trong nhóm bệnh nhân có đột biến vô nghĩa tạo mã kết thúc sớm.

Bảng 3.18. Đặc điểm lâm sàng BN UNBVM có đột biến lệch khung dịch mã

STT	BN	Giới	TSGĐ	Tuổi (Tháng)	Thể bệnh	Nhóm	Yếu tố NCC	Đột biến
1	RB50	Nam	Không	34	MT	0/E	Có	p.Pro232Serfs*8
2	RB57	Nữ	Có	15	2M	B, D	Không	p.Ile124Argfs*6
3	RB62	Nữ	Có	26	2M	B, D	Không	p.Ile124Argfs*6
4	RB66	Nam	Không	84	MP	D/0	Không	p.893Glyfs24*
5	RB70	Nam	Không	20	2M	D, B	Không	p.Val714*
6	RB76	Nữ	Không	06	2M	B,D	Có	c.1312delT(fs)
7	RB79	Nam	Không	02	2M	E, B	Có	p.Thr345Argfs*6

Nhận xét: Trong nghiên cứu của chúng tôi có 07 BN có đột biến lệch khung dịch mã trong tổng số 24 BN phát hiện đột biến (29,2%). Có 02 BN có tiền sử gia đình trong đó: BN RB57 có bố bị bệnh thể một mắt ở MP đã bỏ nhãn cầu lúc nhỏ, em trai cũng bị bệnh thể hai mắt. Có 02 bệnh nhân có mắt bệnh ở giai đoạn E khối u xuất ngoại ra bán phần trước và ra sau hốc mắt.

Có 5 bệnh nhân thể bệnh hai mắt và 5/7 BN phát hiện bệnh trên 1 tuổi và có 3 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao, có 4 bệnh nhân mang đột biến mới chưa được báo cáo trước đó trong đó có 3 bệnh nhân mang đột biến mới này giải phẫu bệnh có yếu tố nguy cơ cao. Có 06 đột biến khác nhau trong nhóm các bệnh nhân có đột biến lệch khung dịch mã tạo mã kết thúc sớm.

3.3.3.3 Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và dạng đột biến sai nghĩa

Bảng 3.19. Đặc điểm lâm sàng BN UNBVM với đột biến sai nghĩa

STT	BN	Giới	TSGĐ	Tuổi (Tháng)	Thể bệnh	Nhóm	Yếu tố NCC	Đột biến	Ghi chú
1	RB6	Nam	Không	36	MP	D/0	Không	p.Ser402Thr	New
2	RB29	Nam	Không	33	MT	0/D	Không	p.Trp681Cys	New
3	RB31	Nữ	Không	07	2M	D/A	Không	p.Ser402Thr	New
4	RB51	Nam	Không	3	2M	D/C	Có	p.Phe162Tyr	New
5	RB69	Nam	Không	20	2M	D/B	Không	p.Ser402Thr	New

Nhận xét: Trong nghiên cứu của chúng tôi có 05 BN có đột biến sai nghĩa trong tổng số 24 BN phát hiện đột biến (20,8%), cả 05 BN có đột biến đều là đột biến mới chưa được báo cáo trước đó trên thế giới. Không có BN nào có tiền sử gia đình. Có 3 bệnh nhân là thể hai mắt và 2 bệnh nhân thể bệnh một mắt, có 1 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao. Tuổi đi khám và phát hiện bệnh từ 03 tháng cho đến 36 tháng. Có 3 đột biến khác nhau trong nhóm bệnh nhân đột biến sai nghĩa

3.3.3.4 Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và dạng đột biến tại vị trí nối exon- intron

Bảng 3.20. Đặc điểm lâm sàng BN UNBVM với đột biến tại vị trí nối

STT	BN	Giới	TSGĐ	Tuổi (Tháng)	Thể bệnh	Nhóm	Yếu tố NCC	Đột biến	Ghi chú
1	RB5	Nam	Có	19	2M	A/D	Không	c.861G>A	LOVD
2	RB8	Nam	Không	12	2M	E/C	Có	c.2211+1G>A	LOVD
3	RB10	Nữ	Không	10	2M	B/D	Có	c.2664-10T>A	LOVD
4	RB11	Nữ	Không	28	MT	0/D	Không	c.2664-10T>A	LOVD
5	RB55	Nữ	Có	15	2M	B/D	Không	c.1333-2A>G	LOVD
6	RB61	Nữ	Có	03	2M	D, B	Không	c.2520+1_2520+4del	LOVD
7	RB59	Nữ	Không	20	MT	D/D	Có	c.265-1G>T	LOVD
8	RB75	Nam	Không	02	2M	D/A	Không	c.2664-10T>A	LOVD
9	RB78	Nữ	Có	18	2M	B/D	Không	c.2664-10T>A	LOVD

Nhận xét: Trong nghiên cứu của chúng tôi có 9 BN có đột biến tại vị trí nối exon- intron trong tổng số 24 BN phát hiện đột biến (37,5%). Có 04 bệnh nhân có tiền sử gia đình, có 07 bệnh nhân thể bệnh hai mắt và 2 bệnh nhân còn lại thể bệnh một mắt. Có 3 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao khi cắt bỏ nhãn cầu. Có tất cả 6 đột biến khác nhau trong nhóm đột biến tại vị trí nối

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh UNBVM

4.1.1. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh UNBVM

4.1.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi phát hiện bệnh

Tại Việt Nam và một số nước đang hoặc kém phát triển bệnh nhân UNBVM thường được phát hiện muộn hơn các nước phát triển. Bởi vậy nhiều bệnh nhân bệnh đã ở giai đoạn muộn là nhóm D, E. Một số bệnh nhân khối u đã xâm lấn bán phần trước nhãn cầu hoặc khối u đã xuất ngoại ra hốc mắt.

Nghiên cứu của Nguyễn Ngân Hà và cộng sự tại Bệnh viện Mắt Trung ương trong 10 năm từ 2004- 2013 thì tuổi trung bình của bệnh nhân tại thời điểm phát hiện bệnh là 25.44 ± 15.84 tháng [97].

Nghiên cứu trên 295 bệnh nhân tại một bệnh viện ở TP Bắc Kinh (Trung Quốc) tuổi trung bình khi phát hiện bệnh là 2,8 tuổi, bệnh nhân nhỏ nhất là 1 tháng và bệnh nhân nhiều tuổi nhất là 14 tuổi [98].

Nghiên cứu ở Brazil trên 38 bệnh nhân cho thấy tuổi trung bình khi phát hiện bệnh là 33.8 tháng ở nhóm bệnh nhân thể bệnh một mắt và 19.15 tháng ở nhóm bệnh nhân thể hai mắt bị bệnh [99].

Nghiên cứu ở 105 bệnh nhân Thổ Nhĩ Kỳ cho thấy tuổi trung bình khi phát hiện bệnh là 25 tháng, ở nhóm bệnh nhân thể bệnh một mắt là 29 tháng và nhóm bệnh nhân thể bệnh hai mắt là 16 tháng [100].

Nghiên cứu tại Iran trên 105 BN cho thấy tuổi trung bình khi phát hiện bệnh là 28,5 tháng, ở nhóm bệnh nhân thể bị bệnh một mắt là 27,4 tháng và nhóm bệnh nhân thể hai mắt bị bệnh là 30 tháng, tuổi bệnh nhân thấp nhất là 3 tháng và bệnh nhân lớn nhất là 72 tháng [101].

Nghiên cứu khác tại Hàn Quốc trên 70 BN cho thấy tuổi trung bình là 21,2 tháng (1,5–84 tháng), ở nhóm bệnh nhân thể một mắt là 27,4 tháng và nhóm bệnh nhân thể bệnh hai mắt là 30 tháng, tuổi thấp nhất là 1,5 tháng và bệnh nhân lớn nhất là 84 tháng [102].

Nghiên cứu của tác giả Zhao và cộng sự tại Trung Quốc trên 470 bệnh nhân cho thấy tuổi trung bình là 23 tháng (1,5- 84 tháng), ở nhóm bệnh nhân thể một mắt trung bình là 27 tháng và nhóm bệnh nhân thể hai mắt trung bình là 15 tháng, tuổi thấp nhất là 2 tuần tuổi và lớn nhất là 10,2 tuổi [24].

Nghiên cứu tại Malaysia trên 119 BN cho thấy tuổi trung bình là 22 tháng, ở nhóm bệnh nhân thể một mắt và 29 tháng và nhóm BN thể hai mắt là 14 tháng, tuổi thấp nhất là 1 tháng tuần tuổi và lớn nhất là 123 tháng [103].

Nghiên cứu tại Pakistan trên 295 BN cho thấy tuổi trung bình khi phát hiện bệnh là 35,92 tháng, ở nhóm bệnh nhân thể một mắt là 38,97 tháng và nhóm bệnh nhân thể hai mắt là 31,10 tháng [104].

Một nghiên cứu của K Shahraki và cộng sự trên bệnh nhân Ấn Độ, độ tuổi trung bình khi chẩn đoán là 24 tháng ($27,6 \pm 19,2$ tháng), tuổi phát hiện bệnh từ 6 tháng đến 138 tháng [105].

Một nghiên cứu của Pakistan cho thấy tuổi khi được khám và chẩn đoán lần đầu từ 2- 84 tháng, tuổi trung bình của cả nhóm nghiên cứu là 18 tháng, thể bị bệnh một mắt tuổi trung bình khi khám là 22 tháng, nhóm bị bệnh hai mắt là 13 tháng [106].

Theo Abidi các bệnh nhân Maroc ở độ tuổi chẩn đoán từ 2 đến 36 tháng. Tuổi trung khi chẩn đoán là 10,47 tháng đối với bệnh nhân thể hai mắt và 17 tháng đối bệnh nhân thể một mắt [83].

Một nghiên cứu của các tác giả Singapor nhóm bệnh nhân có độ tuổi trung bình khi chẩn đoán là $22,1 \pm 16,5$ tháng (59 bệnh nhân) [68] và có độ tuổi thấp hơn của một nhóm nghiên cứu trước đó cũng tại Sigapor có độ tuổi

trung bình khi khám là 25.7 ± 19.9 tháng (51 bệnh nhân) [107]. Điều này chứng tỏ bệnh nhân ngày càng được khám và điều trị sớm hơn do công tác thông tin tuyên truyền và chăm sóc y tế ngày càng tốt hơn.

Trong một nghiên cứu của Singapor của tác giả Tomar và cộng sự thì tuổi trung bình ở nhóm 59 bệnh nhân nghiên cứu là $22,1 \pm 16,5$ tháng [68], thấp hơn một chút so với một báo cáo trong một nghiên cứu trước đó cũng trên 51 bệnh nhân Singapore là $25,7 \pm 19,9$ tháng [108].

Trong nghiên cứu của chúng tôi hầu hết bệnh nhân tới bệnh viện khám và được chẩn đoán xác định lần đầu ở độ tuổi là: $15,47 \pm 11,92$ tháng, bệnh nhân ít tuổi nhất là 2 tháng, nhiều tuổi nhất là 84 tháng, tuổi trung bình 13 tháng.

Theo y văn trên thế giới tuổi phát hiện bệnh ở nhóm bệnh nhân bị bệnh hai mắt có độ tuổi trung bình đi khám lần đầu sớm hơn nhóm bệnh nhân bị bệnh một mắt.

4.1.1.2. Phân bố bệnh nhân theo giới

Nghiên cứu của Nguyễn Ngân Hà và cộng sự tỷ lệ nam/nữ là 1,2/1, không có sự khác biệt về tỷ lệ giới tính [97].

Theo nghiên cứu của Taylor tỷ lệ giới tính là 99 bệnh nhân nam (60%) và 66 bệnh nhân nữ (40%) [73].

Nghiên cứu của tác giả Abidi và cộng sự ở Maroc thì có 20 bệnh nhân nữ và 21 nam (tỷ số giới tính 0.95) [83].

Một nghiên cứu của Pakistani có 44 bệnh nhân nam và 26 bệnh nhân nữ (tỷ lệ 1,7) đây là đất nước theo đạo Hồi nên vẫn có bất bình đẳng giới khi chăm sóc y tế nói chung [106].

Một nghiên cứu của Ấn Độ tác giả là K Shahraki và cộng sự cho thấy tỷ lệ nam và nữ tương đương nhau 75 BN nữ (50,3%) và 74 BN nam (49,7%) [105].

Một nghiên cứu ở 37 bệnh nhân Tunisia có 15 bệnh nhân nữ (40%) và 22 bệnh nhân nam (60%), tỷ số nam/nữ là 1,5 [109].

Trong nghiên cứu của chúng tôi số bệnh nhân nam là 23 (53,5%), số bệnh nhân nữ là 20 (46,5%), tỷ lệ này không có ý nghĩa thống kê. Theo các nghiên cứu trên thế giới và của chúng tôi không có sự khác biệt về giới tính. Thực chất bệnh UNBVM là bệnh do đột biến gen trên NST thường thì tỷ lệ mắc bệnh ở nam và ở nữ là như nhau.

4.1.1.3. Lý do đi khám

Trong một nghiên cứu lớn trên 1.265 bệnh nhân UNBVM từ năm 1960-1990 ở Mỹ do tác giả Abramson và cộng sự cho thấy dấu hiệu xuất hiện phổ biến nhất là ánh đồng tử trắng là 56%, lác 24% và thị lực kém 8% [27].

Trong một nghiên cứu của Chang và cộng sự báo cáo trên 56 bệnh nhân Đài Loan các triệu chứng xuất hiện phổ biến nhất là ánh đồng tử trắng là 71%, đau đỏ mắt 18%, và lác là 14% [26].

Trong một nghiên cứu của tác giả Zhao và cộng sự trên 470 bệnh nhân UNBVM ở Trung Quốc thì triệu chứng ánh đồng tử trắng là 73% bệnh nhân [24].

Trong một nghiên cứu của tác giả Wallach và cộng sự báo cáo ở nhóm 139 bệnh nhân UNBVM tại Thụy Sĩ từ năm 1963 đến năm 2004 các biểu hiện phổ biến nhất là ánh đồng tử trắng ở 48% và lác ở 20% [28].

Một nghiên cứu của tác giả Bonanomi và cộng sự (2009) tại Brazil trên 38 bệnh nhân, dấu hiệu ánh đồng tử trắng chiếm 75%, lác chiếm 11% còn lại là các dấu hiệu bệnh muộn như lồi mắt, glacom chiếm 14% [99]

Hầu hết bệnh nhân có dấu hiệu ánh đồng tử trắng do bố mẹ bệnh nhân phát hiện ra và cho trẻ đi khám bệnh, ánh đồng tử trắng được bố mẹ bệnh nhân mô tả như ánh mắt mèo làm gia đình thấy bất thường bao gồm 37 BN

(86%) có dấu hiệu ánh đồng tử trắng, có 2 BN lác (4,7%), 2 BN lồi mắt (4,7%), 2 BN đau đỏ mắt (4,7%).

Ánh đồng tử trắng có liên quan đến bệnh có khối u nội nhãn **tiền triển hơn**, trong khi **lác có liên quan đến khối u vùng hoàng điểm**. Thông thường cha mẹ bệnh nhân phát hiện thấy mắt trẻ bất thường và dấu hiệu ánh đồng tử trắng được phát hiện qua ánh sáng đèn hay chụp ảnh cho bé. Nhiều gia đình không coi đó là dấu hiệu nghiêm trọng và đó là lý do trẻ được đi khám bệnh và chẩn đoán muộn.

Hiện nay trên thế giới có nhiều nước có nhiều chương trình giáo dục, truyền thông để cha mẹ nhận biết ánh đồng tử trắng. Có khi nhờ chụp ảnh mà phát hiện ra dấu hiệu này. Tuy nhiên có những nguyên nhân khác gây ra ánh đồng tử trắng trên ảnh chụp như đục thủy tinh thể bẩm sinh, tồn lưu sợi myelin, khuyết đĩa thị và cận thị nặng...

Lý do thứ hai trẻ bị UNBVM đến khám là lác trong hay lác ngoài. Lác cũng là lý do làm cho khi chụp ảnh thấy đồng tử hai mắt khác nhau dấu hiệu này chiếm khoảng 20% số trường hợp. Các dấu hiệu khác gồm có lồi mắt, mắt đau nhức và đỏ (do glacom) do đến muộn.

Ở nhiều nước đang phát triển trẻ đến khám muộn vì lồi mắt do u đã xuất ngoại như một viêm tổ chức hốc mắt do hoại tử khối u, giãn đồng tử một bên, dị sắc móng mắt, xuất huyết tiền phòng, mủ tiền phòng, viêm màng bồ đào và rung giật nhãn cầu do khối u ở vùng hoàng điểm ở hai mắt. Những bệnh nhân UNBVM ở những nước kém phát triển được chẩn đoán muộn hơn và giai đoạn khối u tiến triển hơn, nhiều bệnh nhân có khối u xuất ngoại hoặc xâm lấn hốc mắt hay bán phần trước nhãn cầu.

Các nghiên cứu trên thế giới đều cho rằng không có bất kỳ mối liên quan nào được tìm thấy giữa giới tính, chủng tộc hay tỷ lệ tử vong, mặc dù các

triệu chứng khi khám, chẩn đoán phát hiện bệnh đã chứng minh tương quan với kích thước khối u và vị trí.

Trong một nghiên cứu của tác giả Ali trên 25 bệnh nhân ở Sudan với các triệu chứng gặp nhiều nhất là lồi mắt và xuất ngoại ở 14 trường hợp (56%) và ánh đồng tử trắng ở 8 trường hợp (32%) [30].

Một nghiên cứu của tác giả Owoeye và cộng sự trên nhóm bệnh nhân Nigeria có 85% số bệnh nhân lồi mắt kèm theo các dấu hiệu xuất ngoại hốc mắt và xâm lấn bán phần trước [31].

Trong một nghiên cứu của tác giả Saiju ở bệnh nhân Nepal thì có 10/30 bệnh nhân (33%) lồi mắt do khối u xuất ngoại và xâm lấn hốc mắt [32].

Trong nghiên cứu của Mali ở tây bắc châu Phi triệu chứng chính xuất hiện ở 55 trường hợp là lồi mắt (55%) và tuổi trung bình khi chẩn đoán là 4 tuổi. Các khối u ở vùng trung tâm đáy mắt có xu hướng gây mất thị lực. Ở trẻ em có tiền sử gia đình mắc UNBVM thường phát hiện ở giai đoạn sớm hơn do được sàng lọc những bệnh nhân này [25].

Trẻ trong gia đình có người thân đã bị UNBVM cần được khám sàng lọc trước khi các triệu chứng và dấu hiệu xuất hiện trừ khi xét nghiệm gen loại trừ alen đột biến ở trẻ đó. Với phần lớn các gia đình, có thể phát hiện đột biến RB1 ở người mắc bệnh đầu tiên, kiểm tra xem có đột biến đó ở các thành viên khác trong gia đình không, xác định những người mang alen đột biến, chẩn đoán và điều trị sớm khi u còn nhỏ bằng laser hay hóa trị liệu để bảo tồn thị lực cũng như nhãn cầu.

Bảng 4.1: So sánh tỷ lệ % các triệu chứng lâm sàng hay gặp ở một số nghiên cứu

Tác giả	Quốc gia (Năm)	Số bệnh nhân	Triệu chứng chính (%)
Abramson và cs [27]	Mỹ (1998)	1265	Ánh đồng tử trắng (56%) Lác (24%) Giảm thị lực (8%)
Wallach và cs [28]	Thụy Sĩ (2006)	139	Ánh đồng tử trắng (48%) Lác (20%)
Chang và cs [26]	Đài loan (2006)	56	Ánh đồng tử trắng (71%) Đỏ mắt (18%) Lác (14%)
Owoeye và cs [31]	Nigeria (2006)	20	Lỗi mắt (85%)
Saiju và cs [32]	Nepal (2006)	30	Ánh đồng tử trắng (43%) Xâm lấn hốc mắt (33%)
Zhao và cs [24]	Trung Quốc (2011)	470	Ánh đồng tử trắng (73%)
Ali và cs [30]	Sudan (2011)	25	Giãn lồi củng mạc (56%) Ánh đồng tử trắng (32%)
Nguyễn Ngọc Chung và cs	Việt Nam (2018)	43	Ánh đồng tử trắng 86% Lác 4,7%

4.1.1.4. Các triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân UNBVM

4.1.1.5. Tiền sử gia đình

Khi khai thác tiền sử gia đình của 43 gia đình bệnh nhân, chúng tôi thấy có 8 trường hợp có tiền sử gia đình. Trong đó có 6 trường hợp có bố, mẹ bị bệnh và có 3 trường hợp ngoài bố, mẹ còn có anh, chị em trong gia đình bị bệnh. Tất cả 6 trường hợp này đều có đột biến gen *RBI* điều đó chứng tỏ bệnh nhân được di truyền từ bố, mẹ một alen của gen *RBI* đột biến và tất cả 6 trường hợp này đều bị bệnh thể hai mắt. Có hai trường hợp bị bệnh có yếu tố gia đình là anh trai bệnh nhân cũng bị bệnh nhưng không phát hiện đột biến gen, hai trường hợp này cần làm thêm các phương pháp xét nghiệm khác như MLPA, QM-PCR (Quantitative multiplex PCR), Allele-specific PCR, NGS (Next Generation Sequencing) để xác định có đột biến gen *RBI* hay không.

Nghiên cứu của tác giả Yousef trên bệnh nhân Jordan có 5 trường hợp có tiền sử gia đình chiếm 13% [70].

Một nghiên cứu tại Parkistan của tác giả Saeeda Kalsoom có 9 (12,8%) trường hợp có tiền sử gia đình ở nhóm bệnh nhân thể hai mắt, và có 4 (5,7%) trường hợp có tiền sử gia đình ở nhóm bệnh nhân thể bệnh một mắt, tỷ lệ chung là 18,5% có đột biến gen *RBI* [106].

Một nghiên cứu dịch tễ học của các tác giả Đài Loan thì chỉ có 3/52 (5,8%) trường hợp có tiền sử gia đình nhưng đây là một nghiên cứu về dịch tễ học mà không đề cập đến nghiên cứu đột biến gen *RBI* [26].

Tương tự một nghiên cứu dịch tễ của các tác giả Thổ Nhĩ Kỳ có 16/141 (11%) bệnh nhân có tiền sử gia đình, không đề cập đến nghiên cứu đột biến gen *RBI* [100].

Có một báo cáo lớn của tác giả Taylor nghiên cứu mối liên quan kiểu hình- kiểu gen trên 50 gia đình bệnh nhân ở trên hơn 500 bệnh nhân (có 165 bệnh nhân có đột biến gen *RBI*) trên người da trắng tại Viện Curi của Pháp.

Các tác giả đi sâu phân tích các dạng đột biến gặp trên các gia đình bệnh nhân và có di truyền từ thế hệ bố, mẹ cho con cái trong gia đình. Tỷ lệ chung có tiền sử gia đình là 10% [73].

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 8/43 (18,6%) trường hợp có tiền sử gia đình, tuy nhiên với cách lấy mẫu khác nhau, số mẫu khác nhau nên tỷ lệ bệnh nhân có tiền sử gia đình ở các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam từ 5,8- 16,8%.

Như vậy các bệnh nhân bị UNBVM có bố, mẹ, anh chị em ruột trong gia đình bị bệnh và điều này phù hợp với quy luật di truyền của Mendel, phù hợp với thể di truyền có đột biến tế bào gốc mà con cái họ nhận một alen đột biến, di truyền trội thể dị hợp tử, và hay gặp ở thể bệnh hai mắt hơn một mắt. Bởi vậy khi khám phát hiện bệnh nhân bị UNBVM cần phải hỏi kỹ tiền sử gia đình và khám lại bố, mẹ bệnh nhân và tất cả anh chị em ruột bệnh nhân. Nếu bệnh nhân là con đầu cần phải làm xét nghiệm xác định đột biến gen *RB1* và tư vấn di truyền cho những lần sinh sau. Khi cần có thể xét nghiệm xác định đột biến gen *RB1* ở phôi thai sau khi thụ tinh nhân tạo để chuyển phôi không mang gen bệnh vào buồng tử cung mẹ cho ra đứa trẻ không mang bệnh.

4.1.2. Các đặc điểm chẩn đoán hình ảnh của bệnh nhân UNBVM

4.1.2.1. Đặc điểm trên siêu âm

Chẩn đoán bệnh UNBVM chủ yếu dựa vào khám đáy mắt. Tuy nhiên không phải lúc nào cũng có thể đánh giá được đầy đủ các thông tin như mức độ u xâm lấn trong nhãn cầu, u thâm nhiễm hắc mạc, u xâm lấn thị thần kinh hay hiện tượng can xi hóa. Chẩn đoán hình ảnh có ý nghĩa quan trọng trong việc xác định chẩn đoán và mức độ nguy cơ của bệnh. Điều trị UNBVM phụ thuộc bệnh ở một hay cả hai mắt, vị trí của khối u (võng mạc trung tâm hay ngoại biên) và mức độ xâm lấn của u.

Nghiên cứu của Roth và cộng sự trên nhóm bệnh nhân tại Mỹ thấy hình ảnh can xi hóa ở 63/69 mắt bệnh của 48 bệnh nhân (chiếm 91,3%) khi làm siêu âm mắt [110].

Nghiên cứu của Bedi và cộng sự cũng phát hiện 91% hình ảnh có can xi hóa ở mắt bệnh nhân u nguyên bào võng mạc khi được làm siêu âm mắt [111].

Nghiên cứu của tác giả Galluzzi 2015 và cộng sự cho kết quả 95% có hình ảnh can xi hóa trên mắt bệnh nhân được làm siêu âm mắt [38].

Nghiên cứu trên 43 bệnh nhân của chúng tôi có 47 mắt được siêu âm thì thấy có 45 mắt có hình ảnh can xi hóa xuất hiện (chiếm 95,7%).

Như vậy nghiên cứu của chúng tôi cũng như nghiên cứu của các tác giả khác trước đó đều cho thấy tỷ lệ phát hiện hình ảnh can xi hóa trên 92- 95%. Siêu âm mắt là phương pháp có tác dụng với các cấu trúc nằm không quá sâu hay có chứa nhiều dịch như nhãn cầu. Siêu âm có thể áp dụng không cần gây mê ở trẻ em, không cần giãn đồng tử. Trên siêu âm mắt, khối u không đều, có âm vang mạnh hơn dịch kính và có những chấm can xi hóa. Can xi hóa giúp phân biệt khối u võng mạc với các tổn thương khác ở trẻ nhỏ. Siêu âm mắt có thể thấy bong võng mạc và đặc biệt có thể phân biệt u phát triển vào trong dịch kính hay ra ngoài vào khoang dưới võng mạc. Siêu âm chỉ có tác dụng khu trú vị trí của u trong nhãn cầu và đánh giá kích thước khối u. Do có độ phân giải kém nên siêu âm không thể phát hiện hiện tượng thâm nhiễm hắc mạc hay thị thần kinh. Vết can xi nếu lớn cũng gây trở ngại cho việc đánh giá gai thị. Siêu âm nhãn khoa có nhiều lợi ích như giúp ích cho Bác sĩ mắt chẩn đoán một cách nhanh chóng, rẻ tiền, dễ làm và nhanh, không xâm nhập cơ thể trẻ đặc biệt là ở các nước đang phát triển [112], [113], [114].

4.1.2.2. Đặc điểm trên chụp cắt lớp vi tính

Nghiên cứu của tác giả Beets-Tan RG và cộng sự tỷ lệ hình ảnh có canxi hóa trên phim chụp cắt lớp vi tính với độ nhạy là 81% và độ đặc hiệu là 96% [115].

Nghiên cứu của Mahajan A và cộng sự trên nhóm bệnh nhân Ấn Độ cho thấy hình ảnh canxi hóa gặp ở hơn 90% mắt bệnh trên phim chụp cắt lớp vi tính [116].

Nghiên cứu của tác giả Brisse và cộng sự cho thấy hình ảnh canxi hóa trong khối u là 96% [35].

Nghiên cứu trên 43 bệnh nhân của chúng tôi có 28 mắt được chụp cắt lớp vi tính thì thấy có 26 mắt có hình ảnh canxi hóa xuất hiện (chiếm 92,8%).

Với tính chất đặc hiệu của chụp cắt lớp vi tính trong việc phát hiện vôi hóa trong khối u; tuy nhiên vôi hóa trong khối u cũng có thể được phát hiện trong quá trình kiểm tra soi đáy mắt và siêu âm mắt. Trong nghiên cứu, sự kết hợp của siêu âm mắt và chụp cắt lớp vi tính trong thời điểm chưa có cộng hưởng từ ở Việt Nam thì chẩn đoán các khối u nội nhãn hay hốc mắt đều có chỉ định chụp cắt lớp vi tính cho bệnh nhân để đánh giá tình trạng khối u nội nhãn, Chụp cắt lớp vi tính là phương pháp chẩn đoán hình ảnh đầu tiên được sử dụng để phát hiện và đánh giá khối u có xâm lấn thần kinh thị giác và rất chính xác trong việc đánh giá kích thước khối u. Có canxi hóa thì càng chẩn đoán chắc chắn hơn trước phẫu thuật cắt bỏ nhãn cầu, ngoài ra còn đánh giá tình trạng hốc mắt xem có xâm lấn, di căn ra hốc mắt chưa và có khối bất thường trong nội sọ để chẩn đoán và tiên lượng khi điều trị.

4.1.2.3. Đặc điểm trên chụp cộng hưởng từ

Một nghiên cứu của tác giả Schueler và cộng sự năm 2003 trên nhóm bệnh nhân Đức cho kết quả với độ đặc hiệu 92% và 100% phát hiện khối u nội nhãn trên phim chụp cộng hưởng từ [117].

Một nghiên cứu của tác giả Graaf và cộng sự 2005 trên nhóm bệnh nhân Hà Lan cho thấy hình ảnh can xi hóa trong khối u chiếm 96% ở mắt bệnh u nguyên bào võng mạc được chụp MRI [118].

Một nghiên cứu của tác giả Lemke và cộng sự năm 2007 trên nhóm bệnh nhân tại Bệnh viện Trường Đại học Berlin (Đức) thấy tỷ lệ can xi hóa trên MRI với độ nhạy là 92% và độ đặc hiệu 89% [119].

Một nghiên cứu của tác giả Brisse 2007 và cộng sự trên nhóm bệnh nhân Pháp thấy hình ảnh can xi hóa trong khối u chiếm 96% ở mắt bệnh u nguyên bào võng mạc được chụp cộng hưởng từ, ngoài ra trên phim chụp cộng hưởng từ còn thấy u xâm lấn ra hắc mạc, thị thần kinh [120].

Nghiên cứu của Wilson và cộng sự trên nhóm bệnh nhân tại Mỹ thấy các hình ảnh u xâm lấn thị thần kinh 95% các mức độ khác nhau [121].

Chụp cộng hưởng từ cho hình ảnh có độ phân giải cao là một phương pháp chẩn đoán hình ảnh không sử dụng tia X tránh nguy cơ gây u ác tính thứ phát cho bệnh nhân mắc UNBVM. Các thông tin mang lại rất có ích để đánh giá khối u. Nhiều thông tin không thể có khi thăm khám lâm sàng như các yếu tố có nguy cơ cao.

Ngày nay bệnh UNBVM giai đoạn sớm chủ yếu được điều trị hóa chất với phác đồ Vincristine, Etoposide và Carboplatin (VEC) nhằm mục đích bảo tồn nhãn cầu và thị lực. Khi bệnh ở giai đoạn muộn hơn phải phẫu thuật cắt bỏ nhãn cầu, nạo vét hốc mắt và giải phẫu bệnh có các yếu tố có nguy cơ cao gây di căn như u xâm lấn hắc mạc, u xâm lấn thị thần kinh hay u xâm lấn tiền phòng được báo cáo là làm tăng khả năng di căn và có thể thay đổi chiến lược điều trị hóa chất.

Hình ảnh của UNBVM là khối u tín hiệu tăng trên phim T1 và kém tín hiệu trên phim T2. Sau khi tiêm thuốc đối quang từ, trên phim T1 khối u tăng dần tín hiệu nhưng không thuần nhất. Trên phim cũng sẽ xác định mức độ

tăng sáng của mống mắt so với nửa mống mắt còn lại hay so với mắt bên kia. Đây là dấu hiệu của tân mạch mống mắt, một dấu hiệu rất có giá trị khi chẩn đoán u xâm lấn bán phần trước.

Một số nghiên cứu trên thế giới đối chiếu hình ảnh giữa MRI và giải phẫu bệnh thấy rằng, nếu khối đã xâm lấn ra tiền phòng hoặc xuất ngoại, xâm lấn qua củng mạc thì rất dễ xác định trên cộng hưởng từ với độ nhạy và độ đặc hiệu 100%. Khối u đã xâm lấn ra tiền phòng đôi khi cũng tương đối dễ phát hiện trên thăm khám cho bệnh nhân bằng đèn soi đáy mắt gián tiếp qua kính Vold phóng đại hoặc quan sát thấy trên phim cộng hưởng từ với độ nhạy là 80% và đặc hiệu là 91%. Trên phim chụp cộng hưởng từ rất dễ dàng nhìn thấy khối u ở tại vị trí thị thần kinh nhưng rất khó xác định xâm lấn trước lá sàng hay sau lá sàng nên độ nhạy rất cao 100% nhưng độ đặc hiệu lại chỉ có 63%. Càng về chi tiết thì độ nhạy và độ đặc hiệu giảm dần, các biểu hiện xâm lấn hắc mạc vi thể đôi khi rất khó xác định trên phim chụp cộng hưởng từ (độ nhạy và độ đặc hiệu 60%). Đặc biệt những trường hợp sau khi có kết quả giải phẫu bệnh, quay ngược lại xem phim chụp cộng hưởng từ cũng rất khó để xác định đó là xâm lấn hắc mạc hay chưa. Trên thế giới các nghiên cứu đối chiếu kết quả giải phẫu bệnh và hình ảnh chụp cộng hưởng từ trước mổ đã được thực hiện với số lượng bệnh nhân khác nhau (18-21 bệnh nhân) với máy 0,6T [119].

Hắc mạc là tổ chức có nhiều mạch máu nên tạo điều kiện cho tế bào u phát tán toàn thân. Khi tiêm thuốc đối quang từ trên phim T1, hắc mạc là lớp màng sáng nằm giữa dịch kính và củng mạc tối. Thâm nhiễm hắc mạc biểu hiện bằng dày hắc mạc nhiều hay ít. Tuy nhiên nếu biểu mô sắc tố bị khối u làm gián đoạn, việc phát hiện dày hắc mạc sẽ khó khăn hơn. Tuy nhiên việc phát hiện u xâm lấn thể mi thường khó khăn do độ tương phản của thể mi kém.

Tế bào u phát tán trong dịch kính là dấu hiệu của khối u phát triển vào trong (endophytic), là tiêu chuẩn phân loại UNBVM, nhưng rất khó phát hiện

trên phim chụp cộng hưởng từ. Tân mạch mỏng mắt biểu hiện bằng mỏng mắt tăng sáng không đều sau khi tiêm thuốc đối quang từ cũng được coi là yếu tố nguy cơ.

Chụp cộng hưởng từ cho phép xác định u xâm lấn tiền phòng, tiền phòng nông gây tăng nhãn áp (T2) và hiện tượng u xâm lấn củng mạc (xuất ngoại). Nhưng khối u xâm lấn thị thần kinh mới là yếu tố đáng lưu ý nhất trên phim chụp cộng hưởng từ.

Tất cả các bệnh nhân được chụp cộng hưởng từ trước khi khoét bỏ nhãn cầu. Có 3 bệnh nhân hai mắt thì mắt thứ hai xếp loại nhóm B nên khối u nhỏ, chưa có thấy các dấu hiệu xâm lấn trên phim chụp cộng hưởng từ. Do đây là nghiên cứu hồi cứu, các bác sĩ chẩn đoán hình ảnh chưa chú ý đến hình ảnh xâm lấn vi thể nên các lát cắt trên phim cộng hưởng từ còn dày 5mm/ lát, chủ yếu khu trú vào phần não chính vì vậy khó xác định độ dài thị thần kinh trên phim cộng hưởng từ nhưng không có bệnh nhân nào có xâm lấn vào thị thần kinh gây biến dạng thị thần kinh. Xâm lấn hắc mạc khu trú đôi khi rất khó xác định do các lát cắt không đồng đều. Đặc biệt trên phim cộng hưởng từ chỉ xác định được khối u đã xâm lấn đến đầu dây thần kinh thị giác nhưng rất khó xác định hình ảnh đó chỉ là xâm lấn trước lá sàng hay đã xâm lấn qua lá sàng. Không có trường hợp nào thấy hình ảnh tân mạch mỏng mắt trên phim chụp cộng hưởng từ nhưng trên lâm sàng có thể nhìn thấy rõ tân mạch mỏng mắt, có thể do trên lâm sàng, chỉ cần một vài tân mạch có thể quan sát rất tốt trên sinh hiển vi nhưng nếu biểu hiện trên phim chụp cộng hưởng từ thì cần tân mạch khá nhiều và dày. Đây cũng là một nhược điểm của chụp cộng hưởng từ khi đánh giá tân mạch trong UNBVM. Có duy nhất một trường hợp xâm lấn củng mạc khá rõ vì bệnh nhân khối u đã xuất ngoại ra ngoài. Tuy nhiên nếu chỉ trường hợp, khối u chưa xuất ngoại có thể rất khó đánh giá giữa việc khối u

chỉ xâm lấn hắc mạc ở ạt hay đã xâm lấn vào thành củng mạc, vì hắc mạc nằm liền sát củng mạc, nên trên phim chụp cộng hưởng từ sẽ rất khó xác định.

4.1.3. Đặc điểm mô bệnh học UNBVM

Giải phẫu bệnh UNBVM

Việt Nam là một quốc gia đang phát triển với nền kinh tế, y tế đang có nhiều bước tiến. Trên cả nước có ba trung tâm quản lý bệnh nhân UNBVM. Nghiên cứu này chỉ được thực hiện tại Bệnh viện Mắt Trung ương vì vậy sẽ không đại diện cho số lượng bệnh nhân trong cả nước. Hơn nữa, việc so sánh các kết quả trong nghiên cứu này với nghiên cứu khác là khó khăn do sự khác nhau về vị trí địa lý, tình trạng kinh tế xã hội của mỗi đất nước và tiêu chí được sử dụng để xác định các yếu tố nguy cơ cao.

Theo các nghiên cứu trước đây, tỷ lệ các trường hợp có yếu tố nguy cơ cao gây di căn chiếm 18.5 – 41.4% [122]. Trong nghiên cứu này, % mắt có yếu tố nguy cơ cao. Điều này do sự chậm trễ trong chẩn đoán và điều trị, liên quan đến việc thiếu hiểu biết về bệnh trong cộng đồng và chưa có các chương trình sàng lọc. Bên cạnh đó, vấn đề có hay không điều trị hóa chất bổ sung sau khoét bỏ nhãn cầu và tỷ lệ sống sót không được đề cập đến trong nghiên cứu này. Lý do là chưa có điều kiên theo dõi bệnh nhân chặt chẽ và thời gian hồi cứu không đủ. So sánh chi tiết về tỷ lệ các yếu tố nguy cơ cao trong các nghiên cứu được trình bày trong bảng 4.

Mức độ xâm lấn hắc mạc có liên quan đến nguy cơ di căn theo đường máu qua các mạch máu hắc mạc hay qua củng mạc [123]. Các báo cáo ở các nước phát triển đã đưa ra tỷ lệ thâm nhiễm củng mạc (1-8%) và ra ngoài củng mạc (2-13%). Tất cả đều thống nhất rằng thâm nhiễm củng mạc và ra ngoài củng mạc là dự báo di căn [42],[43].

Mức độ xâm lấn thị thần kinh có liên quan đến tiên lượng. Theo nhiều công trình nghiên cứu, u ở bề mặt thị thần kinh có tỷ lệ tử vong 10% tương tự

như trường hợp thị thần kinh không bị tổn thương. Nếu u xâm lấn lá sàng, tỷ lệ tử vong là 29%. Tỷ lệ này tăng lên đến 42% nếu u đi ra sau lá sàng và nếu u có ở diện cắt thị thần kinh thì tỷ lệ tử vong là 80% [124],[125],[124],[125]. Các nghiên cứu này cho thấy tầm quan trọng của việc cắt thị thần kinh dài khi khoét bỏ nhãn cầu. Có nghiên cứu cho thấy nếu cắt thị thần kinh dài > 5 mm thì tiên lượng tốt hơn là chỉ cắt được < 5 mm. Vị trí của u trong thị thần cũng quan trọng, u càng gần não và càng gần diện cắt thị thần kinh thì tiên lượng di căn càng xấu. Lượng u có trong thị thần kinh và mức độ xâm lấn hắc mạc có ý nghĩa tiên lượng. Nếu có tế bào u ở diện cắt thị thần kinh chứng tỏ u vẫn còn sót trong hốc mắt. Khi u đã thâm nhập tổ chức mềm của hốc mắt, u sẽ lan vào xương, qua các lỗ vào nền sọ hay xuống mũi họng. Khi tổ chức phần mềm bị xâm lấn thì phải tính đến cả tổ chức này trong các lát cắt giải phẫu bệnh kiểm tra. Hiện nay nhiều nơi đã điều trị hóa chất trước khi khoét bỏ nhãn cầu nếu có nghi ngờ u xâm lấn ra ngoài nhãn cầu [43], [124], U nguyên bào võng mạc tái phát trong hốc mắt sau khoét bỏ nhãn cầu là do tế bào u còn sót mà không điều trị hóa chất sau khi khoét bỏ nhãn cầu. Đó có thể là do sót tế bào u mà lâm sàng và giải phẫu bệnh không nhận thấy hay không lấy hết u trong hốc mắt hay u còn lại trong thị thần kinh. Nếu u còn sót trong hốc mắt và di căn đặc biệt khi xâm lấn thị thần kinh, tỷ lệ tử vong là 68-100%. U xâm lấn ra ngoài nhãn cầu thường xuất hiện 6 tháng sau khi xuất hiện các triệu chứng chủ quan. U trong hốc mắt sẽ di căn máu và bạch mạch [124], [43], [42]. Chỉ có ít báo cáo về u nguyên bào võng mạc xâm lấn móng mắt, thể mi, tiền phòng, vùng bè và giác mạc. Không có báo cáo về kích thước u và các yếu tố nguy cơ đi kèm với u xâm lấn tiền phòng. Các dấu hiệu lâm sàng như tân mạch móng mắt và nhãn áp cao là dự báo của xâm lấn hắc mạc hay thị thần kinh [122], [43].

4.2. Kết quả phân tích xác định đột biến gen *RBI* trên bệnh nhân Việt Nam mắc UNBVM

Những hiểu biết về bệnh học phân tử và vấn đề di truyền của bệnh cùng với tiến bộ trong kỹ thuật Y học phân tử có ý nghĩa to lớn với hiểu biết, chẩn đoán và điều trị, theo dõi, tiên lượng bệnh. Giá trị của chẩn đoán Y học phân tử và tư vấn di truyền đã và đang giúp ngăn ngừa, giải quyết bệnh trong cộng đồng. Chẩn đoán sớm và các phương thức điều trị mới giúp cải thiện tiên lượng sống cho người bệnh, lên tới hơn 90% ở các nước phát triển.

Bệnh UNBVM gây nên bởi đột biến gen *RBI*. Cho đến nay cấu trúc gen, cơ chế phân tử gây bệnh đã được nghiên cứu một cách đầy đủ và rõ ràng. Gen *RBI* nằm ở nhánh dài nhiễm sắc thể 13, vùng 1, băng 4, băng phụ 2, ký hiệu: 13q14.2, chứa tổng cộng 27 exon và 26 intron. Gen *RBI* mã hóa cho một protein gồm 928 amino acid với trọng lượng phân tử 106.159 Da. ProteinRB có vai trò quan trọng đối với sự điều khiển chu kỳ tế bào và quá trình biệt hóa tế bào, tham gia vào sự chuyển pha G1/S bằng cách ức chế yếu tố phiên mã E2F cần thiết cho sự khởi đầu của pha S. Sự bất hoạt của gen *RBI* có tác động lớn nhất đến một quần thể nhỏ các tế bào tiền thân của tế bào nón trong quá trình phát triển võng mạc. Sự biểu hiện cao của gen *RBI* trong nhóm tế bào này chứng tỏ nó có vai trò rất lớn trong việc hạn chế phân chia và tăng sinh tế bào.

ProteinRB thường bị bất hoạt, cắt ngắn protein và mất chức năng bởi các đột biến xóa nucleotid (deletions) và đột biến vô nghĩa, đột biến lệch khung dịch mã trong khi đột biến sai nghĩa gây thay cấu trúc protein chính trong hầu hết các bệnh di truyền.

Đây là lần đầu tiên xét nghiệm sinh học phân tử được áp dụng trên một số lượng bệnh nhân lớn bệnh nhân mắc UNBVM tại Việt Nam. Trước đây đã có một số nghiên cứu nhưng trên một vài bệnh nhân mang tính báo cáo

trường hợp. Nghiên cứu này đã cho thấy một số trạng thái đột biến, phổ đột biến khác nhau trên bệnh nhân Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu cho thấy 24/43 (55,8%) bệnh nhân UNBVM được phát hiện có đột biến gen *RBI* và 19/43 (44,2%) bệnh nhân không phát hiện thấy đột biến gen *RBI*. Tỷ lệ đột biến phát hiện được đã được báo cáo trong các nghiên cứu trên thế giới dao động từ 19% đến 72% , [69], [77], [64], [66], [56], [81],... Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu trên 1020 bệnh nhân UNBVM tại Châu Âu, Bắc Mỹ và châu Á (49%) [66], tại New Zealand [82] hay tương tự như tỷ lệ đột biến phát hiện ở 192 bệnh nhân UNBVM tại Pháp (46%) [64]. Tại Châu Á tỷ lệ phát hiện đột biến của chúng tôi còn cao hơn ở một số nước như Nhật Bản [126], Trung Quốc [69], và tương đương tỷ lệ tại Malaysia [103], và thấp hơn đáng kể so với Singapor [68]. So với nhiều nghiên cứu khác ở châu Âu [65] và châu Phi [84] cũng như Mỹ Latin [79] và Israel [86].

Tỷ lệ đột biến trong UNBVM dao động có thể được giải thích là do trong các nghiên cứu sử dụng đa dạng các phương pháp khác nhau và cỡ mẫu nghiên cứu xác định các đột biến. Mạng lưới chất lượng phân tử châu Âu (EMQN) kiến nghị nên kết hợp hai hoặc nhiều hơn các phương pháp khác nhau để tăng độ nhạy phát hiện các đột biến RB1 [64], [86], [127].

Phân bố các đột biến trên toàn bộ gen *RBI*

Nghiên cứu phát hiện thấy 12 dạng đột biến trên 11 exon của gen *RBI*, chiếm tỷ lệ 66,7%. Đột biến trên intron chiếm tỷ lệ thấp hơn (33,3%) với 5 dạng đột biến khác nhau trên 5 vùng Intron.

Trong nghiên cứu này các đột biến khác nhau đã được phát hiện và được đối chiếu với trình tự chuẩn trên GenBank và tham khảo cơ sở dữ liệu *rb1-lovd.d-lohmann.de*. Nghiên cứu này đã phát hiện được các đột biến trải dài trên toàn bộ gen *RBI* ở vùng exon 3, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19, 20, 21, 24, 26 và

intron 2, 12, 13, 21, 24, 25. Trong đó đột biến ở vùng exon 12 và intron 25 chiếm tỉ lệ cao nhất, đột biến ở vùng exon 3, exon 8, 10, chiếm tỉ lệ cao thứ 2, tiếp theo là ở vùng exon 19, exon 20 và intron 13, các exon và intron còn lại chiếm tỷ lệ thấp (bảng 3.11).

Số liệu này khác với các công bố khác trên thế giới. Các dạng đột biến đã được phát hiện trên gen *RBI* ở 43 bệnh nhân UNBVM Việt Nam bao gồm: đột biến sai nghĩa, đột biến vô nghĩa, đột biến mất một hoặc nhiều nucleotid, đột biến trên intron làm ảnh hưởng đến quá trình cắt nối. Ngoài ra, nghiên cứu còn xác định được một số dạng đột biến mới và các đa hình thái đơn nucleotid xuất hiện với tỷ lệ cao trên bệnh nhân UNBVM.

Thống kê từ các nghiên cứu trên thế giới được Valverde và cộng sự cập nhật vào năm 2005 có 932 báo cáo đột biến gây bệnh, trong đó đột biến vô nghĩa có tỷ lệ cao nhất chiếm 42,4%, và đột biến gây lệch khung dịch mã (mất hoặc thêm nucleotid chiếm 27,3%, hai đột biến này (gây cắt ngắn pRB làm cho pRB mất chức năng) gặp nhiều nhất, các đột biến làm ảnh hưởng tới quá trình cắt nối splicing chiếm 20,8% và đột biến sai nghĩa chiếm 8,7% [58]. Nghiên cứu của Valverde và cộng sự (2005) còn tổng hợp trên 932 báo cáo bệnh nhân mang đột biến gen *RBI* cho thấy các exon có tỉ lệ đột biến cao là 9, 10, 14, 17, 18, 20 và 23. Trong đó exon có tỉ lệ cao nhất là exon 17 còn exon 14 có tỉ lệ đột biến thấp hơn [58]. Gần 40% đột biến gen *RBI* lặp lại và tập trung ở 16 điểm nóng, bao gồm 12 đột biến vô nghĩa, 2 đột biến sai nghĩa và 2 đột biến tại khớp nối Exon- intron. Các đột biến còn lại nằm rải rác trên toàn bộ gen *RBI*, thường xuyên nhất trong exon 9, 10, 14, 17, 18, 20 và 23.

Theo thống kê tại ngân hàng dữ liệu về bệnh UNBVM (<http://rb1-lovd.d-lohmann.de/>) cho tới thời điểm hiện tại có 3390 (tháng 03- 2019) đột biến trên toàn bộ gen *RBI* đã được báo cáo trên toàn thế giới bao gồm: đột biến thay thế nucleotid, đột biến lặp đoạn, đột biến thêm đoạn, đột biến xóa

đoạn, đột biến thêm/mất nucleotid (đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa, đột biến lệch khung dịch mã, đột biến tại khớp nối, đột biến xóa nucleotid). Các đột biến này vẫn hay gặp trên các exon 9, 10, 14, 17, 18, 20 và 23.

Tỉ lệ phát hiện đột biến trên các vùng Exon trọng điểm ở các nước khác nhau là khác nhau như Trung Quốc (19%), Singapore (42%) [89], [68]. Ngoài ra trong nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện đột biến trọng điểm trên 4 exon bao gồm: 8, 12, 13, 20.

Nghiên cứu của Tomar và cộng sự tại Singapore cho thấy vị trí xuất hiện đột biến nhiều nhất là exon 14 và 17 (cùng là 7/59 bệnh nhân). Sự khác nhau về vị trí đột biến trọng điểm này có thể giải thích do các quần thể nghiên cứu khác nhau có đặc điểm di truyền khác nhau, chủng tộc khác nhau dẫn đến các vị trí đột biến trọng điểm không tương đồng nhau [68].

Valvedre và cộng sự đã phát hiện đột biến trên 932 báo cáo khác nhau và tổng kết kết quả đã chỉ ra intron 6, 12, 16, 17, 19 và 24 có tỉ lệ đột biến cao. Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi gặp ở các Intron 2, 12, 13, 21, 25, các đột biến trên intron ảnh hưởng đến quá trình cắt nối tạo mRNA hoàn chỉnh (đột biến tại vị trí nối) chiếm tỉ lệ 37,5%, tiếp theo là đột biến lệch khung dịch mã (chiếm tỉ lệ 29,2%), đột biến sai nghĩa chiếm 20,8% , đột biến vô nghĩa chiếm 12,5%. Sự khác biệt này có thể do khác biệt về cấu trúc di truyền của các quần thể khác nhau có đặc điểm đột biến và phân bố đột biến khác nhau và có thể do cỡ mẫu nghiên cứu chưa đủ lớn.

4.2.1. Đột biến vô nghĩa (nonsense)

Dựa trên các công bố quốc tế, các công bố trên ngân hàng dữ liệu về đột biến *RBI* ở bệnh nhân UNBVM (<http://rb1-lovd.d-lohmann.de/>) và kết quả nghiên cứu của chúng tôi (Bảng 3.17) thấy rằng có 2 đột biến vô nghĩa quan trọng nhất và được công bố trên nhiều tài liệu quốc tế và có trong 3 BN trong nhóm nghiên cứu. 3 BN có đột biến vô nghĩa trong tổng số 24 BN phát hiện

đột biến (chiếm 12,5%) trong nghiên cứu và 2 đột biến vô nghĩa này đã được báo cáo trước đó.

*** Đột biến p.Trp99X (c.297G>A)**

Khi tiến hành giải trình tự toàn bộ gen *RBI* cho các bệnh nhân UNBVM, nhóm nghiên cứu phát hiện bệnh nhân RB54 mang đột biến thay thế nucleotid A thay thế thành G ở vị trí 297 trên chuỗi cDNA và dẫn đến bộ ba thứ 99 TGG mã hóa Triptophan chuyển thành mã kết thúc sớm TGA. Đây là đột biến dị hợp tử trên exon 3 gặp trên bệnh nhân RB54 và RB73, hai bệnh nhân này đều bị bệnh UNBVM thể hai mắt. Với protein RB có chiều dài 982 axit amin thì proteinRB trên những bệnh nhân đột biến này chỉ có 99 axit amin làm cho proteinRB mất đi chiều dài cần thiết và kèm theo đó là mất chức năng của gen *RBI* gây bệnh UNBVM. Đột biến này đã được một số tác giả công bố như:

Tác giả Blanquet công bố năm 1995 được nghiên cứu trên 232 bệnh nhân UNBVM do di truyền và không do di truyền [94].

Choy nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân Hồng Kong (Trung Quốc) và công bố năm 2002, trường hợp bệnh nhân của Choy là do đột biến tế bào gốc và bệnh ở thể một mắt, được phát hiện lúc 18 tháng [69].

Taylor báo cáo năm 2007 trên nhóm bệnh nhân người da trắng và phân tích đột biến tại Viện Curie ở Paris (Pháp) và bệnh nhân có tiền sử gia đình mang gen có đột biến này [73].

Babenko công bố năm 2002, đột biến được tìm thấy trên DNA ở khối u trên bệnh nhân thể một mắt [72].

*** Đột biến p.Tyr651X (c.1953T>A)**

Khi tiến hành giải trình tự toàn bộ gen *RBI* cho các bệnh nhân UNBVM, nhóm nghiên cứu phát hiện 2 bệnh nhân RB65 và RB71 mang đột biến thay thế nucleotid A thành T ở vị trí 1953 trên chuỗi cDNA, dẫn đến bộ ba thứ 651 TAT mã hóa Tyrosine chuyển thành mã kết thúc sớm TAA. Đây là đột biến dị hợp tử trên exon 19 thuộc vùng B của proteinRB, đây là vùng mã hóa có tính

bảo tồn cao, ngoài ra proteinRB thay vì có 982 axit amin như bình thường thì chỉ còn 651 axit amin làm proteinRB bị cắt ngắn và mất chức năng dẫn đến gây bệnh UNBVM. Đây là đột biến đã được Abidi và cộng sự báo cáo năm 2011 trên nhóm bệnh nhân Maroc, trên bệnh nhân đột biến tế bào gốc và thể bệnh hai mắt [83].

4.2.2. Bệnh nhân có đột biến lệch khung dịch mã (*frame-shift*)

*** Đột biến p.Val714* (c.2139delA)**

Khi tiến hành giải trình tự toàn bộ gen *RBI* cho các bệnh nhân UNBVM nhóm nghiên cứu phát hiện đột biến mất 1 nucleotid A tại vị trí 2139 trên trình tự cDNA ở BN RB70, bệnh nhân này bị bệnh thể hai mắt. Hệ quả của đột biến mất 1 nucleotid này làm thay đổi khung dịch mã, chuyển mã bộ ba GTG mã hóa cho axit amin Valine thành mã bộ ba kết thúc sớm TGA (stop codon). Đây là đột biến dị hợp tử trên exon 21 thuộc vùng B của proteinRB, vùng mã hóa này có tính bảo tồn cao trên proteinRB. Ngoài ra proteinRB thay vì có 982 axit amin thì chỉ còn 714 axit amin làm proteinRB bị cắt ngắn và mất chức năng từ đó gây bệnh UNBVM. Đột biến này đã được Houdayer và cộng sự báo cáo 2004 trên bệnh nhân Pháp, thể bệnh hai mắt và do đột biến dòng tế bào gốc [64].

*** Đột biến p.Ile124Argfs*6 (c.371_372delTA)**

Khi tiến hành giải trình tự toàn bộ gen *RBI* cho các bệnh nhân UNBVM nhóm nghiên cứu phát hiện đột biến xóa 2 nucleotid T và A tại vị trí 371 và 372 trên trình tự cDNA ở hai bệnh nhân RB57 và RB62. Hệ quả của đột biến xóa 2 nucleotid này là sự thay đổi khung dịch mã, biến đổi axit amin thứ 124 từ Isoleuxine thành Argine và tạo mã kết thúc sớm sau 6 codon kế tiếp. Đây là đột biến dị hợp tử trên exon 3, proteinRB bị dừng mã hóa chỉ có 130 axit amin thay vì đầy đủ 928 axit amin dẫn đến proteinRB bị cắt ngắn gây nên mất

chức năng và gây bệnh UNBVM. Hai bệnh nhân này đều bị bệnh thể hai mắt và có yếu tố gia đình là bố bị bệnh thể một mắt.

Đột biến này đã được báo cáo bởi tác giả Abidi và cộng sự vào năm 2011 trên bệnh nhân Maroc cũng ở thể hai mắt và đột biến dòng tế bào gốc [83].

*** Đột biến p.The345Serfs*6 (g.64424delCT, c1034- 1035delCT)**

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, nhóm nghiên cứu phát hiện đột biến xóa 2 nucleotid C, T tại vị trí 1034 và 1035 trên trình tự cDNA ở bệnh nhân mã số RB79. Hậu quả của đột biến xóa 2 nucleotid này là sự thay đổi khung dịch mã, biến đổi axit amin thứ 345 từ Theolin thành Serin và tạo mã kết thúc sớm sau 6 codon kế tiếp. Đây là đột biến dị hợp tử trên exon 10, proteinRB bị dừng mã hóa chỉ có 351 axit amin thay vì đầy đủ 928 axit amin dẫn đến proteinRB bị cắt ngắn gây nên mất chức năng và gây bệnh UNBVM. Bệnh nhân này bị bệnh thể hai mắt. Đây là một đột biến chưa được công bố trên cơ sở dữ liệu của thế giới. Đột biến này đã được phân tích trên phần mềm MutationTaster và Polyphen-2 để xác định khả năng gây bệnh. Kết quả dự đoán đột biến này có khả năng gây bệnh, tuy nhiên để khẳng định chắc chắn cần có nghiên cứu thực nghiệm trên tế bào hoặc động vật thực nghiệm để chứng minh ảnh hưởng của đột biến tới chức năng của protein.

Đột biến p.Pro232Serfs*8

Bằng kỹ thuật giải trình tự trên toàn bộ gen *RBI*, nhóm nghiên cứu đã phát hiện bệnh nhân mã số RB50 có đột biến dị hợp tử c.693-694insT trên Exon 7, đây là đột biến thêm nucleotide T vào giữa vị trí 693 và 694 trên trình tự cDNA. Đột biến này gây biến đổi axit amin tại vị trí 232 từ Prolin thành Serin và gây lệch khung tạo mã kết thúc sớm tại vị trí axit amin thứ 8 tính từ điểm đột biến. Đây là một đột biến chưa được công bố trên cơ sở dữ liệu của thế giới. Đột biến này đã được phân tích trên phần mềm MutationTaster và Polyphen-2 để xác định khả năng gây bệnh. Kết quả dự đoán đột biến này có

khả năng gây bệnh, tuy nhiên để khẳng định chắc chắn cần có nghiên cứu thực nghiệm trên tế bào hoặc động vật thực nghiệm để chứng minh ảnh hưởng của đột biến tới chức năng của protein.

*** Đột biến p.Gly893Serfs*24**

Bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ gen *RBI*, nhóm nghiên cứu đã phát hiện bệnh nhân mã số RB66 có đột biến dị hợp tử đột biến c.2677insT trên Exon 26, là đột biến thêm nucleotide T vào vị trí 2677 trên trình tự cDNA. Đột biến này gây biến đổi acid amin tại vị trí 893 từ Glycin thành Serin và gây lệch khung tạo mã kết thúc sớm tại vị trí axit amin thứ 24 tính từ điểm đột biến. Đây là một đột biến chưa được công bố trên cơ sở dữ liệu của thế giới. Đột biến này đã được phân tích trên phần mềm MutationTaster và Polyphen-2 để xác định khả năng gây bệnh. Kết quả dự đoán đột biến này có khả năng gây bệnh, tuy nhiên để khẳng định chắc chắn cần có nghiên cứu thực nghiệm trên tế bào hoặc động vật thực nghiệm để chứng minh ảnh hưởng của đột biến tới chức năng của protein.

4.2.3. Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa (Missense)

* **Đột biến p.Trp681Cys**: Khi tiến hành giải trình tự toàn bộ gen *RBI* cho các bệnh nhân UNBVM, nhóm nghiên cứu phát hiện bệnh nhân RB29 mang đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 2043G>T trên trình tự cDNA ở Exon 20 dẫn đến bộ ba thứ 681 mã hóa Tryptophan thành Cysteine làm thay đổi cấu trúc pRB đây là đột biến mới và chưa được báo cáo trước đó. Đột biến mới này ở Exon 20 trên gen *RBI* thuộc vùng B. Trong các đột biến tại các vùng mã hóa được bảo tồn cao là hai vùng A từ exon 12–18 và vùng B từ exon 19–23 của gen *RBI* từ đó mã hóa proteinRB thì dự đoán đột biến này có thể gây bệnh UNBVM tuy nhiên chúng ta vẫn cần nghiên cứu thêm. Đây là một đột biến chưa được công bố trên cơ sở dữ liệu của thế giới. Đột biến này đã được phân tích trên phần mềm MutationTaster và Polyphen-2 để xác định

khả năng gây bệnh. Kết quả dự đoán đột biến này có khả năng gây bệnh, tuy nhiên để khẳng định chắc chắn cần có nghiên cứu thực nghiệm trên tế bào hoặc động vật thực nghiệm để chứng minh ảnh hưởng của đột biến tới chức năng của protein.

*** Đột biến Phe162Tyr trên exon 4**

Giải trình tự gen *RBI* phát hiện bệnh nhân mã số RB51 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid thứ 42030T>A trên Exon 4 tại vị trí 485 trên trình tự cDNA dẫn đến bộ ba mã hóa chuyển từ Phenylalanine thành Tyrosine ở axit amin vị trí 162 trên pRB, đây là một đột biến mới chưa được công bố trong các báo cáo trước đây, tuy nhiên Phenylalanin và Tyrosin đều là các axit amin có gốc chứa nhân thơm do đó vẫn chưa thể kết luận được đột biến có gây bệnh UTVM hay không. Đột biến này đã được phân tích trên phần mềm MutationTaster và Polyphen-2 để xác định khả năng gây bệnh. Kết quả dự đoán đột biến này có khả năng gây bệnh, tuy nhiên để khẳng định chắc chắn cần có nghiên cứu thêm.

*** Đột biến p.Ser402Thr**

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, nghiên cứu đã phát hiện 03 bệnh nhân mã số RB6, RB31, RB69 có đột biến dị hợp tử do thay đổi T>A tại vị trí c.1204 trên Exon 12. Đột biến này gây biến đổi acid amin tại vị trí 402 từ Serin thành Threonin, đột biến này trên Exon 12 thuộc vùng A là vùng mã hóa pRB có tính bảo tồn cao và dự đoán có thể gây bệnh nên gặp trên nhiều bệnh nhân nhưng cũng có thể là SNP. Do vậy cần nghiên cứu thêm về các đột biến mới xuất hiện trên quần thể người Việt Nam.

4.2.4. Đột biến tại vị trí nối exon- intron (Splicing)

*** Đột biến c.2664-10T>A trên Intron 25**

Giải trình tự toàn bộ gen RB1 của bệnh nhân UNBVM thấy nucleotid A thay thế T tại vị trí g.174351T>A trên intron 25 (bệnh nhân RB10, RB11,

RB75, RB78) đây là dạng đột biến đồng hợp tử tại vị trí nối exon- intron, ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein RB. Đột biến này đã được các tác giả báo cáo trước đó lúc đầu tương ứng với một đa hình đơn nucleotid được báo cáo bởi Yandell và Dryja cùng vào năm 1989 [23], [128]. Sau đó đã được một số tác giả chứng minh là đột biến gây bệnh như Kiran, Kontic, Nichols, Dalamon và đặc biệt Barbosa phát hiện trên một trường hợp sinh tư trong thụ tinh trong ống nghiệm IVF và ông đã chứng minh đột biến này gây bệnh UNBVM [78], [66], [67], [93], [55].

*** Đột biến c.1333-2A>G trên Intron 13**

Bệnh nhân mã số RB59 phát hiện thấy dạng đột biến ở vùng intron 13 do thay thế nucleotid ở vị trí g.76428 từ A thành G trên gen *RBI*. Đây là đột biến thay thế nucleotid tại vị trí nối exon- intron làm ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein RB. Đột biến c.1333-2A>G ở intron 13 này được công bố là gây bệnh UNBVM tại Canada vào năm 2003 và được cập nhật trên trang <http://rb1-lovd.d-lohmann.de> [50].

*** Đột biến c.861G>A trên Exon 8**

Đột biến này là thay đổi nucleotid G thay cho A ở vị trí g.59793G>A trên Exon 8 ở bệnh nhân RB5 đây là đột biến tại vị trí nối exon- intron và đã được tác giả Price và cộng sự báo cáo năm 2014 [91].

*** Đột biến c.265- 1G>T trên Intron 2**

Giải trình tự gen *RBI* phát hiện bệnh nhân mã số RB55 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid G thành T ở vùng intron 2 (g.39445 G>T), ngay phía trước bộ ba đầu tiên mã hóa cho exon 3 của gen. Đây là hai đột biến thay thế nucleotid tại vị trí nối exon- intron (splicing) ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức

năng của protein RB. Đây là đột biến gây bệnh đã được báo cáo trên trang <http://rb1-lsdb.d-lohmann.de>.

*** Đột biến c.2520+1_c.2520+4del (intron24)**

Kết quả giải trình tự gen *RBI* của bệnh nhân mã số RB61 cho thấy bệnh nhân có đột biến xóa 4 nucleotid TGAG tại intron 24 (từ vị trí 2520+1 đến 2520+4) trên trình tự cDNA. Đây là dạng đột biến tại vị trí nối exon- intron, ảnh hưởng đến quá trình cắt nối và tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein RB đột biến này đã được báo cáo trên trang <http://rb1-lsdb.d-lohmann.de> (ký hiệu LOVD).

4.2.5. Các đột biến mới

*** Đột biến p.Trp681Cys (c.2041G>T trên Exon 20)**

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, nghiên cứu đã phát hiện bệnh nhân mã số RB29 có đột biến dị hợp tử c.2041G>T đột biến trên Exon 20, là đột biến thay đổi nucleotide T thay cho G tại vị trí 2043 trên trình tự cDNA. Đột biến này gây biến đổi acid amin Tryptophan tại vị trí 681 thành Cystein, từ đó làm thay đổi cấu trúc pRB. Đây là đột biến nằm trên vùng mã hóa cho vùng của proteinRB, vùng này có tính chất mã hóa di truyền cao và tính bảo tồn cao trên proteinRB và được nghiên cứu trên phần mềm Mutations taster và Polyphen- 2 để xác định là đột biến có gây bệnh. Đột biến này là đột biến mới chưa từng được báo cáo trước đó bởi vậy cần được nghiên cứu thêm.

*** Đột biến c.1312delT trên Exon 13**

Đột biến này là đột biến xóa một nucleotid T ở vị trí g.73849delT ở bệnh nhân có mã số RB76, đột biến dị hợp tử gây lệch khung dịch mã ở vị trí c.1312 trên trình tự cDNA, đột biến này ở trên bệnh nhân bị bệnh ở cả hai mắt. Đột biến nằm ở vùng mã hóa được bảo tồn cao là hai vùng A (exon 12–18) và B (exon 19–23) của proteinRB, bởi vậy được xác định là có thể gây bệnh UNBVM, tuy nhiên vẫn cần nghiên cứu thêm.

Trong số các đột biến mới trên thì có một số đột biến nằm ở các vùng mã hóa được bảo tồn cao là hai miền A (exon 12–18) và B (exon 19–23) của proteinRB. Những đột biến này tương đương với vị trí trên vùng A (axit amin 379- 645) và vùng B (axit amin 646-772) và toàn bộ vùng A/B (axit amin 379-869) của proteinRB. Khu vực này đã được công nhận là cần thiết cho sự tham gia trong việc kiểm soát sự phát triển của tế bào [129].

* Tư vấn di truyền

Hiện nay việc xác định yếu tố gây ra đột biến gen vẫn chưa rõ ràng (tia X, vi rút, tử ngoại và hút thuốc lá). Các dạng đột biến gen là đột biến điểm, mất đoạn lớn nhỏ, methyl hóa quá mức gen khởi động gây chặn quá trình sản xuất proteinRB và hiếm gặp hơn là đảo lộn trật tự DNA (chromothripsis). Đa số đột biến là xuất hiện hoàn toàn mới, đặc thù với một gia đình. Nhưng cũng có những đột biến lặp lại hay xảy ra ở vị trí “đảo” CpG trên DNA (chiếm đến 22% đột biến). Các nghiên cứu thấy đột biến xảy ra trước khi thụ thai hay ở tế bào sinh dục người cha (có lẽ do quá trình phân bào xảy ra nhanh) hơn là tế bào sinh dục người mẹ. Tuổi cha cao cũng là yếu tố nguy cơ gây đột biến. Với đột biến mới, bất thường xảy ra trên nhiều tế bào võng mạc nên sẽ có nhiều khối u và bệnh ở hai mắt. Nếu đột biến xảy ra sau thụ thai thì chỉ một số nhỏ tế bào bị mắc đột biến (hiện tượng thể khảm).

Tùy theo loại đột biến gen *RBI* thấy đa số (nhưng không phải tất cả) đều mắc UNBVM hay mắc bệnh ung thư khác trong suốt cuộc đời. Mỗi con cái của người mang gen *RBI* đột biến đều có 50% nguy cơ di truyền gen bệnh cho thế hệ sau. Các nghiên cứu trên thế giới hay sử dụng chỉ số DER (Disease Eye ratio, bệnh - mắt) tức là số mắt bị khối u chia cho số người có mang đột biến gen *RBI*). Đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã ở tế bào gốc gây mất chức năng pRB hoàn toàn hay mất đoạn gen làm proteinRB bị cắt ngắn mất cấu trúc và gây mất chức năng proteinRB, từ đó gây mắc UNBVM hai mắt

khoảng 90% do thâm nhập hoàn toàn ($DER = 2$). Đột biến một phần với *RBI* còn chức năng có mức độ thâm nhập và biểu hiện thay đổi thì khối u ít hơn và xuất hiện muộn hơn, thậm chí một số người không bao giờ mắc UNBVM ($DER = 1-1,5$).

Hiện nay ở Việt Nam, tư vấn di truyền UNBVM vẫn do bác sĩ Nhãn nhi khi khám mắt trực tiếp cho bệnh nhân đảm nhiệm. Cho nên các khái niệm cơ bản cần được hiểu và thực hiện là:

- Nếu có tiền sử gia đình, u nguyên bào thể 2 hai mắt hay u ba vị trí, hay xét nghiệm thấy đột biến gen *RBI* thì gọi là H1. Xét nghiệm H1 thấy đột biến di truyền cần theo dõi khối u mắt từ lúc sinh.

- Nếu không có những đặc điểm của H1 đó trước khi xét nghiệm là HX.

- H0 để chỉ những người trong gia đình không có đột biến như người mắc bệnh đầu tiên trong gia đình (hay còn gọi chung là phả hệ: Proband). H0 chỉ bệnh nhân xét nghiệm máu không thấy đột biến tế bào khối u và cha mẹ không mang đột biến như con họ. Nguy cơ vẫn còn $< 1\%$ do hiện tượng khảm. Con cái của những người H0 không có đột biến gen *RBI* vẫn là H0.

Tư vấn di truyền là một quá trình mang tính chất tâm lý và hỗ trợ, tư vấn trước sau sinh, giáo dục nhằm hỗ trợ bệnh nhân và gia đình họ thích ứng với nguy cơ di truyền cho thế hệ sau và ra quyết định cần làm gì khi mang gen bệnh. Khi không có xét nghiệm xác định đột biến gen thì tư vấn di truyền lại càng quan trọng. Kết quả xét nghiệm gen làm cho tư vấn di truyền thêm chính xác và tập trung vào những người cần (có mang đột biến gen *RBI*) và sẽ tiết kiệm được chi phí cho việc xét nghiệm ở tất cả các thành viên trong gia đình.

Nếu người bệnh đầu tiên mắc bệnh thể hai mắt, xác suất thấy đột biến tế bào gốc từ máu là cao (97%). Nhưng ở 3% bệnh nhân bị u hai mắt, không phát hiện thấy đột biến gen *RBI* trong máu. Khi đó phát hiện thấy đột biến ở tế bào khối u mang ý nghĩa quan trọng trong việc xác định đột biến tế bào

gốc, bao gồm cả hiện tượng khảm. Có 15% bệnh nhân có u một mắt có đột biến tế bào gốc, cần xét nghiệm tế bào khối u và tế bào máu. Nếu máu không tìm thấy đột biến, nguy cơ đột biến tế bào gốc giảm xuống < 1% với cha mẹ, anh chị em ruột. Chất lượng xét nghiệm tùy thuộc vào chất lượng tế bào và DNA, như tế bào được bảo quản với EDTA thì chất lượng sẽ tốt hơn. Có nhiều dạng đột biến gen và có rất nhiều kỹ thuật phát hiện. Việc lựa chọn xét nghiệm nào tùy thuộc vào bệnh cảnh lâm sàng. Một số lưu ý với xét nghiệm đột biến gen:

- Giải trình tự gen thế hệ kế tiếp NGS (Next Generation Sequencing) nhằm phát hiện đột biến mới ở người mắc bệnh đầu tiên trong phả hệ và có thể phát hiện đột biến ở mức độ khảm tỷ lệ thấp. Để sàng lọc các thành viên trong gia đình đã biết đột biến gen *RB1* nhờ giải trình tự, phương pháp Dideoxy Sanger rất tốn kém và mất thời gian.

- Với mất đoạn exon trên gen *RB1* lớn hay lặp đoạn exon trên gen chiếm toàn bộ chiều dài exon hay nhiều exon khác nhau mà không thể phát hiện bằng giải trình tự trực tiếp cDNA. Có các phương pháp khác như MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), QM-PCR (Quantitative Multiplex PCR) hay aCGH (array comparative genomic hybridization).

- Xét nghiệm phát hiện chỉ thị vi ỏ trên nhiễm sắc thể 13 cũng được dùng để tìm hiện tượng mất tính dị hợp của tế bào máu so với khối u.

- Các yếu tố không phải gen (epigenetic) khởi phát UNBVM như methyl hóa quá mức gen khởi động gây ức chế sao chép gen *RB1* bất thường ở 10-12% khối u.

- Hiếm hơn, có trường hợp không phát hiện thấy đột biến ở gen trong máu bệnh nhân bị khối u hai mắt. Để phát hiện ra đột biến gen *RB1* này hiện nay nhờ kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcriptase - PCR) và xét nghiệm RNA có thể làm rõ vai trò của biến đổi ở intron.

- Các kỹ thuật bản đồ nhiễm sắc thể, xét nghiệm FISH (Fluorecent In Situ Hybridization) hay Karotyp nhằm phát hiện mất đoạn lớn hay mất đoạn NST ở tế bào máu ngoại vi.

Bác sĩ Di truyền cũng phải tư vấn trước sinh với lần có thai tiếp theo. Các thành viên trong gia đình có nguy cơ cần xét nghiệm máu xác định đột biến gen RB1. Nếu đột biến có ở người mắc bệnh đầu tiên không được tìm thấy ở cha mẹ, vẫn còn nguy cơ mắc bệnh thể khảm xuất hiện với tỷ lệ thấp. Con cái của một thành viên gia đình mang đột biến gen RB1 cần được xét nghiệm trong khi có thai hay ngay sau khi sinh. Nếu người mắc bệnh đầu tiên có thể khảm với đột biến *RBI*, cha mẹ và anh em ít có nguy cơ vì thể khảm không di truyền. Cần xét nghiệm sớm con cái người mắc bệnh đầu tiên có khảm vì nếu trẻ được truyền alen đột biến, khả năng bị bệnh hai mắt cao. Nếu trẻ không mang đột biến thể tế bào gốc thì nguy cơ mắc UNBVM như tỷ lệ chung trong cộng đồng ở thể không do di truyền.

Xét nghiệm xác định có đột biến tế bào gốc hay không có ý nghĩa quan trọng nhằm tránh cho trẻ không phải khám mắt nhiều lần đặc biệt khám dưới gây mê. Nếu không có đột biến tế bào gốc, không cần phải khám mắt lành nhiều lần và khám dưới gây mê. Nếu trẻ có đột biến tế bào gốc hay có hiện tượng khảm, khả năng xuất hiện khối u đòi hỏi phải khám liên tục cho đến khi trẻ được ít nhất trên 3 tuổi. Nguy cơ ung thư thứ phát cao ở trẻ có đột biến tế bào gốc nên phải theo dõi hàng năm.

Phương pháp lấy máu ngoại vi để xét nghiệm xác định đột biến gen di truyền cũng được đặt ra khi có thai. Sinh thiết rau thai qua đường âm đạo hay qua thành bụng lúc thai 11-14 tuần tuổi. Tỷ lệ xảy thai là 1%. Trong khi đó sinh thiết ối có tỷ lệ xảy thai là 0,1-0,5%. Nếu thai không có đột biến có thể kéo dài tiếp tục quá trình thai nghén. Nếu thai có mang đột biến, cha mẹ có

nhiều lựa chọn: hoặc kết thúc thai kỳ hay tiếp tục thai kỳ cho sinh ra sau đó khám phát hiện sớm khối u và điều trị.

Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF-In vitro fertilization) để xét nghiệm phôi lúc giai đoạn 8 tế bào. Phôi không có đột biến mới được cấy vào buồng tử cung. Tuy nhiên phương pháp này tốn kém nên chỉ một số nước phát triển mới được bảo hiểm chi trả. Gia đình không hiểu ý nghĩa của xét nghiệm gen và tư vấn di truyền. Bảo hiểm không chi trả việc xét nghiệm gen. Đó là lý do làm cho bệnh xuất hiện nhiều và muộn, tạo gánh nặng lớn cho gia đình và xã hội. Ví dụ ở Trung Quốc, chính phủ cho phép gia đình có trẻ mắc bệnh có thêm con làm thúc đẩy người dân đi xét nghiệm và được bác sĩ tư vấn di truyền. Một số nước không thể làm xét nghiệm di truyền trong lúc thụ tinh trong ống nghiệm để chắc chắn mắc bệnh hay không mới cấy phôi thai vào buồng tử cung để giữ thai nên tư vấn di truyền sau sinh là giải pháp duy nhất với các gia đình có trẻ mắc bệnh cũng như khám và điều trị sớm để bảo tồn mắt và tính mạng. Bác sĩ chuyên khoa Mắt nên xây dựng chiến lược sàng lọc UNBVM rộng rãi và tuyên truyền đầy đủ trên truyền thông cũng như khám phát hiện sớm và điều trị kịp thời cho bệnh nhân.

4.3. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và đột biến gen *RB1*

Kể từ khi Mendel quan sát các kiểu hình khác nhau của đậu Hà Lan, kiểu hình đã được nghiên cứu để xác định một cách hệ thống các nguyên nhân các bệnh do các đột biến di truyền gây nên. Tương tự như vậy từ các mối liên quan kiểu gen- kiểu hình ở một số bệnh lý ở người có thể được phân tích chỉ khi có xác định được đột biến gen rõ ràng và kiểu hình tương đối đồng nhất. Vì các xét nghiệm xác định đầy đủ và mở rộng để tìm thông tin di truyền không khả thi về mặt kỹ thuật hoặc hiệu quả kinh tế, về chi phí. Trước khi ra đời phương pháp giải trình tự trực tiếp, các nhà khoa học đã nghiên cứu các gia đình bệnh nhân có đặc điểm lâm sàng có tính chất đặc trưng để thu hẹp,

loại trừ dần và xác định đột biến gen hợp lý. Tuy nhiên bị hạn chế để tìm ra các đột biến hoặc bệnh có tính chất gia đình rõ mà không tìm thấy đột biến gen gây bệnh. Do đó các nghiên cứu sinh học phân tử, di truyền trước khi có giải trình tự trực tiếp đã đánh giá một cách hệ thống các phá hệ, số lượng biến thể di truyền thực sự. Hiểu được mức độ và nguồn gốc của bệnh, của các biến thể này là rất quan trọng trong ứng dụng chẩn đoán, lựa chọn điều trị và chăm sóc, lâm sàng dựa nhiều vào dự đoán kiểu hình và từ các hình thái đột biến. Đối với nhiều bệnh do đột biến gen, các bệnh chỉ do đột biến một gen hay biến thể di truyền đơn lẻ (các đa hình đơn nucleotide, đột biến lệch khung dịch mã, đột biến xóa, đột biến lặp lại) thường là những yếu tố dự báo tốt về bệnh cảnh lâm sàng. Tuy nhiên đối với hầu hết các bệnh có phổ đột biến rộng và phức tạp) thì tiên lượng chẩn đoán và điều trị là thách thức vì các cơ chế di truyền phức tạp. Sự ra đời của giải trình tự trực tiếp mang lại hiệu quả xác định đột biến trên toàn bộ chiều dài các gen gây bệnh, từ đó dẫn đến một sự bùng nổ của những khám phá về các đột biến gen mới được tìm thấy. Từ đó các nghiên cứu mối liên quan kiểu gen - kiểu hình ngày càng được nghiên cứu sâu rộng hơn. Trong các nghiên cứu về bệnh đột biến gen và di truyền, các alen có khả năng gây bệnh đã được phát hiện qua xét nghiệm giải trình tự gen được xác định ở bệnh nhân và gia đình họ.

Bệnh u nguyên bào võng mạc là do đột biến gen trội trên nhiễm sắc thể thường với hơn 3000 đột biến khác nhau trên toàn thế giới. Nghiên cứu của chúng tôi có 43 bệnh nhân phát hiện được 24 bệnh nhân mang 10 đột biến khác nhau đã được công bố và 7 đột biến mới.

Các bệnh nhân này có đặc điểm lâm sàng, chẩn đoán hình ảnh và giải phẫu bệnh đa dạng và điển hình. Bởi vậy để giúp cho quá trình chẩn đoán sớm, điều trị kịp thời và tư vấn di truyền cho bệnh nhân và người nhà trong

gia đình cũng như chẩn đoán trước sinh và quản lý thai ngen một cách chính xác, chúng tôi tiến hành phân tích mối liên quan kiểu gen- kiểu hình cho các bệnh nhân có đột biến gen RB trong quần thể người Việt Nam.

4.3.1. Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen *RB1*

Kết quả từ bảng 3.14 Và biểu đồ hình 3.14 Tuổi phát hiện bệnh khi đi khám lần đầu ở lứa tuổi < 6 tháng có số bệnh nhân đột biến gen cao nhất là 9 BN (37,5%) sau đó đến lứa tuổi từ 6 đến 12 tháng có 6 BN (25%) và tỷ lệ thấp nhất là lứa tuổi > 36 tháng chỉ có 1 BN (4,16%). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê $p = 0,224$ ($p > 0,05$)

Mối liên quan giữa đột biến gen *RB1* trong bệnh UNBVM và tuổi phát hiện bệnh là tuổi của bệnh nhân đi khám bệnh và được chẩn đoán xác định bệnh lần đầu tiên hoặc khi khối u được khám lần đầu và được đánh giá phân nhóm khối u theo phân nhóm quốc tế ở mắt bệnh.

Theo nghiên cứu của Lohmann và cộng sự năm 1996, đây là báo cáo đầu tiên trên thế giới nghiên cứu xem có mối liên quan đến đặc điểm lâm sàng của bệnh UNBVM và đột biến gen *RB1* hay là mối liên quan kiểu hình- kiểu gen trên bệnh nhân UNBVM. Tác giả kết luận không thấy mối liên quan giữa các đột biến gen *RB1* với tuổi phát hiện bệnh ở nhóm bệnh nhân nghiên cứu cũng như mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và vị trí của đột biến trên các exon của gen *RB1*. [60]. Cũng theo tác giả Lohmann và cộng sự khẳng định năm 2004 thì sự phân bố lứa tuổi khi chẩn đoán phát hiện bệnh không khác nhau giữa các bệnh nhân có hay không có đột biến gen *RB1* [45]. Tuổi khi khám bệnh và được chẩn đoán lần đầu không giúp chẩn đoán xác định người mang gen *RB1* đột biến gen ở những bệnh nhân thể bệnh một mắt không do di truyền. Điều này khuyến khích xét nghiệm xác định đột biến gen *RB1* ở tất cả trẻ em bị UNBVM bất kể tuổi được chẩn đoán.

Nghiên cứu của Choy và cộng sự trên nhóm bệnh nhân Trung Quốc không tìm thấy có mối liên quan về đột biến gen RB cũng như các dạng đột biến gen RB1 với tuổi phát hiện bệnh [69].

Nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân Ấn Độ của tác giả Ata-ur-Rasheed và cộng sự cũng không tìm thấy mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng như tuổi phát hiện bệnh, mức độ nặng của bệnh với đột biến gen *RBI* trên bệnh nhân UNBVM [87].

Nghiên cứu trên bệnh nhân Israel năm 2016 không thấy có mối liên quan nào giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen *RBI*, cũng như sự khác biệt của các dạng đột biến khác nhau ảnh hưởng lên tuổi khi phát hiện bệnh [86].

Nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân Thái Lan không thấy mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen *RBI*. Tuy nhiên tác giả thấy rằng ở một bệnh nhân có mắt bệnh ở giai đoạn muộn có khối u xuất ngoại sớm nhất là 15 tháng và tương tự như bệnh nhân có khối u chưa xuất ngoại. Tác giả cho rằng các bệnh nhân bị xuất ngoại có đột biến gen RB1 có thể chịu trách nhiệm cho sự khởi đầu của bệnh UNBVM ở độ tuổi sớm hơn. Điều này là do các bệnh nhân bị xuất ngoại có đột biến gen *RBI* có thể chịu trách nhiệm cho sự khởi đầu của bệnh UNBVM do đó được xác định ở độ tuổi sớm hơn [130].

Trong các trường hợp chẩn đoán và phát hiện bệnh muộn khi bệnh đã ở giai đoạn D, E. Đặc biệt một số bệnh nhân khối u đã xâm lấn bán phần trước và xuất ngoại hay xâm lấn hốc mắt. Các nghiên cứu trước đây của một số tác giả đã báo cáo rằng khối u xuất ngoại thường được xác định trong các trường hợp bệnh thể một mắt [131], [132] mặc dù các nghiên cứu xác định những bệnh nhân này có khối u xuất ngoại ở bệnh nhân không có đột biến gen *RBI*. Từ đó các tác giả cho rằng chẩn đoán muộn là một yếu tố nguy cơ cao cho

sự xuất hiện của khối u xuất ngoại, thường ở độ tuổi trung bình trên 3,5 năm [131], [132].

Nghiên cứu của Sethi cũng cho rằng không có mối liên quan giữa tuổi chẩn đoán phát hiện bệnh với đột biến gen *RBI*, tác giả cho rằng bệnh nhân ở giai đoạn muộn có khối u xuất ngoại thường có độ tuổi được chẩn đoán xác định trung bình trên 3,5 tuổi (3.6 ± 1.9 tuổi) là do bệnh nhân được tiếp cận chẩn đoán muộn khi khối u đã to gây xâm lấn bán phần trước và hốc mắt [133].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi khi chẩn đoán phát hiện bệnh ở những bệnh nhân giai đoạn D, E sớm nhất là 2 tháng và bệnh ở giai đoạn D, E gặp ở mọi lứa tuổi ở bệnh nhân có mang đột biến gen *RBI* và cũng tương tự như nhiều bệnh nhân không mang đột biến gen *RBI*. Điều này chứng tỏ mặc dù có hay không có mang đột biến gen *RBI* thì tuổi phát hiện bệnh ở các nhóm phân loại sớm hay muộn là tương đương nhau.

Các nghiên cứu trước đây đã được tác giả Valverde tổng kết và cập nhật vào năm 2005 cho thấy rằng các đột biến tại vị trí nối có liên quan đến các kiểu hình bệnh khởi phát muộn hơn dẫn đến tuổi phát hiện bệnh muộn hơn so với các bệnh nhân mang đột biến vô nghĩa, lệch khung và đột biến sai nghĩa [58]. Tuy nhiên, chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt về tuổi khi chẩn đoán ở các nhóm đột biến khác nhau và nghiên cứu của chúng tôi tương tự với báo cáo từ nhóm tác giả nghiên cứu trên bệnh nhân Israel [86] và nghiên cứu của các tác giả Thái Lan [130]

4.3.2. Mối liên quan giữa yếu tố nguy cơ cao và đột biến gen *RBI*

Kết quả từ bảng 3.14 Và biểu đồ hình 3.15 Trong số 19 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao gây di căn thì có 59,7% bệnh nhân mang đột biến gen *RBI*

(11 bệnh nhân), cao hơn số bệnh nhân không mang đột biến gen *RBI* (8 BN chiếm 42,1%). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Nghiên cứu đầu tiên trên thế giới tìm hiểu về mối liên quan kiểu gen-kiểu hình UNBVM của nhóm tác giả Lohmann năm 1996 đã kết luận rằng không có mối liên quan nào giữa đột biến gen *RBI* và yếu tố nguy cơ cao gây di căn ở trên nhóm bệnh nhân nghiên cứu.

Trong nghiên cứu của Josseph và cộng sự trên nhóm bệnh nhân Ấn Độ, tác giả cho rằng không có mối liên quan nào giữa các đột biến gây cắt ngắn proteinRB trong các đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã với yếu tố nguy cơ cao khi làm xét nghiệm giải phẫu bệnh trên mắt bị cắt bỏ [51], đây là các đột biến ảnh hưởng đến cấu trúc proteinRB và thường được dự đoán gây bệnh sớm và nặng ở những bệnh di truyền do đột biến gen.

Nghiên cứu của tác giả Albrecht và cộng sự năm 2005 kết luận không tìm thấy mối liên quan giữa đột biến gen và yếu tố nguy cơ cao gây di căn trên bệnh nhân UNBVM trong nhóm nghiên cứu. Đặc biệt là các dạng đột biến gây cắt ngắn proteinRB như đột biến vô nghĩa và đột biến lệch khung dịch mã [88].

Ngoài ra trong một số nghiên cứu trước đây các tác giả như Choy, Ataur-Rasheed cũng không thấy mối liên quan giữa đột biến gen *RBI* và mức độ nghiêm trọng của bệnh UNBVM mặc dù trong phân loại và đánh giá mức độ nghiêm trọng của bệnh thì có yếu tố nguy cơ cao trên mắt bệnh nhân đã điều trị cắt bỏ nhãn cầu là một trong những tiêu chí để xếp loại bệnh nhân có mức độ nghiêm trọng cao nhất là mức độ nặng [69], [87].

4.3.3. Mối liên quan giữa mức độ nặng của bệnh với đột biến gen *RBI*

Kết quả từ bảng 3. 15: Trong nhóm bệnh nhân có đột biến gen thì bệnh mức độ nặng là 17 bệnh nhân (chiếm 39,5%) cao hơn nhóm bệnh nhân không

có đột biến gen với mức độ nặng có 15 bệnh nhân chiếm 34,9%. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Nghiên cứu của Choy và cộng sự trên nhóm 40 bệnh nhân Trung Quốc không tìm thấy bất cứ mối liên quan về đột biến gen RB cũng như các dạng đột biến gen *RBI* với giai đoạn của bệnh, u tiên triễm hay yếu tố nguy cơ cao để chứng minh mức độ nghiêm trọng của bệnh [69].

Nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân Ấn Độ của tác giả Ata-ur-Rasheed và cộng sự cũng không tìm thấy mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng như mức độ nghiêm trọng của bệnh UNBVM với đột biến gen *RBI* trên bệnh nhân [87].

Nghiên cứu của He và các cộng sự trên nhóm bệnh nhân Trung Quốc [89] chỉ ra rằng sự phân bố mức độ nghiêm trọng của bệnh UNBVM theo phân loại ICRB, tác giả suy đoán rằng nhóm E trong nghiên cứu của họ là do thiếu tiếp cận chăm sóc sức khỏe ban đầu cho bệnh nhân.

Gần đây nhất là nghiên cứu của Frenkel và cộng sự trên bệnh nhân Israel công bố năm 2016 trên 149 bệnh nhân UNBVM cũng không thấy có mối liên quan nào giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen *RBI*, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng không có mối liên quan nào giữa mức độ nặng của bệnh với đột biến gen *RBI*, tác giả còn bổ sung các dữ liệu để so sánh cho các bệnh nhân ở những nơi chăm sóc y tế phát triển và đầy đủ. Tác giả cũng kết luận không có sự khác biệt của các dạng đột biến khác nhau ảnh hưởng hay liên quan đến tuổi phát hiện bệnh trên bệnh nhân [86].

Nghiên cứu của tác giả Taylor và cộng sự công bố năm 2007 trên bệnh nhân Pháp, tác giả mô tả sự phân bố của các loại đột biến. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi có nhiều bệnh nhân có sự sắp xếp lại lớn hơn và ít bệnh nhân hơn đột biến tại các vị trí mối nối, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê hoặc lâm sàng.

4.3.4. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và dạng đột biến gen RB1

Kết quả ở bảng 3.16 cho thấy tuổi trung bình khi chẩn đoán phát hiện bệnh UNBVM ở nhóm mang đột biến vô nghĩa thấp nhất và cao nhất là nhóm bệnh nhân mang đột biến lệch khung dịch mã, mặc dù hai đột biến này đều tạo mã kết thúc sớm. Khi so sánh mối liên quan giữa 4 nhóm đột biến này với tuổi phát hiện bệnh thì thấy rằng sự khác biệt giữa các nhóm là không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Tuổi trung bình khi chẩn đoán phát hiện bệnh không khác nhau giữa các bệnh nhân có các dạng đột biến khác nhau khi phân tích bằng phép toán Anova. Chẩn đoán và phát hiện bệnh muộn không liên quan đến các dạng đột biến. Phân tích cho bệnh nhân bị đột biến dẫn đến tạo mã kết thúc sớm: đột biến vô nghĩa và đột biến lệch khung so với bệnh nhân có đột biến vị trí nối và đột biến sai nghĩa bằng phép toán Fisher.

4.3.4.1. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng với đột biến tạo mã kết thúc sớm

Hai dạng đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã đều đưa đến hậu quả là proteinRB bị cắt ngắn và tạo thành một proteinRB không hoàn chỉnh dẫn đến mất chức năng và gây bệnh u nguyên bào võng mạc.

Theo các báo cáo trên thế giới thì đột biến vô nghĩa được xác định là hay gặp nhất ở những bệnh nhân mắc bệnh thể di truyền và bệnh nhân thể bệnh hai mắt, sau đó là đột biến lệch khung dịch mã, tuy nhiên các nhà khoa học cũng thấy rằng đột biến sai nghĩa hay đột biến tại vị trí nối exon- intron cũng có tỷ lệ cao gây bệnh UNBVM thể hai mắt bị bệnh. Ngoài ra có những bệnh nhân thể một mắt bị bệnh sau thời gian điều trị và theo dõi mắt còn lại cũng có thể bị bệnh nhưng muộn hơn [89], [85], [134], [68], [106], [86]

Theo bảng 3.17 : Trong nghiên cứu của chúng tôi có 3 BN có đột biến vô nghĩa trong tổng số 24 BN phát hiện đột biến (12,5%) tất cả 3 BN đều thể bệnh hai mắt (100%), tuổi phát hiện bệnh sớm trước 6 tháng. Chủ yếu mắt bên nặng thuộc nhóm E, D, mắt còn lại là nhóm A, B. Tiền sử gia đình chỉ có một BN RB54 là có bố bị bệnh UNBVM thể một mắt đã bỏ nhãn cầu lúc nhỏ đây là trường hợp di truyền rõ ràng. Có một BN có yếu tố nguy cơ cao.

Theo bảng 3.18: Trong nghiên cứu của chúng tôi có 6 BN có đột biến lệch khung dịch mã trong tổng số 24 BN phát hiện đột biến (16,7%). Có 02 BN có tiền sử gia đình trong đó: BN RB57 có bố bị bệnh thể một mắt ở MP đã bỏ nhãn cầu lúc nhỏ, em trai cũng bị bệnh thể hai mắt

Tất cả bệnh nhân đều thể hai mắt và 5/6 BN phát hiện bệnh trên 1 tuổi và không có yếu tố nguy cơ cao, những bệnh nhân này đều mang đột biến đã được báo cáo trước đó. Có hai bệnh nhân mang đột biến mới nhưng giải phẫu bệnh có yếu tố nguy cơ cao

Nghiên cứu mối liên quan kiểu hình- kiểu gen hay đặc điểm lâm sàng với kiểu gen trong các bệnh lý do đột biến gen hay di truyền rất quan trọng đối với việc tư vấn di truyền cho các bệnh nhân và gia đình bệnh nhân u nguyên bào võng mạc, cho phép chẩn đoán sớm, đánh giá nguy cơ bị bệnh ở các thành viên gia đình và thế hệ sau, tiên lượng bệnh [45]. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu khác nhau, cách lấy mẫu cũng khác nhau để nghiên cứu các dạng đột biến gen *RBI* liên quan tới đặc điểm lâm sàng như thế nào, mức độ cắt ngắn của proteinRB với mức độ nặng của bệnh không. Để đánh giá mức độ nặng của bệnh các nhà Khoa học dựa vào phân loại quốc tế để phân nhóm, độ tuổi, yếu tố nguy cơ cao của mắt bị bệnh, thể bệnh một hay hai mắt, có yếu tố gia đình hay không.

Theo nghiên cứu của tác giả Lohmann và cộng sự năm 1996 đây là báo cáo nghiên cứu xem có mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng của bệnh

UNBVM và đột biến gen *RBI* hay là mối liên quan kiểu hình- kiểu gen trên bệnh nhân UNBVM. Tác giả kết luận không thấy mối liên quan giữa các đột biến vô nghĩa hoặc lệch khung dịch mã với tuổi phát hiện bệnh, đây là hai đột biến tạo mã kết thúc sớm và hay gây bệnh sớm và nặng nề ở các bệnh gây nên bởi đột biến gen. Tác giả cũng thấy ở những bệnh nhân không liên quan trong gia đình nhưng có mang đột biến giống hệt nhau thì sự thay đổi về tuổi chẩn đoán phát hiện bệnh cũng đa dạng như ở những bệnh nhân có đột biến khác [60]

Tác giả Albrecht và cộng sự cũng không tìm thấy có mối liên quan nào giữa các đột biến cắt ngắn proteinRB trong các đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã với tuổi khi chẩn đoán phát hiện bệnh sớm hay muộn, phân nhóm mắt bị bệnh theo quốc tế như mắt nhóm D, E là những mắt giai đoạn muộn, hay mối liên quan với yếu tố nguy cơ cao khi làm xét nghiệm giải phẫu bệnh trên mắt bị cắt bỏ [88].

Tác giả Josseph và cộng sự cũng kết luận rằng không có mối liên quan đáng kể nào giữa các đột biến cắt ngắn proteinRB trong các đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã với tuổi khi chẩn đoán phát hiện bệnh sớm hay muộn, phân nhóm mắt bị bệnh theo quốc tế như mắt nhóm D, E là những mắt giai đoạn muộn hay mối liên quan với yếu tố nguy cơ cao khi làm xét nghiệm giải phẫu bệnh trên mắt bị cắt bỏ [51].

Nghiên cứu của Qi và cộng sự năm 2005 cũng không thấy có mối liên quan giữa các đột biến vô nghĩa và đột biến lệch khung dịch mã gây cắt ngắn proteinRB với tuổi phát hiện bệnh, mắt bệnh giai đoạn D, E hay yếu tố nguy cơ cao gây di căn. Ngoài ra tác giả cũng cho thấy không có mối liên quan giữa các dấu hiệu lâm sàng trên với vị trí của các đột biến trên gen RB1 [51].

Nghiên cứu của He và cộng sự đã báo cáo về mối liên quan đặc điểm lâm sàng với đột biến gen RB1 ở bệnh nhân Trung Quốc rằng sự phân bố mức

độ nặng của bệnh theo phân loại ICRB có sự thay đổi đáng kể. Tác giả cho rằng trên thực tế nhóm E là nhóm gặp nhiều nhất trong nghiên cứu của họ là do chẩn đoán và điều trị muộn, do vấn đề chăm sóc sức khỏe ban đầu và thông tin tuyên truyền về bệnh không đầy đủ và thiếu sự tiếp cận trong hệ thống y tế cơ sở [89].

Nghiên cứu của tác giả Taylor trên bệnh nhân Pháp đã xác định các đột biến gen RB1 và mô tả sự phân bố vị trí của các đột biến cũng như dạng đột biến. Tác giả cho rằng không có mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và đột biến gen RB1.

Nghiên cứu của chúng tôi có ít bệnh nhân bị đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã hơn so với các tác giả khác trong các trường hợp bệnh thể một mắt trong khi các tác giả khác cho tỷ lệ cao hơn. Tỷ lệ phát hiện từ 10-15% trong UNBVM thể một mắt như Richter và cộng sự [50].

Chúng tôi thấy rằng tuổi trung bình khi chẩn đoán phát hiện bệnh là tương tự nhau ở cả nhóm bệnh nhân UNBVM thể một mắt có đột biến gen RB1 và không thấy có đột biến gen *RB1* (kết quả xét nghiệm dương tính và âm tính), từ đó cho thấy tuổi chẩn đoán khi phát hiện bệnh không phải là yếu tố để phân loại mức độ nặng của bệnh và chỉ định lấy máu làm xét nghiệm sinh học phân tử để phát hiện đột biến gen *RB1*. Bởi vậy, xét nghiệm sinh học phân tử được khuyến cáo cho tất cả các bệnh nhân mắc bệnh UNBVM.

Bằng cách phát hiện đột biến dòng tế bào gốc sớm ở bệnh nhân từ đó khám và xét nghiệm cho anh chị em và người thân trong gia đình dòng họ có nguy cơ mắc bệnh, việc khám mắt thường xuyên, chi tiết và đầy đủ có thể được thực hiện thường kỳ để theo dõi phát hiện bệnh. Nếu các khối u nội nhãn được phát hiện và chẩn đoán, phương pháp điều trị thích hợp, đúng chỉ

định có thể được bắt đầu ngay và điều trị sớm để ngăn ngừa bệnh tiến triển. Bảo tồn được nhãn cầu và thị lực cho bệnh nhân

Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng không thấy có mối liên quan nào giữa các đột biến cắt ngắn proteinRB trong các đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã và các mức độ nghiêm trọng của bệnh như mối tương quan với tuổi phát hiện bệnh sớm hay muộn, phân nhóm mắt bị bệnh theo quốc tế như mắt nhóm D, E là những mắt giai đoạn muộn, hay mối tương quan với yếu tố nguy cơ cao khi làm xét nghiệm giải phẫu bệnh trên mắt bị cắt bỏ, kết quả này cũng tương tự nghiên cứu của tác giả Albrecht [88], tác giả Joseph [51].

Chúng tôi thấy rằng các đột biến cắt ngắn nằm trên exon 3 (có một đột biến vô nghĩa là p.Trp99X và một đột biến lệch khung dịch mã là p.Ile124Argfs*6) exon 3 này nằm ở vùng N (từ axit amin 1- 392) của proteinRB. Đột biến phát hiện ở vùng N này có liên quan đến mức độ nghiêm trọng của bệnh. Sự kết hợp của đột biến cắt ngắn mất chiều dài của proteinRB này gây hậu quả của việc mất protein ngoài vùng N trên proteinRB và do đó mất đi toàn bộ vùng A/B và mất chức năng quan trọng của nó trong liên kết với yếu tố phiên mã E2F trong quá trình điều hòa sự phân chia tế bào, từ đó protein mất hoàn toàn chức năng ức chế E2F làm cho tế bào tăng sinh không kiểm soát và tạo thành khối u.

Ngoài ra có đột biến vô nghĩa trên exon 19 là p.Tyr651X, và các đột biến lệch khung dịch mã p.Val714* trên exon 21, đột biến p.Pro232Serfs*8 trên exon 7, đột biến p.Thy345Argfs*6 trên exon 10 xuất hiện trong nghiên cứu của chúng tôi ở bệnh nhân có thể bệnh hai mắt, bệnh nhân bị đột biến vô nghĩa lứa tuổi phát hiện bệnh từ rất sớm < 6 tháng còn các bệnh nhân có đột biến lệch khung dịch mã lứa tuổi phát hiện bệnh đại đa số > 12 tháng, cá biệt có bệnh nhân tuổi phát hiện bệnh rất sớm (2 tháng) nhưng có bệnh nhân tuổi

phát hiện bệnh lại muộn (84 tháng). Điều đó cho thấy không có mối liên quan nào giữa đặc điểm lâm sàng như tuổi phát hiện bệnh, mức độ nặng với dạng đột biến gen RB1 gây cắt ngắn cấu trúc proteinRB.

Nghiên cứu của Lohmann và Gallie những đột biến vô nghĩa hoặc lệch khung dịch mã trong đều xuất hiện trong các exon từ exon 2- 25 và đều có liên quan với u nguyên bào võng mạc hai mắt. [45]. Tuy nhiên đôi khi những đột biến như vậy cũng đã được tìm thấy ở những bệnh nhân thể một mắt như bệnh nhân RB50 có đột biến lệch khung dịch mã p.Pro232Serfs*8, điều này tương tự với nghiên cứu của Lohmann và Joseph [60], [51] . Hơn nữa bệnh nhân RB66 có đột biến p.893Glyfs24* trên exon 26, đột biến này nằm trong vùng C (axit amin 870- 928), có thể làm gián đoạn sự tương tác của vùng A/B với yếu tố phiên mã E2F và dẫn đến kiểu hình thể hai mắt, tương tự trong nghiên cứu của Joseph [51].

4.3.4.2. Mối liên đặc điểm lâm sàng của BN UNBVM có đột biến sai nghĩa

Theo bảng 3.19 Trong nghiên cứu của chúng tôi có 05 bệnh nhân có đột biến sai nghĩa trong tổng số 24 bệnh nhân phát hiện có đột biến gen *RBI* (20,8%), 05 bệnh nhân có 03 đột biến đều là các đột biến mới chưa được báo cáo trước đó trên thế giới. Không có bệnh nhân nào có tiền sử gia đình: Có 03 bệnh nhân là thể bệnh bị bệnh hai mắt, còn lại 02 bệnh nhân thể bệnh một mắt và không có yếu tố nguy cơ cao. Có 5 bệnh nhân đi khám và phát hiện bệnh sớm trước 6 tháng tuổi. Tất cả 5 bệnh nhân bị đột biến thì gặp nhiều nhất là có đột biến p.Ser402Thr trên exon 12 ở 3 bệnh nhân, ngoài ra còn có 1 đột biến p.Trp681Cys trên exon 20 và p.Phe162Tyr trên exon 4. Tất cả 05 bệnh nhân bị bệnh đều có mắt bệnh nhóm D. Trong các bệnh nhân cùng mang đột biến p.Ser402Thr trên exon 12, đột biến này nằm ở vùng mã hóa cho vùng A của proteinRB. Tương tự như vậy đột biến p.Trp681Cys trên exon 20, vùng exon này thuộc vùng mã hóa cho vùng B của proteinRB. Vùng A/B là vùng có tính

bảo tồn cao với chức năng quan trọng của nó trong liên kết với yếu tố phiên mã E2F trong quá trình điều hòa sự phân chia tế bào, từ đó nếu bị đột biến trong vùng A/B của proteinRB làm cho proteinRB bị mất chức năng ức chế yếu tố phiên mã E2F làm cho tế bào tăng sinh không kiểm soát và tạo thành khối u.

Nghiên cứu của Choy và cộng sự trên nhóm bệnh nhân Trung Quốc không tìm thấy có mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng của bệnh với đột biến gen RB cũng như không có mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng và các dạng đột biến gen *RBI* như tuổi phát hiện bệnh, yếu tố nguy cơ cao, mức độ nặng của bệnh [69].

Nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân Ấn Độ của tác giả Ata-ur-Rasheed và cộng sự cũng không tìm thấy mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng như tuổi phát hiện bệnh, mức độ nặng của bệnh với các dạng đột biến gen *RBI* trên bệnh nhân UNBVM [87].

Các đột biến sai nghĩa trong nghiên cứu gặp ở các lứa tuổi từ 2 tháng đến 36 tháng, bị bệnh cả thể một mắt và hai mắt, có 01 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao trong nhóm đột biến sai nghĩa. Qua phân tích mối liên quan giữa đột biến gen *RBI* với độ tuổi đi khám phát hiện bệnh lần đầu, phân nhóm quốc tế ICRB, thể bệnh hai mắt hay một mắt, yếu tố nguy cơ cao di căn khi làm giải phẫu bệnh nhóm nghiên cứu chúng tôi đều không thấy có mối liên quan đặc điểm lâm sàng với đột biến gen *RBI*. Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi hạn chế cỡ mẫu và với số lượng bệnh nhân tương đối nhỏ trong mỗi phân nhóm. Đòi hỏi dữ liệu chính xác hơn về tuổi khi khám phát hiện bệnh, phân nhóm, yếu tố nguy cơ cao để đánh giá mức độ nặng của bệnh và so sánh các trường hợp đột biến gen *RBI* sẽ làm rõ hơn mối liên quan đặc điểm lâm sàng và đột biến gen *RBI* thì cần làm nghiên cứu với số lượng bệnh nhân lớn hơn và kéo dài thời gian hơn.

4.3.4.3. *Mối liên quan đặc điểm lâm sàng của BN UNBVM có đột biến vị trí nối exon- intron*

Theo bảng 3.20 Trong nghiên cứu của chúng tôi có 09 bệnh nhân có đột biến tại vị trí nối exon- intron trong tổng số 24 bệnh nhân phát hiện đột biến (37,5%). Có 04 bệnh nhân có tiền sử gia đình và có 03 bệnh nhân có mắt bệnh có yếu tố nguy cơ cao, có 10 mắt bệnh nhóm D, E và độ tuổi phát hiện bệnh từ 02- 28 tháng. Đột biến c.2664-10T>A gặp ở 4 bệnh nhân, ngoài ra còn có các đột biến c.2211+ 1G>A, đột biến c.1333-2A>G, c.861G>A, c.265- 1G>T, c.2520+1_2520+4del, các đột biến này đã được báo cáo trước đó trên thế giới đã được tìm thấy trên bệnh nhân Việt Nam.

Chúng tôi thấy rằng đột biến ở vị trí nối được xác định ở nhóm bệnh nhân của chúng tôi cao hơn so với các nghiên cứu khác trên bệnh nhân ở các nước châu Á khác [135], [89], [85], [68], [106], [86].

Tác giả Alonso nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân Tây Ban Nha cho rằng không có mối liên quan nào giữa các đặc điểm lâm sàng với các dạng đột biến gen RB1 trong đó có đột biến tại vị trí nối [65].

Tác giả Taylor và cộng sự cũng cho rằng đột biến tại vị trí nối không có mối liên quan nào với đặc điểm lâm sàng của bệnh UNBVM [73].

Các quan sát trước đây cho thấy rằng các đột biến tại vị trí nối có liên quan đến các kiểu hình bệnh khởi phát muộn hơn so với các đột biến vô nghĩa, lệch khung và đột biến sai nghĩa [58]. Tuy nhiên, chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt về tuổi khi chẩn đoán ở các nhóm đột biến khác nhau và nghiên cứu của chúng tôi tương tự với báo cáo từ nhóm tác giả nghiên cứu trên bệnh nhân Israel [86].

Qua phân tích nhóm nghiên cứu không thấy có mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng với đột biến gen *RBI* trên bệnh nhân UNBVM có đột biến tại vị trí nối exon- intron.

Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi hạn chế cỡ mẫu và với số lượng bệnh nhân ít trong mỗi phân nhóm. Đòi hỏi dữ liệu chính xác hơn về các dấu hiệu lâm sàng như tuổi khi khám phát hiện bệnh, phân nhóm, yếu tố nguy cơ cao để đánh giá mức độ nặng của bệnh và so sánh các trường hợp đột biến gen *RBI* sẽ làm rõ hơn mối tương quan kiểu gen- kiểu hình thì cần làm nghiên cứu với số lượng bệnh nhân lớn hơn và kéo dài thời gian hơn

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 43 bệnh nhân được chẩn đoán UNBVM chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của UNBVM

1.1. Đặc điểm lâm sàng:

- Tuổi đi khám và phát hiện bệnh lần đầu là $15,47 \pm 11,92$ tháng, tuổi trung bình 13 tháng.
- Có số bệnh nhân nam là 23 (53,5%), số bệnh nhân nữ là 20 (46,5%).
- Dấu hiệu chủ yếu là lý do đi khám của bệnh nhân có 35 (81,4%) bệnh nhân có dấu hiệu ánh đồng tử trắng. Có 4 bệnh nhân đau đỏ mắt (9,3%), 2 bệnh nhân lác (4,7%), 2 bệnh nhân lồi mắt (4,7%), 4 bệnh nhân đau đỏ mắt (9,3%).
- Có 8 bệnh nhân có tiền sử gia đình: trong đó có 6 bệnh nhân có bố, mẹ, anh chị em ruột cùng bị bệnh và đều là thể bệnh hai mắt.
- Các triệu chứng lâm sàng chủ quan: giảm thị lực, đau nhức mắt, chói, chảy nước mắt.
- Các dấu hiệu bệnh ở bán phần trước, khối u trong buồng dịch kính, khối u trên bề mặt võng mạc.
- Phân nhóm theo quốc tế: chủ yếu là nhóm D, E
- Đặc điểm cận lâm sàng: trên siêu âm nhãn khoa, CT và MRI dấu hiệu chủ yếu là canxi hóa.
- Giải phẫu bệnh dấu hiệu chủ yếu là canxi và hoại tử u, có 16 BN có yếu tố nguy cơ cao trên GPB. Trong đó nhóm có đột biến gen *RBI* là có 11 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao.

2. Đột biến gen *RBI* và mối liên quan đặc điểm lâm sàng

- Nghiên cứu phát hiện 24 bệnh nhân có đột biến gen *RBI*, tỷ lệ đột biến gen là 24/43 (55,81%).
- Tỷ lệ đột biến vô nghĩa là 12,50%, đột biến lệch khung dịch mã 29,2 %, đột biến sai nghĩa 20,8%, đột biến tại vị trí nối exon- intron là 37,5%.
- Có tất cả 17 đột biến trong số các đột biến đã được phát hiện:
- + Có 10 đột biến đã được công bố trong ngân hàng dữ liệu GeneBank và LOVD: c.2664-10T>A, c.861G>A, c.2211+1G>A, c.265-1G>T, c.1333-2A>G, c.2520+1_2520+4del, p.Trp99X, p.Ile124Argfs*6, p.Val714*, p.Tyr651X.
- + Có 07 đột biến mới chưa được công bố trên các tài liệu quốc tế: Có 04 đột biến lệch khung dịch mã: p.Thy345Argfs*6, p.Pro232Serfs*8, p.893Glyfs24*, c.1312delT, có 03 đột biến sai nghĩa: p.Trp681Cys, p.Phe162Tyr, p.Ser402Thr.
- Có 5 đột biến trên 5 Intron và có 12 đột biến khác nhau trải dài trên 11 exon có đột biến gen *RBI*.
- Không tìm thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa đột biến gen *RBI* và các đặc điểm lâm sàng trên bệnh nhân UNBVM: như tuổi phát hiện bệnh, mức độ nặng và yếu tố nguy cơ cao.

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

1. Nguyễn Ngọc Chung, Trần Huy Thịnh, Phạm Trọng Văn, Phạm Hồng Vân, Mai Quốc Tùng, Lương Hoàng Long, Trần Văn Khánh (2018) “Đặc điểm và phân bố đột biến gen RB1 trên bệnh nhân U nguyên bào võng mạc”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số 1 Tháng 7 năm 2018, trang 163- 166.

2. Nguyễn Ngọc Chung, Trần Huy Thịnh, Phạm Trọng Văn, Phạm Hồng Vân, Mai Quốc Tùng, Lương Hoàng Long, Trần Văn Khánh (2018). “Phát hiện đột biến gen RB1 trên bệnh nhân U nguyên bào võng mạc bằng kỹ thuật giải trình tự gen”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số 2 Tháng 7 năm 2018, trang 77- 80.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zucker J.M., Desjardins L., Doz F. (1998). Retinoblastoma. *Eur J Cancer*. **34(7)**: p. 1045-8; discussion 1048-9.
2. Xu X.L., Fang Y., Lee T.C., et al. (2009). Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell*. **137(6)**: p. 1018-31.
3. The retinoblastoma protein. pages cm.
4. Mol B.M. (2015). THE MOLECULAR ONCOGENESIS OF RETINOBLASTOMA: IMPLICATIONS FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT,
5. Seregard S., Lundell G., Svedberg H., et al. (2004). Incidence of retinoblastoma from 1958 to 1998 in Northern Europe: advantages of birth cohort analysis. *Ophthalmology*. **111(6)**: p. 1228-32.
6. Moll A.C., Kuik D.J., Bouter L.M., et al. (1997). Incidence and survival of retinoblastoma in The Netherlands: a register based study 1862-1995. *Br J Ophthalmol*. **81(7)**: p. 559-62.
7. Hong F.D., Huang H.J., To H., et al. (1989). Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86(14)**: p. 5502-6.
8. Toguchida J., McGee T.L., Paterson J.C., et al. (1993). Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics*. **17(3)**: p. 535-43.
9. MacCarthy A., Birch J.M., Draper G.J., et al. (2009). Retinoblastoma: treatment and survival in Great Britain 1963 to 2002. *Br J Ophthalmol*. **93(1)**: p. 38-9.
10. Dimaras H., Kimani K., Dimba E.A., et al. (2012). Retinoblastoma. *Lancet*. **379(9824)**: p. 1436-46.
11. Kivela T. (2009). The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. *Br J Ophthalmol*. **93(9)**: p. 1129-31.
12. Navalkele P., O'Dorisio M.S., O'Dorisio T.M., et al. (2011). Incidence, survival, and prevalence of neuroendocrine tumors versus neuroblastoma in children and young adults: nine standard SEER registries, 1975-2006. *Pediatr Blood Cancer*. **56(1)**: p. 50-7.
13. Chantada G.L., Qaddoumi I., Canturk S., et al. (2011). Strategies to manage retinoblastoma in developing countries. *Pediatr Blood Cancer*. **56(3)**: p. 341-8.
14. Chantada G., Fandino A., Manzitti J., et al. (1999). Late diagnosis of retinoblastoma in a developing country. *Arch Dis Child*. **80(2)**: p. 171-4.
15. Bowman R.J., Mafwiri M., Luthert P., et al. (2008). Outcome of retinoblastoma in east Africa. *Pediatr Blood Cancer*. **50(1)**: p. 160-2.
16. Broaddus E., Topham A., Singh A.D. (2009). Incidence of retinoblastoma in the USA: 1975-2004. *Br J Ophthalmol*. **93(1)**: p. 21-3.
17. Cavenee W.K., Hansen M.F., Nordenskjold M., et al. (1985). Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science*. **228(4698)**: p. 501-3.
18. Linn Murphree A. (2005). Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. *Ophthalmol Clin North Am*. **18(1)**: p. 41-53, viii.
19. Shields C.L., Mashayekhi A., Au A.K., et al. (2006). The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success. *Ophthalmology*. **113(12)**: p. 2276-80.
20. Fung Y.K., Murphree A.L., T'Ang A., et al. (1987). Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*. **236(4809)**: p. 1657-61.
21. Bookstein R., Lee E.Y., To H., et al. (1988). Human retinoblastoma susceptibility gene: genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85(7)**: p. 2210-4.

22. Dunn J.M., Phillips R.A., Zhu X., et al. (1989). Mutations in the RB1 gene and their effects on transcription. *Mol Cell Biol.* **9(11)**: p. 4596-604.
23. Dryja T.P., Mukai S., Petersen R., et al. (1989). Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene. *Nature.* **339(6225)**: p. 556-8.
24. Zhao J., Li S., Shi J., et al. (2011). Clinical presentation and group classification of newly diagnosed intraocular retinoblastoma in China. *Br J Ophthalmol.* **95(10)**: p. 1372-5.
25. Ramasubramanian A., Shields C.L. (2012). Retinoblastoma. Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited.
26. Chang C.Y., Chiou T.J., Hwang B., et al. (2006). Retinoblastoma in Taiwan: survival rate and prognostic factors. *Jpn J Ophthalmol.* **50(3)**: p. 242-9.
27. Abramson D.H., Frank C.M., Susman M., et al. (1998). Presenting signs of retinoblastoma. *J Pediatr.* **132(3 Pt 1)**: p. 505-8.
28. Wallach M., Balmer A., Munier F., et al. (2006). Shorter time to diagnosis and improved stage at presentation in Swiss patients with retinoblastoma treated from 1963 to 2004. *Pediatrics.* **118(5)**: p. e1493-8.
29. Abramson D.H., Beaverson K., Sangani P., et al. (2003). Screening for retinoblastoma: presenting signs as prognosticators of patient and ocular survival. *Pediatrics.* **112(6 Pt 1)**: p. 1248-55.
30. Ali A.A., Elsheikh S.M., Elhaj A., et al. (2011). Clinical presentation and outcome of retinoblastoma among children treated at the National Cancer Institute (NCI) in Gezira, Sudan: a single Institution experience. *Ophthalmic Genet.* **32(2)**: p. 122-5.
31. Owoeye J.F., Afolayan E.A., Ademola-Popoola D.S. (2006). Retinoblastoma--a clinico-pathological study in Ilorin, Nigeria. *Afr J Health Sci.* **13(1-2)**: p. 117-23.
32. Saiju R., Thakur J., Chandra Karmacharya P., et al. (2006). Retinoblastoma in Nepal: a clinical profile of 30 cases. **Vol. 8.** 171-5.
33. Boubacar T., Fatou S., Fousseyni T., et al. (2010). A 30-month prospective study on the treatment of retinoblastoma in the Gabriel Toure Teaching Hospital, Bamako, Mali. *Br J Ophthalmol.* **94(4)**: p. 467-9.
34. Galluzzi P., Hadjistilianou T., Cerase A., et al. (2009). Is CT still useful in the study protocol of retinoblastoma? *AJNR Am J Neuroradiol.* **30(9)**: p. 1760-5.
35. Brisse H.J., Lumbroso L., Freneaux P.C., et al. (2001). Sonographic, CT, and MR imaging findings in diffuse infiltrative retinoblastoma: report of two cases with histologic comparison. *AJNR Am J Neuroradiol.* **22(3)**: p. 499-504.
36. Kendall C.J., Prager T.C., Cheng H., et al. (2015). Diagnostic Ophthalmic Ultrasound for Radiologists. *Neuroimaging Clin N Am.* **25(3)**: p. 327-65.
37. de Jong M.C., de Graaf P., Noij D.P., et al. (2014). Diagnostic performance of magnetic resonance imaging and computed tomography for advanced retinoblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology.* **121(5)**: p. 1109-18.
38. Galluzzi P., Hadjistilianou T., Cerase A., et al. (2015). MRI helps depict clinically undetectable risk factors in advanced stage retinoblastomas. *Neuroradiol J.* **28(1)**: p. 53-61.
39. Sirin S., de Jong M.C., de Graaf P., et al. (2016). High-Resolution Magnetic Resonance Imaging Can Reliably Detect Orbital Tumor Recurrence after Enucleation in Children with Retinoblastoma. *Ophthalmology.* **123(3)**: p. 635-45.
40. Cui Y., Luo R., Wang R., et al. (2018). Correlation between conventional MR imaging combined with diffusion-weighted imaging and histopathologic findings in eyes primarily enucleated for advanced retinoblastoma: a retrospective study. *Eur Radiol.* **28(2)**: p. 620-629.

41. Pandey A.N. (2014). Retinoblastoma: An overview. *Saudi J Ophthalmol.* **28(4)**: p. 310-5.
42. Kashyap S., Meel R., Pushker N., et al. (2012). Clinical predictors of high risk histopathology in retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* **58(3)**: p. 356-61.
43. Yousef Y.A., Hajja Y., Nawaiseh I., et al. (2014). A histopathologic analysis of 50 eyes primarily enucleated for retinoblastoma in a tertiary cancer center in Jordan. *Turk Patoloji Derg.* **30(3)**: p. 171-7.
44. Lohmann D.R. (1999). RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat.* **14(4)**: p. 283-8.
45. Lohmann D.R., Gallie B.L. (2004). Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* **129C(1)**: p. 23-8.
46. Goodrich D.W. (2006). The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene.* **25(38)**: p. 5233-43.
47. Rubin S.M. (2013). Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. *Trends Biochem Sci.* **38(1)**: p. 12-9.
48. Sampieri K., Hadjistilianou T., Mari F., et al. (2006). Mutational screening of the RB1 gene in Italian patients with retinoblastoma reveals 11 novel mutations. *J Hum Genet.* **51(3)**: p. 209-16.
49. DiCiommo D., Gallie B.L., Bremner R. (2000). Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Semin Cancer Biol.* **10(4)**: p. 255-69.
50. Richter S., Vandezande K., Chen N., et al. (2003). Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* **72(2)**: p. 253-69.
51. Joseph B., Raman R., Uthra S., et al. (2006). Genotype-phenotype correlation analysis in retinoblastoma patients from India. *Asian Pac J Cancer Prev.* **7(4)**: p. 619-22.
52. Dryja T.P., Morrow J.F., Rapaport J.M. (1997). Quantification of the paternal allele bias for new germline mutations in the retinoblastoma gene. *Hum Genet.* **100(3-4)**: p. 446-9.
53. Munier F.L., Thonney F., Girardet A., et al. (1998). Evidence of somatic and germinal mosaicism in pseudo-low-penetrant hereditary retinoblastoma, by constitutional and single-sperm mutation analysis. *Am J Hum Genet.* **63(6)**: p. 1903-8.
54. Sippel K.C., Fraieli R.E., Smith G.D., et al. (1998). Frequency of somatic and germ-line mosaicism in retinoblastoma: implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet.* **62(3)**: p. 610-9.
55. Barbosa R.H., Vargas F.R., Lucena E., et al. (2009). Constitutive RB1 mutation in a child conceived by in vitro fertilization: implications for genetic counseling. *BMC Med Genet.* **10**: p. 75.
56. Rushlow D., Piovesan B., Zhang K., et al. (2009). Detection of mosaic RB1 mutations in families with retinoblastoma. *Hum Mutat.* **30(5)**: p. 842-51.
57. Mallipatna A., Marino M., Singh A.D. (2016). Genetics of Retinoblastoma. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* **5(4)**: p. 260-4.
58. Valverde J.R., Alonso J., Palacios I., et al. (2005). RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genet.* **6**: p. 53.
59. Ortiz M.V., Dunkel I.J. (2016). Retinoblastoma. *J Child Neurol.* **31(2)**: p. 227-36.
60. Lohmann D.R., Brandt B., Hopping W., et al. (1996). The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* **58(5)**: p. 940-9.
61. Cowell J.K., Cragg H. (1996). Constitutional nonsense germline mutations in the RB1 gene detected in patients with early onset unilateral retinoblastoma. *Eur J Cancer.* **32A(10)**: p. 1749-52.

62. Yilmaz S., Horsthemke B., Lohmann D.R. (1998). Twelve novel RB1 gene mutations in patients with hereditary retinoblastoma. Mutations in brief no. 206. Online. *Hum Mutat.* **12(6)**: p. 434.
63. Klutz M., Horsthemke B., Lohmann D.R. (1999). RB1 gene mutations in peripheral blood DNA of patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* **64(2)**: p. 667-8.
64. Houdayer C., Gauthier-Villars M., Lauge A., et al. (2004). Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF. *Hum Mutat.* **23(2)**: p. 193-202.
65. Alonso J., Garcia-Miguel P., Abelaïras J., et al. (2001). Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat.* **17(5)**: p. 412-22.
66. Nichols K.E., Houseknecht M.D., Godmilow L., et al. (2005). Sensitive multistep clinical molecular screening of 180 unrelated individuals with retinoblastoma detects 36 novel mutations in the RB1 gene. *Hum Mutat.* **25(6)**: p. 566-74.
67. Kiran V.S., Kannabiran C., Chakravarthi K., et al. (2003). Mutational screening of the RB1 gene in Indian patients with retinoblastoma reveals eight novel and several recurrent mutations. *Hum Mutat.* **22(4)**: p. 339.
68. Tomar S., Sethi R., Sundar G., et al. (2017). Mutation spectrum of RB1 mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling. *PLoS One.* **12(6)**: p. e0178776.
69. Choy K.W., Pang C.P., Yu C.B., et al. (2002). Loss of heterozygosity and mutations are the major mechanisms of RB1 gene inactivation in Chinese with sporadic retinoblastoma. *Hum Mutat.* **20(5)**: p. 408.
70. Yousef Y.A., Tbakhi A., Al-Hussaini M., et al. (2018). Mutational analysis of the RB1 gene and the inheritance patterns of retinoblastoma in Jordan. *Fam Cancer.* **17(2)**: p. 261-268.
71. Lohmann D.R., Gerick M., Brandt B., et al. (1997). Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* **61(2)**: p. 282-94.
72. Babenko O.V., Saakian S.V., Brovkina A.F., et al. (2002). [Spectrum and frequencies of RB1 gene structural defects in retinoblastoma]. *Mol Biol (Mosk).* **36(4)**: p. 623-9.
73. Taylor M., Dehainault C., Desjardins L., et al. (2007). Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma. *Hum Mutat.* **28(3)**: p. 284-93.
74. Abouzeid H., Schorderet D.F., Balmer A., et al. (2009). Germline mutations in retinoma patients: relevance to low-penetrance and low-expressivity molecular basis. *Mol Vis.* **15**: p. 771-7.
75. Cowell J.K., Bia B. (1998). A novel missense mutation in patients from a retinoblastoma pedigree showing only mild expression of the tumor phenotype. *Oncogene.* **16(24)**: p. 3211-3.
76. Seo S.H., Ahn H.S., Yu Y.S., et al. (2013). Mutation spectrum of RB1 gene in Korean bilateral retinoblastoma patients using direct sequencing and gene dosage analysis. *Clin Genet.* **83(5)**: p. 494-6.
77. Sugano K., Yoshida T., Izumi H., et al. (2004). Outpatient clinic for genetic counseling and gene testing of retinoblastoma. *Int J Clin Oncol.* **9(1)**: p. 25-30.
78. Dalamon V., Surace E., Giliberto F., et al. (2004). Detection of germline mutations in argentine retinoblastoma patients: low and full penetrance retinoblastoma caused by the same germline truncating mutation. *J Biochem Mol Biol.* **37(2)**: p. 246-53.
79. Alonso J., Frayle H., Menendez I., et al. (2005). Identification of 26 new constitutional RB1 gene mutations in Spanish, Colombian, and Cuban retinoblastoma patients. *Hum Mutat.* **25(1)**: p. 99.

80. Macias M., Dean M., Atkinson A., et al. (2008). Spectrum of RB1 gene mutations and loss of heterozygosity in Mexican patients with retinoblastoma: identification of six novel mutations. *Cancer Biomark.* **4(2)**: p. 93-9.
81. Parsam V.L., Kannabiran C., Honavar S., et al. (2009). A comprehensive, sensitive and economical approach for the detection of mutations in the RB1 gene in retinoblastoma. *J Genet.* **88(4)**: p. 517-27.
82. Pradhan M.A., Ng Y., Strickland A., et al. (2010). Role of genetic testing in retinoblastoma management at a tertiary referral centre. *Clin Exp Ophthalmol.* **38(3)**: p. 231-6.
83. Abidi O., Knari S., Sefri H., et al. (2011). Mutational analysis of the RB1 gene in Moroccan patients with retinoblastoma. *Mol Vis.* **17**: p. 3541-7.
84. Ayari-Jeridi H., Moran K., Chebbi A., et al. (2015). Mutation spectrum of RB1 gene in unilateral retinoblastoma cases from Tunisia and correlations with clinical features. *PLoS One.* **10(1)**: p. e0116615.
85. Mohd Khalid M.K., Yakob Y., Md Yasin R., et al. (2015). Spectrum of germ-line RB1 gene mutations in Malaysian patients with retinoblastoma. *Mol Vis.* **21**: p. 1185-90.
86. Frenkel S., Zloto O., Sagi M., et al. (2016). Genotype-phenotype correlation in the presentation of retinoblastoma among 149 patients. *Exp Eye Res.* **146**: p. 313-7.
87. Ata-ur-Rasheed M., Vemuganti G., Honavar S., et al. (2002). Mutational analysis of the RB1 gene in Indian patients with retinoblastoma. *Ophthalmic Genet.* **23(2)**: p. 121-8.
88. Albrecht P., Ansperger-Rescher B., Schuler A., et al. (2005). Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat.* **26(5)**: p. 437-45.
89. He M.Y., An Y., Gao Y.J., et al. (2014). Screening of RB1 gene mutations in Chinese patients with retinoblastoma and preliminary exploration of genotype-phenotype correlations. *Mol Vis.* **20**: p. 545-52.
90. Ali M.J., Parsam V.L., Honavar S.G., et al. (2010). RB1 gene mutations in retinoblastoma and its clinical correlation. *Saudi J Ophthalmol.* **24(4)**: p. 119-23.
91. Price E.A., Price K., Kolkiewicz K., et al. (2014). Spectrum of RB1 mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *J Med Genet.* **51(3)**: p. 208-14.
92. Jakubowska A., Zajaczek S., Haus O., et al. (2001). Novel RB1 gene constitutional mutations found in Polish patients with familial and/or bilateral retinoblastoma. *Hum Mutat.* **18(5)**: p. 459.
93. Kontic M., Palacios I., Gamez A., et al. (2006). New RB1 oncogenic mutations and intronic polymorphisms in Serbian retinoblastoma patients: genetic counseling implications. *J Hum Genet.* **51(10)**: p. 909-13.
94. Blanquet V., Turleau C., Gross-Morand M.S., et al. (1995). Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Hum Mol Genet.* **4(3)**: p. 383-8.
95. Onadim Z., Hogg A., Cowell J.K. (1993). Mechanisms of oncogenesis in patients with familial retinoblastoma. *Br J Cancer.* **68(5)**: p. 958-64.
96. Bamne M.N., Ghule P.N., Jose J., et al. (2005). Constitutional and somatic RB1 mutation spectrum in nonfamilial unilateral and bilateral retinoblastoma in India. *Genet Test.* **9(3)**: p. 200-11.
97. <Retinoblastoma FULL TEXT_Ngan Ha.pdf>
98. Bai S., Ren R., Shi J., et al. (2011). Retinoblastoma in the Beijing Tongren Hospital from 1957 to 2006: clinicopathological findings. *Br J Ophthalmol.* **95(8)**: p. 1072-6.
99. Bonanomi M.T., Almeida M.T., Cristofani L.M., et al. (2009). Retinoblastoma: a three-year-study at a Brazilian medical school hospital. *Clinics (Sao Paulo).* **64(5)**: p. 427-34.

100. Ozkan A., Pazarli H., Celkan T., et al. (2006). Retinoblastoma in Turkey: survival and clinical characteristics 1981-2004. *Pediatr Int.* **48(4)**: p. 369-73.
101. Naseripour M., Nazari H., Bakhtiari P., et al. (2009). Retinoblastoma in Iran: outcomes in terms of patients' survival and globe survival. *Br J Ophthalmol.* **93(1)**: p. 28-32.
102. Chung S.E., Sa H.S., Koo H.H., et al. (2008). Clinical manifestations and treatment of retinoblastoma in Korea. *Br J Ophthalmol.* **92(9)**: p. 1180-4.
103. Subramaniam S., Rahmat J., Rahman N.A., et al. (2014). Presentation of retinoblastoma patients in Malaysia. *Asian Pac J Cancer Prev.* **15(18)**: p. 7863-7.
104. Adhi M.I., Kashif S., Muhammed K., et al. (2018). Clinical pattern of Retinoblastoma in Pakistani population: Review of 403 eyes in 295 patients. *J Pak Med Assoc.* **68(3)**: p. 376-380.
105. Shahraki K., Ahani A., Sharma P., et al. (2017). Genetic screening in Iranian patients with retinoblastoma. *Eye (Lond).* **31(4)**: p. 620-627.
106. Kalsoom S., Wasim M., Afzal S., et al. (2015). Alterations in the RB1 gene in Pakistani patients with retinoblastoma using direct sequencing analysis. *Mol Vis.* **21**: p. 1085-92.
107. Aung L., Chan Y.H., Yeoh E.J., et al. (2009). Retinoblastoma: a recent experience at the National University Hospital, Singapore. *Ann Acad Med Singapore.* **38(8)**: p. 693-8.
108. Lim F.P., Soh S.Y., Iyer J.V., et al. (2013). Clinical profile, management, and outcome of retinoblastoma in singapore. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* **50(2)**: p. 106-12.
109. Chebbi A., Bouguila H., Boussaid S., et al. (2014). [Clinical features of retinoblastoma in Tunisia]. *J Fr Ophtalmol.* **37(6)**: p. 442-8.
110. Roth D.B., Scott I.U., Murray T.G., et al. (2001). Echography of retinoblastoma: histopathologic correlation and serial evaluation after globe-conserving radiotherapy or chemotherapy. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* **38(3)**: p. 136-43.
111. Bedi D.G., Gombos D.S., Ng C.S., et al. (2006). Sonography of the eye. *AJR Am J Roentgenol.* **187(4)**: p. 1061-72.
112. Mindel S. (1997). Role of imager in developing world. *Lancet.* **350(9075)**: p. 426-9.
113. Kongnyuy E.J., van den Broek N. (2007). The use of ultrasonography in obstetrics in developing countries. *Trop Doct.* **37(2)**: p. 70-2.
114. Mariano E.R., Ilfeld B.M., Cheng G.S., et al. (2008). Feasibility of ultrasound-guided peripheral nerve block catheters for pain control on pediatric medical missions in developing countries. *Paediatr Anaesth.* **18(7)**: p. 598-601.
115. Beets-Tan R.G., Hendriks M.J., Ramos L.M., et al. (1994). Retinoblastoma: CT and MRI. *Neuroradiology.* **36(1)**: p. 59-62.
116. Mahajan A., Crum A., Johnson M.H., et al. (2011). Ocular neoplastic disease. *Semin Ultrasound CT MR.* **32(1)**: p. 28-37.
117. Schueler A.O., Hosten N., Bechrakis N.E., et al. (2003). High resolution magnetic resonance imaging of retinoblastoma. *Br J Ophthalmol.* **87(3)**: p. 330-5.
118. de Graaf P., Barkhof F., Moll A.C., et al. (2005). Retinoblastoma: MR imaging parameters in detection of tumor extent. *Radiology.* **235(1)**: p. 197-207.
119. Lemke A.J., Kazi I., Mergner U., et al. (2007). Retinoblastoma - MR appearance using a surface coil in comparison with histopathological results. *Eur Radiol.* **17(1)**: p. 49-60.
120. Brisse H.J., Guesmi M., Aerts I., et al. (2007). Relevance of CT and MRI in retinoblastoma for the diagnosis of postlaminar invasion with normal-size optic nerve: a retrospective study of 150 patients with histological comparison. *Pediatr Radiol.* **37(7)**: p. 649-56.
121. Wilson M.W., Rodriguez-Galindo C., Billups C., et al. (2009). Lack of correlation between the histologic and magnetic resonance imaging results of optic nerve involvement in eyes primarily enucleated for retinoblastoma. *Ophthalmology.* **116(8)**: p. 1558-63.

122. Kashyap S., Sethi S., Meel R., et al. (2012). A histopathologic analysis of eyes primarily enucleated for advanced intraocular retinoblastoma from a developing country. *Arch Pathol Lab Med.* **136(2)**: p. 190-3.
123. Shields C.L., Shields J.A., Baez K.A., et al. (1993). Choroidal invasion of retinoblastoma: metastatic potential and clinical risk factors. *Br J Ophthalmol.* **77(9)**: p. 544-8.
124. Shields C.L., Shields J.A., Baez K., et al. (1994). Optic nerve invasion of retinoblastoma. Metastatic potential and clinical risk factors. *Cancer.* **73(3)**: p. 692-8.
125. Eagle R.C., Jr. (2009). High-risk features and tumor differentiation in retinoblastoma: a retrospective histopathologic study. *Arch Pathol Lab Med.* **133(8)**: p. 1203-9.
126. Shimizu T., Toguchida J., Kato M.V., et al. (1994). Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. *Am J Hum Genet.* **54(5)**: p. 793-800.
127. Gregersen P.A., Urbak S.F., Funding M., et al. (2016). Danish retinoblastoma patients 1943-2013 - genetic testing and clinical implications. *Acta Oncol.* **55(4)**: p. 412-7.
128. Yandell D.W., Campbell T.A., Dayton S.H., et al. (1989). Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *N Engl J Med.* **321(25)**: p. 1689-95.
129. Hiebert S.W. (1993). Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol.* **13(6)**: p. 3384-91.
130. Rojanaporn D., Boontawon T., Chareonsirisuthigul T., et al. (2018). Spectrum of germline RB1 mutations and clinical manifestations in retinoblastoma patients from Thailand. *Mol Vis.* **24**: p. 778-788.
131. Chawla B., Hasan F., Azad R., et al. (2016). Clinical presentation and survival of retinoblastoma in Indian children. *Br J Ophthalmol.* **100(2)**: p. 172-8.
132. Kaliki S., Patel A., Iram S., et al. (2017). RETINOBLASTOMA IN INDIA: Clinical Presentation and Outcome in 1,457 Patients (2,074 Eyes). *Retina.*
133. Sethi S., Pushker N., Kashyap S., et al. (2013). Extraocular retinoblastoma in Indian children: clinical, imaging and histopathological features. *Int J Ophthalmol.* **6(4)**: p. 481-6.
134. Parma D., Ferrer M., Luce L., et al. (2017). RB1 gene mutations in Argentine retinoblastoma patients. Implications for genetic counseling. *PLoS One.* **12(12)**: p. e0189736.
135. Ahani A., Behnam B., Khorshid H.R., et al. (2011). RB1 gene mutations in Iranian patients with retinoblastoma: report of four novel mutations. *Cancer Genet.* **204(6)**: p. 316-22.
136. Website: <http://rb1-lsdb.d-lohmann.de>

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN NGỌC CHUNG

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN RB1
VÀ MỐI LIÊN QUAN ĐẾN ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG
TRÊN BỆNH NHÂN U NGUYÊN BÀO VĨNG MẠC**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN NGỌC CHUNG

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN RB1
VÀ MỐI LIÊN QUAN ĐẾN ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG
TRÊN BỆNH NHÂN U NGUYÊN BÀO VĨNG MẠC**

Chuyên ngành : Nhân khoa

Mã số : 62720157

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. Phạm Trọng Văn**
- 2. PGS.TS. Trần Huy Thịnh**

HÀ NỘI - 2019

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

CK	Creatine Kinase
CT	Computer Tomography Scanner (Cắt lớp vi tính)
cDNA	Complimentary Deoxyribo Nucleic Acid
DNA	Acid deoxyribonucleic
Kb	Kilobase
kDa	Kilodallton
NST	Nhiễm Sắc Thể
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng khuếch đại chuỗi)
RB	Retinoblastoma (U nguyên bào võng mạc)
RB1	Gen RB1
pRB	ProteinRB
RNA	Acid Ribonucleic
UNBVM	U nguyên bào võng mạc
MRI	Magnetic Resonance Image (Cộng hưởng từ hạt nhân)
DV	Disease Variant
NDV	Non-Disease Variant
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (Kỹ thuật khuếch đại đầu dò đa mồi dựa vào phản ứng nối)
NST 13q	Cánh dài nhiễm sắc thể 13
CKDS	Cyclin-dependent kinases
CSF	Chọc dịch não tủy
M1, M2	Mutations: đột biến lần 1, 2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Đa hình đơn nucleotoid)

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đặc điểm bệnh u nguyên bào võng mạc	3
1.1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh UNBVM	3
1.1.2. Dịch tễ bệnh UNBVM	5
1.1.3. Đặc điểm lâm sàng UNBVM	7
1.1.4. Cận lâm sàng	11
1.1.5. Chẩn đoán	15
1.2. Phân loại u nguyên bào võng mạc	16
1.3. Giải phẫu bệnh	21
1.3.1. Đại thể	21
1.3.2. Vi thể	21
1.3.3. Các yếu tố nguy cơ cao gây di căn được xác định	23
1.3.4. Phân giai đoạn Giải phẫu bệnh theo pTNM 7 th AJCC/UICC	23
1.4. Bệnh học phân tử bệnh u nguyên bào võng mạc	24
1.4.1. Vị trí và cấu trúc và chức năng của gen RB1	24
1.4.2. Protein RB	24
1.4.3. Chức năng gen RB1	26
1.5. Cơ chế gây bệnh.....	Error! Bookmark not defined.
1.5.1. Cơ chế bệnh sinh	27
1.5.2. Đột biến gen Rb1 gây bệnh u nguyên bào võng mạc	28
1.5.3. Di truyền trong bệnh UNBVM.	29
1.6. Các phương pháp phát hiện đột biến gen RB1	32
1.6.1. Đột biến gen RB1 gây bệnh UNBVM	32
1.6.2. Các dạng đột biến gen RB1	34
1.6.3. Sự phân bố các đột biến trên gen RB1	37
1.6.4. Tỷ lệ phát hiện đột biến trên gen RB1	39

1.7. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và đột biến gen RB1 trên bệnh nhân UNBVM	41
1.7.1. Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen RB1	41
1.7.2. Mối liên quan giữa đột biến gen và mức độ nghiêm trọng của bệnh	42
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
2.1. Đối tượng nghiên cứu	44
2.2. Địa điểm nghiên cứu	45
2.3. Thời gian nghiên cứu	45
2.4. Phương pháp nghiên cứu	46
2.4.1. Phương pháp nghiên cứu	46
2.4.2. Cỡ mẫu nghiên cứu	46
2.4.3. Các nội dung nghiên cứu	46
2.5. Các bước tiến hành nghiên cứu	47
2.5.1. Hỏi bệnh và khám bệnh	47
2.5.2. Chẩn đoán hình ảnh	49
2.5.3. Giải phẫu bệnh	49
2.5.4. Chẩn đoán	49
2.5.5. Quy trình phân tích đột biến gen RB1	50
2.6. Xử lý kết quả	54
2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu	54
2.8. QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU	55
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	56
3.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng	56
3.1.1. Đặc điểm lâm sàng	56
3.1.2. Triệu chứng chẩn đoán hình ảnh	62
3.1.3. Giải phẫu bệnh	64
3.2. Kết quả phân tích đột biến gen RB1	65
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA	65

3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen RB1	66
3.2.3. Các dạng đột biến gen RB1 trên bệnh nhân UNBVM	70
3.3. Mối liên quan giữa đột biến gen RB1 và đặc điểm lâm sàng của bệnh U nguyên bào võng mạc	80
3.3.1. Mối liên quan giữa đột biến và đặc điểm lâm sàng ở bệnh nhân UNBVM ..	80
3.3.2. Mối liên quan giữa dạng đột biến gen RB1 và đặc điểm lâm sàng	82
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	87
4.1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh UNBVM	87
4.1.1. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh UNBVM	87
4.1.2. Các đặc điểm chẩn đoán hình ảnh của bệnh nhân UNBVM	95
4.1.3. Đặc điểm mô bệnh học UNBVM 101	
4.2. Kết quả phân tích xác định đột biến gen RB1 trên bệnh nhân Việt Nam mắc UNBVM	103
4.2.1. Đột biến vô nghĩa (nonsense)	106
4.2.2. Bệnh nhân có đột biến lệch khung dịch mã (frame- shift)	108
4.2.3. Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa (Missense)	110
4.2.4. Đột biến tại vị trí nối exon- intron (Splicing)	111
4.2.5. Các đột biến mới	113
4.3. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và đột biến gen RB1	118
4.3.1. Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen RB1	120
4.3.2. Mối liên quan giữa yếu tố nguy cơ cao và đột biến gen RB1	122
4.3.3. Mối liên quan giữa mức độ nặng của bệnh với đột biến gen RB1 ...	123
4.3.4. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và dạng đột biến gen RB1	125
KẾT LUẬN	134
CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các phương pháp xác định đột biến gen RB1	32
Bảng 1.2.	Tỷ lệ phát hiện đột biến trên gen RB1 ở các bệnh nhân UNBVM được báo cáo từ các quốc gia khác nhau	39
Bảng 2.1.	Thành phần phản ứng PCR.....	51
Bảng 2.2.	Chu trình nhiệt phản ứng PCR như sau.....	52
Bảng 2.3.	Thành phần của phản ứng Sequencing.....	53
Bảng 2.4.	Chu trình nhiệt của phản ứng Sequencing.....	53
Bảng 3.1.	Phân bố tuổi đi khám bệnh lần đầu	56
Bảng 3.2.	Tỷ lệ phân bố thể bệnh theo giới.....	58
Bảng 3.3.	Tiền sử gia đình bị bệnh	59
Bảng 3.4.	Triệu chứng lâm sàng chủ quan	59
Bảng 3.5.	Triệu chứng lâm sàng	60
Bảng 3.6.	Triệu chứng lâm sàng khi soi đáy mắt	61
Bảng 3.7.	Phân nhóm UNBVM theo quốc tế (ICR)	62
Bảng 3.8.	Kết quả siêu âm nhãn khoa.....	62
Bảng 3.9.	Kết quả của chụp CT sọ não- hóc mắt	63
Bảng 3.10.	Kết quả của chụp MRI sọ não- hóc mắt	63
Bảng 3.11.	Các dấu hiệu trên GPB	64
Bảng 3.12.	Phân loại giải phẫu bệnh của khối u theo TNM	65
Bảng 3.13.	Phân bố đột biến trên gen RB1 của bệnh nhân UNBVM	68
Bảng 3.14.	Phân bố đột biến và đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân.....	69
Bảng 3.15:	Liên quan mức độ nặng của bệnh và đột biến gen Rb1	82
Bảng 3.16.	Mối liên quan tuổi phát hiện bệnh và dạng đột biến.....	83
Bảng 3.17.	Đặc điểm lâm sàng bệnh nhân UNBVM có đột biến vô nghĩa ..	83
Bảng 3.18.	Đặc điểm lâm sàng BN UNBVM có đột biến lệch khung dịch mã...	84
Bảng 3.19.	Đặc điểm lâm sàng BN UNBVM với đột biến sai nghĩa	85
Bảng 3.20.	Đặc điểm lâm sàng BN UNBVM với đột biến tại vị trí nối.....	85
Bảng 4.1:	So sánh tỷ lệ % các triệu chứng lâm sàng hay gặp ở một số nghiên cứu	93

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Phân bố UNBVM ở các nước trên thế giới	7
Hình 1.2.	UNBVM (A) và hình ảnh siêu âm khối u nội nhãn (B)	12
Hình 1.3:	UNBVM với MRI	14
Hình 1.4:	Hình ảnh T1 có tiêm đối quang từ	14
Hình 1.5:	U phát triển vào buồng dịch kính.	14
Hình 1.6.	UNBVM nhóm A	19
Hình 1.7.	UNBVM nhóm B	19
Hình 1.8.	UNBVM nhóm C	19
Hình 1.9.	UNBVM nhóm D	19
Hình 1.10.	UNBVM nhóm E	20
Hình 1.11.	Các vùng trên Gen RB1, các Exon trên gen RB1	25
Hình 1.12.	Các vùng trên proteinRB	25
Hình 1.13.	Cơ chế bệnh sinh UNBVM	28
Hình 1.14.	Phân bố các đột biến hay gặp trên thế giới	35
Hình 1.15.	Sự phân bố các dạng đột biến hay gặp trên các vùng của gen RB1 ..	38
Hình 3.1.	Tỷ lệ mắc bệnh theo giới	57
Hình 3.2.	Tỷ lệ lý do bệnh nhân đi khám	57
Hình 3.3.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 3 của gen RB1.	66
Hình 3.4.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 8 (B) của gen RB1.	66
Hình 3.5.	Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB54 và RB73	70
Hình 3.6.	Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB65 và RB71	71
Hình 3.7.	Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB70	71

Hình 3.8. Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB57 và RB62	72
Hình 3.9. Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB79	73
Hình 3.10. Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân RB51	75
Hình 3.11. Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB55	76
Hình 3.12. Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB55	77
Hình 3.13. Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB61	78
Hình 3.14. Phân bố tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen RB1	81
Hình 3.15. Phân bố yếu tố nguy cơ cao và đột biến gen RB1	81