

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**BỘ Y TẾ**



**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**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**HÀ NỘI – 2019**

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**Người hướng dẫn khoa học:**

**1. PGS.TS. Phạm Trọng Văn**

**2. PGS.TS. Trần Huy Thịnh**

**Phản biện 1: PGS. TS. Hoàng Thị Phúc**

**Phản biện 2: PGS. TS. Phạm Văn Tân**

**Phản biện 3: PGS. TS. Trần Văn Khoa**

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường  
Họp tại trường Đại học Y Hà Nội.

*Vào hồi.....ngày.....tháng.....năm 2019.*

**Có thể tìm hiểu luận án tại:**

1. Thư viện Đại học Y Hà Nội
2. Thư viện Quốc gia

**DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT**

DNA	Acid deoxyribonucleic
NST	Nhiễm Sắc Thể
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng khuếch đại chuỗi)
RB1	Gen RB1
pRB	ProteinRB
RNA	Acid Ribonucleic
UNBVM	U nguyên bào võng mạc
DV	Disease Variant
NDV	Non-Disease Variant
NST 13q	Cánh dài nhiễm sắc thể 13

**ĐẶT VẤN ĐỀ****1. Tính cấp thiết của đề tài**

U nguyên bào võng mạc là khối u nguyên phát, ác tính ở nội nhãn ở trẻ em. 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. Bệnh 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, 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. UNBVM gây tử vong với tỷ lệ từ 40% đến 70% ở các nước đang phát triển ở Châu Á và Châu Phi. Chẩn đoán sớm, điều trị kịp thời quyết định sự sống của trẻ, cứu thị lực, bảo tồn mắt bị bệnh và tỷ lệ sống từ 88% đến hơn 95% các trường hợp bị bệnh. 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 cũng như phòng bệnh, tư vấn di truyền

**2. Mục tiêu nghiên cứu:**

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.

**3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài**

Nghiên cứu đã phát hiện ra nhiều đột biến gen, ở nhiều vị trí khác nhau của gen RB1 trên người Việt Nam bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp với tỷ lệ là 58%. Đã phát hiện 10 đột biến đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đó và 8 đột biến mới được tìm thấy trong nghiên cứu. Bước đầu xây dựng được bản đồ phân tích đột biến hay phổ đột biến gen RB1 và phân tích mối liên quan với đặc điểm lâm sàng của người bệnh Việt Nam. Góp phần xây dựng quy trình khoa học, phương pháp phân tích và cơ sở dữ liệu cho việc chẩn đoán sớm, tiên lượng bệnh cũng như giúp cho điều trị và phòng bệnh trong gia đình và cộng đồng.

**4. Cấu trúc luận án**

Luận án được trình bày 136 trang (không kể tài liệu tham khảo và phụ lục, mục lục)

Luận án được chia thành 8 phần

Đặt vấn đề: 2 trang

Chương 1: Tổng quan tài liệu 41 trang

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 12 trang

Chương 3: Kết quả nghiên cứu 31 trang

Chương 4: Bàn luận 47 trang

Kết luận 2 trang

Luận án gồm 27 bảng, 30 hình ảnh.

Có 136 tài liệu tham khảo tiếng Việt và tiếng Anh.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. Dịch tễ bệnh UNBVM

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%). 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

### 1.2. Đặc điểm lâm sàng UNBVM

#### 1.2.1. 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. 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 mắt đau nhức và đỏ (do glôcôm), có thể lồi mắt do bệnh nhân được gia đình cho đi khám muộn. Ở nhiều nước đang phát triển trẻ đến khám muộn vì lồi 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.

#### 1.2.2. Cận lâm sàng

**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

**Chụp cắt lớp vi tính (CT- Scanner):** Chụp cắt lớp vi tính cung cấp các chi tiết các mô mềm và xương hóc mắt và có vai trò chẩn đoán xác định UNBVM.

**Chụp cộng hưởng từ (MRI):** 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 nốt vôi hóa xuất hiện như các điểm với cường độ tín hiệu tốt nhất nhìn thấy trên T2.

#### **Phân nhóm theo quốc tế**

Năm 2003, Murphree đề ra phân loại ABC tại hội nghị về UNBVM ở Paris. U được xếp nhóm theo mức độ lan rộng của khối u nội nhãn.

**Nhóm A:** Khối u  $\leq 3\text{mm}$ , u nhỏ và có bờ tròn nét, không có phân tán tế bào u nội nhãn.

**Nhóm B:** U  $> 3\text{ mm}$  hoặc, dịch dưới võng mạc  $\leq 3\text{ mm}$  tính từ viền khối u

**Nhóm C:** Các khối u đã qua nhóm A và B, tiếp theo là reo rắc tế bào u vào dịch kính hay dịch dưới võng mạc hoặc cả hai. Dịch dưới võng mạc chỉ khu trú ở góc 1/4.

#### **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. reo rắc tế bào u toàn bộ dịch kính.

#### **Nhóm E**

Khối u lớn đã tiến triển qua các giai đoạn nói trên và gây phá hủy cấu trúc nhãn cầu:

#### 1.4. 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

#### 1.5. Bệnh học phân tử bệnh u nguyên bào võng mạc

##### 1.5.1. Vị trí và cấu trúc và chức năng của gen RB1

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)

##### **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.

Các đột biến ở cả hai alen của gen RB1 gây nên sự phát triển của khối u. 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

##### **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 RB1, lần đột biến thứ 2 (đột biến tại tế bào võng mạc chưa biệt hóa) dẫn đến sự hình thành khối u

- 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 RB1)

## 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

\* **Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân:** Theo tác giả Ramasubramanian và Shields

- 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.

- 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

### 2.4.2. Cơ mẫu nghiên cứu

UNBVM là bệnh do đột biến gen RB1 và có thể di truyền cho thế hệ sau bởi vậy nên lấy cơ mẫu thuận tiện

### 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

### 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

### 2.5.5. 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.

#### 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 mồi 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.

#### 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).

#### 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

### 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

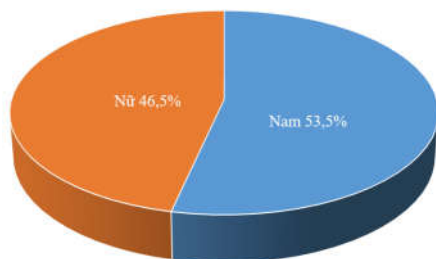
##### 3.1.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi phát hiện bệnh

Tuổi 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

##### 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%)

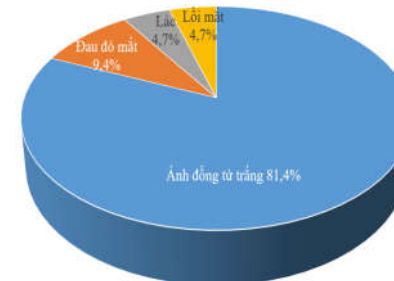
Số bệnh nhân nam bị đột biến gen RB1 là 11/23 (47,8%), số bệnh nhân nữ là 13/20 (65%) phát hiện đột biến gen RB1



Hình 3.1. Tỷ lệ mắc bệnh theo giới

##### 3.1.1.3. Lý do bệnh nhân đi khám bệnh

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



Hình 3.2. Tỷ lệ lý do bệnh nhân đi khám

##### 3.1.1.4. Thể bệnh một mắt, hai mắt

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 (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.

##### \* Đặc điểm khối u khi soi đáy mắt gián tiếp

Bảng 3.5. 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.

### 3.1.2. Triệu chứng chẩn đoán hình ảnh

**3.1.2.1. Siêu âm nhãn khoa:** 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

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

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

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.

## 3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐỘT BIẾN GEN RB1

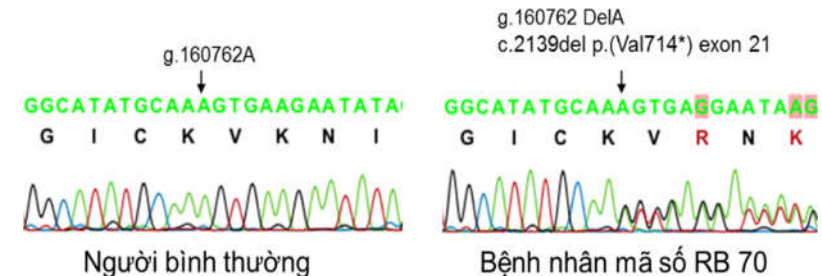
### 3.2.1. Kết quả xác định đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự gen

Kết quả cho thấy có 24/43 (58%) trường hợp phát hiện có đột biến gen RB1. 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

### 3.2.2. Các dạng đột biến gen RB1 trên bệnh nhân UNBVM

#### \* Đột biến p.Val714\*



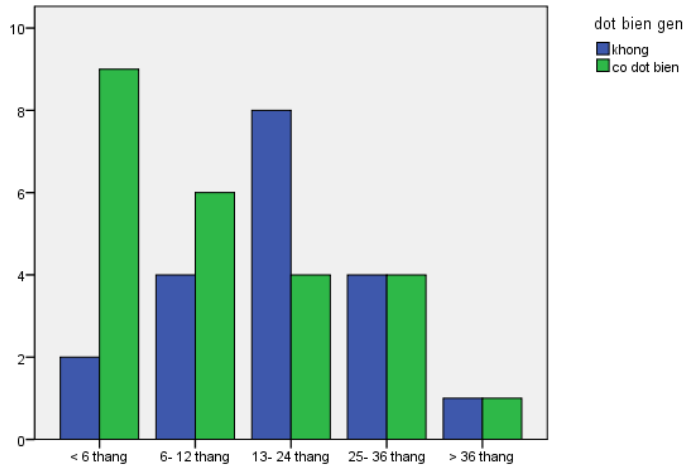
**Hình 3.3. Kết quả giải trình tự gen RB1 của bệnh nhân mã số RB70**

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 RB1 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.

### 3.3.1.1. Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen RB1



**Hình 3.15. Phân bố tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen RB1**

**Nhận xét:** 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  $p = 0,224$  ( $p > 0,05$ )

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

**Bảng 3.1. 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	YT NCC	Mức độ nặng
RB5	c.861G>A	Variant	Vị trí nổi	Đị hợp	DV	19	2M	Có	A/D	Không	TB
RB6	c.1204T>A	p.Ser402 Thr	Sai nghĩa	Đị hợp	New	36	MP	Không	D/0	Không	TB
RB8	c.2211+1 G>A	Variant	Vị trí nổi	Đị hợp	DV	12	2M	Không	E/C	Có	Nặng
RB10	c.2664-10T>A	Variant	Vị trí nổi	Đồng hợp	DV	10	2M	Không	B/D	Có	Nặng
RB11	c.2664-10T>A	Variant	Vị trí nổi	Đồng hợp	DV	28	MT	Không	0/D	Không	TB
RB29	c.2041G>T	p.Trp68 1Cys	Sai nghĩa	Đị hợp	New	33	MT	Không	0/D	Không	TB
RB31	c.1204T>A	p.Ser402 Thr	Sai nghĩa	Đị hợp	New	07	2M	Không	D/A	Không	Nặng
RB50	c.693-694insT	p.Pro23 2Serfs*8	Lệch khung	Đị hợp	New	34	MT	Không	0/E	Có	Nặng
RB51	c.485T>A	p.Phe16 2Tyr	Sai nghĩa	Đị hợp	New	20	2M	Không	D/C	Có	Nặng
RB54	c.297G>A	p.Trp99 X	Vô nghĩa	Đị hợp	DV	04	2M	Có	D/B	Không	Nặng
RB55	c.1333-2A>G	Variant	Vị trí nổi	Đị hợp	DV	15	2M	Có	B/D	Không	TB
RB57	c.371_372del	p.Ile124 Argfs*6	Lệch khung	Đị hợp	DV	02	2M	Có	B/A	ND	Nặng
RB59	c.265-1G>T	Variant	Vị trí nổi	Đị 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.Ile124 Argfs*6	Lệch khung	Dị hợp	DV	15	2M	Có	B/D	Không	TB
RB65	c.1953T>A	p.Tyr65 1X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	06	2M	Không	A/D	Có	Nặng
RB66	c.2677insT	p.893G1 yfs24*	Lệch khung	Dị hợp	New	84	MP	Không	D/0	Không	TB
RB69	c.1204T>A	p.Ser402 Thr	Sai nghĩa	Dị hợp	New	04	2M	Không	B/D	Có	Nặng
RB70	c.2139del	p.Val71 4*	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	02	2M	Không	D/B	Không	Nặng
RB71	c.1953T>A	p.Tyr65 1X	Vô nghĩa	Dị hợp	DV	16	2M	Không	B/D	Có	Nặng
RB75	c.2664-10T>A	Variant	Vị trí nổi	Đòn ghợ p	DV	02	2M	Không	D/A	Có	Nặng
RB76	c.1312delT	Fs	Lệch khung	Dị hợp	New	05	2M	Không	B/D	Có	Nặng
RB78	c.2664-10T>A	Variant	Vị trí nổi	Đòn g hợp	New	18	2M	Có	B/D	Không	TB
RB79	c.1033delCT	p.Thy34 5Argfs*6	Lệch khung	Dị hợp	New	02	2M	Không	E/B	Có	Nặng

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

ND (No Data): không có dữ liệu

YTNCC: yếu tố nguy cơ cao

New: Đột biến mới

TB: trung bình

## 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 khi khám lần đầu

Trong nghiên cứu của chúng tôi hầu hết bệnh nhân tới bệnh viện khám lần đầu:  $15,47 \pm 11,92$  tháng, bệnh nhân ít tuổi nhất là 2 tháng, nhiều tuổi nhất là 84 tháng, tuổi trung bình 13 tháng

Một nghiên cứu trên 295 BN tại một bệnh viện ở TP Bắc Kinh (Trung Quốc) tuổi trung bình 2,8 tuổi, nhỏ nhất là 1 tháng và lớn nhất là 14 tuổi {Bai, 2011 #198; Bai, 2011 #198}

Một nghiên cứu ở Brazil trên 38 BN cho thấy tuổi trung bình của nhóm BN là 33.8 tháng ở nhóm bệnh nhân thể một mắt và 19.15 tháng ở nhóm bệnh nhân thể hai mắt {Bonanomi, 2009 #199}

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 và 27,4 tháng và nhóm BN thể hai mắt là 30 tháng, tuổi thấp nhất là 1,5 tháng và lớn nhất là 84 tháng {Chung, 2008 #203}

Theo y văn trên thế giới thường bệnh nhân nhóm 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

Theo nghiên cứu của Taylor tỷ lệ giới tính là 99 nam và 66 nữ. 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). 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

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 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%. Trong 470 bệnh nhân UNBVM ở Trung Quốc ánh đồng tử trắng là 73% bệnh nhân. 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%

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%)

#### **4.1.1.4. 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.

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 RB1

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%.

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

#### **4.1.2.1. Đặc điểm trên siêu âm**

Nghiên cứu của Roth và cộng sự cho thấy kết quả có hình ảnh can xi hóa ở 63/69 mắt bệnh của 48 bệnh nhân (chiếm 91,3%) khi làm siêu âm mắt {Roth, 2001 #230}

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 {Bedi, 2006 #321}

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%

#### **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 can xi hóa trên phim chụp cắt lớp vi tính với độ nhạy là 81% và độ đặc hiệu là 96%. Nghiên cứu của tác giả Brisse và cộng sự cho thấy hình ảnh can xi hóa trong khối u là 96%

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 can xi hóa xuất hiện (chiếm 92,8%).

#### **4.1.2.3. Đặc điểm trên chụp cộng hưởng từ**

Một nghiên cứu của tác giả Brisse 2007 và cộng sự cho thấy hình ảnh can xi hóa trong khối u chiếm 96% ở mắt bệnh u nguyên bào võng

mạc được chụp MRI. Một nghiên cứu của tác giả Graaf và cộng sự 2005 và cộng sự cho thấy hình ảnh can xi hóa trong khối u chiếm 96% ở mắt bệnh u nguyên bào võng mạc được chụp MRI,

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.

#### **4.1.3. Đặc điểm mô bệnh học UNBVM**

##### **Giải phẫu bệnh UNBVM**

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%. Trong nghiên cứu này 25% 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.

#### **4.2. Kết quả phân tích đột biến gen RB1**

Kết quả nghiên cứu cho thấy 24/43 (55,8%) bệnh nhân UNBVM được phát hiện có đột biến gen RB1 và 19/43 (44,2%) bệnh nhân không phát hiện thấy đột biến gen RB1. Tỷ lệ đột biến phát hiện được đã được báo cáo trong các nghiên cứu trên thế giới dao động từ 19% đến 72%. 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.

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 RB1 ở vùng exon 3, 4, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19, 20, 21, 24, 26 và intron 2, 13, 21, 24, 25.

#### **4.3. Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh và đột biến gen RB1:**

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  $p = 0,224$  ( $p > 0,05$ ). Theo Lohmann và cộng sự sự phân bố tuổi khi chẩn đoán không khác nhau giữa các bệnh nhân có hay không có đột biến gen RB1 {Lohmann, 2004 #210}. 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.

#### **3.3.1.3. Mối liên quan giữa yếu tố nguy cơ cao và đột biến gen RB1**

Trong số 24 BN được xác định có đột biến gen RB1 thì có 11 BN có yếu tố nguy cơ cao (chiếm 50%). Có 11 bệnh nhân không có yếu tố nguy cơ cao, có 2 bệnh nhân không điều trị cắt bỏ nhãn cầu cho nên không có kết quả giải phẫu bệnh xác định yếu tố nguy cơ cao. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

#### **Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và dạng đột biến gen RB1 gây cắt ngắn proteinRB**

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. Nghiên cứu mối liên quan kiểu hình- 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 thể hệ sau, tiên lượng bệnh {Lohmann, 2004 #210}. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu khác nhau, cách lấy mẫu cũng khác nhau để nghiên cứu các dạng đột biến gen RB1 liên quan tới kiểu hình như thế nào, mức độ cắt ngắn của proteinRB với mức độ nặng của bệnh không. Để đánh giá mức độ nghiêm trọng 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. Trong nghiên cứu của Choy và cộng sự trên nhóm bệnh nhân Trung Quốc không tìm thấy có mối tương quan về kiểu hình- kiểu gen nào. Nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân Ấn Độ của tác giả Ata-ur-Rasheed và cộng sự cũng không thấy có mối tương quan giữa kiểu hình- kiểu gen

Gần đây một tác giả Trung Quốc và các đồng nghiệp đã công bố một cuộc khảo sát sơ bộ về mối tương quan kiểu hình- kiểu gen ở bệnh nhân Trung Quốc. Sự phân bố mức độ nghiêm trọng của bệnh theo phân loại ICRB khác biệt đáng kể so với chúng ta. 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 vì thiếu tiếp cận chăm sóc Y tế và tuyên truyền trong dân của họ. Chúng tôi tin rằng việc so sánh sẽ khó khăn trong các nghiên cứu này. Ở những nơi chăm sóc y tế ban đầu và công tác tuyên truyền tốt thì so sánh sẽ tương đối hợp lý. Taylor và cộng sự đã đánh giá các liên quan kiểu hình- kiểu gen ở bệnh nhân Pháp và mô tả sự phân bố của các loại đột biến. Nghiên cứu của chúng tôi có ít bệnh nhân bị đột biến vô nghĩa và lệch khung dịch mã. Chúng tôi đã tìm thấy đột biến RB1 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. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng không thấy 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 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, tác giả Joseph.

**Mối liên đặc điểm lâm sàng của BN UNBVM có đột biến sai nghĩa:** Trong nghiên cứu của chúng tôi có 05 BN có đột biến sai nghĩa trong tổng số 24 BN phát hiện đột biến, cả 05 BN có đột biến là đột biến mới chưa được báo cáo trước đó trên thế giới, bệnh nhân 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. Các đột biến sai nghĩa trong nghiên cứu gặp ở các lứa tuổi từ 2 tháng đến 37 tháng, bị bệnh cả thể một mắt và hai mắt (đa số). có 7/9 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao trong nhóm đột biến sai nghĩa. Qua phân tích mối tương quan giữa đột biến gen RB1 với độ tuổi đi khám phát hiện bệnh lần đầu,

phân nhóm quốc tế ICIOR, 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 tương quan kiểu gen- kiểu hình.

**Mối liên đặc điểm lâm sàng của BN UNBVM có đột biến tại vị trí nối exon- intron:** Trong nghiên cứu của chúng tôi có 9 BN có đột biến tại vị trí nối trong tổng số 24 BN phát hiện. Đột biến c.2664-10T>A gặp ở 3 bệnh nhân, ngoài ra còn độ biến c.2211+ 1G>A, đột biến c.1333-2A>G, c.861G>A đã được báo cáo trước đó trên thế giới đã được tìm thấy trên bệnh nhân Việt Nam. Qua phân tích nhóm nghiên cứu không thấy có mối tương quan kiểu hình- kiểu gen trên bệnh nhân UNBVM có đột biến Splicing. 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.

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.

## 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 RB1 là có 11 bệnh nhân có yếu tố nguy cơ cao

### 2. Đột biến gen RB1 và mối liên quan đặc điểm lâm sàng

- Nghiên cứu phát hiện 24 bệnh nhân có đột biến gen RB1, tỷ lệ đột biến gen là 24/43 (55,8%)

- Tỷ lệ đột biến vô nghĩa là 12,5%, đột biến lệch khung dịch mã 29,2%, đột biến sai nghĩa 20,8%, đột biến Splicing là 37,5%,

- Có tất cả 17 đột biến được phát hiện trong đó có 7 đột biến mới

- Không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa đột biến gen RB1 và các đặc điểm lâm sàng trên bệnh nhân UNBVM

**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.
3. 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.

MINISTRY OF EDUCATION & TRAINING

MINISTRY OF HEALTH

**HANOI MEDICAL UNIVERSITY**



**NGUYEN NGOC CHUNG**

**RB1 MUTATIONS STUDY AND RELALATIONSHIP  
TO CLINICAL CHARACTERISTICS IN PATIENTS  
WITH RETINOBLASTOMA**

**Speciality: Ophthalmology**

**Code: 62720157**

**SUMMARY OF THESIS**

**HA NOI – 2019**

**THE THESIS IS COMPLETED  
IN HANOI UNIVERSITY**

**Supervisors:**

- 1. A.Prof. Pham Trong Van**
- 2. A.Prof. Tran Huy Think**

**Reviewer 1:**

**Reviewer 2:**

**Reviewer 3:**

Hanoi Medical University

At ..... day ..... month ..... 2019

**The thesis can be found at:**

Hanoi Medical University Library

National Library

**LIST OF ABBREVIATIONS**

DNA	Acid deoxyribonucleic
PCR	Polymerase Chain Reaction
RB1	Gen RB1
pRB	ProteinRB
RNA	Acid Ribonucleic
RB	Retinoblastoma
DV	Disease Variant
NDV	Non-Disease Variant

**INTRODUCTION**

**1. The urgency of the topic**

Retinoblastoma is a primary, malignant tumor in the inner eye of children. Most cases occur in one eye, about 25 - 30% of cases are both sides. At a rate of 1/15000 or 1/18000 alive babies. The disease caused by the RB1 gene mutation in chromosome 13, this is the first tumor suppressor gene discovered and studied, the symptoms of this endothelial tumor progressively worsen if not diagnosed and Timely treatment will invade and metastasize the patient. UNBVM is fatal at rates ranging from 40% to 70% in developing countries in Asia and Africa. Early diagnosis, timely treatment determines the life of the child, saving eyesight, conserving the affected eye and survival rate from 88% to over 95% of the cases. Advances in molecular biology have screened for the discovery of RB1 mutations on patients and patients' families to help early diagnosis, detection of healthy carriers and prenatal diagnosis to prevent and reduce incidence. sick. In addition, determining the mutation of RB1 gene with clinical characteristics will help prognosis and have a more precise and effective treatment course as well as disease prevention for family members and lineages. as well as disease prevention, genetic counseling

## **2. Research objectives:**

1. Describe clinical and subclinical characteristics of retinoblastoma patients

2. Analysis of RB1 gene mutation and relationship to clinical characteristics in patients with retinoblastoma.

## **3. The scientific and practical significance of the topic**

The study found many gene mutations, in different positions of RB1 gene in Vietnamese by direct sequencing method with the rate of 58%. 10 mutations have been reported in previous studies and 8 new mutations were found in the study. The first step is to build a map of analyzing mutations or spectrum mutations of RB1 and analyzing the relationship with the clinical characteristics of Vietnamese patients. Contribute to the development of scientific processes, analytical methods and databases for early diagnosis and prognosis, as well as for treatment and prevention in families and communities.

## **4. Structure of the thesis**

The thesis is presented 136 pages (excluding references and appendices, table of contents)

The thesis is divided into 8 sections

Problem: 2 pages

Chapter 1: Document overview 41 pages

Chapter 2: Subjects and research methods 12 pages

Chapter 3: Research results 31 pages

Chapter 4: Discussion 48 pages

Conclude 2 pages

The thesis includes 27 tables, 30 pictures.

Yes 136 Vietnamese and English references.

## **CHAPTER 1. OVERVIEW**

### **1.1. Epidemiology of RB**

Worldwide with 7,202- 8,102 children are diagnosed with retinoblastoma every year, but there are significant differences in survival rates based on the country's economic development and accessibility to diagnosis. Early diagnosis or medical care status. Specifically: the mortality rate due to UNBVM: Africa (70%), Asia without Japan (38%), Japan (3%), Europe (5%), North America (3%), Chau Latin America (20%) and Oceania (10%). Kivela calculated that if the world could achieve the same survival rate to Europe, North America or Japan, the global mortality rate from disease (about 42%) would decrease from 3,001-3,376 to about 400 diseases. deaths per year

### **1.2. Clinical characteristics RB**

#### **1.2.1. Clinical manifestations**

The most common and early signs of UNBVM are white pupil, the sign of white pupil or cat eyes. The second reason children are examined by UNBVM is strabismus or strabismus. Rubbing is also the reason that when photographing, the pupils of two different eyes have this sign, accounting for about 20% of cases. Other signs include soreness and redness (due to glaucoma), which may be protruding because the patient is late for family visits. In many developing countries, children come late for examination because of exophthalmia due to exogenous tumors such as inflammation of the eye socket due to tumor necrosis, pupil dilatation on one side, iris heterochromia, hemorrhage in the room, pus in the room, uveitis and tremor of the eyeball due to tumors in the macula.

#### **1.2.2. Imaging**

Ultrasound: Ultrasound is a simple, fast, non-invasive image diagnostic method and economical to allow easy detection of tumors



and fluid in the eyeball, lesions found in more than 95% of UNBVM evaluated by ultrasound A and B

Computerized tomography (CT-Scanner): Computerized tomography provides details of soft tissue and eye socket bone and has a diagnostic role to determine UNBVM.

Magnetic resonance imaging (MRI): Retinoblastoma manifests an increase in signaling for glass fluid on T1 images and a decrease in signal on T2. The calcified nodules appear as points with the best signal strength seen on T2.

#### **ICRB**

In 2003, Murphree proposed an ABC classification at the RB conference in Paris. U is group according to the extent of the endothelial tumor.

Group A: Tumor  $\leq$  3mm, small and round-sided tumors, no dispersion of intraocular tumor cells.

Group B: U > 3 mm or, below the retinal fluid  $\leq$  3 mm from the tumor border

Group C: Tumors have passed through groups A and B, followed by sprinkling tumor cells into fluid or fluid under the retina or both. Under the retina is only localized at 1/4 angle.

Group D: Reo sprays the tumor cells into the fluid under the retina or translates glasses or both more and larger. The lower retinal fluid accounts for more than 1/4 of the corner, even with a full retinal detachment. sprinkle the entire tumor cell.

Group E: Large tumors have evolved through the above stages and cause destruction of the eye structure:

#### **1.4. Pathology**

The eyes that are treated are removed and will undergo surgery to determine whether the UNBVM has risk factors, differentiate it or not.

### **1.5. Molecular pathology of retinoblastoma tumor**

#### **1.5.1. Location and structure and function of the gene RB1**

The RB1 gene is located in the long chromosome branch 13, zone 1, band 4, secondary band 2, symbol: 13q14.2, the gene consists of 178,240 base pairs (from base pair 48,303,747 to 48,481,986), a total of 27 exon and 26 intron. RB1 gene encodes proteinRB (pRB)

#### **Function gene RB1**

ProteinRB is important for cell cycle control and cell differentiation, involved in G1 / S phase transition by inhibiting the necessary E2F transcription factor for the onset of the phase. S.

Mutations in both alleles of RB1 cause tumor growth. While a de novo mutation or stem cell mutation causes bilateral retinal tumors, somatic mutations in both alleles on retinal cells account for 85% of the tumor in one eye.

Genetics in RB.

Knudson's "two hit" hypothesis was launched in 1971 after studying and tracking the clinical characteristics of the disease. The hypothesis that UNBVM formation requires two gene mutations

- In hereditary disease: the first mutation (stem cell mutation) is a mutation that occurs on exons of RB1 gene, second mutation (mutation in unspecified retinal cells). leads to tumor formation

- In non-hereditary disease: unspecified retinal cells must undergo two new mutations to form retinoblastoma tumor or somatic cell mutation (mutations on 2 alleles of the same gene RB1)

## CHAPTER 2 SUBJECTS AND METHODS

### 2.1. Research subjects

The study included 43 patients diagnosed with UNBVM with the following clinical and subclinical signs

\* Patient selection criteria: According to Ramasubramanian and Shields author {Ramasubramanian, 2012 # 27}

- Comprehensive eye examination from subjective symptoms, examination from the previous part to the ophthalmoscopy

- Under-eye examination: After pupil dilatation, it may be under anesthesia or under anesthesia, assess position, tumor size, number of tumors, tumor color, examine both eyes, The characteristics of the tumor change according to the stage of the disease.

- Imaging diagnosis such as ophthalmic ultrasound, computerized tomography, magnetic resonance imaging with intraocular tumor images and calcification images in tumors.

All patients who undergo ophthalmoscopy with the tumor described above will be diagnosed with retinoblastoma, international classification and included in the study.

\* Exclusion criteria

Patients and families do not agree to participate in this study

### 2.2. Research location

- VNIO, National Pediatric Hospital where diagnosis and treatment and follow-up after treatment

- Center for Protein- Genetic Research at Hanoi Medical University, where tests determine and conduct molecular genetic techniques.

### 2.3. Time

From October 2014 to October 2016

### 2.4. Methods

#### 2.4.1. Methods

Method: cross-sectional description

#### 2.4.2. Sample size of the study

UNBVM is a disease caused by RB1 gene mutation and can be inherited for the next generation so it is convenient to take the sample size

#### 2.5.2. Image analysis

- Ultrasound, CT Scan: conducted at Central Eye Hospital

- Cranial magnetic resonance imaging - eye socket: conducted at the National Hospital of Pediatrics

#### 2.5.3. Pathology

Only when treatment removes the eyeball and takes the eyeball as histopathology in the late stage tumor

#### 2.5.4. Diagnose

##### 2.5.4.1. Implementing the quadrants

- Reasons for examination: white pupil, strabismus, red pain.

- Eye examination and ophthalmoscopy: accurately assess the status of intraocular tumors for definite diagnosis, grouping by international

- Image diagnostics available at the hospital: ultrasound, CT, MRI

- Disease surgery: diagnosis of high risk factors or not only in patients with late stage tumors: group D, E

### ***2.5.5. Process of genetic mutation analysis RB1***

#### ***2.5.5.1. Sampling procedure***

- When the patient has been diagnosed to be diagnosed with UNBVM, the patient will receive peripheral venous blood: 2- 3 ml stored in EDTA anticoagulant tube with a concentration of 1.5mg / ml, ensuring sterile Absolute and cold storage

- Sent to the laboratory of Gen-Protein Center of Hanoi Medical University for molecular biology analysis for gene mutation RB1

#### ***2.5.5.2. DNA extraction process from peripheral blood***

- DNA samples extracted from peripheral blood according to Phenol / chloroform method

#### ***2.5.5.3. PCR technique 27 exon of RB1 gene***

Using PCR technique to amplify all 27 exons of RB1 gene, sequence of primer and gene detection process conducted by Ta Thanh Van and colleagues at Gen- Protein Center, Medical University Hanoi

#### ***2.5.5.4. Genome sequencing***

PCR products will be purified and sequenced directly to determine mutations in the RB1 gene

Follow the process and use BigDye terminator sequencing method (Applied Biosystems, Foster city, USA).

#### ***2.5.5.5. Methods of analyzing results***

- Compare the gene sequences of patients with the standard genome sequences of the Bank (National center for biotechnology information, NCBI) NG\_009009.1 with CLC software.

- Compare the sequence of amino acids of patients with the standard amino acid sequence of Genebank NP\_000312.2 with NCBI's Blast software.

### ***2.6. Analysis***

The data are entered using SPSS 16.0 software. All data and research results are processed according to medical statistical methods, statistical analysis describes, compares, calculates average values, percentages (%), analyzes some clues. correlate.

### ***2.7. Ethical issues in research***

- The thesis strictly follows the medical research ethics. Patients and families completely voluntarily participate in the study: with the consent of the patient's parents

## CHAPTER 3 RESULTS

### 3.1 Clinical and Imaging

#### 3.1.1. Clinical characteristics

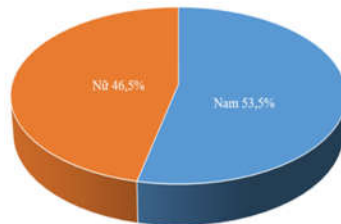
##### 3.1.1.1. Distribution of patients by age of disease detection

The average age of the study group was 13 months ( $15.47 \pm 11.92$  months), 2- 84 months.

##### 3.1.1.2. Distribution of patients by gender

The number of male patients is 23 (53.5%), the number of female patients is 20 (46.5%)

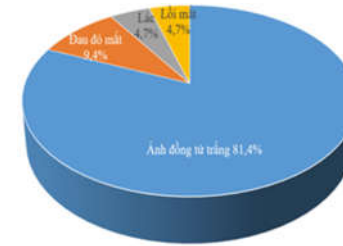
Number of male patients with mutation of RB1 gene is 11/23 (47.8%), number of female patients is 13/20 (65%) of gene mutation RB1 detected



**Figure 3.1. Morbidity rate by gender**

##### 3.1.1.3. The reason

The most common reason for going to UNBMV patients is a sign of white pupil with 35 patients (81.4%), 4 patients with red eye pain (9.3%), 2 patients with strabismus (4, 7%), 2 patients with protruding eyes (4.7%). In the group of patients with eye diseases in both eyes, examination with the reason that white pupils are 100%, while the patients with reasons for examination because the strabismus are found on the side of the affected eye.



**Figure 3.2. Percentage of reasons for patients to go for examination**

##### 3.1.1.4. Lateral and gender

There were 29 (67.4%) patients with both eyes and 14 (32.6%) patients with one eye disease. Among them, one eye patient has 10 male patients and 4 female patients. The number of sick patients in the eyes has 13 male patients (56.5%) and 16 female patients (43.5%)

##### 3.1.1.5. Family history

In the study, there were 08 patients with a clear family history (accounting for 18.6%). In which, there were 2 patients with only a brother and a sick patient. When testing, the RB1 mutation was found and the mutation was not found. The remaining 6 patients all had a sick and unbalanced father or mother, accompanied by sick siblings, all of whom found a RB1 mutation.

##### \* Tumor characteristics when indirect ophthalmoscopy

Remark: When eye examination for UNV patients after pupil dilatation shows that the tumor occupies the entire glass chamber right behind the glass body, the most common symptom is 60 eyes (83.3%), tumor accounts 1/2 and 2/3 of the glass fluid chamber meets in 5 eyes (6.9%) and 4 eyes (5%). Images of tumor cells dispersed into vitreous chambers met in 41 eyes (57%). Other severe signs such as vitreous hemorrhage, lower retinal fluid, and retinal detachment are less common.

### 3.1.2. Imaging

**3.1.2.1. Ophthalmic ultrasound:** Calcium is a common and specific sign in patients with UNBVM, which is a distinguishing sign with other lesions in the eye. On ultrasound A, B can only calculate the tumor size accounting for how much part of the glass fluid chamber (BDK) as the whole or 1/2 BDK..In the study, the tumor accounted for more than 1/2 to all BDK is the most 54

#### 3.1.2.2 CT scan

Calcination is a sign of many and specific symptoms in patients with UNBVM when CT scans of the brain - eye sockets, in our study accounts for 93%, when the tumor is large and occupies the space in the glass translation chamber, CT can be triggered size in mm or can be calculated by taking up how much of the glass chamber.

#### 3.1.2.2 MRI

On MRI with 5 mm slices, many lesions <5mm are difficult to detect on MRI, so in our study the main sign is still calcium (accounting for 91.2%), in addition to signs u invade the retina very rarely.

### 3.1.3. Pathology

Signs of calcification and tumor necrosis are most common in the study group, accounting for 94.7%, with 16 eyes in 16 patients with high risk factors accounting for 37.2%. Typhoid invasive tumors at all levels are the most common signs of infection, with less invasion of the previous part.

## 3.2. GEAR ANALYSIS RESULTS GEN RB1

### 3.2.1. The results of determining point mutations by gene sequencing technique

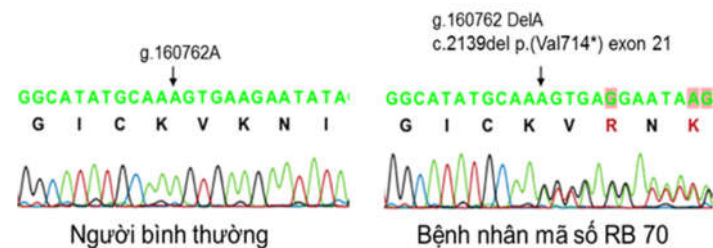
Results showed that there were 24/43 (58%) cases of discovery of RB1 gene mutation. Among the detected mutations, 10 mutations were published in GeneBank data bank and LOVD: c.2664-10T> A, c.861G>

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.

The remaining 07 new mutations have not been published on international documents: including 04 mutations of translation deviation: p.Thy345Argfs \* 6, p.Pro232Serfs \* 8, p.893Glyfs24 \*, c.1312delT, 03 False mutation: p.Trp681Cys, p.Phe162Tyr, p.Ser402Thr

### 3.2.2. Types of RB1 gene mutations in RB patients

\* Mutation p.Val714 \*



**Figure 3.3. Results of RB1 sequencing of patients with RB70**

The vertical arrow indicates the mutation position, the digits on the arrow indicate the position of the nucleotide change.

Comment: Results of exon 21 sequencing in RB1 gene of patient RB70 showed that the patient had a mutation that lost 1 nucleotide A at position 160762, changing position c.2139 on cDNA sequence. The consequence of this 1 nucleotid loss is the shift of the translation frame, transcription of the GTG (coding for the amino acid Valine) into the TGA (stop codon) early triad code. So this mutation makes pRB instead of 928 amino acids, only 714 amino acids.

### 3.3.1.1. Relationship between disease detection age and gene mutation RB1

Remarks: The age of disease detection at the first visit at the age of <6 months has the highest number of mutation patients is 9 patients (37.5%) then 6 to 12 months of age with 6 patients (25%) and the lowest rate is the age of > 36 months with only 1 patient (4.16%). However, this difference is not statistically significant  $p = 0.224$  ( $p > 0.05$ ).

### 3.3.2. Relationship between clinical characteristics and genotype RB1 mutation

ID Patient	Mutation	Protein	Typ mutation	Note	Age (Mon)	Lateryal	ICRB	high risk factors
RB5	c.861G>A	Variant	SP	DV	19	Bi	A/D	No
RB6	c.1204T>A	p.Ser402Thr	MS	New	36	Un	D/0	Yes
RB8	c.2211+1 G>A	Variant	SP	DV	12	Bi	E/C	Yes
RB10	c.2664-10T>A	Variant	SP	DV	10	Bi	B/D	Yes
RB11	c.2664-10T>A	Variant	SP	DV	28	Un	0/D	No
RB29	c.2041G>T	p.Trp681Cys	MS	New	33	Un	0/D	No
RB31	c.1204T>A	p.Ser402Thr	MS	New	07	Bi	D/A	No
RB50	c.693-694insT	p.Pro232Serfs*8	FS	New	34	Un	0/E	Yes
RB51	c.485T>A	p.Phe162Tyr	SP	New	20	Bi	D/C	Yes
RB54	c.297G>A	p.Trp99X	NS	DV	04	Bi	D/B	No
RB55	c.1333-2A>G	Variant	SP	DV	15	Bi	B/D	No
RB57	c.371_372del	p.Ile124Argfs*6	FS	DV	02	Bi	B/A	ND
RB59	c.265-1G>T	Variant	SP	DV	02	Bi	D/D	Yes
RB61	c.2520+1_2520+4del	Variant	SP	DV	03	Bi	D/B	No
RB62	c.371_372del	p.Ile124Argfs*6	FS	DV	15	Bi	B/D	No
RB65	c.1953T>A	p.Tyr651X	NS	DV	06	Bi	A/D	Yes
RB66	c.2677insT	p.893Glyfs24*	FS	New	84	Un	D/0	No
RB69	c.1204T>A	p.Ser402Thr	MS	New	04	Bi	B/D	Yes
RB70	c.2139del	p.Val714*	NS	DV	02	Bi	D/B	No
RB71	c.1953T>A	p.Tyr651X	NS	DV	16	Bi	B/D	Yes
RB75	c.2664-10T>A	Variant	SP	DV	02	Bi	D/A	Yes
RB76	c.1312delT	Variant	FS	New	05	Bi	B/D	Yes
RB78	c.2664-10T>A	Variant	SP	New	18	Bi	B/D	No
RB79	c.1033delCT	p.Thy345Argfs*6	FS	New	02	Bi	E/B	Yes

Note: SP: Splicing mutation, NS: Nonsense mutation, MS: Missense mutation, FS: Frame shift mutation  
Bi: Bilateral, Un: Unilateral

## CHAPTER 4 DISCUSSION

### 4.1. CLINICAL CHARACTERISTICS AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF RB

#### 4.1.1. Clinical features of RB

##### 4.1.1.1. Distribution of patients by age

In our study, most patients went to the hospital for the first time:  $15.47 \pm 11.92$  months, the youngest patient was 2 months, the oldest was 84 months, the average age was 13 months.

A study of 295 patients at a hospital in Beijing City (China) averaged 2.8 years old, at least 1 month and the largest was 14 years old

A study in Brazil in 38 patients showed that the average age of the patient group was 33.8 months in the single-eye group and 19.15 months in the binomial patient group

Another study in Korea over 70 patients showed that the average age was 21.2 months (1.5–84 months), in the monocular and 27.4 months and the binocular group was 30 months, the lowest age was 1.5 months and the maximum is 84 months

According to the medical literature in the world, patients with middle-aged patients with double-eyed disease often go to the hospital for the first time.

##### 4.1.1.2. Distribution of patients by gender

According to Taylor's study, the sex ratio is 99 men and 66 women. Abidi and colleagues' research in Morocco has 20 female patients and 21 male (sex ratio 0.95). A Pakistani study has 44 male

patients and 26 female patients (ratio 1.7). This is a Muslim country so there is still gender inequality in general health care. According to researches in the world and ours there is no gender difference. In fact, RB disease is a disease caused by mutations of genes on chromosomes often, the incidence in men and women is the same

#### **4.1.1.3. The reason**

In a report on 56 Taiwanese patients the most common symptoms were white pupil lightness of 71%, redness of 18%, and strabismus 14%. In 470 RB patients in China, white pupil is 73% of patients. In a report of 139 RB patients in Switzerland from 1963 to 2004 the most common manifestations were white pupil at 48% and 20% strabismus. Most patients show signs of white pupil due to the parents' discoveries and the children go to the doctor, pupils White patients described by parents as cat eyes make the family abnormal including 37 patients (86%) showing signs of white pupil, 2 patients with strabismus (4.7%), 2 patients with protruding eyes ( 4.7%), 2 patients have red eyes (4.7%)

#### **4.1.1.4. Family history**

When exploiting the family history of 43 patient families, we found 8 cases with a family history. In which there are 6 cases where the parents are sick and there are 3 cases besides father and mother, there are also brothers and sisters in the family who are sick.

Similarly an epidemiological study of Turkish authors has 16/141 (11%) patients with a family history, not mentioning gene mutation study RB

In our study, there were 8/43 (18.6%) cases with a family history, however with different sampling methods, the number of samples varied so the proportion of patients with a family history in the studies Save the world and Vietnam from 5.8 to 16.8%.

### **4.1.2. The diagnostic characteristics of RB patients**

#### **4.1.2.1. Characteristics on ultrasound**

Roth's and colleagues' work showed results in calcification in 63/69 diseased eyes of 48 patients (accounting for 91.3%) when eye ultrasound was performed. Bedi and colleagues' work also found 91% of images with calcification in the eye of retinoblastoma when made with an ultrasound eye.

Thus, our research as well as the research of other authors previously showed the detection rate of calcium images over 92-95%

#### **4.1.2.2. Characteristics on computerized tomography**

The study of the author Beets-Tan RG and the proportion of images with calcification on computerized tomography film with sensitivity of 81% and specificity of 96%

Research by Brisse et al. Showed that the calcification image in tumors is 96%. The study on 43 of our patients had 28 computerized tomography eyes, and there were 26 eyes with calcified images appeared (accounting for 92.8%).

#### **4.1.2.3. Characteristics on magnetic resonance imaging**

A study by Brisse 2007 and colleagues showed that the image of calcification in tumors accounts for 96% in retinoblastoma tumor with MRI. A study by author Graaf et al 2005 and colleagues showed that

the image of calcium in the tumor accounted for 96% in the retinoblastoma tumor with MRI. Magnetic resonance imaging for high resolution images is a method of imaging without X-rays to avoid the risk of secondary melanoma for patients.

#### ***4.1.3. Histological characteristics of RB***

According to previous studies, the incidence of high risk factors for metastasis accounted for 18.5 - 41.4%. In this study, % of eyes had high risk factors. This is due to delays in diagnosis and treatment, involving a lack of knowledge about the disease in the community and no screening programs. In addition, the issue of whether or not additional chemical treatment after removing the eyeball and survival rate is not mentioned in this study.

#### **4.2. Results of gene mutation analysis RB1**

The study results showed that 24/43 (55.8%) of patients with mutations RB1 gene and 19/43 patients (44.2%) did not detect the RB1 gene mutation. The rate of detectable mutations has been reported in the world studies of 19% to 72% oscillation. The rate of mutations in oscillator can be explained by studies using a variety of different methods and sample size to identify mutations.

In this study different mutations were detected and compared with the standard sequence on GenBank and refer to the database rb1-lovd.d-lohmann.de. This study has found mutations across the entire RB1 gene in exon regions 3, 4, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19, 20, 21, 24, 26 and intron 2, 13, 21, 24, 25.

#### **4.3. Relationship between the age of disease detection and gene mutation RB1:**

The age of disease detection at the first visit at the age of <6 months has the highest number of gene mutation patients is 9 patients (37.5%) and then comes 6 to 12 months of age have 6 patients (25%) and the lowest rate is age > 36 months with only 1 patient (4.16%). However, this difference is not statistically significant  $p = 0.224$  ( $p > 0.05$ ). According to Lohmann et al, the age distribution at diagnosis does not differ between patients with or without RB1 gene mutations. The age at which medical examination and initial diagnosis are made does not help determine the identity of the RB1 gene mutant in non-hereditary monocular patients. This encourages testing to identify RB1 gene mutations in all children with UNV regardless of the age of diagnosis.

#### ***Relationship between high risk factors and gene mutations RB1***

Among 24 patients identified as having RB1 mutation, 11 patients had high risk factors (accounting for 50%). There were 11 patients without high risk factors, 2 patients did not treat removal of eyeballs, so there were no pathological results to identify high risk factors. However, the difference is not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

The relationship between clinical characteristics and RB1 gene mutation causes shortening of proteinRB.

Two types of mutations nonsense and deviation of the translation frame result in the proteinRB being cut short and forming an incomplete proteinRB that leads to loss of function and disease. Research on



phenotypic associations - genotypes in genetic or genetic mutations is important for genetic counseling for patients and families of retinoblastoma patients, allowing diagnosis. early, assess the risk of disease in family members and the next generation, prognosis of the disease. In the world, there have been many different studies, different sampling methods to study the types of RB1 mutations related to phenotype, short cut level of proteinRB and the severity of the disease. To assess the severity of the disease Scientists rely on international classification for grouping, age, high risk factors of eye disease. In the study of Choy et al., A group of Chinese patients found no correlation of phenotype-genotype. Research on Indian patient group by Ata-ur-Rasheed and colleagues also found no correlation between phenotype-genotype.

Recently a Chinese author and colleagues published a preliminary survey of phenotypic-genotypic correlations in Chinese patients. The distribution of the severity of the ICRB disease is significantly different from ours. The author believes that in fact, group E is the most encountered group in their research due to late diagnosis and treatment because of lack of access to health care and propaganda among their people. We believe that comparisons will be difficult in these studies. Where primary health care and good propaganda work, comparisons will be relatively reasonable. Taylor et al evaluated phenotypic associations - genotypes in French patients and described the distribution of mutations. Our study had few patients with meaningless mutations and code translation deviations. We found RB1 mutations in

single-eye cases while other authors gave higher rates. Rate of detection from 10-15% in UNBVM as Richter and partner. In this study, we also found no significant association between proteinRB short-term mutations in meaningless mutations and translation shift frames and disease severity as correlations with age of detection. sooner or later, international subgroups of diseased eyes such as those of group D and E are late-stage eyes, or correlations with high risk factors. This result is similar to that of author Albrecht and Joseph.

The clinical characteristics linkage of patients with missense mutation have a wrong definition: In our study, there were 05 patients with a mean difference in total 24 patients who detected mutations, all 05 patients with mutations are new mutations yet. previously reported in the world, the patient carries the p.Ser402Thr mutation on exon 12, which is located in the coding region for the A region of proteinRB. Similarly, the mutation p.Trp681Cys on exon 20, this exon region belongs to the coding region for region B of proteinRB. The A/B domain is a highly conserved region with its important function in binding to the E2F transcription factor in the regulation of cell division, thereby, if mutated in the A/B domain of ProteinRB causes proteinRB to lose its function of inhibiting E2F transcription factors, causing proliferation cells to not control and form tumors. Differential mutations in the study were in the ages of 2 months to 37 months, both monocular and ocular (most). 7/9 patients had high risk factors in the wrong mutation group. By analyzing the correlation between mutation of RB1 gene with age for first-time detection, ICRB international

group, bilateral or monocular disease, high-risk metastatic risk factor in group pathology. We did not find a genotype-phenotypic correlation.

The clinical characteristics linkage of patients with RB with Splicing mutation: In our study, there were 9 patients with Splicing mutations (mutations in joints) among 24 patients detected. The mutation c.2664-10T> A was found in 3 patients, in addition to the variable c.2211 + 1G> A, c.1333-2A> G mutation, c.861G> A was previously reported. The world has been found on Vietnamese patients. Through analysis, the study group found no phenotypic correlation - genotypes in patients with RB splicing mutations. Albrecht et al. Also found no association between proteinRB short-term mutations in nonspecific mutations and age-shifted translation of the age when diagnosis of early or late diagnosis, subgroup of diseased eyes Internationally, such as the eyes of the D and E groups are the late stage eyes, or the association with high risk factors whe, Josseph et al. Also concluded that there was no significant association between short-term mutations of protein RB in mutations. Nonsense and frame shift mutation with ages when diagnosis of early or late detection, the subgroup of infected eyes internationally such as group D and E eyes are late stage eyes or related to high risk factors.

## CONCLUSION

By studying 43 patients diagnosed with RB, we draw some conclusions

### 1. Clinical and subclinical characteristics of RB

#### 1.1. Clinical characteristics:

- The age for examination and the first detection of disease is  $15.47 \pm 11.92$  months, the average age is 13 months. There are 23 male patients (53.5%), the number of female patients is 20 (46.5%). The main sign is the reason for the patient's examination, with 35 (81.4%) patients showing signs of white pupils. There were 4 patients with red eye pain (9.3%), 2 patients with strabismus (4.7%), 2 patients with protruding eyes (4.7%), 4 patients with red eye pain (9.3%).

- There are 8 patients with a family history: in which 6 patients have sick parents, siblings and both can be bipolar

- Subjective clinical symptoms: amblyopia, eye pain, glare, lacrimation ..

- Signs of disease in the anterior part, tumor in the fluid chamber, tumor on the retina surface ..

- Grouping by international: mainly D, E groups

- Clinical characteristics: on ophthalmic ultrasound, CT and MRI signs are mainly calcified

- Anatomy of major signs of disease is calcium and tumor necrosis, there are 16 patients with high risk factors. In the group with RB1 mutation, there were 11 patients with high risk factors

## ***2. RB1 gene mutation and clinical characteristics association***

- The study found 24 patients with RB1 mutation, the rate of gene mutation was 24/43 (55.8%). The rate of meaningless mutations is 12.5%, mutation of translation frame shift is 29.2%, mutation is 20.8%, Splicing mutation is 37.5%. All 17 mutations were discovered, including 7 new mutations. No statistically significant correlation was found between RB1 gene mutations and clinical characteristics in patients with RB

## **PUBLISHED**

1. Nguyen Ngoc Chung, Tran Huy Thinh, Pham Trong Văn, Pham Hong Van, Mai Quoc Tung, Luong Hoang Long, Tran Van Khanh (2018) "Characteristic and spectrum of RB1 gene mutations in patients retinoblastoma ". *Vietnam Medical Journal*, No. 1 July 2018, page 163-166.
2. Nguyen Ngoc Chung, Tran Huy Thinh, Pham Trong Van, , Mai Quoc Tung, Pham Hong Van, Luong Hoang Long, Tran Van Khanh (2018) "Point mutation detection of RB1 gene in retinoblastoma patients using sequencing method". *Vietnam Medical Journal*, No. 2 July 2018, page 77-80.