BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

TRẦN THU HÀ

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN CYP1B1 GÂY BỆNH GLÔCÔM BẨM SINH NGUYÊN PHÁT VÀ PHÁT HIỆN NGƯỜI LÀNH MANG GEN BỆNH

Chuyên ngành : Nhãn khoa

Mã số : 62720157

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ 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. Trần Vân Khánh
2. PGS.TS. Vũ Thị Bích Thủy

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước

Họp tại: Trường Đại học Y Hà Nội

Vào hồi ngày tháng năm 2019

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

CONCLUSION

1. CYP1B1 mutation and correlation with clinical characteristics in primary congenital glaucoma patients

19/86 patients had CYP1B1 mutations, in which 17 cases have point mutations identificated by DNA sequencing and 2 cases have deletion by MLPA. 10 new mutations were identified including 9 point mutations, p.Q86K, p.Q159X, p.Q164X, p.D218H, p.L191Sfs * 4, p.A133T, p.L27Q, p.D242N, p.G365E and 1 mutation deletion whole exon 1-3 CYP1B1.

There is a correlation between clinical characteristics and mutations: patients with an early onset 1.21 months, often bilateral (94.4%). Patients with genetic mutations had a more severe stage (46.8%) and had a higher rate of surgery than non-mutation group.

2. Detecting carrier of CYP1B1 mutation in patients' family members

5/26 parents of 15 patients carry CYP1B1 mutation including 3 fathers, 2 mothers. 1 in 3 siblings of a patient who has the disease gene but has no clinical manifestations and 1 person who has just had a mutation gene that manifests primary congenital glaucoma.

Genetic mutations occur in 4 family genealogies in which 2 families inherit point mutations, 2 genetic families mutate deletions. 11 families of patients with genetic mutations CYP1B1 did not detect genetic disease status. In the pedigree of patients' families, there is a genetic phenomenon of both mutations and SNPs.

FURTHER RESEARCH

There is a need to detect mutations in some other genes related to primary congenital Glaucoma in patients to find the cause.

Detecting healthy people carrying disease genes in families with primary congenital glaucoma to have genetic management and counseling plans.

p.D218H is a mutation that replaces Aspartate into Histidine at the position of amino acid 218.

This is the starting position of the Alpha-helix structure (alpha helix) of the CYP1B1 protein. The family of G40 patients has 2 children. Parents of normal patients do not detect disease. The patient's sister also has a 50% chance of carrying the gene, which requires genetic testing. Patients need genetic counseling before marriage.

There are 3 brothers in the G85 family of patients. Analysis of CYP1B1 showed that two brothers in the family had a mutant heterozygous p.E229K mutation that showed severe primary glaucoma. The patient's sister did not carry mutated genes and normal clinical manifestations.

The mother of the patient is a healthy person carrying p.E229K in the heterozygous state of submerged diving for the child, not showing the disease. The patient's father did not detect the mutation. Father, the patient's mother did not detect any other mutations on this gene.

This genealogy does not follow the genetic rule Melden but as other studies have demonstrated that the mutation p.E229K is capable of causing disease when in a heterogeneous state or has a mutated gene mutation that has not been understood. In this study, Patients and sibling need genetic counseling before marriage.

CYP1B1 gene mutation: two patients carry the completely deletion the exon 1-3 in homozygous state. Both patients showed very severe disease, early surgery but failed results led to blindness in both eyes, white opaque corneal scar affecting the aesthetic. Parents need to make prenatal diagnosis when they intend to have more children. Girls need genetic counseling at marriage. Patients need genetic counseling before marriage.

G56 family has 3 brothers. The patient's father is a healthy person who carries the disease gene in a heterosexual state for the child, unable to obtain blood samples from the patient's mother who is sent by the mother to work abroad. We predict that genetics also occurs according to the same rules as the G02 patient's family, so it also requires genetic counseling and prenatal diagnosis for families if they want to have more children.

4.3.2. Non genetically pedigree

11 genomes without genetic mutations include patient families G08, G09, G11, G19, G20, G21, G24, G43, G44, G70 and G84.

NHỮNG CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Trần Thu Hà, Trần Huy Thịnh, Vũ Thị Bích Thủy, Trần Vân Khánh (2017). Xác định đột biến tại vùng trọng điểm trên gen CYP1B1 ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 106 (1). 79-85.
2. Trần Thu Hà, Đỗ Thị Hương Lan, Trần Huy Thịnh, Vũ Thị Thanh, Vũ Thị Bích Thủy, Trần Vân Khánh (2017). Phát hiện đột biến gen CYP1B1 ở gia đình bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát, *Tạp chí y học Việt Nam,* tập 470, 94-99.
3. Trần Thu Hà, Trần Huy Thịnh, Trần Vân Khánh (2018). Xác định đột biến gen CYP1B1 ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát, *Tạp chí nghiên cứu y học,* 110(1), 32-38.

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Glôcôm bẩm sinh nguyên phát là tình trạng tăng nhãn áp do sự phát triển bất thường của bán phần trước nhãn cầu. Bệnh thường xảy ra ở hai mắt và là một trong những nguyên nhân gây mù lòa quan trọng ở trẻ nhỏ. Các nghiên cứu sinh học phân tử đã đề cập đến các gen đột biến liên quan đến bệnh lý này là CYP1B1, LTBP2, MYOC. Trong đó tỷ lệ đột biến của gen CYP1B1 là cao nhất từ 10% đến 100% và được khẳng định là một trong các nguyên nhân gây ra bệnh glôcôm bẩm sinh. Những nghiên cứu ở mức độ in vitro và in vivo đã chỉ ra rằng protein CYP1B1 đóng vai trò quan trọng nhất trong việc hình thành cấu trúc và duy trì chức năng của mắt. Đột biến gen CYP1B1 chủ yếu là đột biến điểm nằm rải rác trên toàn bộ chiều dài gen; tỉ lệ phát hiện đột biến CYP1B1 cũng mang tính đặc trưng cho từng chủng tộc, ở châu Á khoảng 20%. Hàng năm bệnh viện Mắt Trung ương tiếp nhận khoảng 20 ca bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát mắc mới. Áp dụng chẩn đoán người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh để đưa ra lời khuyên di truyền thích hợp sẽ giảm được tỷ lệ trẻ mắc bệnh trong cộng đồng và về lâu dài sẽ tác động tốt tới sự phát triển kinh tế, xã hội. Xuất phát từ thực tiễn này, đề tài "***Nghiên cứu xác định đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát và phát hiện người lành mang gen bệnh***" được thực hiện với hai mục tiêu:

1. *Xác định đột biến gen CYP1B1 và mối liên quan với lâm sàng trên bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát.*
2. *Phát hiện người lành mang gen bệnh trên các thành viên gia đình có quan hệ huyết thống với bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát.*

2. Những đóng góp mới của luận án

- Đây là nghiên cứu đầu tiên và quy mô khá lớn ở Việt Nam phối hợp giữa lâm sàng bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát với sinh học phân tử. Nghiên cứu là bước chuẩn bị quan trọng cho các tiếp cận điều trị trong tương lai.

- Luận án đã đưa ra tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 ở Việt Nam, phát hiện 10 đột biến mới trong đó 9 đột biến điểm và 1 đột biến xóa đoạn lớn. Kết quả được công bố quốc tế và được chấp nhận đăng.

- Nghiên cứu cũng đưa ra mối liên quan chặt chẽ giữa một số đặc điểm lâm sàng với đột biến gen CYP1B1 cũng như tỷ lệ di truyền đột biến

recessive disease and genetic disease has been reported in many Middle Eastern families due to inbreeding.

The rate of genetic mutations encountered in 4/15 families accounted for 26.7% similar to other studies in the world like the study of María T. García-Antón in Spain in 2017, this rate is 25%. However, lower than Do Tan's research, 100% genetic discovery.

Mutation p.E229K: is a missense, heterozygous mutation. This mutation was genetically detected in the patient's family G40 and G85 codes. This mutation was first described by Michels-Rautenstrauss in 2001 in patients with primary congenital glaucoma in Germany and was found to be associated with the p.A443G variant, but the pathogenicity of A443G has not been published.

The author identified a mutant p.E229K mutation that is a disease-causing mutation. According to Mukesh Tanwar (2009) mutation p.E229K is considered one of the 6 most common mutations (p.G61E, p.P193L, p.Ter223, p.E229K, p. R368H and p.R390C). This mutation was also reported by Ni Li as one of the common mutations in the white community. p.E229K was identified in heterozygous state in two French patients with primary congenital glaucoma, in 5 Indian patients.

Choudhary D. analyzed p.E229K mutation, location of 229 amino acid in an important area, contributing to the three-dimensional structure of the protein. This mutation occurs at the COOH terminal of F-helix in the vicinity of the substrate. Replacing glutamic acid with lysine amino acid leads to a change from a negatively charged residue to a positive side-chain and this in turn affects local distribution. This mutation disturbs an important termite bridge.

In wild type (WT), R-194 / E-229, R-194 / D-333 and D-333 / K-512 form an ion interactive triangle, hold I-twist with F-twist and thread S3.2. Due to this mutation, the interaction R-194 / E-229 is lost and is capable of destabilizing other ion interactions in the protein.

A second report also identifies p.E229K as hypomorphic allele (reduced image allen) and suggests that this mutation may act as a risk allele, which may lead to the development of glaucoma with presence of modified genes or environmental effects. This mutation has also been found to reduce protein stability, p.E229K affecting substrate metabolism.

P.D218H mutation: according to the silico analysis results predicting the pathogenicity of CYP1B1 mutations, mutation D218H is a new mutation of causing disease with a score of 1,000. Mutation

pregnant was 60.0% higher than the rate of mutations of CYP1B1 in the group of patients whose mothers did not suffer. Pregnancy disease was 18.8%, however the difference was not statistically significant with p = 0.062 because the data were not large enough, other studies have not concluded on this issue.

The relationship with the number of diseased eyes: To assess the relationship between the number of diseased eyes and the mutation of CYP1B1, the analysis of the results in bilateral a close correlation. The results are similar to those of other authors. The Wool Suh study (2012) showed that the incidence of 2-eye disease in the group of 22 patients with CYP1B1 mutation was 81.8%, higher than that of the 63.9% non-mutant group of patients. However, the difference is not statistically significant (p = 0.087).

Relationship with clinical characteristics and treatment: Compared with other authors in the world as in the study of Xueli Chen (2013), the degree of corneal turbidity in the group carries significantly greater gene mutations. For the group without the gene mutation (p = 0.034), however, there was no difference in mean intraocular pressure and corneal diameter of 2 groups (p=0.064 and p = 0.986).

In the study of Orna Geyer (2011), the degree of severe stage 58% (10/17 patients) in the group with higher mutation than the non-mutant group 11% (2/17 patients) (p = 0.004). Wool Suh's study (2011) found that in the group with CYP1B1 mutation, the incidence of severe disease was higher (52.4%) compared to the group without the gene mutation (43.9%), but this difference was not statistically significant.

The study in Lebanon (2016) also showed that there was no difference in mean pre-operative intraocular pressure (35.2mmHg and 35.6mmHg), average post-operative pressure (15.6mmHg and 14.8mmHg), level Concave disc (0.57 ± 0.19 and 0.62 ± 0.3) between the two groups with and without gene mutations (p> 0.05). Besides, the severity (severe corneal opacity and buffalo eye convex) at the time of detection of the group with mutations was 67% higher than the group without mutations (p = 0.32).

4.3. CYP1B1 gene mutations in patients' family members

People with disease genes are carriers of heterozygous and capable of transmitting disease genes to the next generation. Detection of carriers is the basis of genetic counseling and prenatal diagnosis. Primary congenital glaucoma is a common chromosomal gen và phát hiện các thành viên trong gia đình mang gen bệnh từ đó có lời khuyên di truyền thích hợp cho bệnh nhân và gia đình.

3. Bố cục của luận án

Luận án có 121 trang, gồm Đặt vấn đề (2 trang), 4 chương: Chương 1: Tổng quan (33 trang), Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (12 trang), Chương 3: Kết quả nghiên cứu (39 trang), Chương 4: Bàn luận (31 trang), Kết luận (2 trang), đóng góp mới (1 trang), Hướng nghiên cứu tiếp (1 trang).

Ngoài ra còn có: phần tài liệu tham khảo, phụ lục, bảng, biểu đồ, hình ảnh minh họa kết quả.

Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. Đại cương bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

Năm 1970, Shaffer và Weiss định nghĩa glôcôm bẩm sinh nguyên phát là "glôcôm di truyền phổ biến nhất ở trẻ em, di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, với bất thường đặc biệt về góc là không có hiện tượng lùi điểm gắn chân mống mắt tạo góc tại vùng bè và không kèm những bất thường phát triển khác". Tăng nhãn áp là nguyên nhân gây giác mạc to, đục và chảy nước mắt do rạn màng Descemet. Glôcôm bẩm sinh nguyên phát là bệnh hiếm gặp. Hầu hết xảy ra ở cả hai mắt. 25% khởi bệnh lúc sinh, 60% trẻ được chẩn đoán dưới 6 tháng tuổi và 80% xuất hiện trong năm đầu tiên.

Qua nghiên cứu phôi thai học và giải phẫu học góc tiền phòng cho thấy cơ chế tăng nhãn áp trong glôcôm bẩm sinh là do sự tồn tại màng Barkan ở lưới bè. Ngày nay, thuyết di truyền trong glôcôm bẩm sinh nguyên phát ngày càng được đề cập đến nhiều hơn và sáng tỏ qua các nghiên cứu. Người ta cho rằng các gen CYP1B1 đột biến sẽ làm rối loạn sản xuất men, thay đổi phản ứng hóa sinh nội bào, tạo nên bất thường cấu trúc mạng lưới vùng bè, dẫn đến ứ trệ thủy dịch làm tăng nhãn áp. Gen CYP1B1 gồm 543 acid amin, nằm trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể 2 tại vị trí 2p22.2 và bao gồm 3 exon, phần mã hóa gen bắt đầu từ exon thứ 2 gồm 1629 cặp base.

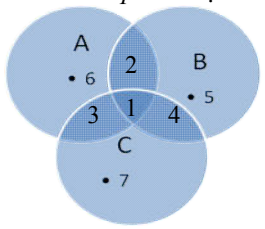
Chẩn đoán bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

Chẩn đoán xác định: khi bệnh nhân có 4 triệu chứng trở lên

- Nhãn áp cao ≥25mmHg (nhãn áp kế Maklakov) hoặc ≥22mmHg (nhãn áp kế Icare)
- Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng
- Đường kính giác mạc to bất thường ≥12mm

- Giác mạc phù, mờ đục
- Tiền phòng sâu, góc tiền phòng có tổ chức bất thường
- Tổn hại lõm teo đĩa thị trong bệnh glôcôm

Chẩn đoán phân biệt theo sơ đồ Ourgaud:



Ba yếu tố chính của glôcôm bẩm sinh là:
vòng A là nhãn áp cao
vòng B là đường kính giác mạc tăng
vòng C là phù mờ đục giác mạc

Có 7 khả năng xảy ra: Khu vực 1: hội tụ đủ 3 yếu tố chính (A, B,C) là glôcôm bẩm sinh nguyên phát điển hình. Khu vực 2: nhãn áp cao kèm theo đường kính giác mạc tăng glôcôm bẩm sinh nguyên phát không mờ đục giác mạc cần phân biệt với bệnh giác mạc to. Khu vực 3: nhãn áp tăng kèm theo đục giác mạc glôcôm ở trẻ lớn tuổi và người trẻ, cần phân biệt với những bệnh giác mạc đục hoặc glôcôm thứ phát do những dị tật khác. Khu vực 4: đường kính giác mạc tăng kèm theo đục giác mạc. Khu vực 5: đường kính giác mạc to đơn thuần. Khu vực 6: nhãn áp tăng đơn thuần glôcôm bẩm sinh ở trẻ lớn tuổi xảy ra ở mắt thứ 2. Khu vực 7: mờ đục giác mạc, sang chấn lúc sinh, xơ hóa giác mạc.

Chẩn đoán giai đoạn: theo Al-Hazmi : Giai đoạn nhẹ: nhãn áp <25mmHg, đường kính giác mạc <13mm, giác mạc còn trong. Giai đoạn trung bình: nhãn áp 25-35mmHg, đường kính GM 13-14mm, GM phù đục. Giai đoạn nặng: nhãn áp >35mmHg, đường kính giác mạc >14mm, giác mạc đục trắng.

Điều trị bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

Điều trị nội khoa chỉ là bước đầu chuẩn bị cho phẫu thuật hoặc bổ sung khi phẫu thuật chưa đạt kết quả hoàn toàn hoặc thất bại.

Điều trị ngoại khoa với mục đích phá màng tổ chức bất thường tạo điều kiện cho thủy dịch tới được vùng bè, vào ống Schlemm và lưu thông ra ngoài.

1.2. Đột biến gen CYP1B1 và mối liên quan với lâm sàng

Đột biến gen CYP1B1

Tỷ lệ đột biến gen CYP1B1: hay gặp nhất ở Trung Đông (64,8%) và Địa Trung Hải (54,4%) do tình trạng kết hôn cận huyết gây nên, châu Âu (34,7%), châu Á (21,3%), tỷ lệ thấp nhất ở Mỹ (14,9%).

membrane of cornea or Haabs stain is often not seen in cornea with horizontal diameter less than 12.5mm or disease appears after 3 years.

In this study, 15 eyes had Habb's strike, accounting for 10.3%, lower than that of Latifa Hilal (2010) 38/180 eyes with Habb's stain, this rate was 21.11% and equivalent to research in India (2013) is 9%. In addition, there are a number of other factors such as pre-room, vision, IOP, ultrasound.

4.2. Genotype and phenotype correlation

4.2.1. CYP1B1 gene mutation: Rate of CYP1B1 mutations: 22.1%. The results consistent with previous studies showed that this gene mutation in Asia is about 20%. The mutation position on the gene similar to Do Tan's study on 30 patients with primary congenital glaucoma in Vietnam discovered. 5 point mutations are all on exon 2.

From this, it can be determined that the point mutation in the CYP1B1 gene in Vietnamese patients occurs mainly on exon 2. In addition, the study found 2/86 cases of mutation deleting the segment by MLPA technique. With the primer kit for exon 1-exon 3, both patients have cleared the entire gene segment. The rate of mutation deletion only detected a mutation rate of 2.3%, so sequencing techniques are still the preferred technique to identify mutations of CYP1B1 on patients. If no mutation in CYP1B1 by sequencing, the patient should be analyzed by MLPA.

4.2.2. The relationship between clinical and mutations

The association with the early onset in the mutation group was similar to that of other authors. The study of Reddy A. B. in India (2004) conducted on 64 patients found 24 patients (37.5%) had mutations of CYP1B1 gene. All of these patients appeared very early in the first month after birth. The study of Geyer O. (2010) conducted on 34 patients of 26 Israeli families found 17 patients (50%) in 12 families (46%) carried the CYP1B1 mutation. The study showed that in patients with mutations, the mean age of occurrence was 1.3 months earlier than the non-mutant group (4 months) in a statistically significant way ($p = 0.0009$).

Chen's gender relationship (2014) studied 192 patients in China, indicating a higher rate of CYP1B1 mutations in male patients (18.9%) than female patients (13%). Geyer (2010) in Israel also gave similar results, gender differences were not significantly different.

Relationship with patient and family history: The rate of mutations of CYP1B1 in the group of mothers whose mothers were

4.1.3. Patient and family history: Of the 86 patients only G85 families have two brothers with primary congenital glaucoma. The G11 family had their father and grandmother with glaucoma together. No family has inbreeding. The proportion of children who are the first child with the disease accounts for 53.5%, so families need genetic counseling to predict the incidence and prevention in the next ones.

4.1.4. The condition of the patient's eye condition: the rate of 2 eyes is more serious than 1 eye in a meaningful way with p = 0.000, the result is also consistent with the characteristics of the disease and the research of other authors on world. Latifa Hilal's study in 90 patients showed that 82 patients showed two-eye disease accounted for 91.11%.

4.1.5. Stage of disease: Most eyes suffer from disease in the middle stage (63.7%) and the severe stage (33.6%), the rare phase is rare (2.7%). The percentage of disease stages in the study was statistically significant (p = 0.000). Comparing the results with the study of Do Tan also found that the average level was 34.6%, the severity was much higher, accounting for 65.4%, there was no patient in the mild stage.

4.1.6. Symptoms: The results are similar to those of Ezequiel Campos-Mollo (2009) in Spain over 39 patients, the incidence of glare and photophobia is 72%, and tearing is 64%. The most difficult to detect signs of blurred vision, the family can only detect when the child has no reflex to look at the object or has a clear influence on the child's vision.

4.1.7. Signs: An important finding in primary congenital glaucoma is to assess the condition of the cornea. Corneal edema is caused by the corneal epithelial edema caused by increased intraocular pressure, if treated early, the cornea will fully recover, the cornea will return to and not affect vision, if the disease progresses Long can cause irreversible permanent corneal parenchyma.

The degree of corneal edema is assessed according to 3 levels of clear, opaque and opaque white. In the study, the degree of light corneal opacity (38.4%) was higher than the other 2 groups, although the difference was not statistically significant. In our study, the average corneal diameter of 146 eyes measured in the study was 13.06 ± 0.85mm, the largest was 16.0mm, the smallest was 11.5mm.

Tharwat H. Mokbel's study (2018) on 305 eyes of 207 Egyptian patients also gave similar results, corneal horizontal diameter 12.80 ± 1.10mm, the largest was 16mm, the smallest is 11 mm. Descemet

Các loại đột biến gen CYP1B1: theo thống kê của Li và cộng sự, tính đến năm 2010, trên thế giới đã tiến hành khoảng 655 nghiên cứu về đột biến gen CYP1B1 trong bệnh glôcôm, trong đó có 52 nghiên cứu về đột biến gen CYP1B1 trong bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại các nước khác nhau.

- Đột biến sai nghĩa (missense) 66,76% hay gặp nhất.
- Đột biến xóa đoạn (deletion) (14,12%).
- Đột biến mất/thêm nucleotid (deletion/insertion) (0,09%).
- Đột biến lặp đoạn (duplication) (4,28%).
- Đột biến lặp/ mất nucleotid (duplication/deletion) (0,09%).
- Đột biến thêm nucleotid (insertion) (2,82%).
- Đột biến vô nghĩa (nonsense) (3,55%).
- 89 trường hợp (8,11%) không phát hiện được đột biến.

Các tác giả cũng đưa ra kết luận, đột biến sai nghĩa là loại đột biến hay gặp nhất. Ở châu Á, tỷ lệ đột biến loại này chiếm khoảng 20% trong tổng số bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát và khoảng 60% trong tổng số đột biến gen *CYP1B1*.

Các vị trí đột biến gen CYP1B1: theo thống kê của Li và cộng sự, trong thời gian 14 năm tính đến năm 2010, 542 bệnh nhân đã được nghiên cứu, phát hiện mang 147 vị trí đột biến khác nhau.

Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen CYP1B1

Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction): dựa vào hoạt tính của các DNA polymerase xúc tác tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch DNA khuôn, với nguyên liệu là bốn loại nucleotid. Phản ứng này đòi hỏi sự có mặt của những mồi xuôi và mồi ngược có trình tự bổ sung với hai đầu của trình tự DNA khuôn.

Kỹ thuật giải trình tự gen (DNA sequencing): là phương pháp xác định vị trí sắp xếp của các nuceotid trong phân tử DNA. Ngày nay kỹ thuật giải trình tự gen được ứng dụng rộng rãi để phát hiện các đột biến gen gây bệnh tại mắt và toàn thân như bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh, bệnh Wilson, viêm thị thần kinh Leber, ung thư võng mạc, bệnh thoái hóa sắc tố võng mạc. Hiện nay, người ta thường sử dụng hai phương pháp giải trình tự đó là phương pháp dideoxynucleotid và giải trình tự bằng máy tự động.

Phương pháp MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)

Mối liên quan giữa bệnh glôcôm bẩm sinh NP đột biến gen

Mối liên quan với giới tính: các nghiên cứu đều chỉ ra rằng tỷ lệ đột biến giữa hai giới không khác biệt.

Mối liên quan với thời gian xuất hiện bệnh: thời gian xuất hiện bệnh sớm hơn ở nhóm bệnh nhân có mang đột biến gen *CYP1B1* so với nhóm không có đột biến gen

Tỷ lệ bị bệnh cả hai mắt trong nhóm bệnh nhân có đột biến gen *CYP1B1* cao hơn nhóm không có đột biến, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

Mối liên quan giữa mức độ nặng của bệnh với đột biến gen *CYP1B1*: Trong nghiên cứu của Xueli Chen (2014), mức độ đục giác mạc ở nhóm mang đột biến gen nặng hơn có ý nghĩa so với nhóm không có đột biến gen (p=0,034). Nghiên cứu của Orna Geyer (2011), mức độ đục giác mạc nặng và lồi mắt trâu chiếm 58% (10/17 bệnh nhân) ở nhóm mang đột biến cao hơn nhóm không đột biến là 11% (2/17 bệnh nhân) (p=0,004). Nghiên cứu của Wool Suh (2012) thấy ở nhóm có đột biến gen ***CYP1B1*** tỷ lệ mức độ bệnh nặng cao hơn (52,4%) so với nhóm không có đột biến gen (43,9%), tuy nhiên các khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

1.3. Đột biến CYP1B1 phát hiện ở người lành mang gen bệnh

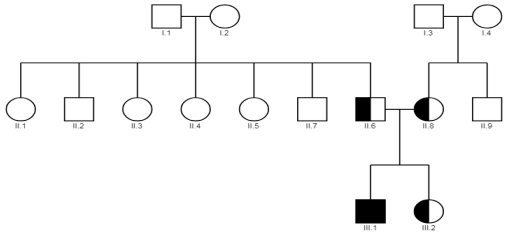
Từ báo cáo năm 2009 tại Tây Ban Nha đề cập đến đột biến gen *CYP1B1* di truyền gen lặn, ở trạng thái dị hợp tử. Trong 5 năm gần đây, ngày càng có nhiều nghiên cứu về phát hiện người lành mang gen bệnh trong các thành viên gia đình bệnh nhân.

Việc lập phả hệ để xem xét tính chất đột biến gen di truyền giúp ích trong chẩn đoán trước sinh, đưa cho gia đình bệnh nhân những tư vấn di truyền, chẩn đoán bệnh sớm nhằm nâng cao chất lượng dân số nói chung và chất lượng điều trị bệnh nói riêng.

Năm 2007, đột biến p.E173K lần đầu tiên được phát hiện ở một gia đình bệnh nhân Ai Cập. Cùng năm đó, Chitsazian cũng mô tả đột biến này trên gia đình bệnh nhân Iran bị glôcôm bẩm sinh nguyên phát với tỷ lệ 1,9% trong số 29 đột biến gen ***CYP1B1*** phát hiện được.

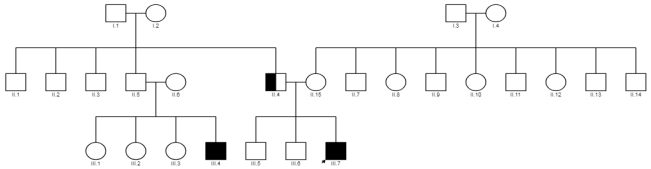
Đột biến này cũng được nghiên cứu của Ling Chen (2015) tìm thấy ở một gia đình gồm 19 thành viên tại Trung Quốc có 3 bệnh nhân biểu hiện bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Đột biến p.E173K nằm trên exon 2 của gen ***CYP1B1***, di truyền lặn nhiễm sắc thể thường là đột biến gây bệnh di truyền qua 3 thế hệ.

Nghiên cứu tại Nhật Bản cũng cho thấy có sự di truyền lặn ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Bố bệnh nhân mang đột biến Asp192Val ở trạng thái dị hợp tử, mẹ mang đột biến Val364Met ở trạng



The MLPA results showed that: The patient had a mutation that completely deleted the exon 1-3 in homozygous state. Father, mother and sister are healthy people with mutations in heterozygous state.

**** Pedigree G56***



MLPA results showed that the patient had a mutation that erased the exon 1-3 completely in a homozygous state. The patient's father is a healthy person with a mutation that erases the complete exon 1-3 in heterozygous state.

3.3.2. Non-mutation Pedigree

Of the 15 pedigrees of study, 9 families did not detect genetic mutations, but found that there were a number of SNPs.

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.1. Characteristics of primary congenital glaucoma

4.1.1. Age of onset: The average time of disease detection is 2.58 ± 3.59 months. Results are equivalent to other authors in Vietnam and around the world. Do Tan's study (2016) on 30 patients found the age of the disease discovered right from birth to 10 years old, but the median is also 2 months old. The study in 90 Moroccan patients had an average detection time of 26 days of age, as early as birth and no later than 6 months of age.

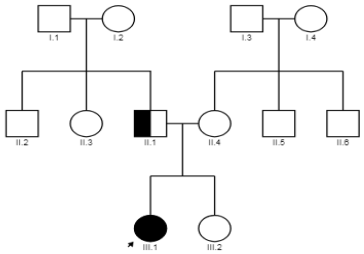
4.1.2. Distribution of patients by gender: Compared with studies in the world, our research also showed similar results, male patients had more diseases than women, although not much difference.

Code	Patient		Carrier					
			Father		Mother		Siblings	
	Mutation	Type of mutation	Mutation	Type of mutation	Mutation	Type of mutation	Mutation	Type of mutation
G85	p.E229K	Heter	Non		p.E229K	Heter	Brother: p.E229K	Heter
							Sister: no mutation	

3.3.1. Mutation pedigree

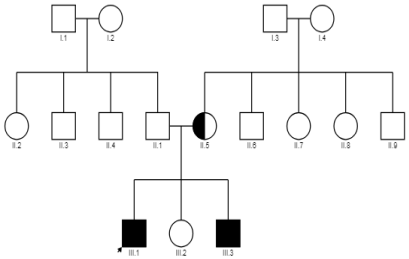
Research results show that 4 pedigrees with genetic mutations include patient families G2, G40, G56 and G85. In which, 2 families have mutated heterozygous p.E229K mutation, 2 families with mutation delete the whole gene segment CYP1B1.

**** Pedigree G40***



Patients with 1 heterozygous mutation p.E229K and 1 combination heterozygous mutation p.D218H. Dad has a heterozygous p.E229K. Her mother did not detect mutation. Dad, mom did not detect mutation p.D218H.

**** Pedigree G85***



The patient had a p.E229K heterozygous. The patient's brother also had a mutation p.E229K heterozygous gene and manifested in a patient-like disease. The patient's mother also had a heterozygous mutation p.E229K. The father and sister do not detect mutations and do not get sick.

The study found 2/86 cases of mutation deleting the entire exon 1-exon 3 segment. Both of these cases follow the genetic rules of Melden.

**** Pedigree G02***

thái dị hợp tử đều không biểu hiện bệnh. Khi di truyền cho con mang 2 đột biến ở trạng thái dị hợp biểu hiện bệnh.

Nghiên cứu tại Việt Nam của Đỗ Tấn (2016) thấy 5 gia đình bệnh nhân có đột biến gen CYP1B1 di truyền từ bố mẹ sang con. Trong đó 2 bệnh nhân mang đột biến di truyền ở trạng thái đồng hợp và 3 bệnh nhân mang đột biến ở trạng thái dị hợp tử.

Năm 2017, nghiên cứu của María tại Tây Ban Nha đã chỉ ra trong 4 gia đình mang đột biến gen CYP1B1 chỉ có 1 gia đình có di truyền đột biến từ bố mẹ sang các con.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại bệnh viện Mắt Trung ương và xét nghiệm xác định đột biến gen CYP1B1 tại trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein Trường Đại học Y Hà Nội từ tháng 9 năm 2014 đến tháng 9 năm 2018.

Các thành viên cùng huyết thống với BN mang đột biến gen.

Nhóm người khỏe mạnh, tiền sử gia đình không có người mắc bệnh di truyền được dùng để làm mẫu đối chứng trong quá trình xác định đột biến gen CYP1B1 khi thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử và chạy kiểm chứng các đột biến mới phát hiện trên bệnh nhân.

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát khi bệnh nhân có từ 4 triệu chứng sau trở lên: Nhãn áp cao ≥25mmHg (nhãn áp kế Maklakov) hoặc ≥22mmHg (nhãn áp kế Icare).Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng. Đường kính ngang giác mạc to bất thường ≥12mm. Giác mạc phù, mờ đục. Tiền phòng sâu, góc tiền phòng có tổ chức bất thường. Tổn hại lõm teo đĩa thị trong bệnh glôcôm.

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh nhân có các bệnh toàn thân hoặc tại mắt kèm theo, các bệnh di truyền khác. Bệnh nhân hoặc đại diện gia đình không tự nguyện tham gia nghiên cứu.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: từ tháng 9 năm 2014 đến tháng 9 năm 2018.

Địa điểm: bệnh viện Mắt Trung ương là nơi chẩn đoán, điều trị và quản lý bệnh nhân bị bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein Trường Đại học Y Hà Nội là nơi tiến hành các kỹ thuật di truyền phân tử.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Cỡ mẫu và chọn mẫu: cỡ mẫu thuận tiện. 86 bệnh nhân. 29 thành viên gia đình. 50 người khỏe mạnh để làm mẫu đối chứng.

Phương tiện nghiên cứu: khám mắt, dùng xác định đb gen, hóa chất

Các bước tiến hành nghiên cứu

Chẩn đoán bệnh nhân và lập phả hệ gia đình: Tất cả các bệnh nhân đều được hỏi, khám bệnh theo một mẫu bệnh án thống nhất. Hỏi bệnh, khám bệnh, phân loại giai đoạn bệnh. Lập phả hệ gia đình.

Quy trình phân tích đột biến gen CYP1B1 trên các bệnh nhân: Gia đình bệnh nhân được giải thích về nghiên cứu và kí cam đoan tự nguyện tham gia nghiên cứu. Lấy khoảng 2ml máu ngoại vi chống đông trong EDTA. Tách chiết DNA. Tiến hành giải trình tự toàn bộ gen CYP1B1 phát hiện đột biến điểm, sử dụng các cặp mồi được thiết kế bao phủ toàn bộ chiều dài gen CYP1B1 để tiến hành phản ứng PCR, sản phẩm PCR sẽ được giải trình tự trực tiếp, so sánh với trình tự GeneBank để phát hiện đột biến. Tiến hành kỹ thuật MLPA xác định đột biến xóa đoạn: sử dụng Kit MLPA (MRC- Holland). Xác định đột biến mới và khả năng gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát của đột biến mới bằng phần mềm in silico (phần mềm Polyphen 2), khả năng gây bệnh càng cao khi điểm đánh giá càng gần 1 điểm. Khẳng định đột biến mới khi giải trình tự gen CYP1B1 của 50 người Việt Nam bình thường không thấy xuất hiện đột biến giống như bệnh nhân.

Quy trình phát hiện người lành mang gen bệnh: Tách chiết DNA từ mẫu máu của người nhà. Định vị các vùng đột biến chỉ điểm và đột biến xóa đoạn (dựa vào kết quả phân tích gen CYP1B1 trên bệnh nhân của mỗi gia đình) để phân tích đột biến. Đề xuất tư vấn di truyền.

Quy trình kỹ thuật nghiên cứu: Bệnh nhân và các thành viên gia đình của bệnh nhân, người đối chứng được lấy 2ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA với hàm lượng 1,5mg/ml. Quy trình đảm bảo tuyệt đối vô trùng. DNA được tách chiết từ máu ngoại vi theo phương pháp phenol/chloroform. Toàn bộ 3 exon của gen CYP1B1 được khuếch đại với các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế tại trung tâm Gen – Protein trường đại học Y Hà Nội.

Trình tự mồi dùng cho phản ứng PCR

one third of the children were identified as among 11 families who obtained blood from their parents and tested the genetic mutation of CYP1B1 gene in 3 families accounted for 27.3%. Of the four families who only took blood from the father or mother of the patient, there was one family with genetically mutated CYP1B1. Specifically, mutations in family members of patients with mutations of CYP1B1 are as follows:

Result of mutation detection in patients' family members

Code	Patient		Carrier					
			Father		Mother		Siblings	
	Mutation	Type of mutation	Mutation	Type of mutation	Mutation	Type of mutation	Mutation	Type of mutation
G02	Deletion exon 1-3	Homo	Deletion exon 1-3	Heter	Deletion exon 1-3	Heter	Deletion exon 1-3	Heter
G08	p.Q86K	Heter	Non		Non			
G09	p.Q159X	Heter	Non		Non			
	p.Q164X	Heter						
	p.D218H	Heter						
G11	p.Q86K	Heter	Non		Non			
	p.Q159X	Heter						
G19	p.A133T	Heter	Non		Non			
G20	p.L27Q	Heter	Non		Non			
	p.G36D	Heter						
	p.G61E	Heter						
G21	p.Q86K	Heter	Non		Non			
	p.V198I	Heter						
G24	p.E229K	Heter			Non			
	p.D242N	Homo						
G40	p.D218H	Heter	p.E229K	Heter	Non			
	p.E229K	Heter						
G43	p.Q86K	Heter	Non		Non			
G44	p.365E	Heter	Non					
G56	Deletion exon 1-3	Homo	Deletion exon 1-3	Heter				
G70	p.E229K	Heter			Non			
G84	p.E229K	Heter	Non		Non			

When considering a time factor for the occurrence of the disease with the mutation of the gene, it was found that in the patient group that appeared immediately after birth, the rate of gene mutation was 25%, in the group of patients with later disease appearance was 18.9%. The possibility of mutation of CYP1B1 gene in the group of patients presenting soon after birth is 1.43 times higher than the possibility of mutation in the group of patients with late disease but the difference is not statistically significant.

When considering the two factors of combination, the time of occurrence of the disease immediately after birth and the status of the disease in both eyes show that the mutation rate in this group is 34.5%, the group of patients does not have two at the same time In this case, the rate of gene mutations is 14.3%. The possibility of mutation of CYP1B1 gene in the group of patients with both disease manifestations soon after birth and both eyes is 3.16 times higher than the possibility of mutation in patients with late disease manifestations and / or One-eye disease, the difference was statistically significant.

Considering the three associated factors: the time of occurrence of the disease immediately after birth, the disease manifestations in both eyes show that the mutation rate in this group is 53.8%, higher than the group of patients without simultaneously. The above characteristics are 15.3%. The possibility of mutation of CYP1B1 gene in the group of patients with simultaneous disease manifestations immediately after birth, in both eyes and severe disease period is 6.47 times higher than the possibility of mutation in the patient group. Again, the difference is statistically significant.

3.3. Mutations of carrier

The study found 19/86 cases of CYP1B1 mutation by sequencing techniques and MLPA, including two brothers in a family so continue to look for this mutation on the members of 18 Families are related to patients.

The study obtained 29 blood samples from members of 15 patient families including 13 fathers, 13 mothers and 3 siblings of patients. As a result, we found that 3/13 fathers, 2/13 mothers and

Mồi	Trình tự đoạn mồi (5'-3')	Kích thước (bp)
1F-E1	5′-GAAAGCCTGCTGGTAGAGCTCC-3′	308
1R-E1	5′-CTGCAATCTGGGGACAACGCTG-3′	
1F-E2	5'- TCT CCA GAG AGT CAG CTC CG-3'	449
1R-E2	5'-GGG TCG TGG CTG TAC-3' TCG	
2F-E2	5'-ATG GCT TTC GGA CAC TAC T-3'	787
2R-E2	5'-GAT CTT GGT TTT GAG GGG TG-3'	
3F-E3	5'-TCC CAG AAA TAT TAA TTT AGT CAC TG-3'	885
3R-E3	5'-TAT GCA GCA CAC CTC ACC TG-3'	

Kỹ thuật giải trình tự gen: tinh sạch sản phẩm PCR. Giải trình tự gen theo quy trình, sử dụng pp BigDye terminator sequencing.

Kỹ thuật tiến hành phản ứng MLP: Biến tính DNA, gắn (lai) probe vào gen đích, nối 2 đầu probe, khuếch đại sản phẩm lai (probe). Sản phẩm khuếch đại probe sẽ được điện di mao quản huỳnh quang trên máy giải trình tự gen để phân tích kết quả.

Sơ đồ nghiên cứu

Chỉ số, biến số nghiên cứu và tiêu chí đánh giá kết

Mục tiêu 1: *Xác định đột biến gen CYP1B1 và mối liên quan với lâm sàng trên bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát.*

Bệnh nhân được đánh giá các biến số và chỉ số về tiền sử bản thân và gia đình. Tuổi phát hiện bệnh được chia thành 3 giai đoạn ≤1 tháng, 1-6 tháng và >6 tháng. Giới, số mắt bị bệnh. Đo nhãn áp, tính trung bình và phân thành 3 nhóm <25mmHg, 25-35mmHg, >35mmHg. Đánh giá mức độ trong suốt của giác mạc, chia 3 mức độ: trong, đục ít, đục trắng. Đo đường kính giác mạc, tính trung bình và chia 3 nhóm <13mm, 13-14mm, >14mm. Chia bệnh thành 3 giai đoạn theo phân loại giai đoạn của Al-Hazmi. Dựa trên kết quả giải trình tự gen **CYP1B1**, so sánh với trình tự trên GenBank và kết quả giải trình tự gen của nhóm chứng, xác định được số lượng, vị trí, loại đột biến ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát đồng thời phát hiện đột biến mới. Đánh giá mối liên quan giữa đột biến xác định được với các đặc điểm lâm sàng như thời gian khởi phát bệnh, giai đoạn bệnh, triệu chứng và các dấu hiệu, kết quả đáp ứng với điều trị.

Mục tiêu 2: *Phát hiện người lành mang gen bệnh trên các thành viên gia đình có quan hệ huyết thống với BN glôcôm bẩm sinh NP.*

Lựa chọn các thành viên gia đình. Lấy máu xét nghiệm để phát hiện người lành mang gen bệnh trên các thành viên gia đình có quan hệ huyết thống với bệnh nhân dựa trên kết quả giải trình tự gen CYP1B1. Phả hệ di truyền là phả hệ có bố và/ hoặc mẹ bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 đột biến di truyền cho con. Phả hệ không di truyền là phả hệ có bố và mẹ không mang đột biến gen CYP1B1 mà đột biến phát sinh trong quá trình tạo giao tử.

Xử lý kết quả

Các số liệu được ghi chép vào bệnh án nghiên cứu và xử lý theo thuật toán thống kê y học với phần mềm SPSS 16.0. So sánh các biến định lượng bằng T-test, so sánh các biến định tính bằng Test $\chi 2$. Mối liên quan giữa các yếu tố với tình trạng đột biến được đánh giá qua giá trị OR và khoảng tin cậy 95%. Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê khi sử dụng để kiểm định sự khác biệt về kết quả.

2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học. Bệnh nhân và gia đình hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu, có sự chấp thuận của đại diện bệnh nhân và/hoặc gia đình.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ

unilateral 3.8% p = 0.009 (Test χ^2). The likelihood of occurrence of two-eye disease in the group of 18 patients with mutations was 10.12 times higher than in the group of 67 non-mutant patients (OR = 10,12, 95% confidence interval [1,27–80,73]).

3.2.4.5. Relationship with some clinical characteristics and treatment

Stage: The rate of mutations of patients with severe eyes is highest (accounting for 46.8%), the difference is statistically significant with the mutation rate of patients in the middle stage. (12.9%) and light (25%) with p=0.000 (Fisher Exact - Test).

IOP: Among 85 patients, we measured intraocular pressure for 143 eyes. The average intraocular pressure of the group with the mutation of 28.03 ± 8.89mmHg was higher than the average intraocular pressure of the group without the gene mutation was 26.74 ± 8,27mmHg, but the difference was not significant meaning (p>0,05 T-Test).

Corneal diameter: The average diameter of the average cornea in the group with gene mutations was 13.22 ± 0.87mm higher than the non-mutant group of 12.99 ± 0.84mm (p> 0.05). Meanwhile, the mean diameter of the average cornea in the group with the gene mutation was 12.47 ± 0.75mm higher than the non-mutant group of 12.10 ± 0.82mm (p = 0.018 T-Test).

Axial length: the average of the group with gene mutation is 23.21 ± 2.95mm, not different from the average length of the eyeball axis of the non-mutant group is 23.64 ± 3.42mm (p> 0.05 T-Test).

Optic disc: Of the 85 patients, visual plates were observed to assess the degree of disc depression of 58 eyes. The average degree of concave disc of the group with gene mutation was 0.73 ± 0.14 not different from the average concave level of the non-mutant group was 0.72 ± 0.23 (p> 0.05 -T-Test) Long-term eyeball axis: the average of the group with gene mutation was 23.21 ± 2.95mm, no different from the average length of the eyeball axis of the non-mutant group was 23.64 ± 3.42mm (p> 0.05 T-Test).

Surgery: The rate of the second and third eye operations of the mutant group was 20.6%, 2.9% higher than the non-mutant group 13.6%, 1.8%.

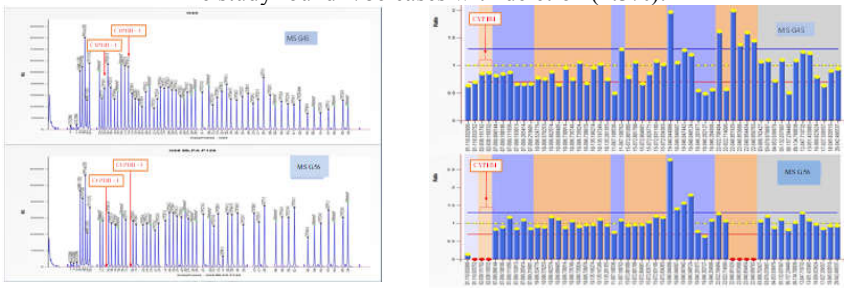
Combination of signs and symptoms: When assessing the relationship between the synthesis of clinical factors and the mutation status CYP1B1 obtained the following results:

						cause disease	
8	c.571delC	p.L191Sfs*4	0	1	Cause disease	Ability to cause disease	
9	c.1094G>A	p.G365E	1	0	Cause disease	Ability to cause disease	0,997

SNPs: p.R48G, p.A119S and p.L432V.

3.2.3. Results of the determination of CYP1B1 mutation by MLPA technique

The study found 2/86 cases with deletion (2.3%).



MLPA image (left picture) and calculation result (Relative Peak Area) by coffalyser software (right picture) of patients G45 and G56. The new deletion in 2 patients determined by MLPA technique is to completely delete exon 1 to exon 3.

3.2.4. Genotype, phenotype correlation

Of the 86 patients studied, two were siblings in a family and had a genetic mutation. When assessing the relationship between clinical and genetic mutations, the study analyzed 85 patients without relationship with 144 eyes. The results are as follows:

3.2.4.1. Relationship with time of onset: The detection time of patients with mutation was 1.21 ± 1.75 earlier than the non-mutant group with an average of 2.99 ± 3, 88 in a statistically significant way with p = 0.006 (T-Test).

3.2.4.2. Relationship with gender: The rate of male mutations is 25.0%, higher than female mutation rate of 15.2% (p> 0.05 - Test χ^2).

3.2.4.3. The relationship between history: The rate of mutations group of patients whose unhealthy mothers is 60.0% higher than the group of mothers without the disease during pregnancy is 18.8%, p = 0.062 *(Test Fisher Exact)*.

3.2.4.4. The relationship with the number of diseased eyes: the rate of gene mutations in patients with both eyes is 28.8%, which is statistically significantly higher than the group of patients with

3.1. Đặc điểm bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát

3.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi phát hiện bệnh

Tuổi phát hiện bệnh là thời gian tính từ khi bệnh nhân được sinh ra đến khi gia đình phát hiện dấu hiệu bất thường đầu tiên tại mắt của trẻ. Đa số bệnh nhân được phát hiện bệnh từ ngay khi sinh ra đến dưới 1 tháng tuổi chiếm 58,2%. Thời gian phát hiện bệnh trung bình là 2,58±3,59 tháng tuổi, sớm nhất là ngay khi sinh ra, muộn nhất là 11 tháng. Trong số 47,7% bệnh nhân phát hiện bệnh ngay lúc sinh có 51,2% bệnh nhân phát hiện bệnh sớm trước 2 tuần.

3.1.2. Phân bố bệnh nhân theo giới

Trong tổng số 86 bệnh nhân mắc bệnh, tỷ lệ giới nam cao gấp 1,6 lần nữ (53 bệnh nhân nam và 33 bệnh nhân nữ), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p=0,031 (Test χ^2).

3.1.3. Tiền sử bệnh nhân và gia đình

Tiền sử bản thân: Có 53,5% trẻ là con đầu, 37,2% trẻ là con thứ 2 và chỉ có 9,3% là con thứ 3 hoặc thứ 4. Cân nặng khi sinh trung bình là 2986,1±433,6g, nhỏ nhất là 700g, lớn nhất là 3800g.

Tiền sử gia đình: 1 gia đình có 2 anh em trai cùng bị bệnh (1,16%). 3 gia đình có tiền sử ông hoặc bà tiếp xúc chất độc màu da cam. 5/85 mẹ mắc bệnh khi mang thai (5,9%), trong đó: 3 bà mẹ cúm, 1 bà mẹ sốt phát ban, 1 bà mẹ có tiền sử dùng thuốc trầm cảm khi mang thai.

3.1.4. Tình trạng mắt bị bệnh của bệnh nhân: số bệnh nhân biểu hiện bệnh hai mắt là 60 bệnh nhân (69,8%) nhiều hơn số bệnh nhân biểu hiện bệnh ở 1 mắt (30,2%) với p=0,000 (Test χ^2). Trong số 26 bệnh nhân mắc bệnh 1 mắt, có 13 bệnh nhân biểu hiện bệnh ở mắt phải (50%), 13 bệnh nhân biểu hiện bệnh ở mắt trái (50%), (p>0,05).

3.1.5. Phân bố giai đoạn bệnh: Nghiên cứu tiến hành ở 86 bệnh nhân trong đó 60 bệnh nhân bệnh biểu hiện ở cả hai mắt, 26 bệnh nhân bệnh ở một mắt nên tổng số mắt trong nghiên cứu là 146 mắt. 63,7% số mắt bị bệnh ở giai đoạn trung bình, 33,6% giai đoạn nặng và 2,7% giai đoạn nhẹ. Tỷ lệ số mắt giữa các giai đoạn bệnh trong nghiên cứu khác biệt có ý nghĩa thống kê với p=0,000 (Test χ^2).

3.1.6. Triệu chứng cơ năng: hay gặp nhất là sợ ánh sáng 84,9%, chảy nước mắt (82,2%) và dấu hiệu chói (80,1%). Dấu hiệu ít gặp nhất ở bệnh nhân là nhìn mờ, gặp ở 111 mắt bệnh nhân (76,0%).

3.1.7. Dấu hiệu thực thể

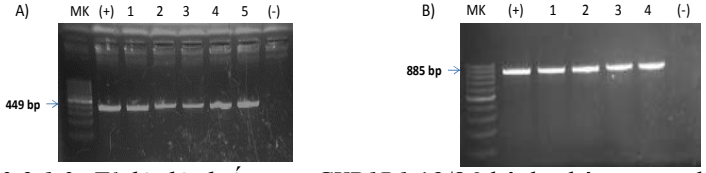
Nhãn áp: trung bình là 27,11±8,41mmHg, 55mmHg - 9mmHg.

Chiều dài trục nhãn cầu: trung bình là 23,52±3,28mm, dài nhất là 33,10 và ngắn nhất là 15,70.
Kết mạc: kết mạc cương tụ gặp ở 55/146 mắt (chiếm 37,7%).
Vùng rìa củng giác mạc: dãn lồi gặp ở 54 mắt (chiếm 37,0%).
Giác mạc: 43 mắt giác mạc trong (29,4%), giác mạc đục 103 mắt (70,6%) trong đó đục nhẹ chiếm 38,4% và đục trắng chiếm 32,2%. Đường kính ngang trung bình là 13,06±0,85mm, lớn nhất là 16,0 và nhỏ nhất là 11,5. Đường kính dọc TB là 12,20±0,82mm, lớn nhất là 15,0 và nhỏ nhất là 11,0. 15 mắt có vết Habb's (10,3%) và 131 mắt không có vết Habb's (89,7%).
Tiền phòng: soi góc tiền phòng được thực hiện ở 20/43 mắt có giác mạc trong (46,5%) toàn bộ đều thấy tiền phòng sâu, chân mống mắt bám cao, không quan sát được các thành phần góc.
Đĩa thị: quan sát được đĩa thị của 61/146 mắt (39,7%), C/D trung bình là 0,72±0,21 (0,2 - 0,9).

3.2. Kết quả xác định đột biến gen và mối liên quan với lâm sàng

3.2.1. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1

3.2.1.1. Kết quả tách chiết DNA: độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280nm nằm trong khoảng 1,7–2,0 và nồng độ mẫu tách chiết đạt từ 101,0–233,2ng/µL.
3.2.1.2. Kết quả PCR: Sản phẩm PCR chỉ có 1 băng đặc hiệu, rõ nét.

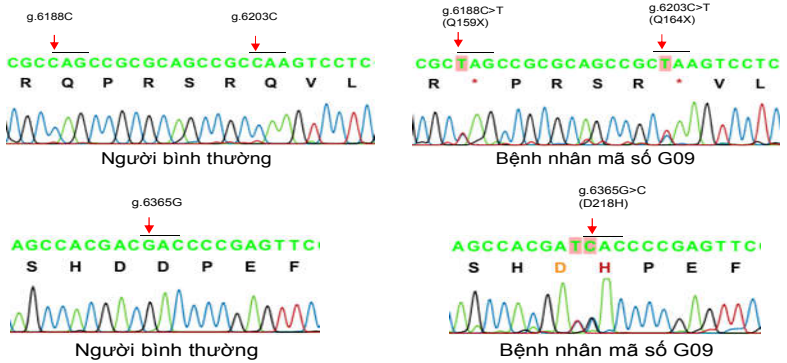


*3.2.1.3. Tỷ lệ đột biến gen CYP1B1:*19/86 bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 (22,1%), trong đó 17/86 trường hợp có đột biến điểm (19,8%) và 2/86 bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn (2,3%).
3.2.1.4. Các dạng đột biến gen CYP1B1: có 2 bệnh nhân là anh em ruột nên khi đánh giá các dạng đột biến ở những BN không có quan hệ huyết thống, số bệnh nhân đột biến là 18/85, phân bố như sau: ĐB sai nghĩa hay gặp nhất (17,6%). Đột biến vô nghĩa (3,5%). Đột biến xóa đoạn (2,4%) và đột biến làm thay đổi khung dịch mã (1,2%).

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

3.2.2.1. Distribution of gene mutations CYP1B1: 17 patients with point mutations with 12 different positions on DNA. Mainly on exon 2 (91.7%), exon 3 (8.3%). 25 allen. p.E229K is the highest percentage (25%), p.Q86K (16.7%). Mutation p.Q159X created the ending code and p.D218H (12.5%). The remaining mutations found in 1 patient.
Point mutations: 3 mutations have been reported to cause disease p.G61E, p.V198I, p.E229K, 9 new points, p.Q86K, p.Q159X, p.Q164X, p.D218H, p.L191Sfs * 4, p.A133T, p.L27Q, p.D242N, p.G365E.

Illustrations patient has 03 new mutations



Result of prediction of mutations

No	cDNA	Amino acid changes	Number of cases		Analysis in silico		
			Heter	Homo	Type of mutation	PolyPhen 2	Point
1	c.80T>A	p.L27Q	1	0	Cause disease	Ability to cause disease	0,992
2	c.256C>A	p.Q86K	4	0	Cause disease	Ability to cause disease	0,995
3	c.397G>A	p.A133T	1	0	Cause disease	Benign ability	0,244
4	c.475C>T	p.Q159X	3	0	Cause disease		
5	c.490C>T	p.Q164X	1	0	Cause disease		
6	c.652G>C	p.D218H	3	0	Cause disease	Ability to cause disease	1,000
7	c.724G>A	p.D242N	0	1	Cause disease	Ability to	1,000

Cornea: 43 clear corneal (29.4%), 103 eyes (70.6%) of which light cloudy accounted for 38.4% and white opaque 32.2%. The average horizontal diameter is 13.06 ± 0.85mm, the largest is 16.0 and the smallest is 11.5. The vertical diameter is 12.20 ± 0.82mm, the largest is 15.0 and the smallest is 11.0. 15 eyes have Habb strike (10.3%) and 131 eyes do not have Habb strike (89.7%).

Anterior chamber: 20/43 eyes which have clear cornea (46.5%), iris sticking high, no angle components were observed.

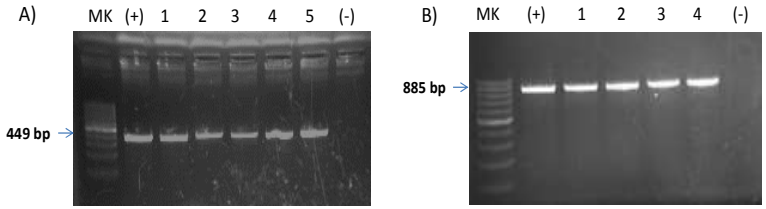
Optic disc: 61/146 eyes (39.7%), average C / D of 0.72 ± 0.21 (0.2 - 0.9).

3.2. Results of gene mutation determination and clinical relevance

3.2.1. Results of determining gene mutation CYP1B1

3.2.1.1. DNA extraction: high purity with a optical density ratio of 260 / 280nm in the range of 1.7–2.0 and the concentration of extracted samples is from 101,0-22,2.2 / µL.

3.2.1.2. PCR: PCR products have only one specific, clear band.



3.2.1.3. Rate of CYP1B1 mutation: 19/86 patients had mutations of CYP1B1 (22.1%), of which 17/86 cases had point mutations (19.8%) and 2/86 patients had mutations deletion (2.3%).

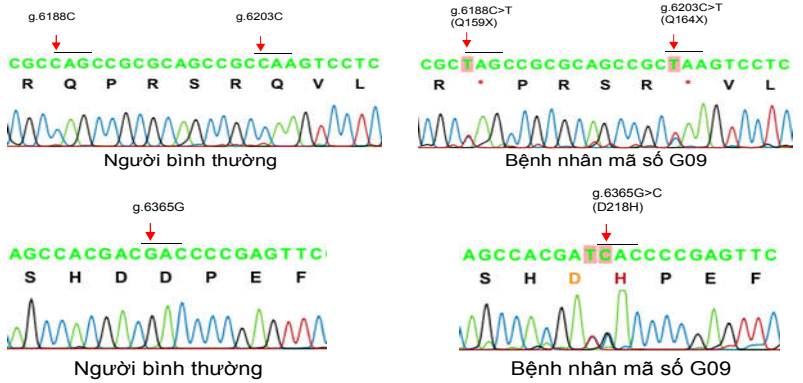
3.2.1.4. Genotypes of CYP1B1 mutation: there are 2 patients who are siblings, so when assessing mutations in patients who are not related by blood, the number of mutated patients is 18/85, distributed as follows: missense the most common (17.6%). Nonsense mutations (3.5%). The deletion mutation (2.4%) and frameshift (1.2%).

3.2.2. Results of gene mutation determination by sequencing

Phân bố đột biến điểm gen CYP1B1: 17 bệnh nhân mang đột biến điểm với 12 vị trí khác nhau trên DNA. Chủ yếu trên exon 2 (91,7%), exon 3 (8,3%). 25 allen. Đột biến sai nghĩa p.E229K chiếm tỷ lệ cao nhất (25%), p.Q86K (16,7%). Đột biến p.Q159X tạo mã kết thúc sớm và p.D218H (12,5%). Các đột biến còn lại tìm thấy ở 1BN.

Các đột biến điểm: 3 ĐB đã được công bố gây bệnh p.G61E, p.V198I, p.E229K, 9 ĐB điểm mới là p.Q86K, p.Q159X, p.Q164X, p.D218H, p.L191Sfs*4, p.A133T, p.L27Q, p.D242N, p.G365E.

Minh họa BNcó 03 ĐB mới (2 ĐB vô nghĩa, 1 ĐB sai nghĩa).



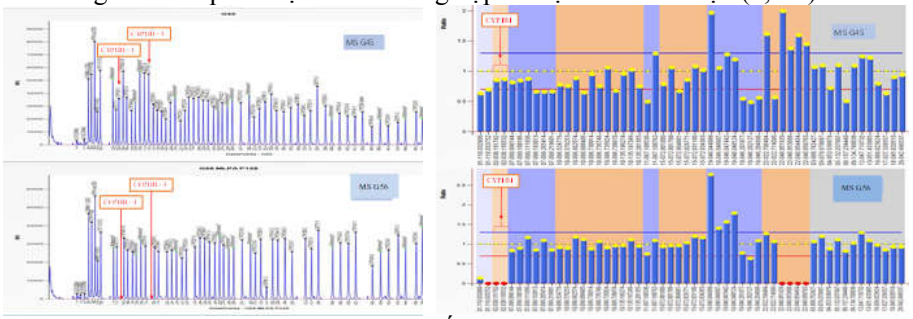
Kết quả dự đoán gây bệnh của các đột biến

STT	cDNA	Thay đổi acid amin	Số trường hợp		Phân tích *in silico*		
			Dị hợp	Đồng hợp	Loại đột biến	PolyPhen 2	Điểm
1	c.80T>A	p.L27Q	1	0	Gây bệnh	Có khả năng gây bệnh	0,992
2	c.256C>A	p.Q86K	4	0	Gây bệnh	Có khả năng gây bệnh	0,995
3	c.397G>A	p.A133T	1	0	Gây bệnh	Khả năng lành tính	0,244
4	c.475C>T	p.Q159X	3	0	Gây bệnh		
5	c.490C>T	p.Q164X	1	0	Gây bệnh		
6	c.652G>C	p.D218H	3	0	Gây bệnh	Có khả năng gây bệnh	1,000
7	c.724G>A	p.D242N	0	1	Gây bệnh	Có khả năng gây bệnh	1,000
8	c.571delC	p.L191Sfs*4	0	1	Gây bệnh		
9	c.1094G>A	p.G365E	1	0	Gây bệnh	Có khả năng gây bệnh	0,997

Các đa hình gen đã công bố: p.R48G, p.A119S và p.L432V.

3.2.3. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 bằng kỹ thuật MLPA

Nghiên cứu phát hiện 2/86 trường hợp có đột biến xóa đoạn (2,3%).



Hình ảnh MLPA (hình trái) và kết quả tính toán (Relative Peak Area) bằng phần mềm coffalyser (hình phải) của bệnh nhân G45 và G56.

Đột biến xóa đoạn mới gặp ở 2 bệnh nhân được xác định bằng kỹ thuật MLPA là xóa đoạn hoàn toàn exon 1 đến exon 3.

3.2.4. Mối liên quan giữa lâm sàng và đột biến gen CYP1B1

Trong tổng số 86 bệnh nhân nghiên cứu, có hai bệnh nhân là anh em ruột trong một gia đình và cùng có đột biến gen. Khi đánh giá mối liên quan giữa lâm sàng và đột biến gen, nghiên cứu tiến hành phân tích 85 bệnh nhân không có mối quan hệ huyết thống với 144 mắt. Kết quả thu được như sau:

3.2.4.1. Mối liên quan với thời gian phát hiện bệnh: Thời gian phát hiện bệnh của nhóm bệnh nhân có mang đột biến gen trung bình là 1,21±1,75 sớm hơn nhóm không mang đột biến trung bình là 2,99±3,88 một cách có ý nghĩa thống kê với p=0,006 (T-Test).

3.2.4.2. Mối liên quan với giới tính: Tỷ lệ đột biến của nam là 25,0% cao hơn tỷ lệ đột biến của nữ là 15,2% (p>0,05 - Test χ^2).

3.2.4.3. Mối liên quan giữa tiền sử: Tỷ lệ đột biến gen trong nhóm bệnh nhân có mẹ bị bệnh khi mang thai là 60,0% cao hơn nhóm mẹ không bị bệnh khi mang thai là 18,8%, p=0,062 (Test Fisher Exact).

3.2.4.4. Mối liên quan với số mắt bị bệnh: tỷ lệ đột biến gen trong nhóm bệnh nhân bị bệnh cả hai mắt là 28,8% cao hơn nhóm bệnh nhân bị bệnh một mắt là 3,8% một cách có ý nghĩa thống kê với p=0,009 (Test χ^2). Khả năng xuất hiện bệnh ở 2 mắt trong nhóm 18 bệnh nhân mang đột biến cao gấp 10,12 lần nhóm 67 bệnh nhân không mang đột biến (OR=10,12, khoảng tin cậy 95% 1,27–80,73).

3.2.4.5. Mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng và điều trị

3.1.2. Gender

Among 86 patients, the rate of male is 1.6 times higher than female (53 male and 33 female), this difference is statistically significant with p = 0.031 (Test χ^2).

3.1.3. History of patients and families

Personal history: 53.5% of children were first children, 37.2% were second children and only 9.3% were third or fourth children. The average birth weight was 2986.1 ± 433.6g, the smallest is 700g, the largest is 3800g.

Family history: 1 family has 2 brothers with the same illness (1.16%). 3 families have a history of grandfather or grandmother contacting Agent Orange. 5/85 mothers got sick during pregnancy (5.9%), of which: 3 mothers with flu, 1 mother with typhus, 1 mother with a history of depression medicine during pregnancy.

3.1.4. The condition of the patient's eye disease: the number of patients with bilateral is 60 patients (69.8%) more than the number of patients with unilateral (30.2%) with p = 0,000 *(Test χ^2).* Among 26 unilateral patients, 13 patients had right eye (50%), 13 patients showed left (50%).

3.1.5. Stage of disease: The study was conducted in 86 patients in which 60 patients showed symptoms in both eyes, 26 patients in one eye, the total number of eyes in the study was 146 eyes. 63.7% of the eyes suffered from disease in the middle stage, 33.6% of the severe stage and 2.7% of the mild stage. The ratio of the number of eyes between different stages of the study was statistically significant with p = 0.000 *(Test χ^2).*

3.1.6. Symptoms: most common are photophobia 84.9%, blepharospasm, and excessive tearing (82.2% and 80.1%). The least common sign in patients is blur, seen in 111 patient eyes (76.0%).

3.1.7. Signs:

IOP: average 27.11 ± 8.41mmHg, 55mmHg - 9mmHg.

Axial length: average is 23.52 ± 3.28mm, the longest is 33.10 and the shortest is 15.70.

Conjunctiva: 55/146 eyes (accounting for 37.7%).

Scleral: protrusion is seen in 54 eyes (accounting for 37.0%).

sequencing of CYP1B1, comparing with sequencing on GenBank and the results of gene sequencing of the control group, determining the number, location and mutation in patients with primary congenital glaucoma simultaneously detect new mutations. Evaluate the relationship between mutations identified with clinical characteristics such as disease onset time, disease stage, symptoms and signs and results of response to treatment.

Objective 2: *Detecting healthy people carrying disease genes on family members who are related to the NP congenital glaucoma.*

Select family members. Taking blood for detection of healthy people carrying disease genes on family members who are related by blood to patients based on the sequencing results of CYP1B1. Genetic genealogy is the genealogy of the father and / or the patient's mother carrying the mutated CYP1B1 gene mutation for the child. Genetic non-genetic pedigree is the genealogy of parents without the mutation of CYP1B1 mutation that arises during gamete generation.

Data processing

The data were recorded in the medical record and studied according to the medical statistical algorithm with SPSS 16.0 software. Compare quantitative variables with T-test, compare qualitative variables with Test χ^2. The relationship between factors with mutation was assessed by OR value and 95% confidence interval. P value <0.05 was considered to be statistically significant when used to test the difference in results.

2.4. Research ethics

The thesis strictly follows the research ethics in Medicine. Patients and families voluntarily participate in the study, with the consent of the patient and / or family representative.

CHAPTER 3: RESULTS

3.1. Characteristics of primary congenital glaucoma patients

3.1.1. Age of onset

The age of onset is the time from when the patient is born until the family first discovers abnormalities in the child's eyes. The majority of patients detected disease from birth to less than 1 month old accounted for 58.2%. The average detection time is 2.58 ± 3.59 months of age, as early as the birth, no later than 11 months. Among 47.7% of patients detected the disease at birth, 51.2% of patients detected the disease 2 weeks after birth.

Giai đoạn bệnh: Tỷ lệ đột biến của những bệnh nhân có mắt ở giai đoạn nặng là cao nhất (chiếm 46,8%), khác biệt có ý nghĩa thống kê với tỷ lệ đột biến của nhóm bệnh nhân ở giai đoạn trung bình (12,9%) và nhẹ (25%) với p=0,000 (Fisher Exact - Test).

Nhãn áp: Trong số 85 bệnh nhân, chúng tôi đo được nhãn áp cho 143 mắt**.** Nhãn áp trung bình của nhóm có đột biến gen là 28,03±8,89mmHg cao hơn so với nhãn áp trung bình của nhóm không có đột biến gen là 26,74±8,27mmHg, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05-T-Test).

Đường kính giác mạc: Đường kính ngang của giác mạc trung bình ở nhóm có đột biến gen là 13,22±0,87mm cao hơn so nhóm không đột biến là 12,99±0,84mm (p>0,05). Trong khi đó đường kính dọc của giác mạc trung bình ở nhóm có đột biến gen là 12,47±0,75mm cao hơn so nhóm không đột biến là 12,10±0,82mm (p=0,018-T-Test).

Chiều dài trục nhãn cầu: trung bình của nhóm có đột biến gen là 23,21±2,95mm không khác biệt so với chiều dài trục nhãn cầu trung bình của nhóm không đột biến là 23,64±3,42mm (p>0,05-T-Test).

Đĩa thị: Trong số 85 bệnh nhân, quan sát được đĩa thị để đánh giá mức độ lõm đĩa của 58 mắt. Mức độ lõm đĩa trung bình của nhóm có đột biến gen là 0,73±0,14 không khác biệt so với mức độ lõm đĩa trung bình của nhóm không đột biến là 0,72±0,23 (p>0,05-T-Test).

Phẫu thuật: Tỷ lệ số mắt mổ lần 2, 3 của nhóm đột biến là 20,6%, 2,9% cao hơn nhóm không đột biến 13,6%, 1,8%. Nhóm đột biến có 2 mắt của cùng 1BN phải mổ lại lần 4 chiếm 5,9%, nhóm không có đột biến không có BN nào, p=0,047 (Fisher Exact-Test). Các phương pháp phẫu thuật bao gồm rạch bè, cắt rạch bè, cắt bè có hoặc không áp chất chống chuyển hóa, đặt van dẫn lưu tiền phòng và quang đông thể mi giữa hai nhóm bệnh nhân có và không đột biến gen khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Fisher Exact - Test).

Phối hợp các yếu tố lâm sàng: Khi đánh giá mối liên quan giữa tổng hợp các yếu tố lâm sàng với tình trạng đột biến gen CYP1B1 thu được kết quả như sau:

Khi xét một yếu tố thời gian xuất hiện bệnh với tình trạng đột biến gen thấy ở nhóm bệnh nhân xuất hiện bệnh ngay sau sinh tỷ lệ đột biến gen là 25%, ở nhóm bệnh nhân xuất hiện bệnh muộn hơn là 18,9%. Khả năng đột biến gen ***CYP1B1*** ở nhóm bệnh nhân biểu hiện bệnh sớm ngay sau sinh cao gấp 1,43 lần so với khả năng đột biến ở nhóm bệnh

nhân biểu hiện bệnh muộn tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%.

Khi xét hai yếu tố kết hợp là thời gian xuất hiện bệnh ngay sau sinh và tình trạng biểu hiện bệnh ở cả hai mắt thấy tỷ lệ đột biến gen trong nhóm này là 34,5%, nhóm bệnh nhân không có cùng lúc hai yếu tố này thì tỷ lệ đột biến gen là 14,3%. Khả năng đột biến gen ***CYP1B1*** ở nhóm bệnh nhân mang đồng thời hai đặc điểm bệnh biểu hiện sớm ngay sau sinh và cả hai mắt cao gấp 3,16 lần so với khả năng đột biến ở nhóm bệnh nhân biểu hiện bệnh muộn và/hoặc bệnh ở một mắt, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%.

Khi xét ba yếu tố kết hợp là thời gian xuất hiện bệnh ngay sau sinh, tình trạng biểu hiện bệnh ở cả hai mắt thấy tỷ lệ đột biến gen trong nhóm này là 53,8% cao hơn nhóm bệnh nhân không có đồng thời ba đặc điểm trên là 15,3%. Khả năng đột biến gen ***CYP1B1*** ở nhóm bệnh nhân mang đồng thời ba đặc điểm bệnh biểu hiện sớm ngay sau sinh, ở cả hai mắt và giai đoạn bệnh nặng cao gấp 6,47 lần so với khả năng đột biến ở nhóm bệnh nhân còn lại, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%.

3.3. Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh trong thành viên gia đình bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát

Nghiên cứu đã phát hiện 19/86 trường hợp có đột biến gen ***CYP1B1*** bằng kỹ thuật giải trình tự và MLPA, trong đó có hai anh em trai ở một gia đình vì vậy tiếp tục tìm đột biến gen này trên các thành viên của 18 gia đình có quan hệ huyết thống với bệnh nhân.

Nghiên cứu lấy được 29 mẫu máu xét nghiệm của các thành viên thuộc 15 gia đình bệnh nhân bao gồm 13 người bố, 13 người mẹ, 3 người em ruột của bệnh nhân. Kết quả chúng tôi phát hiện 3/13 người bố, 2/13 người mẹ và 1/3 người em được xác định là người

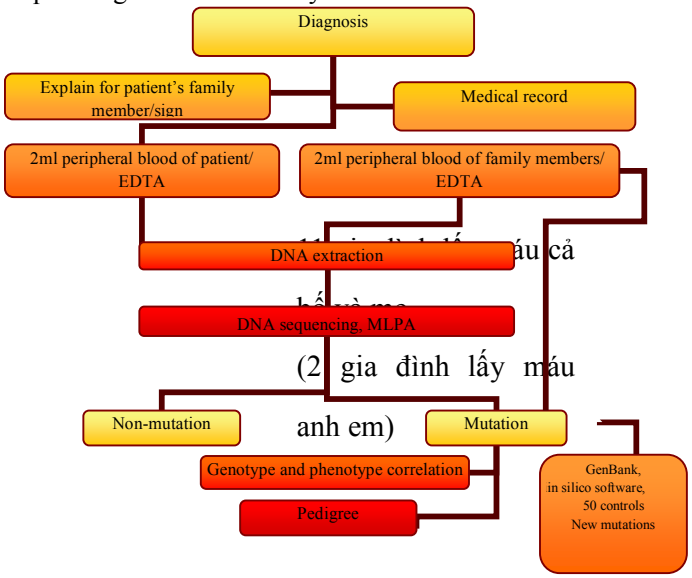
trong số 11 gia đình lấy được máu bố và mẹ làm xét nghiệm thấy di truyền đột biến gen ***CYP1B1*** ở 3 gia đình chiếm 27,3%. Trong số 4 gia đình chỉ lấy được máu bố hoặc mẹ bệnh nhân thấy có 1 gia đình có di truyền đột biến gen ***CYP1B1***. Cụ thể tình trạng đột biến ở các thành viên gia đình bệnh nhân có đột biến gen ***CYP1B1*** như sau:

Kết quả phát hiện đột biến ở các thành viên gia đình bệnh nhân

Mã số	Bệnh nhân	Người lành mang gen bệnh

Genome sequencing techniques: purification of PCR products. Solve the process of sequencing genes, using pp BigDye terminator sequencing.

Technique of conducting MLP reaction: DNA denaturation, attachment (hybridization) probe to target gene, connecting 2 probe heads, amplifying hybrid product (probe). The probe amplification product will be electrophoresis on the fluorescent capillary on the sequencing machine to analyze the results.



Indicators, research variables and criteria for evaluating results

Objective 1: *Identify mutations of CYP1B1 gene and clinical relevance in patients with primary congenital glaucoma.*

Patients were evaluated for variables and indicators for their personal and family history. Disease detection age is divided into 3 periods đoạn1 month, 1-6 months and> 6 months. Gender, number of eyes sick. Measure intraocular pressure, averaged and divided into 3 groups <25mmHg, 25-35mmHg,> 35mmHg. Assess the degree of transparency of the cornea, divided into 3 levels: clear, less cloudy, cloudy. Measure corneal diameter, averaged and divided into 3 groups <13mm, 13-14mm,> 14mm. Based on the results of

Diagnosis of patients and making family pedigree: All patients were asked, examined according to a record. Ask patients, examine and classify disease stages. Establish family pedigree.

Process of analyzing mutation of CYP1B1 gene in patients: The patient's family is explained about the study and signed a commitment to voluntarily participate in the study. Take about 2ml of anticoagulant peripheral blood in EDTA. DNA extraction. The sequence of CYP1B1 gene was detected to detect point mutations, using primer pairs designed to cover the entire length of CYP1B1 gene to conduct PCR reaction, PCR products will be sequenced directly, compared to Compare with GeneBank sequences to detect mutations.

Conducting MLPA technique determines the deletion mutation section: using MLPA Kit (MRC-Holland). Identify new mutations and the ability to cause primary congenital glaucoma of new mutations by silico software (software Polyphen 2), the higher the ability to cause disease when the evaluation point is closer to 1 point. Confirming a new mutation when sequencing the CYP1B1 gene of 50 normal Vietnamese people does not appear mutated like a patient.

Process of detecting healthy people carrying disease genes: Extract DNA from blood samples of family members. Locate point mutations and deletion mutations (based on the analysis of CYP1B1 gene in each patient's family) for mutation analysis. Proposed genetic counseling.

Technical research process: Patients and family members of the patient, the control was taken 2ml of EDTA blood with an anticoagulant of 1.5mg / ml. The process is absolutely sterile. DNA was extracted from peripheral blood by phenol / chloroform method. All 3 exons of CYP1B1 are amplified with specific primers designed at the HMU and Protein Center.

Primer

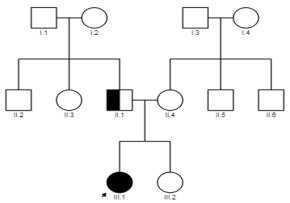
Primer	Sequence (5'-3')	Bp
1F-E1	5′-GAAAGCCTGCTGGTAGAGCTCC-3′	308
1R-E1	5′-CTGCAATCTGGGGACAACGCTG-3′	
1F-E2	5'- TCT CCA GAG AGT CAG CTC CG-3'	449
1R-E2	5'-GGG TCG TGG CTG TAC-3' TCG	
2F-E2	5'-ATG GCT TTC GGA CAC TAC T-3'	787
2R-E2	5'-GAT CTT GGT TTT GAG GGG TG-3'	
3F-E3	5'-TCC CAG AAA TAT TAA TTT AGT CAC TG-3'	885
3R-E3	5'-TAT GCA GCA CAC CTC ACC TG-3'	

			Bố bệnh nhân		Mẹ bệnh nhân		Anh/em bệnh nhân	
	Đột biến	**Thể đột biến**	**Đột biến**	**Thể đột biến**	**Đột biến**	**Thể đột biến**	**Đột biến**	**Thể đột biến**
G02	Xóa đoạn exon 1-3	Đồng hợp	Xóa đoạn exon 1-3	Dị hợp	Xóa đoạn exon 1-3	Dị hợp	Xóa đoạn exon 1-3	Dị hợp
G08	p.Q86K	Dị hợp	Không		Không			
G09	p.Q159X	Dị hợp	Không		Không			
	p.Q164X	Dị hợp						
	p.D218H	Dị hợp						
G11	p.Q86K	Dị hợp	Không		Không			
	p.Q159X	Dị hợp						
G19	p.A133T	Dị hợp	Không		Không			
G20	p.L27Q	Dị hợp	Không		Không			
	p.G36D	Dị hợp						
	p.G61E	Dị hợp						
G21	p.Q86K	Dị hợp	Không		Không			
	p.V198I	Dị hợp						
G24	p.E229K	Dị hợp			Không			
	p.D242N	Đồng hợp						
G40	p.D218H	Dị hợp	p.E229K	Dị hợp	Không			
	p.E229K	Dị hợp						
G43	p.Q86K	Dị hợp	Không		Không			
G44	p.365E	Dị hợp	Không					
G56	Xóa đoạn exon 1-3	Đồng hợp	Xóa đoạn exon 1-3	Dị hợp				
G70	p.E229K	Dị hợp			Không			
G84	p.E229K	Dị hợp	Không		Không			
G85	p.E229K	Dị hợp	Không		p.E229K	Dị hợp	Em trai: p.E229K	Dị hợp
							Em gái: không đột biến	

3.3.1. Phả hệ có di truyền đột biến

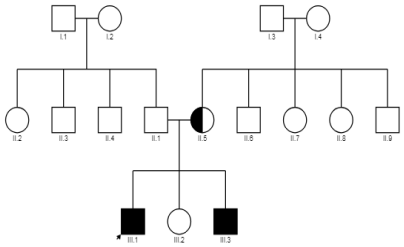
Kết quả nghiên cứu thấy 4 phả hệ có đột biến di truyền gồm các gia đình bệnh nhân G2, G40, G56 và G85. Trong đó 2 gia đình mang đột biến p.E229K di truyền dạng dị hợp tử, 2 gia đình mang đột biến xóa đoạn toàn bộ gen CYP1B1.

**** Phả hệ gia đình bệnh nhân G40***



BN mang 1 đột biến gen p.E229K dị hợp tử và 1 đột biến dị hợp tử kết hợp p.D218H. Bố BN có đột biến p.E229K thể dị hợp tử. Mẹ BN không phát hiện ĐB. Bố, mẹ không phát hiện ĐB p.D218H.

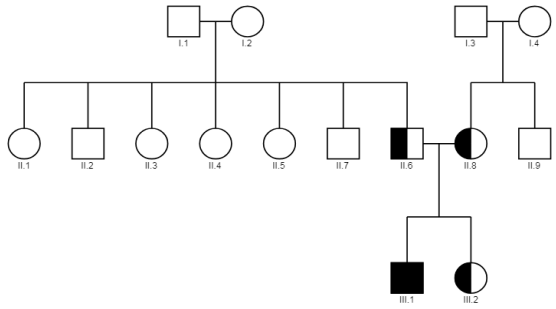
**** Phả hệ gia đình bệnh nhân G85***



Bệnh nhân mang 1 đột biến gen p.E229K dị hợp tử. Em trai bệnh nhân cũng mang 1 đột biến gen p.E229K dị hợp tử và biểu hiện bệnh giống bệnh nhân. Mẹ bệnh nhân cũng mang đột biến p.E229K thể dị hợp tử. Bố và em gái bệnh nhân không phát hiện đột biến và không mắc bệnh.

Nghiên cứu đã phát hiện 2/86 trường hợp có đột biến xóa đoạn toàn bộ exon 1-exon 3. Cả hai trường hợp này đều tuân theo quy luật di truyền của Melden.

**** Phả hệ gia đình bệnh nhân G02:***



Kết quả MLPA cho thấy: BN mang đột biến xóa đoạn hoàn toàn cả exon 1-3 ở trạng thái đồng hợp tử. Bố, mẹ và em gái BN là người lành mang đột biến ở trạng thái dị hợp tử.

**** Phả hệ gia đình bệnh nhân G56***

2.1. Research subjects

All patients who were diagnosed with primary congenital glaucoma at VNIO and tested to identify mutation of CYP1B1 gene at the Center of Genetic-Protein Research in Hanoi Medical University from September 2014 to September of the year 2018.

Members of patients' fmilies who have mutations.

A healthy group of people with a family history of no genetic disease were used as a control sample during the identification of CYP1B1 mutation when performing molecular biology techniques and running new mutations.

Selection criteria: the patient was diagnosed with primary congenital glaucoma when the patient has 4 or more symptoms: (1) elevated IOP; (2) enlargement of the globe, particularly the anterior segment; (3) edema and opacification of the cornea, with rupture of Descemet's membrane; (4) thinning of the anterior sclera and atrophy of the iris; (5) anomalously deep anterior chamber; (6) structurally normal posterior segment, except for progressive optic atrophy; and (7) photophobia, blepharospasm, and excessive tearing (hyperlacrimation).

Exclusion criteria: patients with accompanying systemic or ocular diseases, other genetic diseases. The patient or family representative did not voluntarily participate in the study.

2.2. Time and place of study

Time: from September 2014 to September 2018.

Location: VNIO is the place to diagnose, treat and manage patients with primary congenital glaucoma. Center for Genetic Research - Protein Hanoi Medical University is the place to conduct molecular genetic techniques.

2.3. Research Methods

Methods of cross-sectional descriptive research.

Sample size and sample selection: convenient sample size. 86 patients. 29 family members. 50 healthy people to take control samples.

Research facilities: eye examination, use to determine genes and chemicals

Steps to conduct research

1.3. Carrier CYP1B1 mutation in healthy people

From the 2009 report in Spain, the gene mutation of the recessive gene CYP1B1 was mentioned, in heterozygous state. In the last 5 years, there have been more and more studies on discovering healthy people carrying disease genes in patients' family members.

The development of genealogy to examine genetic mutation properties helps in prenatal diagnosis, giving patients' families genetic counseling and early diagnosis to improve the general population quality and quality. Treatment of diseases in particular.

In 2007, mutation p.E173K was first detected in an Egyptian patient family. That same year, Chitsazian also described this mutation in the family of Iranian patients with primary congenital glaucoma at a rate of 1.9% of the 29 detected CYP1B1 gene mutations.

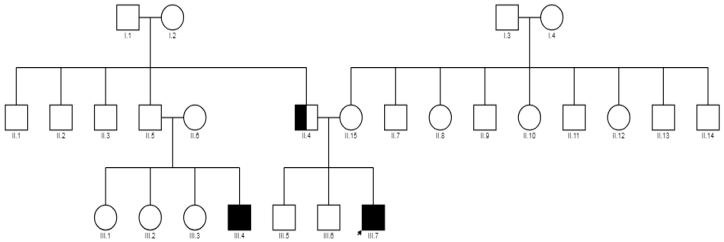
This mutation was also studied by Ling Chen (2015) found in a family of 19 members in China with 3 patients with primary congenital glaucoma. The mutation p.E173K is located on exon 2 of the CYP1B1 gene, the chromosomal recessive genome is usually a mutation that causes genetic disease over three generations.

Research in Japan also showed a recessive inheritance in patients with primary congenital glaucoma. The patient's father had an Asp192Val mutation in heterozygous state, the mother with the Val364Met mutation in heterozygous state did not show any disease. When inherited for children, there are 2 mutations in heterozygous state manifested.

The study in Vietnam by Do Tan (2016) found that 5 patient families had a genetic mutation of CYP1B1 from parents to children. In which 2 patients with genetic mutations in the state of homozygous and 3 patients with mutations in heterozygous state.

In 2017, María's study in Spain showed that only four families with a CYP1B1 mutation had only one family with mutations from parents to children.

CHAPTER 2: SUBJECTS AND METHODOLOGY



Kết quả MLPA cho thấy bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn hoàn toàn exon 1-3 ở trạng thái đồng hợp tử. Bố bệnh nhân là người lành mang đột biến xóa đoạn hoàn toàn exon 1-3 ở trạng thái dị hợp tử.

3.3.2. Phả hệ không di truyền đột biến

Trong số 15 phả hệ nghiên cứu, 9 gia đình không phát hiện đột biến di truyền, tuy nhiên thấy có di truyền một số đa hình đơn và tiền sử đặc biệt.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm của bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

4.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi phát hiện bệnh: Thời gian phát hiện bệnh trung bình là 2,58±3,59 tháng tuổi. Kết quả tương đương với các tác giả khác ở Việt Nam và trên thế giới. Nghiên cứu của Đỗ Tấn (2016) trên 30 bệnh nhân thấy tuổi phát hiện bệnh từ ngay khi sinh đến 10 tuổi, tuy nhiên trung vị cũng là 2 tháng tuổi. Nghiên cứu ở 90 bệnh nhân Moroccan thời gian phát hiện bệnh trung bình là 26 ngày tuổi, sớm nhất là ngay khi sinh ra và muộn nhất là 6 tháng tuổi.

4.1.2. Phân bố bệnh nhân theo giới: So sánh với các nghiên cứu trên thế giới nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự, bệnh nhân nam mắc bệnh nhiều hơn nữ tuy chênh lệch không nhiều.

4.1.3. Tiền sử bệnh nhân và gia đình: Trong số 86BN chỉ có gia đình G85 có 2 anh em trai cùng bị bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Gia đình G11 có bố và bà nội cùng bị glôcôm. Không có gia đình nào có tình trạng kết hôn cận huyết. Tỷ lệ trẻ là con thứ nhất bị bệnh chiếm tới 53,5% nên các gia đình rất cần sự tư vấn di truyền để tiên lượng tỷ lệ mắc bệnh và phòng bệnh ở những con tiếp theo.

4.1.4. Tình trạng mắt bị bệnh của bệnh nhân: tỷ lệ 2 mắt bị bệnh nhiều hơn 1 mắt một cách có ý nghĩa thống kê với p=0,000, kết quả cũng phù hợp với đặc điểm của bệnh và nghiên cứu của các tác giả

khác trên thế giới. Nghiên cứu của Latifa Hilal ở 90 bệnh nhân thấy 82 bệnh nhân biểu hiện bệnh ở hai mắt chiếm 91,11%.

4.1.5. Giai đoạn bệnh của mắt bệnh nhân: Đa số các mắt bị bệnh ở giai đoạn trung bình (63,7%) và giai đoạn nặng (33,6%), giai đoạn nhẹ hiếm gặp (2,7%). Tỷ lệ giai đoạn bệnh trong nghiên cứu khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,000). So sánh kết quả với nghiên cứu của Đỗ Tấn cũng cho thấy mức độ trung bình 34,6%, mức độ nặng gặp nhiều hơn chiếm tới 65,4%, không có bệnh nhân ở giai đoạn nhẹ.

4.1.6. Triệu chứng cơ năng: Kết quả tương tự như nghiên cứu của Ezequiel Campos-Mollo (2009) tại Tây Ban Nha trên 39 bệnh nhân, tỷ lệ chói và sợ ánh sáng là 72%, chảy nước mắt là 64%. Dấu hiệu nhìn mờ khó phát hiện nhất, gia đình chỉ phát hiện được khi trẻ không có phản xạ đưa mắt nhìn theo vật hoặc đã ảnh hưởng rõ đến thị lực của trẻ.

4.1.7. Dấu hiệu thực thể: Khám xét quan trọng trong bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát là đánh giá tình trạng giác mạc. Phù giác mạc gây nên bởi tình trạng phù biểu mô giác mạc đơn thuần do tăng nhãn áp, nếu điều trị sớm giác mạc sẽ phục hồi hoàn toàn, giác mạc trong trở lại và không ảnh hưởng đến thị lực, nếu bệnh tiến triển kéo dài có thể gây phù nhu mô giác mạc vĩnh viễn không hồi phục. Mức độ phù đục giác mạc được đánh giá theo 3 mức độ là trong, đục lờ và đục trắng. Trong nghiên cứu mức độ giác mạc đục nhẹ (38,4%) cao hơn 2 nhóm còn lại tuy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Trong nghiên cứu của chúng tôi đường kính ngang giác mạc trung bình của 146 mắt đo được trong nghiên cứu là 13,06±0,85mm, lớn nhất là 16,0mm, nhỏ nhất là 11,5mm. Nghiên cứu của Tharwat H. Mokbel (2018) trên 305 mắt của 207 bệnh nhân Ai Cập cũng cho kết quả tương tự, đường kính ngang giác mạc 12,80±1.10mm, lớn nhất là 16mm, nhỏ nhất là 11mm. Rạn màng Descemet của giác mạc hay gọi là vết Haabs dấu hiệu này thường không gặp ở giác mạc có đường kính ngang dưới 12,5mm hoặc bệnh xuất hiện sau 3 tuổi. Trong nghiên cứu này 15 mắt có vết Habb's chiếm 10,3% thấp hơn nghiên cứu của Latifa Hilal (2010) 38/180 mắt có vết Habb's, tỷ lệ này là 21,11% và tương đương nghiên cứu tại Ấn Độ (2013) là 9%. Ngoài ra còn một số yếu tố khác như tiền phòng, đĩa thị, nhãn áp, siêu âm.

4.2. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 và mối liên quan với lâm sàng bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

PCR (Polymerase Chain Reaction): based on the activity of the catalytic DNA polymerase, with material being four types of nucleotides. This reaction requires the presence of primers and reverse sequential primers with two ends of the DNA sequence.

DNA sequencing: is a method of determining the placement of nuceotids in DNA molecules. Today gene sequencing techniques are widely used to detect mutations in the eye and body diseases such as congenital adrenal hyperplasia, Wilson's disease, Leber neuritis, retinal cancer, Retinal pigment degenerative disease. Currently, it is common to use two sequencing methods that are dideoxynucleotid and automated sequencing.

MLPA method (multiplex ligation-dependent probe amplification)

The relationship between mutated NP congenital glaucoma

Relationship with gender: studies have shown that the mutation rate between the sexes is not different.

Relationship with time of occurrence of disease: earlier occurrence of disease in patients with CYP1B1 mutation compared with group without gene mutation.

The incidence of both eyes was higher in patients with CYP1B1 mutations than those without mutations, but this difference was not statistically significant.

The relationship between severity of disease and CYP1B1 gene mutations: In the study of Xueli Chen (2014), corneal opacity levels in the group were significantly more significant than those without the mutation (p = 0.034). In the study of Orna Geyer (2011), the degree of severe corneal and buccal ocular hypertension accounted for 58% (10/17 patients) in the group with higher mutations than the non-mutant group 11% (2/17 patients) (p = 0.004). The Wool Suh study (2012) found that in the group with CYP1B1 mutation, the incidence of severe disease was higher (52.4%) compared to the group without the mutation (43.9%), however the differences were This is not statistically significant.

- Mild: intraocular pressure (IOP) <25mmHg, cornea diameter <13mm, clear cornea.

- Moderate: IOP 25-35mmHg, cornea diameter 13-14mm, cornea clouding.

- Severe: IOP >35mmHg, cornea diameter >14mm, cornea opacity.

Treatment of primary congenital glaucoma

Medical therapy is just a preparation for surgery or an adjunct to surgery when it is not effective.

Surgery was applied in order to break abnormal membrane which allows aqueous humor flow to trabecular meshwork, Schlemm canal then flow outside.

1.3. Genotype and phenotype correlation

CYP1B1 mutation

Rate of CYP1B1 mutation: most common in the Middle East (64.8%) and Mediterranean (54.4%), Europe (34.7%), Asia (21.3%), the lowest rate in the US (14.9%).

Genotypes of CYP1B1: According to Li and colleagues, as of 2010, around 655 worldwide studies of CYP1B1 gene mutations in glaucoma have been conducted in the world, including 52 genetic mutations. CYP1B1 in primary congenital glaucoma in different countries.

- Missense 66.76% most common.
- Deletion (14.12%).
- Deletion / insertion (0.09%).
- Duplication (4.28%).
- Duplication / deletion (0.09%).
- Insertion (2.82%).
- Nonsense (3.55%).
- 89 cases non mutation (8.11%).

The authors also conclude that missense is the most common mutation. In Asia, this type of mutation accounts for about 20% of all patients with primary congenital glaucoma and about 60% of the total mutations of CYP1B1.

CYP1B1 mutation: According to Li et al., During the 14-year period up to 2010, 542 patients were studied and found 147 different mutations.

Techniques for detecting gene mutations CYP1B1

4.2.1. Tình trạng đột biến gen CYP1B1: Tỷ lệ đột biến gen CYP1B1: là 22,1%. Kết quả phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy đột biến gen này ở châu Á là khoảng 20%.Vị trí đột biến trên gen tương tự nghiên cứu của Đỗ Tấn trên 30 bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát Việt Nam phát hiện 5 đột biến điểm đều nằm trên exon 2. Từ đó có thể nhận định rằng đột biến điểm trên gen CYP1B1 ở BN Việt Nam xảy ra chủ yếu trên exon 2. Bên cạnh đó, nghiên cứu phát hiện 2/86 trường hợp có đột biến xóa đoạn bằng kỹ thuật MLPA. Với Kit mồi cho exon 1-exon 3, thấy cả hai bệnh nhân có xóa đoạn toàn bộ gen này. Tỷ lệ đột biến xóa đoạn chỉ phát hiện được tỷ lệ đột biến là 2,3%, do đó kỹ thuật giải trình tự vẫn là kỹ thuật ưu tiên để xác định các đột biến gen CYP1B1 trên bệnh nhân.Tuy nhiên nếu không khuếch đại được exon trên gen CYP1B1 thì bệnh nhân nên được phân tích bằng MLPA.

4.2.2. Mối liên quan giữa lâm sàng và đột biến gen CYP1B1

Mối liên quan với thời gian xuất hiện bệnh trong nhóm bệnh nhân có mang đột biến gen sớm hơn nhóm không mang đột biến tương tự nghiên cứu của các tác giả khác. Nghiên cứu của Reddy A. B. ở Ấn Độ (2004) tiến hành trên 64 bệnh nhân đã phát hiện 24 bệnh nhân (37,5%) mang đột biến gen CYP1B1. Tất cả các bệnh nhân này đều xuất hiện bệnh rất sớm trong tháng đầu sau sinh. Nghiên cứu của Geyer O. (2010) tiến hành trên 34 bệnh nhân của 26 gia đình Israel đã phát hiện 17 bệnh nhân (50%) trong 12 gia đình (46%) mang đột biến gen CYP1B1. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng ở nhóm bệnh nhân có đột biến, tuổi xuất hiện bệnh trung bình là 1,3 tháng sớm hơn nhóm không đột biến (4 tháng) một cách có ý nghĩa thống kê (p=0,0009).

Mối liên quan với giới tính Chen (2014) tiến hành nghiên cứu 192 bệnh nhân tại Trung Quốc cho thấy tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 của bệnh nhân nam (18,9%) cao hơn bệnh nhân nữ (13%). Geyer (2010) tại Israel cũng cho kết quả tương tự, sự khác biệt về giới đều không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Mối liên quan với tiền sử bệnh nhân và gia đình: Tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 trong nhóm bệnh nhân có mẹ bị bệnh khi mang thai là 60,0% cao hơn tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 trong nhóm bệnh nhân có mẹ không bị bệnh khi mang thai là 18,8%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p=0,062 do số liệu không đủ lớn, các nghiên cứu khác cũng chưa có kết luận về vấn đề này.

Mối liên quan với số mắt bị bệnh: Để đánh giá mối liên quan giữa số mắt bị bệnh với tình trạng đột biến gen CYP1B1, nghiên cứu phân tích kết quả theo 2 chiều đều thấy sự liên quan chặt chẽ. Kết quả cũng tương tự như các nghiên cứu của các tác giả khác. Nghiên cứu của Wool Suh (2012) cho thấy tỷ lệ xuất hiện bệnh ở 2 mắt trong nhóm 22 bệnh nhân mang đột biến CYP1B1 là 81,8%, cao hơn so với nhóm 63 bệnh nhân không mang đột biến là 61,9% tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,087).

Mối liên quan với đặc điểm lâm sàng và điều trị: So sánh với các tác giả khác trên thế giới như trong nghiên cứu của Xueli Chen (2013), mức độ đục giác mạc ở nhóm mang đột biến gen nặng hơn có ý nghĩa so với nhóm không có đột biến gen (p=0,034), tuy nhiên không có sự khác biệt về nhãn áp trung bình và đường kính giác mạc của 2 nhóm (p=0,064 và p=0,986). Nghiên cứu của Orna Geyer (2011), mức độ đục giác mạc nặng và lồi mắt trâu chiếm 58% (10/17 bệnh nhân) ở nhóm mang đột biến cao hơn nhóm không đột biến 11% (2/17 bệnh nhân) (p=0,004). Nghiên cứu của Wool Suh (2011) thấy ở nhóm có đột biến gen CYP1B1 tỷ lệ mức độ bệnh nặng cao hơn (52,4%) so với nhóm không có đột biến gen (43,9%), tuy nhiên khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Nghiên cứu tại Liban (2016) cũng chỉ ra rằng không có sự khác biệt về nhãn áp trung bình trước mổ (35,2mmHg và 35,6mmHg), nhãn áp trung bình sau mổ (15,6mmHg và 14,8mmHg), mức độ lõm đĩa (0,57±0,19 và 0,62±0,3) giữa hai nhóm có và không có đột biến gen (p>0,05). Bên cạnh đó mức độ nặng (đục giác mạc nặng và lồi mắt trâu) tại thời điểm phát hiện bệnh của nhóm mang đột biến là 67% cao hơn gấp 2 lần nhóm không mang đột biến, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,32).

4.3. Đột biến gen *CYP1B1* trong các thành viên gia đình bệnh nhân

Người mang gen bệnh là người mang gen ở trạng thái dị hợp tử và có khả năng truyền gen bệnh cho thế hệ sau. Phát hiện người mang gen bệnh là cơ sở của tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh. Glôcôm bẩm sinh nguyên phát là bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường và hiện tượng di truyền bệnh đã được ghi nhận ở nhiều gia đình Trung Đông do tình hình hôn nhân cận huyết. Tỷ lệ đột biến di truyền gặp ở 4/15 gia đình chiếm 26,7% tương đồng với các nghiên cứu khác trên thế giới như nghiên cứu của María T. García-Antón tại Tây Ban Nha năm 2017 tỷ lệ này là 25%, tuy nhiên thấp hơn nghiên

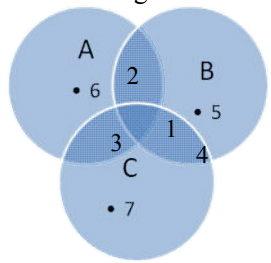
543 aminoacid, locate at position 2p22.2 of short arm of chromosome 2 and it has 3 exons, gene coding starts from the second exon, length of this gene is 1629 pairs of base.

Diagnose of primary congenital glaucoma

Diagnose confirmed if patient has at least 4 symptoms of the followings:

- *Intraocular pressure ≥ 25mmHg (Maklakov) or ≥ 22mmHg (Icare*)
- Photophobia, epiphora
- Cornea diameter ≥ 12mm
- Cornea edema, clouding
- Deep anterior chamber, abnormal angle
- Glaucomatous optic disc defect

Differential diagnose follow Ourgaud map



Three main factors of congenital glaucoma are three circles
A : ocular hypertension
B : cornea enlargement
C : cornea clouding

There are 7 possibilities:

- Zone 1 has 3 main factors (A + B + C) is typical primary congenital glaucoma.
- Zone 2 has ocular hypertension and cornea enlargement (A + B) is primary congenital glaucoma without cornea clouding which require differentiating with megalocornea.
- Zone 3 has ocular hypertension and cornea clouding (A + C): glaucoma in older children and adults, require differentiating with other causes of cornea clouding and secondary glaucoma
- Zone 4: cornea enlargement and clouding.
- Zone 5: cornea enlargement.
- Zone 6: ocular hypertension, congenital glaucoma in the second eye of older children.
- Zone 7: cornea clouding, birth trauma, sclerocornea.

Stage diagnose : Al-Hazmi

- This study has also confirm the tight relation between some clinical signs with CYP1B1 mutation as well as gene mutation hereditary rate and detect gene mutation in healthy family member, therefore consult proper genetic advises for patients and their family.

3. Arrangement of study:

This study has 121 pages including Introduction (2 pages); 4 chapters: Chapter 1: Overview (33 pages), chapter 2: Subjects and study methoad (12 pages), Chapter 3: Result (39 pages), Chapter 4: Discussion (31 pages), Conclusion (2 pages)

Other parts: reference, appendix, table, graph, picture.

Chapter 1
OVERVIEW

1.1. Background

In 1970, definition of primary congenital glaucoma was made by Shaffer and Weiss which was "the most common glaucoma in children, autosomal recessive mutation with abnormal anterior chamber angle which iris and ciliary body have an anterior insertion at trabecular meshwork without other abnomalities". Ocular hypertension is the cause of cornea enlargement, cornea clouding and epiphora caused by breaks in Descemet's membrane. Primary congenital glaucoma is rare, typically present in both eyes (65% - 80%). 25% presents at birth, 60% of the patient is diagnosed before 6 months of age and 80% in the first year of life.

Based on researches of embryology and anatomy of anterior chamber angle, ocular hypertension in patient with congenital glaucoma is caused by Barkan membrane existence at trabecular meshwork. Nowadays, genetics theory of congenital glaucoma has been proven by many studies.

It is said that CYP1B1 mutation results in enzym production disorder, intracellular chemical reaction change which in turn cause trabecular meshwork structure abnormality leading to ocular hypertension dues to aqueous humor blockage. CYP1B1 gene has

cứu của Đỗ Tấn 100% phát hiện di truyền.

***Đột biến p.E229K*:** là đột biến sai nghĩa, dị hợp tử. Đột biến này được phát hiện di truyền ở gia đình bệnh nhân mã số G40 và G85. Đột biến này được Michels-Rautenstrauss mô tả lần đầu tiên năm 2001 ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại Đức và được phát hiện liên kết với biến thể p.A443G, tuy nhiên trạng thái gây bệnh của A443G chưa được công bố. Tác giả đã xác định đột biến p.E229K dị hợp là đột biến gây bệnh. Theo Mukesh Tanwar (2009) đột biến p.E229K được xem là 1 trong 6 đột biến phổ biến nhất (p.G61E, p.P193L, p.Ter223, p.E229K, p. R368H và p.R390C). Đột biến này cũng được tác giả Ni Li thống kê là một trong số những đột biến phổ biến ở cộng đồng người da trắng. p.E229K đã được xác định ở trạng thái dị hợp tử ở hai bệnh nhân Pháp bị bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát, ở 5 bệnh nhân Ấn Độ. Tác giả Choudhary D. đã phân tích đột biến p.E229K, vị trí acid amin 229 nằm trong một vùng quan trọng, góp phần vào cấu trúc ba chiều của protein . Đột biến này xảy ra ở đầu tận COOH của F-xoắn trong vùng lân cận của vùng kết dính đế. Thay thế acid glutamic bằng acid amin lysin dẫn đến một sự thay đổi từ một dư lượng tích điện âm cho một chuỗi bên tích điện dương và điều này lần lượt ảnh hưởng đến phân phối cục bộ. Đột biến này làm rối loạn một cụm cầu mối quan trọng. Trong kiểu hoang dã (WT), R-194/E-229, R-194/D-333 và D-333/K-512 tạo thành một tam giác tương tác ion, giữ I-xoắn với F-xoắn và sợi S3.2. Do đột biến này, tương tác R-194/E-229 bị mất và có khả năng làm mất ổn định các tương tác ion khác trong protein. Một báo cáo thứ hai cũng xác định p.E229K như alen hypomorphic (allen giảm hình) và đề xuất rằng đột biến này có thể hoạt động như alen nguy cơ, có thể dẫn đến sự phát triển của tăng nhãn áp với sự hiện diện của gen sửa đổi hoặc ảnh hưởng môi trường. Đột biến này cũng đã được tìm thấy làm giảm sự ổn định protein, p.E229K tác động đến khả năng chuyển hóa chất nền.

Đột biến p.D218H: theo kết quả phân tích *in silico* dự đoán khả năng gây bệnh của các đột biến gen CYP1B1, đột biến D218H là đột biến mới có khả năng gây bệnh với số điểm là 1,000. Đột biến p.D218H là đột biến thay thế Aspartate thành Histidine tại vị trí acid amin 218. Đây là vị trí khởi đầu của cấu trúc Alpha-helix (xoắn alpha) của protein CYP1B1. Gia đình bệnh nhân mã số G40 có 2 người con. Bố mẹ bệnh nhân bình thường, không phát hiện bệnh. Em gái bệnh nhân cũng có 50% khả năng mang gen, cần làm xét nghiệm di truyền. Bệnh

nhân cần tư vấn di truyền trước hôn nhân.

Ở gia đình bệnh nhân mang mã số G85 có 3 anh em. Phân tích gen ***CYP1B1*** thấy 2 anh em trai trong gia đình có mang đột biến p.E229K ở trạng thái dị hợp tử đều biểu hiện bệnh glôcôm nguyên phát nặng. Em gái bệnh nhân không mang gen đột biến và biểu hiện lâm sàng bình thường. Mẹ bệnh nhân là người lành mang gen bệnh p.E229K ở trạng thái dị hợp tử lặn di truyền cho con, không biểu hiện bệnh. Bố bệnh nhân không phát hiện đột biến. Bố, mẹ bệnh nhân không phát hiện đột biến nào khác trên gen này. Phả hệ này không tuân theo quy luật di truyền Melden nhưng như các nghiên cứu khác đã chứng minh đột biến p.E229K có khả năng gây bệnh khi ở trạng thái dị hợp hoặc có một đột biến gen khác phối hợp mà chưa được tìm hiểu trong nghiên cứu này. BN và em trai cần được tư vấn di truyền trước hôn nhân.

Đột biến xóa đoạn gen CYP1B1: hai BN mang ĐB xóa đoạn hoàn toàn cả exon 1-3 ở trạng thái đồng hợp tử, đây là ĐB mới phát hiện. Hai BN đều biểu hiện bệnh rất nặng, phẫu thuật sớm nhưng kết quả thất bại dẫn đến mù lòa cả hai mắt, sẹo giác mạc đục trắng ảnh hưởng đến thẩm mỹ. Bố mẹ BN cần làm chẩn đoán trước sinh khi có ý định sinh thêm con. Em gái BN cần tư vấn di truyền khi kết hôn. Bệnh nhân cần được tư vấn di truyền trước hôn nhân.

Gia đình bệnh nhân G56 có 3 anh em. Bố bệnh nhân là người lành mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp di truyền cho con, không lấy được mẫu máu của mẹ bệnh nhân do mẹ bệnh nhân đi xuất khẩu lao động ở nước ngoài. Chúng tôi dự đoán di truyền cũng xảy ra theo quy luật giống như gia đình bệnh nhân G02 nên cũng cần tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh cho gia đình nếu muốn sinh thêm con.

4.3.2. Các phả hệ không di truyền đột biến

11 phả hệ không có đột biến di truyền gồm các gia đình bệnh nhân G08, G09, G11, G19, G20, G21, G24, G43, G44, G70 và G84.

INTRODUCTION

Primary congenital glaucoma is a condition in which ocular hypertention occurs dues to abnormal developement of anterior segment. The disease usually occurs in both eyes and it is one of the most common causes of blindness in young children. Molecule biological researches have mentioned the role of gene mutation including CYP1B1, LTBP2, MYOC in this disease, in which CYP1B1 mutant is the most common form with the incidence from 10 to 100%. CYP1B1 has been confirmed to be one of the causes of congenital glaucoma. In vitro and in vivo have showned that CYP1B1 protein plays the most crucial role in forming ocular structure and maintain its function. CYP1B1 mutant mainly locates sporadically alongs the gene; CYP1B1 mutant incidence varies in different races with about 20% in Asia [8],[9],[10]. Vietnam National Institute of Ophthalmology has about 20 more new primary congenital glaucoma cases every year. Gene application to detect gene mutation in normal people and prenatal diagnosis helps consulting proper genetic advices, therefore decrease the number of patients in public which then has positive effect to social and economics developement in long-term. The research **"Identification of CYP1B1 mutation as cause of primary congenital glaucoma and detect mutant gene in healthy people**" was proceeded in order to

Identify CYP1B1 mutation and its clinical relation with primary congenital glaucoma

Detect gene mutation in family member of patient with primary congenital glaucoma

2. New contribution of the study:

- This is the first large-scale study in Vietnam which combines clinical signs of patients with primary congenital glaucoma and mocular biology. This study is a crucial preparation to approach treatment method in future.
- This study has figured out the rate of CYP1B1 mutation in Vietnam with 10 new gene mutation (9 point mutations and 1 whole CYP1B1 deletion). The result was publicized and accepted by international journal.

LIST OF OF THE AUTHOR'S SCIENTIFIC ARTICLES RELATED TO THE THESIS

1. Tran Thu Ha, Tran Huy Thinh, Vu Thi Bich Thuy, Tran Van Khanh (2017). Mutation analysis inhotspots region of CYP1B1 gene in patients with primary congenital glaucoma. *Journal of Medical Research,* Volume 106, N^{0}1, 79-85
2. Tran Thu Ha, Vu Thi Bich Thuy, Tran Van Khanh et al (2017). Mutation analysis of CYP1B1 gene in a family with primary congenital glaucoma. *Viet Nam, Medical journal,* N^0 470, 94-99.
3. Tran Thu Ha, Tran Huy Thinh, Tran Van Khanh (2018). Mutation spectrum of the CYP1B1 gene in the primary congenital glaucoma patients. *Journal of Medical Research,* Volume 110 N0 1, 32-38.

KẾT LUẬN

1. Tình trạng đột biến gen *CYP1B1* và mối liên với liên quan với lâm sàng trên bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát

19/86 bệnh nhân có đột biến gen CYP1B1 trong đó 17 trường hợp xác định đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự gen và 2 trường hợp xác định đột biến xóa đoạn bằng kỹ thuật MLPA. 10 đột biến mới được xác định gồm 9 đột biến điểm là p.Q86K, p.Q159X, p.Q164X, p.D218H, p.L191Sfs*4, p.A133T, p.L27Q, p.D242N, p.G365E và 1 đột biến xóa đoạn toàn bộ exon 1-3.

Có mối liên quan giữa lâm sàng và tình trạng đột biến gen: Bệnh nhân mang đột biến khởi phát sớm trung bình là 1,21 tháng tuổi, thường biểu hiện bệnh ở cả hai mắt (94,4%). Bệnh nhân mang đột biến gen có giai đoạn bệnh nặng hơn (46,8%) và tỷ lệ phẫu thuật lại nhiều lần hơn so với nhóm không có đột biến gen. Kh□ n□ng □□t bi□n gen CYP1B1 □ nhúm b□nh nhõn mang □□ng th□i ba □□c □i□m b□nh bi□u hi□n s□m ngay sau sinh, □ hai m□t và giai □o□n b□nh n□ng cao g□p 6,47 l□n so v□i kh□ n□ng □□t bi□n □ nhúm b□nh nhõn cũn l□i.

2. Phát hiện người lành mang đột biến gen CYP1B1 trên người nhà bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát

5/26 bố mẹ của 15 bệnh nhân có đột biến gen CYP1B1 mang gen bệnh di truyền cho con cái trong đó 3 người bố, 2 người mẹ. 1 trong 3 người anh em của bệnh nhân mang gen bệnh nhưng không có biểu hiện lâm sàng và 1 người vừa mang gen đột biến vừa biểu hiện bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát.

Đột biến di truyền xảy ra ở 4 phả hệ gia đình trong đó 2 gia đình di truyền đột biến điểm, 2 gia đình di truyền đột biến xóa đoạn. 11 gia đình bệnh nhân có đột biến gen CYP1B1 không phát hiện tình trạng gen bệnh di truyền. Trong phả hệ các gia đình bệnh nhân thấy có hiện tượng di truyền cả đột biến gen và đa hình gen.

HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Cần phát hiện đột biến trên một số gen khác liên quan đến bệnh Glôcôm bẩm sinh nguyên phát ở nhóm bệnh nhân để tìm nguyên nhân gây bệnh.

Phát hiện người lành mang gen bệnh trong các gia đình bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát để có kế hoạch quản lý, theo dõi và tư vấn di truyền.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY

TRAN THU HA

IDENTIFICATION OF CYP1B1 MUTATION AS CAUSE OF PRIMARY CONGENITAL GLAUCOMA AND DETECT MUTANT GENE IN HEALTHY PEOPLE

Field of study : Ophthalmology

Code : 62720157

SUMMARY OF MEDICAL DOCTORAL THESIS

HANOI – 2019

THE THESIS WAS COMPLETED AT:

HANOI MEDICAL UNIVERSITY

Scientific advisors:

1. Assoc.Prof. Dr. Tran Van Khanh
2. Assoc. Prof. Dr. Vu Thi Bich Thuy

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The thesis defense shall be held by the university-level Thesis Assessment Board at Hanoi Medical University.

Time:

The thesis can be found at:

- Library of Hanoi Medical University
- National Library