

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2019

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: Nhân khoa

Mã số : 62720157

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Trần Văn Khánh
2. PGS.TS. Vũ Thị Bích Thủy

**HÀ NỘI – 2019**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trần Thu Hà nghiên cứu sinh khoá 33, chuyên ngành nhãn khoa, Trường Đại học Y Hà Nội xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Trần Văn Khánh và PGS.TS. Vũ Thị Bích Thủy.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam đoan này.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2019*

**Người viết cam đoan**

**Trần Thu Hà**

# CÁC CHỮ VIẾT TẮT

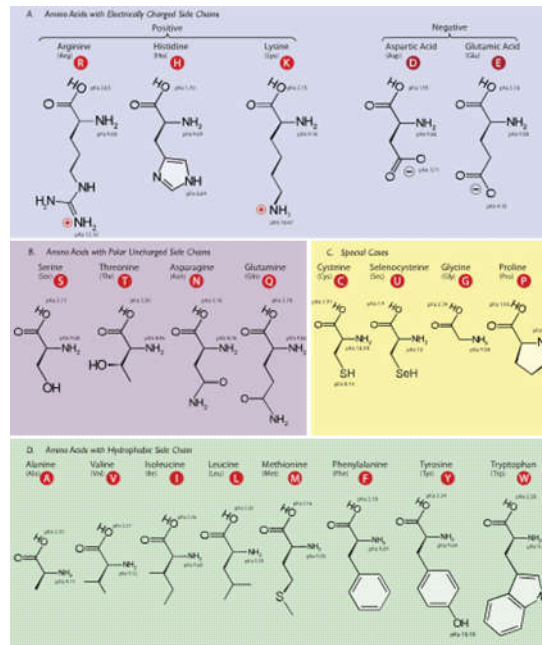
## Tiếng Việt

- BN : Bệnh nhân
- MP : Mắt phải
- MT : Mắt trái
- NR : Đa hình gen mới
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- SNP : Đa hình gen
- UD : Đột biến mới chưa xác định

## Tiếng Anh

- Bp : Base pair
- DNA : Deoxyribonucleic acid
- EDTA : Ethylene Diamin Tetraacetic Acid
- MLPA : Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
- NTP : Nucleoside Triphosphate
- OCT : Optical Coherence Tomography
- OD : Optical Density

## Bảng viết tắt các amino acid



## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ.....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....</b>	<b>3</b>
1.1. Đại cương bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát .....	3
1.1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát.....	3
1.1.2. Dịch tễ học bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát.....	3
1.1.3. Cơ chế bệnh sinh của bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát.....	4
1.1.4. Chẩn đoán bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát .....	10
1.1.5. Điều trị bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát.....	15
1.2. Đột biến gen CYP1B1 và mối liên quan với lâm sàng.....	16
1.2.1. Đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát .	16
1.2.2. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen CYP1B1 .....	22
1.2.3. Mối liên quan giữa bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát với đột biến gen.....	28
1.3. Đột biến CYP1B1 phát hiện ở người lành mang gen bệnh.....	31
<b>CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>36</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	36
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn.....	36
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	36
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	37
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	37
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu. ....	37
2.3.2. Cỡ mẫu và chọn mẫu nghiên cứu.....	37
2.3.3. Phương tiện nghiên cứu .....	37
2.3.4. Các bước tiến hành nghiên cứu.....	40
2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu .....	47

<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>48</b>
3.1. Đặc điểm bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát .....	48
3.1.1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi phát hiện bệnh .....	48
3.1.2. Phân bố bệnh nhân theo giới.....	48
3.1.3. Tiền sử bệnh nhân và gia đình .....	49
3.1.4. Tình trạng mắt bị bệnh của bệnh nhân .....	49
3.1.5. Phân bố giai đoạn bệnh.....	49
3.1.6. Triệu chứng cơ năng.....	50
3.1.7. Dấu hiệu thực thể.....	50
3.2. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 và mối liên quan với lâm sàng...	52
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA.....	52
3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 bằng kỹ thuật giải trình tự...	52
3.2.3. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 bằng kỹ thuật MLPA....	58
3.2.4. Tỷ lệ đột biến chung của gen CYP1B1 .....	59
3.2.5. Mối liên quan giữa lâm sàng và đột biến gen CYP1B1 .....	62
3.3. Kết quả phát hiện người lành mang gen.....	72
3.3.1. Phả hệ có di truyền đột biến.....	76
3.3.2. Phả hệ không di truyền đột biến.....	82
<b>CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>88</b>
4.1. Một số đặc điểm của bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát .....	88
4.1.1. Sự phân bố bệnh nhân theo tuổi phát hiện bệnh .....	88
4.1.2. Sự phân bố bệnh nhân theo giới.....	88
4.1.3. Tiền sử bệnh nhân và gia đình .....	89
4.1.4. Tình trạng mắt bị bệnh của bệnh nhân .....	89
4.1.5. Giai đoạn bệnh của mắt bệnh nhân .....	89
4.1.6. Triệu chứng cơ năng.....	90
4.1.7. Dấu hiệu thực thể.....	90

4.2. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 và mối liên quan với lâm sàng bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát.....	92
4.2.1. Tình trạng đột biến gen CYP1B1.....	92
4.2.2. Mối liên quan giữa lâm sàng và đột biến gen CYP1B1.....	97
4.3. Đột biến gen CYP1B1 trong các thành viên gia đình bệnh nhân.....	105
4.3.1. Các phả hệ có di truyền đột biến.....	106
4.3.2. Các phả hệ không di truyền đột biến.....	111
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>119</b>
<b>ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....</b>	<b>121</b>
<b>HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO .....</b>	<b>122</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TÀI LIỆU THAM KHẢO PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các loại đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại các nước khác nhau tính đến năm 2010.....	17
Bảng 1.2.	Các loại đột biến gen CYP1B1 hay gặp theo vùng lãnh thổ .....	19
Bảng 1.3.	Phân loại mức độ nặng của bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát ...	30
Bảng 1.4.	Lâm sàng và điều trị của bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát trong phả hệ .....	33
Bảng 2.1.	Tên, kích thước và vị trí của các sản phẩm PCR trong Kit MLPA P128-CYP450 (MRC- Holland).....	39
Bảng 2.2.	Trình tự môi dùng cho phản ứng PCR .....	43
Bảng 3.1.	Tuổi phát hiện bệnh .....	48
Bảng 3.2.	Phân bố mắt theo giai đoạn bệnh .....	50
Bảng 3.3.	Tỷ lệ các triệu chứng cơ năng .....	50
Bảng 3.4.	Tình trạng giác mạc của nhóm nghiên cứu.....	51
Bảng 3.5.	Kết quả dự đoán gây bệnh của đột biến điểm mới gen CYP1B1 ....	56
Bảng 3.6.	Các đa hình SNP của gen CYP1B1 trên bệnh nhân nghiên cứu	57
Bảng 3.7.	Đặc điểm bệnh nhân mang đột biến trên gen CYP1B1 .....	60
Bảng 3.8.	Tỷ lệ các dạng đột biến gen CYP1B1 .....	62
Bảng 3.9.	Mối liên quan giữa thời gian phát hiện bệnh và đột biến gen ...	63
Bảng 3.10.	Mối liên quan giữa giới tính và tình trạng đột biến gen.....	63
Bảng 3.11.	Mối liên quan giữa tiền sử mắc bệnh của mẹ khi mang thai với tình trạng đột biến gen CYP1B1 .....	64
Bảng 3.12.	Mối liên quan giữa tình trạng đột biến gen với số mắt bị bệnh.	64
Bảng 3.13.	Mối liên quan giữa giai đoạn bệnh với tình trạng đột biến gen.	65
Bảng 3.14.	Mối liên quan giữa nhãn áp với đột biến gen CYP1B1 .....	66
Bảng 3.15.	Mối liên quan giữa đường kính giác mạc với đột biến gen.....	66



Bảng 3.16.	Mối liên quan giữa chiều dài trục nhãn cầu với đột biến gen ...	67
Bảng 3.17.	Mối liên quan giữa mức độ lõm đĩa với đột biến gen CYP1B1	67
Bảng 3.18.	Mối liên quan giữa số lần phẫu thuật với tình trạng đột biến....	68
Bảng 3.19.	Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh với tình trạng đột biến.	70
Bảng 3.20.	Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh và số mắt bị bệnh với tình trạng đột biến.....	71
Bảng 3.21.	Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh, số mắt bị bệnh và giai đoạn bệnh với tình trạng đột biến.....	72
Bảng 3.22.	Tỷ lệ phát hiện đột biến gen CYP1B1 di truyền qua các thế hệ	73
Bảng 3.23.	Đột biến gen CYP1B1 của các thành viên gia đình bệnh nhân.	75
Bảng 3.24.	Kết quả phát hiện đa hình gen một số gia đình bệnh nhân.....	76
Bảng 4.1.	Kết quả phát hiện tỷ lệ đột biến ở bệnh nhân châu Á .....	94

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Phát triển một phân mống mắt trên bề mặt vùng bè .....	4
Hình 1.2.	Vị trí của gen MYOC trên nhánh dài nhiễm sắc thể 1 .....	5
Hình 1.3.	Vị trí của gen LTBP2 trên nhánh dài nhiễm sắc thể 14 .....	5
Hình 1.4.	Vị trí của gen CYP1B1 trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể 2.....	6
Hình 1.5.	Hình ảnh không gian 3 chiều vùng C' tận của protein CYP1B1 .	7
Hình 1.6.	Sơ đồ minh họa cơ chế ảnh hưởng của đột biến gen CYP1B1 ...	9
Hình 1.7.	Vết rạn giác mạc màng Descemet.....	11
Hình 1.8.	Hình ảnh soi góc tiền phòng .....	12
Hình 1.9.	Vị trí đột biến gen CYP1B1 thường gặp .....	20
Hình 1.10.	Loại và vị trí đột biến gen CYP1B1 thường gặp ở người châu Á .	20
Hình 1.11.	Loại và vị trí đột biến gen CYP1B1 thường gặp ở người da trắng	21
Hình 1.12.	Loại và vị trí đột biến gen CYP1B1 thường gặp ở người Di-gan ..	22
Hình 1.13.	Loại và vị trí đột biến gen CYP1B1 gặp ở người Trung Đông .	22
Hình 1.14.	PCR khuếch đại exon 2, gen CYP1B1 đột biến p.G61E .....	23
Hình 1.15.	Cấu trúc phân tử dNTP và ddNTP .....	24
Hình 1.16.	Quá trình tổng hợp DNA bình thường (A)và DNA bị ức chế (B) .	25
Hình 1.17.	Quy trình giải trình tự theo phương pháp ddNTP.....	26
Hình 1.18.	Các giai đoạn của Kỹ thuật MLPA (Schouten, 2002).....	27
Hình 1.19.	Tỷ lệ phẫu thuật thành công ở nhóm có và không có đột biến..	31
Hình 1.20.	Hình ảnh giải trình tự gen của đột biến p.E173K .....	32
Hình 1.21.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mang đột biến gen p.E173K .....	33
Hình 1.22.	Phả hệ gia đình Nhật Bản mang đột biến Asp192Val và Val364Met.....	34
Hình 1.23.	Phả hệ 5 gia đình bệnh nhân Việt Nam mang đột biến gen CYP1B1 .....	34
Hình 1.24.	Phả hệ các gia đình bệnh nhân tại Tây Ban Nha .....	35

Hình 2.1.	Kết quả MLPA sử dụng Kit MLPA P128-CYP450.....	39
Hình 3.1.	Sản phẩm PCR exon 2 (A), exon 3 (B) của gen CYP1B1 (+) mẫu đối chứng dương, (-) mẫu đối chứng âm, (1-5) mẫu bệnh nhân, (MK) Marker .....	52
Hình 3.2.	Hình ảnh cấu trúc gen CYP1B1 với đột biến p.E229K .....	54
Hình 3.3.	Hình ảnh đột biến gen của bệnh nhân mã G15 .....	54
Hình 3.4.	Hình ảnh đột biến gen của bệnh nhân mã G09 .....	55
Hình 3.5.	Hình ảnh đột biến gen của bệnh nhân mã G24.....	55
Hình 3.6.	Hình ảnh cấu trúc gen CYP1B1 với 04 đột biến mới .....	57
Hình 3.7.	Hình ảnh MLPA (hình trái) và kết quả tính toán (Relative Peak Area) bằng phần mềm coffalyser (hình phải) của bệnh nhân G40 và G02.....	58
Hình 3.8.	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.....	59
Hình 3.9.	Mối liên quan giữa phương pháp phẫu thuật với đột biến gen..	69
Hình 3.10.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G40 .....	77
Hình 3.11.	Hình ảnh đột biến gen của gia đình bệnh nhân mã số G40.....	78
Hình 3.12.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G85 .....	79
Hình 3.13.	Hình ảnh đột biến gen của gia đình bệnh nhân mã số G85.....	80
Hình 3.14.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G02 .....	80
Hình 3.15.	Hình ảnh MLPA của các thành viên gia đình bệnh nhân mã số G02. Các đỉnh tương ứng với vị trí exon 1, exon 3 của gen CYP1B1. ....	81
Hình 3.16.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G56 .....	82
Hình 3.17.	Phả hệ gia đình bệnh nhân G08.....	82
Hình 3.18.	Hình ảnh đột biến p.Q86K ở bệnh nhân G08 .....	83

Hình 3.19.	Hình ảnh đa hình gen ở gia đình bệnh nhân G08 .....	83
Hình 3.20.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G11 .....	84
Hình 3.21.	Đa hình gen p.L432V ở gia đình G11 .....	84
Hình 3.22.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G19 .....	85
Hình 3.23.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G20 .....	85
Hình 3.24.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G21 .....	86
Hình 3.25.	Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G24 .....	87

## 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 (65%-80%), phát hiện ở giai đoạn muộn, điều trị gặp tỷ lệ thất bại cao nếu không được điều trị kịp thời và theo dõi chặt chẽ. Đây là một trong những nguyên nhân gây mù lòa quan trọng ở trẻ nhỏ [1], [2], [3].

Glôcôm bẩm sinh nguyên phát là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường với tần suất mắc bệnh khoảng 1/10.000 [4], [5]. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra mối liên quan của bệnh với tình trạng đột biến gen CYP1B1, LTBP2, MYOC, trong đó đột biến gen CYP1B1 chiếm tỷ lệ cao nhất (10%-100%) [3], [4], đột biến gen MYOC và LTBP2 ít gặp hơn (0%-5,5%) [5], [6], [7], [8], [9]. Đột biến gen CYP1B1 chủ yếu là đột biến điểm nằm rải rác trên toàn bộ chiều dài gen, với tỷ lệ phát hiện đột biến khác nhau giữa các quốc gia trên thế giới (Nhật là 23,1%, Indonesia là 38,1%, Ấn Độ là 44% và Ả Rập tỷ lệ này rất cao 100% do tình trạng kết hôn cận huyết gây nên) [8], [9], [10]. Những nghiên cứu ở mức độ *in vitro* và *in vivo* đã chỉ ra rằng protein CYP1B1 đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành cấu trúc và duy trì chức năng của mắt [10]. Theo Khan và cộng sự (2012), 90% những người mang đột biến gen CYP1B1 sẽ biểu hiện bệnh ở cả hai mắt với các mức độ khác nhau [11].

Trong 5 năm gần đây, các nghiên cứu về bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát đã và đang tập trung đi sâu vào cơ chế bệnh sinh ở mức độ phân tử, làm cơ sở cho việc triển khai chẩn đoán trước sinh cũng như liệu pháp điều trị gen, đồng thời giúp việc quản lý tốt những người mang gen gây bệnh. Tại Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu phân tích đột biến gen cho các bệnh lý di truyền như: ung thư vồng mạc, tăng sản thượng thận bẩm sinh, Wilson, Thalassemia..., tuy nhiên các nghiên cứu bệnh glôcôm bẩm sinh

nguyên phát mới chỉ đề cập về tỉ lệ mắc bệnh, biểu hiện lâm sàng, kết quả điều trị và các biến chứng của bệnh. Hàng năm bệnh viện Mắt Trung ương tiếp nhận khoảng 20 ca bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát mắc mới. Áp dụng phát hiện người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh để đưa ra những tư vấn di truyền thích hợp sẽ làm giảm 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 CYP11B1 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 CYP11B1 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.*

## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN

#### 1.1. Đại cương bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

##### 1.1.1. Lịch sử nghiên cứu bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

Từ thời Hippocrates vào những năm 460-377 trước công nguyên, Celus thế kỷ thứ nhất và Galen năm 130-201 sau công nguyên đã ghi nhận bệnh mắt to (buphthalmos) bẩm sinh mặc dù thời điểm đó chưa ai biết có mối liên quan giữa mắt to và nhãn áp [12]. Cho đến thế kỷ 18, Berger (1744) đã đề cập đến vấn đề tăng nhãn áp và phân vào nhóm bệnh di truyền [1]. Năm 1896, Von Muralt xác định các trường hợp mắt to trong gia đình bệnh glôcôm [13]. 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 móng 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 [5].

##### 1.1.2. Dịch tễ học bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

Glôcôm bẩm sinh nguyên phát là bệnh hiếm gặp, có tần suất khoảng 1/20.000 đến 1/10.000 trẻ sinh sống ở các nước châu Âu và Mỹ. Trong khi đó tỷ lệ này rất cao ở cộng đồng có cha mẹ cùng huyết thống như 1/3.300 ở Ấn Độ, 1/2.500 ở Trung Đông và 1/2.250 ở Slovakia hay Rumani.

Bệnh chiếm 55% tổng số glôcôm nguyên phát trẻ em.

Ở Nhật Bản, trẻ nữ bị nhiều hơn nam trong khi ở Mỹ và châu Âu thì trẻ nam mắc nhiều hơn với tỷ lệ 3:2.

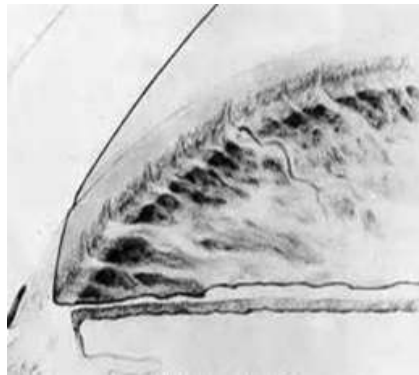
Bệnh xảy ra trên khắp thế giới không ưu thế rõ rệt về chủng tộc, địa lý.

Hầu hết các trường hợp glôcôm bẩm sinh nguyên phát xảy ra ở cả hai mắt (65% - 80%) với mức độ bệnh thường không tương đương nhau.

Khoảng 25% khởi bệnh lúc sinh, 60% trẻ được chẩn đoán dưới 6 tháng tuổi và 80% xuất hiện trong năm tuổi đầu tiên [1].

### ***1.1.3. Cơ chế bệnh sinh của bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát***

Qua nghiên cứu quá trình phát triển phôi thai học và giải phẫu học góc tiền phòng cho thấy cơ chế tăng nhãn áp trong glôcôm bẩm sinh khác hoàn toàn với cơ chế glôcôm góc đóng và glôcôm góc mở ở người trưởng thành. Các nghiên cứu sớm nhất của Von Hippel (1897), Gros (1897), Parson (1904), Siegrist (1905), Reis (1905–1911), Seefelder (1906 - 1920) đã phát hiện những bất thường bẩm sinh ở cấu trúc góc tiền phòng và ông Schlemm [14]. Barkan năm 1949 cho rằng có sự tồn tại một màng phôi thai ở lưới bè [15] và năm 1966 Worst đã khẳng định điều này, gọi đó là màng Barkan [16]. Tuy nhiên nghiên cứu của Anderson, Hansson, Maumenee đã không tìm thấy bằng chứng nào về màng Barkan bằng ánh sáng đèn hoặc sinh hiển vi điện tử nhưng lại phát hiện mặt trước của mống mắt bám cao vào vùng bè (Hình 1.1). Smelser và Ozanics lại cho rằng cơ chế bệnh là do sự thay đổi mạng lưới bè màng bồ đào, đồng thời có một chất vô định tạo thành lớp dày trong nội mô thành ống Schlemm [17], [18], [19], [20], [21].



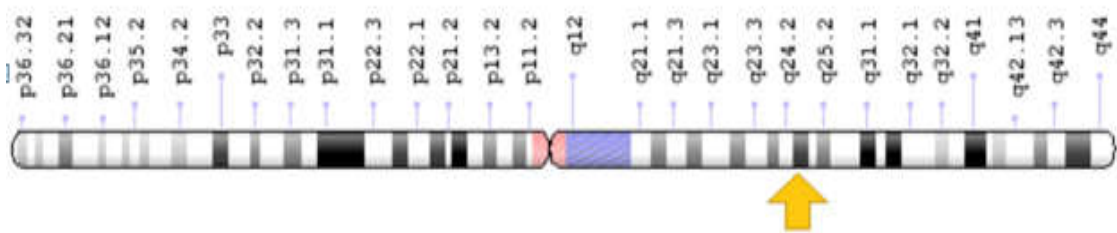
***Hình 1.1. Phát triển một phần mống mắt trên bề mặt vùng bè [22]***

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, LTBP2, MYOC bị đột biến sẽ làm rối loạn sản xuất



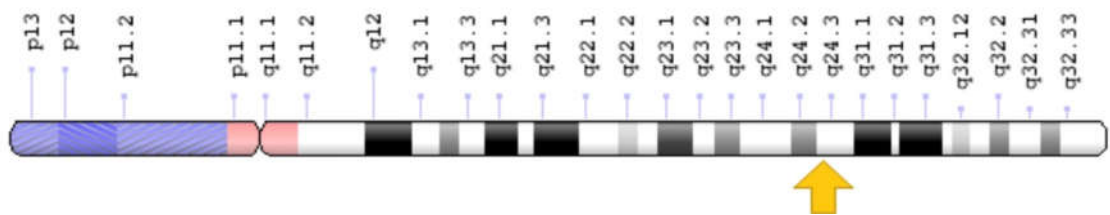
men, thay đổi phản ứng hóa sinh nội bào, tạo nên bất thường cấu trúc mạng lưới vùng bề, dẫn đến ứ trệ thủy dịch làm tăng nhãn áp [6], [23].

Gen MYOC nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể 1 tại vị trí 1q24.3, còn có tên gọi là GLC1A được cho là giúp duy trì cấu trúc góc tiền phòng, thể mi và mạng lưới bề củng giác mạc tuy nhiên các nghiên cứu đã đưa ra tỷ lệ đột biến của gen MYOC rất thấp trong bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Theo nghiên cứu của Kim tỷ lệ này là 2,4%, nghiên cứu của Kaur là 5,5% và nhiều nghiên cứu khác không tìm ra đột biến gen MYOC trong bệnh này [24], [25].



**Hình 1.2. Vị trí của gen MYOC trên nhánh dài nhiễm sắc thể 1 [26]**

Gen LTBP2 hay còn gọi là GLC3D nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể 14 tại vị trí 14q24.3. Gen LTBP2 không có đột biến gây bệnh mà chỉ ở dạng đa hình gen độc lập hoặc phối hợp với đột biến gen CYP1B1. Nghiên cứu ở Trung Quốc, Ả Rập và Thổ Nhĩ Kỳ đều cho tỷ lệ đột biến của gen LTBP2 là 0% [27], [28], [29].



**Hình 1.3. Vị trí của gen LTBP2 trên nhánh dài nhiễm sắc thể 14 [26]**

Trong số 3 gen nói trên, chỉ có đột biến gen CYP1B1 được chứng minh gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát với tỷ lệ đột biến là cao từ 10% đến 100% tùy theo vùng lãnh thổ [30], [31]. Vì vậy, chúng tôi đi sâu vào nghiên cứu đặc điểm và cơ chế gây bệnh của gen CYP1B1.

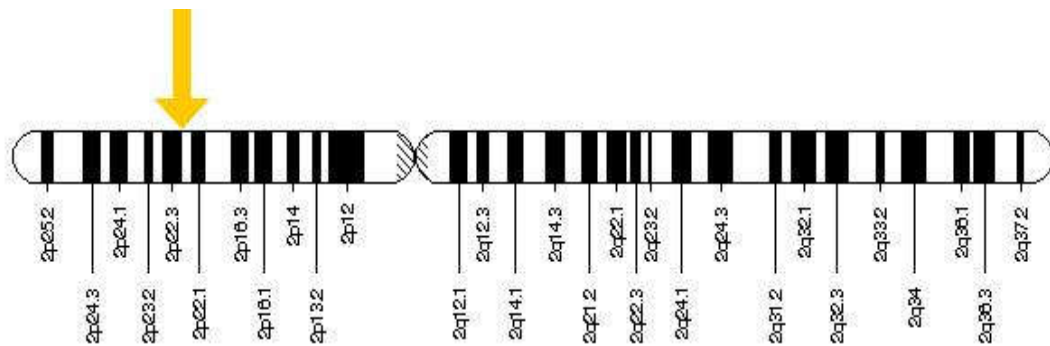
### 1.1.3.1. Cấu trúc và vị trí gen *CYP1B1*

Tên khoa học chính thức của gen *CYP1B1* là "cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1". Ngoài ra gen *CYP1B1* còn được gọi với các tên khác như: *aryl hydrocarbon hydroxylase*, *CP1B*, *CP1B1\_HUMAN*, *cytochrome P450-subfamily I (dioxin-inducible) -polypeptide 1*, *flavoprotein - linked monooxygenas*, *microsomal monooxygenase*, *xenobiotic monooxygenase*.

Năm 1994, Sutter và cộng sự đã xác định được gen *CYP1B1* gồm 543 acid amin và là một phân họ gen mới của cytochrome P450, P4501B1. Bằng cách phân tích tế bào sinh dưỡng của người và động vật gặm nhấm, tác giả đã lập bản đồ gen *CYP1B1* và xác định gen nằm trên nhiễm sắc thể 2 [32].

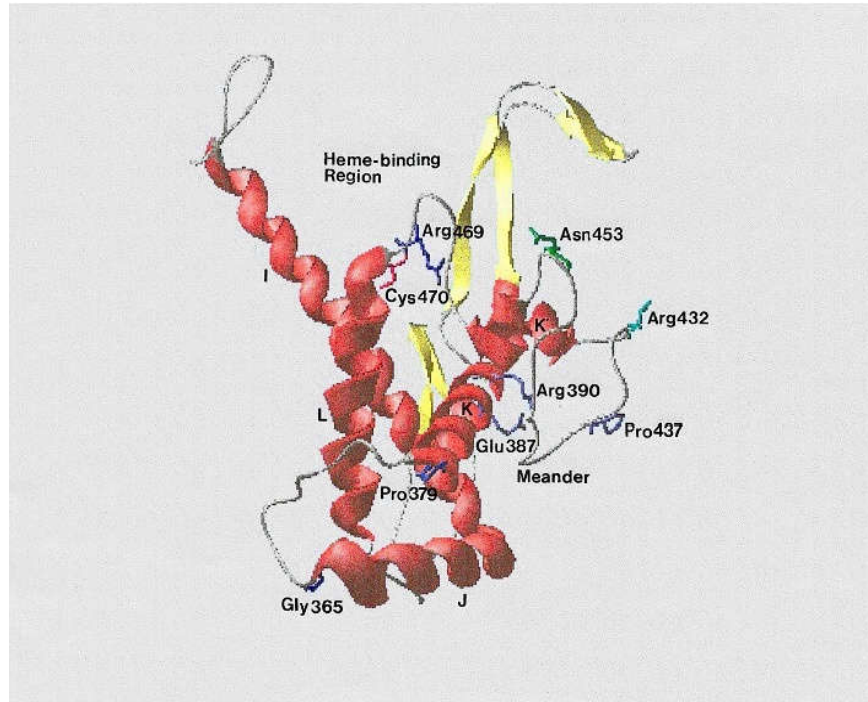
Năm 1996, Tang và cộng sự đã phát hiện ra gen *CYP1B1* nằm trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể 2 tại vị trí 2p22.2 và bao gồm 3 exon, phần mã hóa gen bắt đầu từ exon thứ 2, chiều dài gen là 1629 cặp base [33].

Từ việc xác định vị trí nối intron/exon của gen *CYP1B1*, Stoilov và cộng sự (1997) đã chỉ ra gen *CYP1B1* có 3 exon và 2 intron, dài 12kb, mã hóa phân tử mRNA gồm 1.631 base. Cụ thể hơn nữa, các gen *CYP1B1* nằm từ cặp base số 38.067.602 đến 38.076.180 [34] (Phụ lục 1). Trong một loạt nghiên cứu về nhiễm sắc thể 2, vùng chứa gen *CYP1B1* đã được xác định là GLC3A [35].



**Hình 1.4. Vị trí của gen *CYP1B1* trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể 2 [26]**

Năm 1998, Ivaylo Stoilov và cộng sự đã xây dựng mô hình ba chiều về vùng C' tận (C-terminal) của protein CYP1B1. Cấu trúc này gồm bốn vùng I, L, J và K cùng với vùng gắn heme mô tả 3 đột biến dẫn đến thiếu một sản phẩm giữa acid amin 189 và 254, acid amin từ vùng C là Glu387, Arg390 và Cys470.



**Hình 1.5. Hình ảnh không gian 3 chiều vùng C' tận của protein CYP1B1 [36]**

#### 1.1.3.2. Chức năng, cơ chế gây bệnh của gen CYP1B1

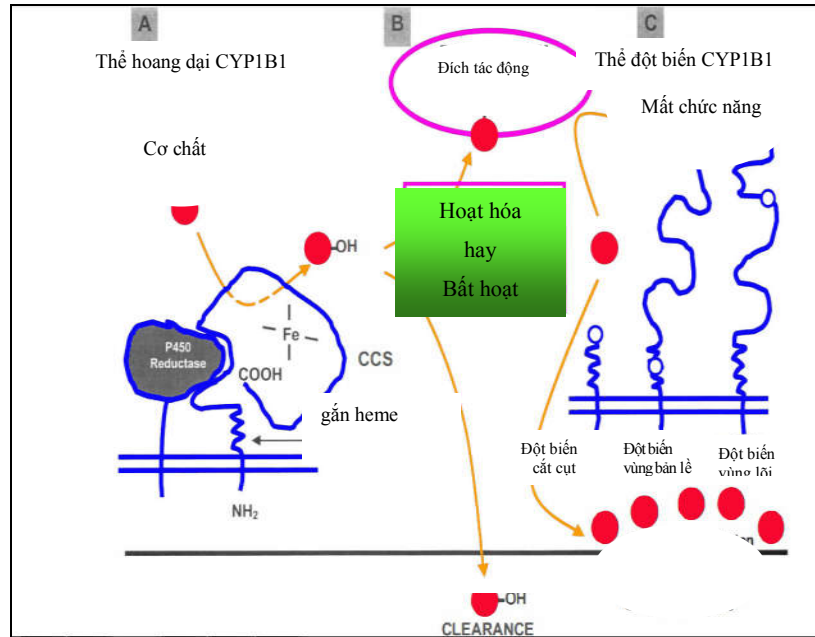
Gen CYP1B1 là một phân họ của cytochrome P450. Các cytochrome của dòng P450 được biết đến chủ yếu với khả năng chuyển hóa các chất lạ sinh học (xenobiotics) và có chức năng giống như bất kỳ phân tử men nào. Các cytochrome tham gia vào các phản ứng oxy hóa như: sinh tổng hợp, sản xuất hormon cần thiết hoặc đóng vai trò là các hợp chất trao đổi chất trung gian trong hầu hết các sinh vật sống. Đột biến ảnh hưởng đến men thường tạo ra các đột biến lặn. Đối với đột biến lặn dạng dị hợp tử, alen bình thường có khả năng bù đắp chức năng cho alen bị đột biến. Từ quan điểm này, một kiểu

hình lặn như glôcôm bẩm sinh nguyên phát được gây ra bởi đột biến trong một loại men như CYP1B1 là hợp lý.

Trong quá trình hình thành và phát triển nhãn cầu, chức năng của men CYP1B1 chưa rõ ràng, nhưng nó được giả thiết rằng đóng một vai trò trong việc hình thành các cấu trúc ở phía trước của mắt và cũng có thể tham gia vào một quá trình điều chỉnh sự bài tiết thủy dịch.

Schwartzman và cộng sự năm 1987 đã xác định có mối liên quan giữa arachidonate phụ thuộc cytochrome P450 với ức chế  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase trong giác mạc trong việc điều chỉnh tính trong suốt của giác mạc và tiết thủy dịch. Phát hiện này phù hợp với mờ đục của giác mạc và tăng nhãn áp, 2 tiêu chuẩn chẩn đoán chính cho bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát [37].

Stoilov (2000) đã đưa ra giả thuyết rằng CYP1B1 chuyển hóa một phân tử có nguồn gốc nội sinh (như steroid, axit béo hoặc hợp chất prostanoid) cần thiết cho phát triển bình thường và chức năng của mắt. Hoạt động của CYP1B1 có thể dưới hai dạng: tạo ra một hợp chất hoạt động trên một số mục tiêu hoặc ngừng tác dụng của các hợp chất sinh học khác và chiếm vị trí của nó. Tuy nhiên các phân tử này được chuyển hóa bởi quá trình kích hoạt có tổ chức của các men. Vì vậy, CYP1B1 có thể thuộc về một con đường tín hiệu sinh hóa nội sinh chưa được biết rõ, liên quan đến trưởng thành cuối cùng của góc tiền phòng. Đột biến gen CYP1B1 sẽ gây ra rối loạn sản xuất men, làm bất thường cấu trúc mạng lưới vùng bè, nơi có các ống tuyến giúp lưu thoát thủy dịch khỏi mắt. Sự ứ trệ thủy dịch này làm tăng nhãn áp gây bệnh glôcôm [23].



**Hình 1.6. Sơ đồ minh họa cơ chế ảnh hưởng của đột biến gen CYP1B1**

Có sự khác biệt về tác động của thể hoang dại và thể đột biến của phân tử CYP1B1. Phân tử CYP1B1 thể hoang dại được neo trên màng của lưới nội nguyên sinh. Chức năng bình thường của nó đòi hỏi sự tham gia của một số đối tác oxy hóa khử P450 reductase. P450 reductase có khả năng đưa một nguyên tử của phân tử oxy vào cơ chất của nó. Khi đó có 2 khả năng xảy ra: trường hợp cơ chất được hoạt hóa và tác động trên mục tiêu xuôi dòng chưa được biết. Tuy nhiên, oxy phân tử có thể làm tăng khả năng ưa nước của cơ chất và làm dễ dàng cho sự bài tiết và thanh lọc cơ chất từ trong tế bào. Bởi vậy, đột biến CYP1B1 có thể làm thay đổi 2 khả năng trên. Sự điều hòa không gian và thời gian của các gen kiểm soát phát triển của góc tiền phòng sẽ bị thay đổi bởi sự vắng mặt của phân tử điều hòa (ví dụ như steroid) được sản sinh bởi CYP1B1. Bên cạnh đó, những dấu hiệu dừng phát triển của góc tiền phòng được quan sát thấy trong góc tiền phòng của glôcôm bẩm sinh nguyên phát có thể phản ánh ảnh hưởng của một quá trình chuyển hóa có thể được giới hạn và loại bỏ bởi phân tử CYP1B1 (Hình 1.6).

#### **1.1.4. Chẩn đoán bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát**

##### **1.1.4.1. Đặc điểm lâm sàng bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát**

**Triệu chứng:** gồm tam chứng kinh điển

- Sợ ánh sáng, co quắp mi: thường là triệu chứng khởi đầu và quan trọng. Bệnh nhân thường nheo mắt hoặc quay mặt đi nơi khác khi có ánh sáng chiếu vào mắt, ở trẻ nhỏ thường hay gục đầu vào lòng mẹ. Sợ ánh sáng là do kích thích các tế bào biểu mô giác mạc khi áp lực nội nhãn tăng.

- Chảy nước mắt.

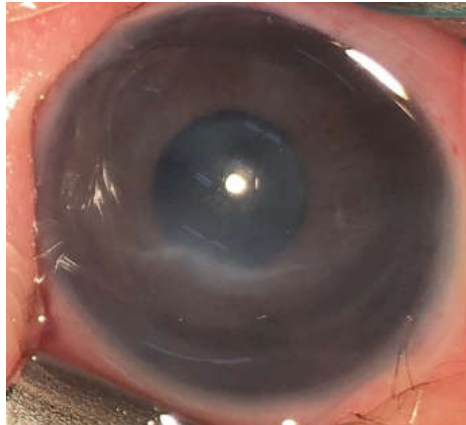
- Mờ mắt.

**Dấu hiệu lâm sàng:** để chẩn đoán xác định glôcôm bẩm sinh cần phải khám và đánh giá rất nhiều thông số, khi trẻ nhỏ không hợp tác cần khám dưới gây mê.

- Mi mắt: có xu hướng khép lại nhằm hạn chế ánh sáng vào mắt.

- Giác mạc: thường to đi cùng nhãn cầu to đặc biệt khi xuất hiện ở trẻ dưới 3 tuổi. Bình thường khi mới sinh giác mạc trong và có đường kính ngang là 10-10,5mm và tăng thêm 0,5-1mm sau một năm. Theo Kluys Ken, đường kính ngay khi sinh là 10mm, khi 1 tuổi là 11,5mm; theo Aminlary đường kính giác mạc lúc sinh là 9,4-11mm, lúc 1 tuổi là 10,5-11,7mm và 12mm khi 6 tuổi. Trong năm đầu nếu đường kính ngang lớn hơn 12mm là dấu hiệu rất nghi ngờ của glôcôm bẩm sinh nguyên phát.

Rạn màng Descemet (vết Haab's): là vết trắng ngang khi ở trung tâm hoặc song song với rìa khi ở chu biên giác mạc. Dấu hiệu này thường không gặp ở giác mạc có đường kính ngang dưới 12,5mm hoặc bệnh xuất hiện sau 3 tuổi.



**Hình 1.7. Vết rạn giác mạc màng Descemet (vết Haab's)**

Phù giác mạc: phù biểu mô giác mạc đơn thuần do tăng nhãn áp, nếu bệnh tiến triển kéo dài có thể gây phù nhu mô giác mạc vĩnh viễn.

- Cứng mạc: mỏng và dẫn làm quan sát thấy được hắc mạc bên dưới ở trẻ sơ sinh và tạo nên cứng mạc có màu đen hoặc hơi xanh. Dây Zinn có thể dẫn ra gây lệch thể thủy tinh. Ở giai đoạn muộn nhãn cầu bị dẫn to toàn bộ do hậu quả tăng nhãn áp lâu ngày gây ra hiện tượng lồi mắt trâu.

- Tiền phòng sâu.

- Mống mắt: chân mống mắt bám cao ở góc tiền phòng.

- Đồng tử giãn, mất phản xạ khi nhãn cầu mất chức năng.

- Đáy mắt: có thể thấy các dấu hiệu teo lõm đĩa tùy theo mức độ bệnh.

Lõm đĩa trong glôcôm bẩm sinh nguyên phát có thể hồi phục hoàn toàn nếu nhãn áp được điều chỉnh tốt, đây là đặc điểm khác với lõm đĩa người lớn.

- Góc tiền phòng: soi góc tiền phòng bằng kính soi góc phát hiện chân mống mắt bám cao và ra trước hơn. Bè màng bồ đào nhạt màu hơn làm khó phân biệt dải thể mi, vùng bè và cửa cứng mạc.



**Hình 1.8. Hình ảnh soi góc tiền phòng**

- Thị lực: nếu thử được thường giảm.

- Nhãn áp: trẻ sơ sinh có nhãn áp trung bình là  $11,4 \pm 2,4$  mmHg, trẻ dưới 1 tuổi có giới hạn trên nhãn áp bình thường là 21 mmHg. Ở trẻ lớn có thể đo nhãn áp theo phương pháp hay dùng, trẻ nhỏ cần đo nhãn áp khi ngủ hoặc dưới gây mê.

- Thị trường: thường không làm được ở trẻ nhỏ. Trẻ lớn thị trường bị tổn hại.

- Chiều dài trục nhãn cầu: thường tăng gây cận thị trục tiến triển.

***Dấu hiệu cận lâm sàng***

- Siêu âm A: siêu âm A dùng để chẩn đoán và theo dõi bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Ở trẻ sơ sinh bình thường trục dọc nhãn cầu khoảng 17mm nhỏ hơn trục ngang (18,3mm). Trong 2 năm đầu đời nhãn cầu phát triển rất nhanh, đến 2 tuổi trục nhãn cầu tương tự như trục nhãn cầu người lớn là 23mm-24mm. Theo Ramanjit và cộng sự trục nhãn cầu bình thường ở trẻ em từ 0 đến 12 tuổi mắt phải là  $22,0 \pm 1,45$  mm, mắt trái là  $21,8 \pm 1,26$  mm. Trong glôcôm bẩm sinh nguyên phát đặc biệt là ở trẻ dưới 2 tuổi, nhãn cầu dẫn lồi theo mọi hướng khi nhãn áp tăng do đó trục nhãn cầu thường lớn hơn kích thước bình thường cùng lứa tuổi. Nếu glôcôm xuất hiện sau 4 tuổi thì mắt ít khi to ra vì sự thay đổi cấu trúc củng mạc lệ thuộc theo tuổi. Kết quả



siêu âm A còn có giá trị chẩn đoán xác định trong trường hợp nhãn áp cao giới hạn và glôcôm ở một mắt [1].

- Cắt lớp võng mạc (OCT): một số trẻ lớn ta có thể làm OCT để xác định mức độ tổn hại thị thần kinh đồng thời đánh giá được chính xác mức độ teo lõm đĩa thị.

- Chụp ảnh đáy mắt, Retcam: đánh giá tình trạng đĩa thị trong bệnh glôcôm bẩm sinh và theo dõi tiến triển của bệnh theo thời gian.

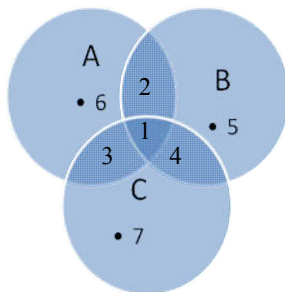
**Dấu hiệu toàn thân:** đối với glôcôm bẩm sinh nguyên phát thường không có các dị tật bẩm sinh tại mắt và toàn thân kèm theo.

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

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

**1.1.4.3. Chẩn đoán phân biệt**

Glôcôm bẩm sinh nguyên phát không phải lúc nào cũng xuất hiện đầy đủ các triệu chứng và dấu hiệu nêu trên. Sơ đồ Ourgaud hình tượng để giúp phân biệt glôcôm bẩm sinh nguyên phát với một số bệnh khác [38].



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 (A + B) 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 (A + C): 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.

#### *1.1.4.4. Chẩn đoán giai đoạn*

Ở người lớn dựa vào nhãn áp, mức độ lõm đĩa và sự thu hẹp thị trường để phân chia giai đoạn glôcôm, nhưng ở trẻ em không thể dựa vào các yếu tố này được vì hầu hết trẻ em không đo được thị trường.

Một số tác giả phân loại thành 4 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: đường kính giác mạc tăng hơn 1-2mm, phù nhẹ giác mạc, thị lực ít biến đổi, không có teo lõm đĩa.
- Giai đoạn 2: đường kính giác mạc tăng hơn 3mm, giác mạc phù đục, dẫn vùng rìa giác mạc, đồng tử dẫn, có teo lõm đĩa.
- Giai đoạn 3: đường kính giác mạc tăng hơn 4mm, giác mạc phù đục mạnh, củng mạc dẫn rộng, tiền phòng sâu, đồng tử dẫn, thị lực giảm nhiều.

- Giai đoạn 4: đục giác mạc rất nặng, dẫn lồi vùng rìa, lồi mắt trâu, tiền phòng sâu, mỏng mắt teo có tân mạch, thị lực giảm trầm trọng, teo lõm đĩa hoàn toàn [39].

Theo Corcelles phân loại theo đường kính giác mạc như sau [39]:

- Giai đoạn nhẹ: đường kính giác mạc  $\leq 12\text{mm}$ , giác mạc trong.
- Giai đoạn trung bình: đường kính giác mạc từ  $>12\text{mm}$  đến  $14\text{mm}$ , giác mạc trong.
- Giai đoạn nặng: đường kính giác mạc  $>14\text{mm}$ , giác mạc phù đục, dẫn lồi nhãn cầu không hồi phục.

Phân loại của Al-Hazmi về giai đoạn bệnh glôcôm bẩm sinh như sau:

- Giai đoạn nhẹ: nhãn áp  $< 25\text{mmHg}$ , đường kính giác mạc  $< 13\text{mm}$ , giác mạc còn trong.
- Giai đoạn trung bình: nhãn áp  $25\text{-}35\text{mmHg}$ , đường kính giác mạc  $13\text{-}14\text{mm}$ , giác mạc phù đục.
- Giai đoạn nặng: nhãn áp  $>35\text{mmHg}$ , đường kính giác mạc  $>14\text{mm}$ , giác mạc đục trắng [40].

### **1.1.5. Điều trị bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát**

#### *1.1.5.1. Điều trị nội khoa*

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.

Các thuốc dùng trong điều trị nội khoa gồm: thuốc co đồng tử, thuốc ức chế anhydrase carbonic, thuốc hủy beta - adrenergic, các thuốc nhóm prostaglandin, cường adrenergic, thuốc tăng thẩm thấu.

#### *1.1.5.2. Điều trị ngoại khoa*

Nguyên lý: cơ chế bệnh sinh của glôcôm bẩm sinh nguyên phát là do sự tồn lưu tổ chức bất thường ở góc tiền phòng nên hai phẫu thuật thực sự sinh lý

là từ trong ống Schlemm ra (mở bè) hoặc từ tiền phòng vào ống Schlemm (mở góc) 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.

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam thực tế có nhiều bệnh nhân đến viện ở giai đoạn muộn không thể áp dụng phương pháp mở góc và mở bè. Do vậy nhiều phương pháp khác đã được áp dụng như: cắt bè củng giác mạc, cắt rạch bè củng giác mạc, đặt van dẫn lưu tiền phòng, hủy thể mi, thậm chí phải bỏ nhãn cầu. Bên cạnh đó các thuốc chống chuyển hóa cũng được các nhà nhãn khoa phối hợp để điều trị glôcôm bẩm sinh phức tạp, nhãn áp không điều chỉnh sau nhiều lần phẫu thuật.

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

### **1.2.1. Đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát**

#### *1.2.1.1. Tỷ lệ đột biến gen CYP1B1*

Theo tổng kết của Chouiter năm 2017, trên thế giới từ năm 2011 đến năm 2016 có 19 nghiên cứu về đột biến gen *CYP1B1* được thực hiện với tổng số 1220 bệnh nhân cho thấy tỷ lệ phát hiện đột biến gen *CYP1B1* trung bình là 41,6%. Trong đó, 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, tiếp đến là châu Âu (34,7%), châu Á (21,3%), tỷ lệ thấp nhất ở Mỹ (14,9%) [41].

#### *1.2.1.2. 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 (Phụ lục 2). Các loại đột biến thường gặp là [42]:

- Đột biến sai nghĩa (missense) phát hiện được ở 733 các trường hợp (66,76%) là đột biến hay gặp nhất.

- Đột biến xóa đoạn (deletion) phát hiện được ở 155 trường hợp (14,12%).
- Đột biến mất hoặc thêm nucleotid (deletion/insertion) phát hiện được ở 1 trường hợp (0,09%).
- Đột biến lặp đoạn (duplication) phát hiện được ở 47 trường hợp (4,28%).
- Đột biến lặp hoặc mất nucleotid (duplication/deletion) phát hiện được ở 1 trường hợp (0,09%).
- Đột biến thêm nucleotid (insertion) phát hiện được ở 31 trường hợp (2,82%).
- Đột biến vô nghĩa (nonsense) phát hiện được ở 39 trường hợp (3,55%).
- 89 trường hợp (8,11%) không phát hiện được đột biến.

Theo một báo cáo khác vào năm 2011 đã đưa ra tỷ lệ các loại đột biến *CYP1B1* như sau [43]:

**Bảng 1.1. Các loại đột biến gen *CYP1B1* gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại các nước khác nhau tính đến năm 2010**

Quốc gia (n)	Loại đột biến					BN không đột biến gen <i>CYP1B1</i>
	Sai nghĩa (%)	Vô nghĩa (%)	Xóa đoạn (%)	Lặp đoạn (%)	Thêm nucleotid (%)	
Ả Rập (n=62)	55 (88,7)	-	2 (3,2)	-	-	5 (8,1)
Braxin (n=52)	5 (9,6)	3 (5,8)	16 (30,8)	4 (7,8)	-	24 (46,1)
Iran (n=104)	81 (77,9)	1 (0,96)	4 (3,84)	3 (2,9)	1 (0,96)	14 (13,5)
Úc (n=37)	8 (21,6)	1 (2,7)	1 (2,7)	1 (2,7)	-	26 (70)
Nhật (n=65)	10 (15,4)	1 (1,5)	1 (1,5)	-	3 (4,6)	50 (76,9)
Thổ Nhĩ Kỳ (n=35)	13 (37,1)			1 (2,9)	1 (2,9)	20 (57,1)
Ecuador (n=15)	2 (13,3)	-	1 (6,7)	-	-	12 (80)
Cô-oét (n=17)	11 (64,7)	1 (5,9)	-	-	-	5 (29,4)

Quốc gia (n)	Loại đột biến					BN không đột biến gen CYP1B1
	Sai nghĩa (%)	Vô nghĩa (%)	Xóa đoạn (%)	Lặp đoạn (%)	Thêm nucleotid (%)	
Indonesia (n=21)	5 (23,8)	1 (4,8)	2 (9,5)	-	-	13 (61,9)
Ma Rốc (n=32)	9 (28,1)	-	4 (12,5)	-	-	19 (59,4)
Pháp (n=31)	6 (19,4)	9 (29,0)	2 (6,5)	-	-	14 (45,2)
Mexico (n=12)	4 (33,3)	-	-	1 (8,3)	-	7 (58,3)
Mỹ&Braxin (n=21)	2 (9,5)	-	2 (9,5)	2 (9,5)	-	15 (71,4)
Trung Đông (n=10)	3 (30)	-	-	-	-	7 (70)

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 glôm bầm sinh nguyên phát và khoảng 60% trong tổng số đột biến gen *CYP1B1*.

Trong những năm gần đây, ngày càng có nhiều nước tại châu Á nghiên cứu về đột biến gen *CYP1B1* nhằm phát hiện các đột biến gen hay gặp ở khu vực và góp phần tìm ra cơ chế gây bệnh glôm bầm sinh nguyên phát.

Năm 2011, nghiên cứu tại Hàn Quốc đã phát hiện 11 loại đột biến, trong đó loại đột biến hay gặp là đột biến lệch khung dịch mã (p.T325SfsX104) và hai đột biến mới là p.G329S và p.V419Gfs11X [24].

Cùng năm này, nghiên cứu ở Ả Rập phát hiện 13 đột biến hay gặp là: 9 đột biến sai nghĩa (p.G61E, p.A119S, p.R390H, p.P437L, p.D441G, p.A443G, p.G466S, p.G466D và p.R469W), 2 đột biến xóa đoạn (g.4238\_4247del và g.7901\_7913del) và 2 đột biến tạo mã kết thúc sớm (p.R355X và p.R444X); trong đó đột biến p.G61E là hay gặp nhất [28].

Qua tổng kết của Chouiter (2017), hầu hết các loại đột biến thường gặp đều ở dạng đột biến sai nghĩa, tùy theo vùng lãnh thổ có một số loại đột biến hay gặp hơn các loại khác (Bảng 1.2).

**Bảng 1.2. Các loại đột biến gen *CYP1B1* hay gặp theo vùng lãnh thổ**

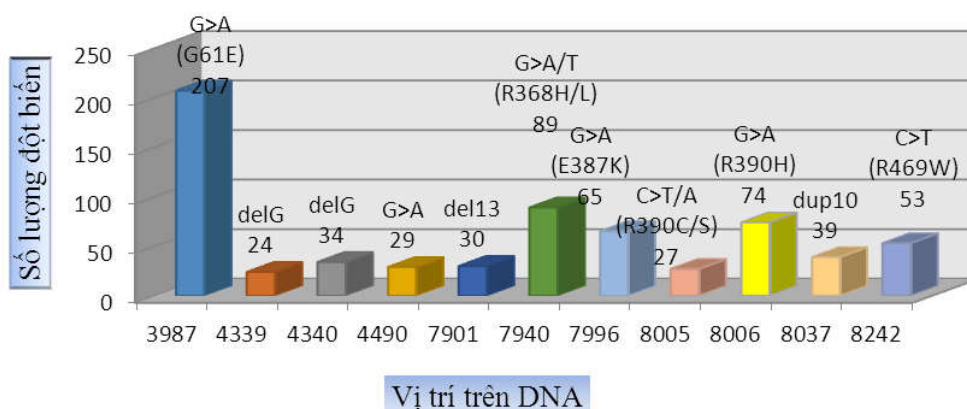
STT	Các nước/ vùng lãnh thổ	Vị trí trên DNA	Đột biến gen hay gặp
1.	Iran/Ả rập	c.182G>A	p.Gly61Glu
2.	Pakistan	8006G>A	p.Arg390His
3.	Li Băng	3987G>A	p.Gly61Glu
4.	Ma Rốc	g.4339delG	c.4339delG
5.	Châu Âu	7996G>A	p.E387Lys
6.	Việt Nam/ Hàn Quốc	958G>T	p.Val320Leu

#### 1.2.1.3. 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 trên gen *CYP1B1* [42] (Phụ lục 3).

Trong số 147 vị trí đột biến gen, 11 vị trí thường gặp đột biến là:

- 3987G>A (p.G61E) được tìm thấy trong 207 trường hợp (18,85%)
- 7940G>A/T (p.R368H/L) ở 89 trường hợp (8,11%)
- 8006G>A (p.R390H) ở 74 trường hợp (6,74%)
- 7996G>A (p.E387K) ở 65 trường hợp (5,92%)
- 8242C>T (p.R469W) ở 53 trường hợp (4,83%)
- 8037dup10 ở 39 trường hợp (3,55%)
- 4340delG ở 34 trường hợp (3,10%)
- 7901del13 ở 30 trường hợp (2,73%)
- 4490G>A ở 29 trường hợp (2,64%)
- 8005C>T/A (p.R390C/S) ở 27 trường hợp (2,46%)
- 4339delG ở 24 trường hợp (2,19%)

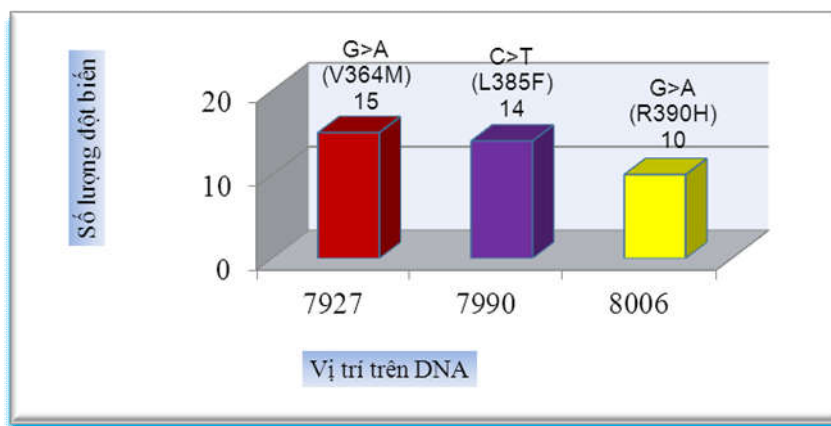


**Hình 1.9. Vị trí đột biến gen *CYP1B1* thường gặp**

Đến năm 2017, Chouiter và cộng sự đã tiếp tục tổng kết thấy có 20 loại đột biến được tìm thấy, trong đó 47,1% đột biến nằm trên exon 2 và 52,9% đột biến nằm trên exon 3 [41] (Phụ lục 3).

Bên cạnh đó, các loại đột biến gen xảy ra ở các chủng tộc trên thế giới là khác nhau [42]:

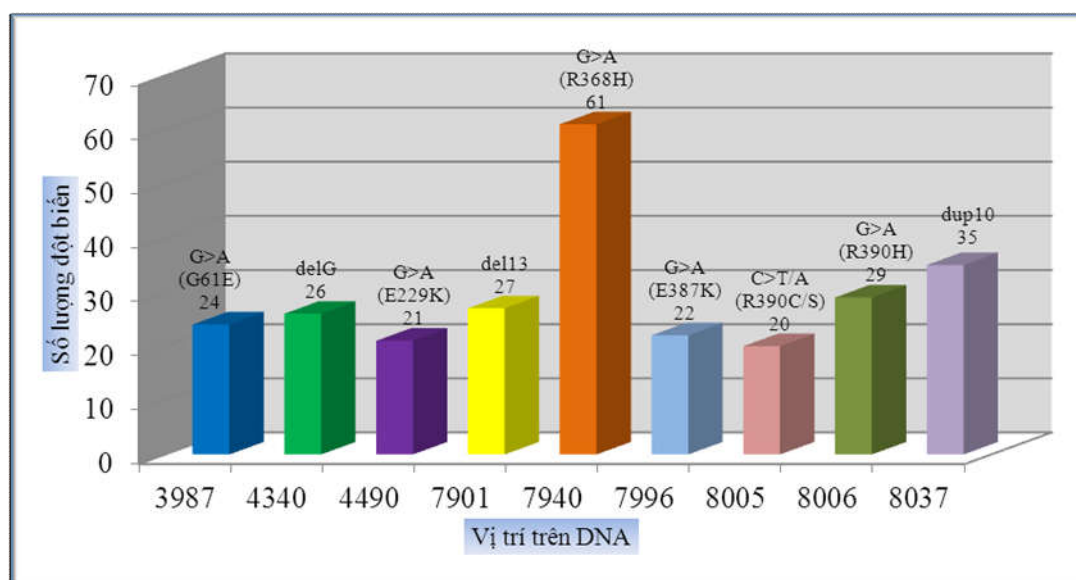
**Người châu Á:** phát hiện 64 bệnh nhân với 120 đột biến gen *CYP1B1*. Ba vị trí đột biến hay gặp nhất là p.V364M, p.L385F và p.R390H. Đột biến p.V364M được tìm thấy trong 15 trường hợp (15 trong số 120 đột biến, 12,50%), p.L385F đột biến trong 14 trường hợp (11,67%), p.R390H đột biến trong 10 trường hợp (8,33%).



**Hình 1.10. Loại và vị trí đột biến gen *CYP1B1* thường gặp ở người châu Á**

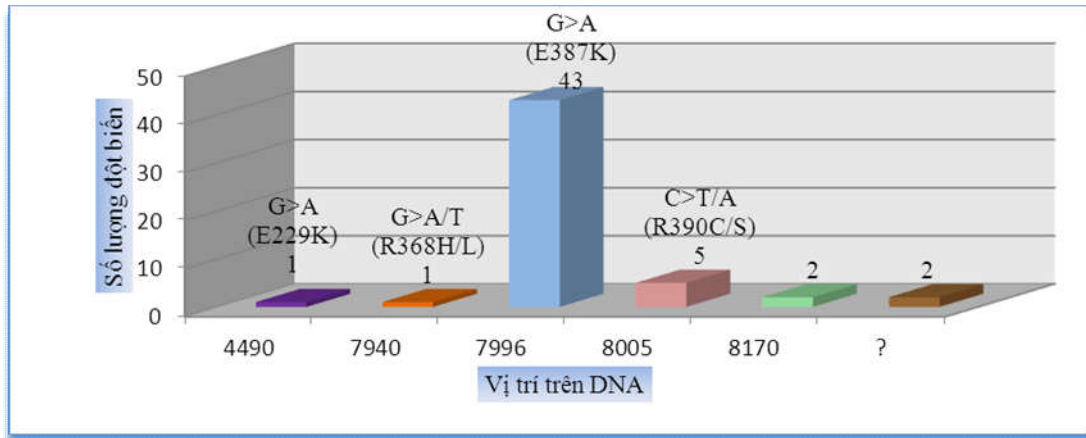


**Người da trắng:** phát hiện 252 bệnh nhân da trắng với 522 đột biến gen. 9 đột biến phổ biến nhất là: p.R368H, p.8037dup10, p.R390H, 7901del13, 4340delG, p.G61E, p.E387K, p.E229K và p.R390C/S. Tỷ lệ các loại đột biến phân bố như sau: p.R368H được tìm thấy trong 61 trường hợp (61 trong số 522, 11,69%), p.8037dup 10 trong 35 trường hợp (6,70%), p.R390H đột biến trong 29 trường hợp (5,56%), p.7901del 13 đột biến trong 27 trường hợp (5,17%), p.4340delG trong 26 trường hợp (4,98%), p.G61E trong 24 trường hợp (4,60%), p.E387K trong 22 trường hợp (4,21%), p.E229K trong 21 trường hợp (4,02%), p.R390C/S trong 20 trường hợp (3,83%).



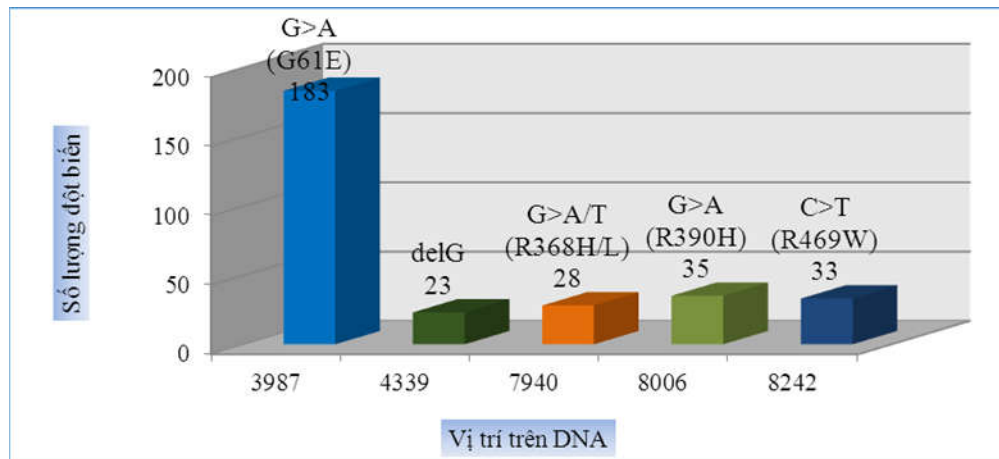
**Hình 1.11. Loại và vị trí đột biến gen CYP1B1 thường gặp ở người da trắng**

**Người Di-gan:** các nghiên cứu phát hiện được 27 bệnh nhân với 54 đột biến gen CYP1B1, trong đó đột biến hay gặp nhất là p.E387K, chiếm 79,63% (43 trường hợp).



**Hình 1.12. Loại và vị trí đột biến gen CYP1B1 thường gặp ở người Di-gan**

**Người Trung Đông:** phát hiện 402 đột biến ở 199 bệnh nhân. Trong đó phổ biến nhất là đột biến p.G61E chiếm 45,52% (183 trong số 402 đột biến). Các đột biến hay gặp khác là 8006G>A p.R390H (8,71%), p.R469W (8,21%) và 4339delG (5,72%).



**Hình 1.13. Loại và vị trí đột biến gen CYP1B1 gặp ở người Trung Đông**

## 1.2.2. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen CYP1B1

### 1.2.2.1. Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

#### Nguyên tắc chung

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 môi xuôi và môi ngược có trình tự bổ sung với hai đầu của trình tự DNA khuôn.

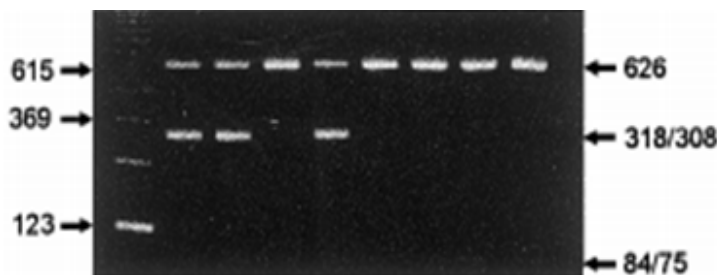
Phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba bước: biến tính, bắt cặp, kéo dài chuỗi.

**Các thành phần tham gia phản ứng PCR:** gồm có DNA khuôn, môi, các nucleotid tự do, enzym DNA polymerase và dung dịch đệm của phản ứng [44], [45], [46], [47].

**PCR đơn môi (monoplex PCR):** là PCR kinh điển nhất, trong mỗi phản ứng PCR, chỉ sử dụng duy nhất một cặp môi đặc hiệu để khuếch đại một đoạn gen đặc hiệu từ phân tử DNA của tế bào [48].

Các tác giả đã sử dụng từng cặp môi để khuếch đại từng exon của gen *CYP1B1* bằng phản ứng PCR, sau đó điện di trên gel agarose, mẫu bệnh nhân được tiến hành song song với mẫu đối chứng. Nếu mẫu đối chứng xuất hiện vạch DNA tương ứng với kích thước của exon được khuếch đại, trong khi mẫu bệnh nhân không xuất hiện vạch thì bệnh nhân bị đột biến mất đoạn exon đó.

Để khuếch đại gen *CYP1B1* trong bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát, các nghiên cứu trước đây đều sử dụng phương pháp PCR.



**Hình 1.14. PCR khuếch đại exon 2, gen *CYP1B1* đột biến p.G61E [36]**

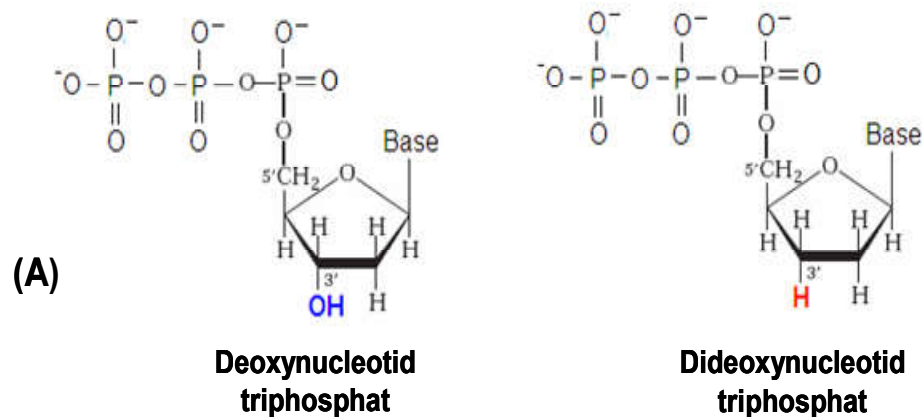
#### 1.2.2.2. Kỹ thuật giải trình tự gen (DNA sequencing)

Giải trình tự gen (DNA sequencing) là phương pháp xác định vị trí sắp xếp của các nucleotid 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.

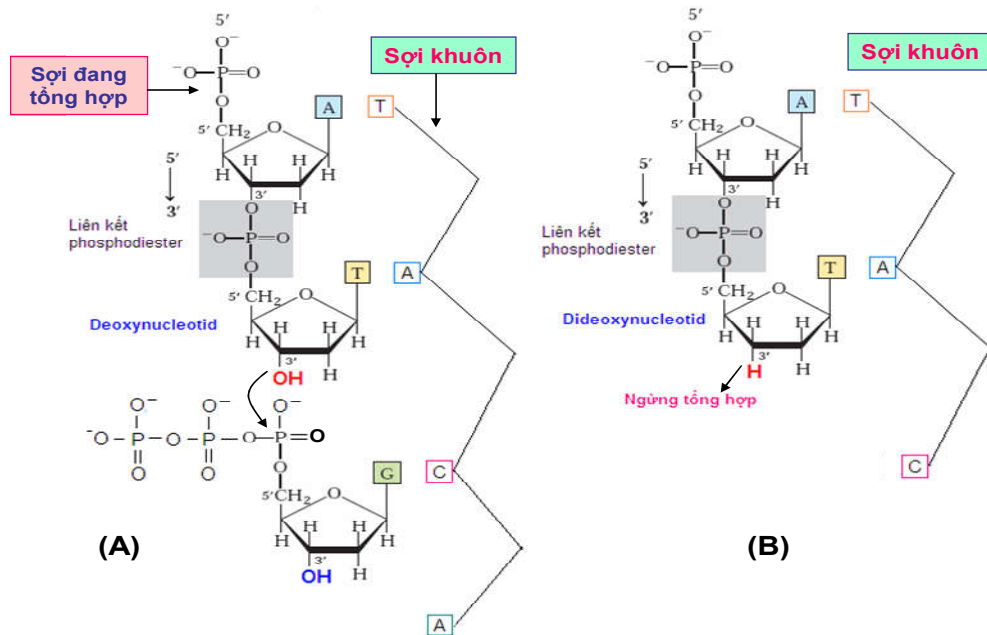
### Giải trình tự theo phương pháp dideoxynucleotid

Phương pháp này do Sanger và cộng sự phát hiện ra năm 1977. Nguyên lý của phương pháp này như sau: dideoxynucleotid (ddNTP) là một phân tử nhân tạo, cấu trúc của nó tương tự như phân tử deoxynucleotid (dNTP), tuy nhiên ở carbon số 3 của đường deoxyribose không phải là nhóm hydroxyl ( $-OH$ ) mà là  $-H$  (hình 1.16).



**Hình 1.15. Cấu trúc phân tử dNTP và ddNTP**

Trong quá trình tổng hợp mạch đơn bổ sung, một dNTP tự do gắn vào chuỗi đang tổng hợp bằng liên kết phosphodiester giữa 5'phosphat với nhóm 3'hydroxyl của nucleotid cuối cùng của chuỗi (hình 1.17.A). Tuy nhiên, nếu một ddNTP được gắn vào đầu 3' của chuỗi đang tổng hợp thì sự tổng hợp DNA sẽ dừng lại do không hình thành được liên kết phosphodiester với nucleotid tiếp theo (hình 1.17.B).



**Hình 1.16. Quá trình tổng hợp DNA bình thường (A) và DNA bị ức chế (B)**

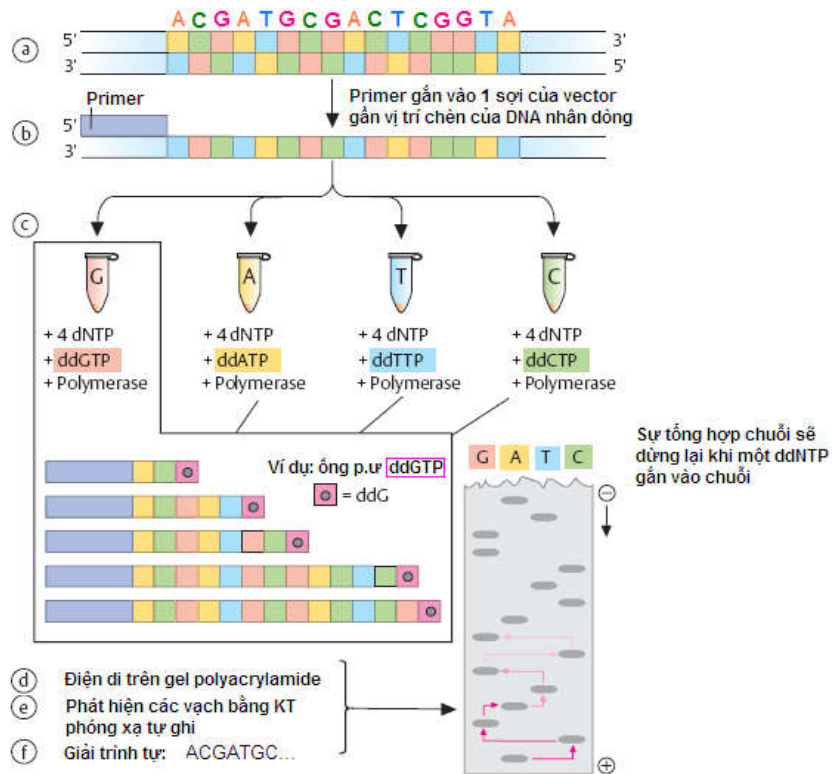
### Quy trình giải trình tự theo phương pháp dideoxynucleotid:

#### Giải trình tự bằng máy tự động

Giải trình tự gen là phương pháp xác định vị trí sắp xếp của các nucleotid trong phân tử DNA.

Máy giải trình tự gen tự động hoàn toàn được thiết kế trên nguyên tắc sử dụng ddNTP do Sanger và cộng sự phát minh. Máy giải trình tự gen dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP, hệ thống điện di thường là điện di mao quản. Mỗi khi có một vạch điện di đi qua, phân tử ddNTP cuối cùng ở đầu 3' của đoạn DNA sẽ phát ra một màu huỳnh quang tương ứng, máy sẽ ghi nhận màu sắc này và chuyển về máy tính phân tích. Dựa vào màu huỳnh quang mà máy nhận biết được từng loại nucleotid và trình tự của DNA đích [49].

Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự gen trên GeneBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI).



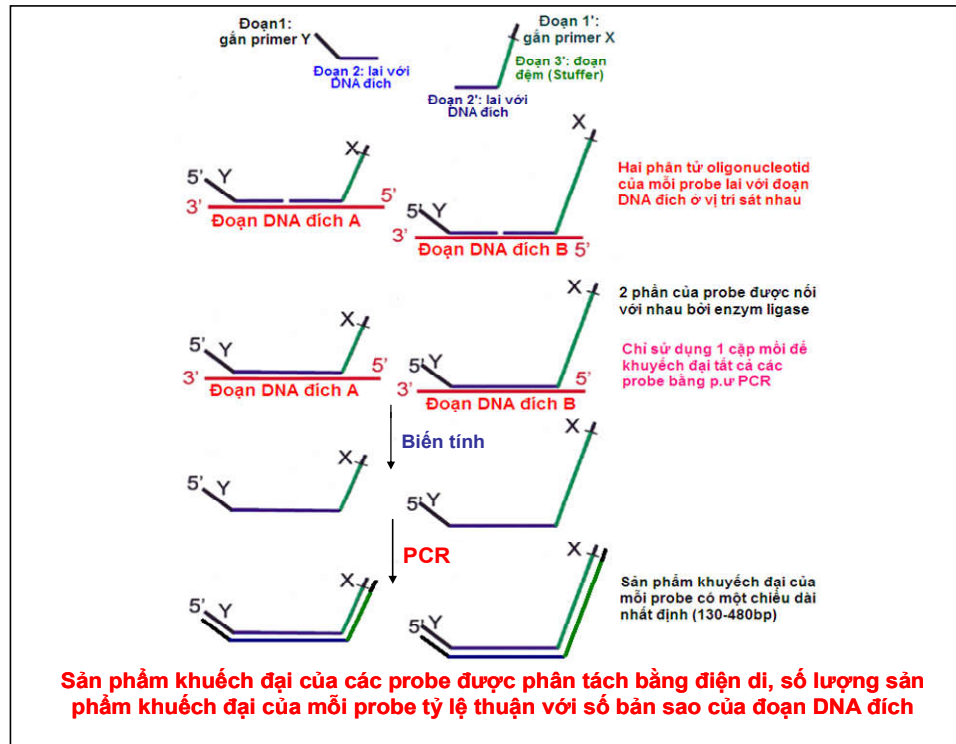
**Hình 1.17. Quy trình giải trình tự theo phương pháp ddNTP**

### 1.2.2.3. Phương pháp MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)

Hiện nay, kỹ thuật MLPA được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về bệnh lý di truyền cho phép phát hiện các tổn thương gen một cách nhanh chóng [50].

#### **Chuẩn bị probe**

Trong phản ứng MLPA, vấn đề thiết kế các probe gắn đặc hiệu với các đoạn DNA đích đóng vai trò cực kỳ quan trọng. Thông thường, mỗi probe chứa hai phân tử oligonucleotid có kích thước dài ngắn khác nhau [51], [52].



**Hình 1.18. Các giai đoạn của Kỹ thuật MLPA (Schouten, 2002)**

### Các bước tiến hành phản ứng MLPA

- Mẫu DNA hòa với 5  $\mu$ l TE được biến tính ở 98°C trong 5 phút.
- Cho hỗn hợp chứa các đoạn oligonucleotid của các probe vào.
- Hỗn hợp được ủ ở 60°C trong vòng 16 giờ (qua đêm). Hai đoạn lai của 2 phân tử oligonucleotid sẽ gắn với DNA đích đặc hiệu ở vị trí sát nhau.
- Cho enzym ligase vào và ủ ở 54°C trong 15 phút, enzym lipase xúc tác, nối hai đoạn oligonucleotid của probe lại với nhau. Phản ứng nối sẽ chấm dứt bởi sự tăng nhiệt độ lên 98°C trong 5 phút của phản ứng PCR để khuếch đại các probe.
- Hai đầu 5' và 3' của các probe có trình tự nucleotid hoàn toàn giống nhau, đây cũng là vị trí gắn mồi khi tiến hành phản ứng PCR. Do vậy, chúng ta chỉ cần dùng duy nhất 1 cặp mồi nhưng khuếch đại được toàn bộ các probe khác nhau có trong hỗn hợp.

- Sau phản ứng PCR, mỗi probe sẽ được khuếch đại thành nhiều bản sao. Các probe khác nhau sẽ có kích thước khác nhau do độ dài đoạn đệm của chúng khác nhau. Do vậy, chúng sẽ được phân tách bằng phương pháp điện di (thường sử dụng phương pháp điện di mao quản). Số lượng sản phẩm khuếch đại của mỗi probe sẽ tỷ lệ thuận với số bản sao của đoạn DNA đích đặc hiệu với probe đó [51], [52].

### ***1.2.3. Mối liên quan giữa bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát với đột biến gen***

Các nghiên cứu trên thế giới trước đây đã đề cập đến một số dấu hiệu lâm sàng và kết quả điều trị liên quan đến đột biến gen *CYP11B* gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát.

#### ***1.2.3.1. Mối liên quan với giới tính***

Các nghiên cứu đều chỉ ra rằng tỷ lệ đột biến giữa hai giới không khác biệt.

Nghiên cứu của Xueli Chen tại Trung Quốc (2013) cho thấy tỷ lệ đột biến gen *CYP11B* của bệnh nhân nam là 18,9% và của bệnh nhân nữ là 13%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) [53].

Tỷ lệ nam:nữ trong nghiên cứu của Orna Geyer tại Israel (2010) ở nhóm đột biến là 7:10 và nhóm không đột biến là 8:9, sự khác biệt về giới tính ở hai nhóm không có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,72$  [54].

#### ***1.2.3.2. 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 *CYP11B* so với nhóm không có đột biến gen [55], [56].

Nghiên cứu của Reddy ở Ấn Độ (2004) tiến hành trên 64 bệnh nhân đã phát hiện 24 bệnh nhân (37,5%) mang đột biến gen *CYP11B*. Tất cả các bệnh nhân này đều xuất hiện bệnh rất sớm trong tháng đầu sau sinh [58].

Nghiên cứu của Geyer (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 *CYP11B*. 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 ( $p=0,0009$ ) [54].

Nghiên cứu của Wool Suh (2012) tiến hành trên 85 bệnh nhân Hàn Quốc phát hiện 22 bệnh nhân (25,9%) mang đột biến *CYP11B* và 63 bệnh nhân không mang đột biến. Trong đó có 61,1% bệnh nhân xuất hiện triệu chứng đầu tiên trong vòng 6 tháng tuổi [55].

Nghiên cứu của Xueli Chen tại Trung Quốc (2013) trên 238 bệnh nhân cho thấy tuổi trung bình xuất hiện bệnh ở nhóm mang đột biến là 2 tháng sớm hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với tuổi trung bình của nhóm không mang đột biến là 6 tháng ( $p=0,028$ ) [53].

Nghiên cứu của Christiane Al-Haddad (2016) tại Liban tiến hành trên 18 bệnh nhân đã phát hiện 6 bệnh nhân có đột biến gen *CYP11B* (33%), tuổi phát hiện bệnh trung bình là 1,5 tháng. Khi so sánh tuổi xuất hiện bệnh trung bình giữa hai nhóm thấy ở nhóm có đột biến gen là 0,8 tháng sớm hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có đột biến gen là 5,7 tháng ( $p=0,01$ ) [56].

Như vậy ở bệnh nhân biểu hiện bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát càng sớm càng cần được xét nghiệm đột biến gen *CYP11B* giúp tìm hiểu thêm về nguyên nhân gây bệnh.

Tỷ lệ bị bệnh cả hai mắt trong nhóm bệnh nhân có đột biến gen *CYP11B* cao hơn nhóm không có đột biến, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê [55],[56].

Mối liên quan giữa mức độ nặng của bệnh với đột biến gen *CYP11B*: để đánh giá mối liên quan giữa mức độ nặng của bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát với đột biến gen *CYP11B*, các nghiên cứu trên thế giới đã chia bệnh thành 3 mức độ bệnh [57].

**Bảng 1.3. Phân loại mức độ nặng của bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát**

Đặc điểm lâm sàng	Bình thường	Nhẹ	Trung bình	Nặng
Đường kính giác mạc (mm)	≤10,5	>10,5–12	>12–13	>13
Nhãn áp (mm Hg)	≤16	>16–20	>20–30	>30
Tỷ lệ lõm đĩa (C/D)	0,3–0,4	>0,4–0,6	>0,6–0,8	>0,8
Thị lực	20/20	<20/20- 20/60	<20/60- 20/200	<20/200–20/400, <20/400–ST(-) (mù)
Giác mạc	Trong	Đục nhẹ	Đục nặng	Đục nặng và có vết Haab's

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 ( $p=0,034$ ) [53].

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) ( $p=0,004$ ) [54].

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 [55].

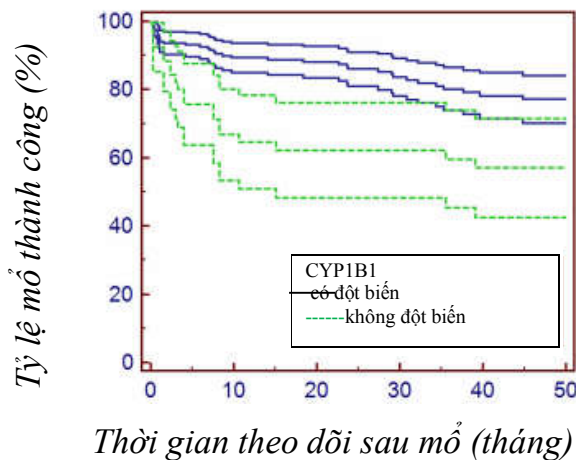
Nghiên cứu tại Li-băng (2016) chỉ ra rằng không có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu về nhãn áp trung bình trước mổ và sau mổ. Bên cạnh đó mức độ nặng (đục giác mạc nặng và lồi mắt trâu) tại thời điểm phát hiện bệnh của nhóm mang đột biến là 67% cao hơn gấp 2 lần nhóm không mang đột biến, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p=0,32$ ) [56].

Các nghiên cứu khác nhau trên thế giới đã đề cập đến mối liên quan giữa phương pháp phẫu thuật, số lần phẫu thuật, kết quả thị lực, nhãn áp, khúc

xạ sau mổ với nhóm bệnh nhân có và không có đột biến gen, số lượng đột biến gen, loại đột biến gen ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát.

Nghiên cứu của Reddy (2004) phát hiện 2 bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn đều có kết quả phẫu thuật rất kém, chỉ làm hạ nhãn áp còn thị lực dưới đếm ngón tay 1 mét. Ngược lại, 2 bệnh nhân mang đột biến sai nghĩa ở trạng thái đồng hợp tử kết quả thị lực sau mổ rất tốt là 20/40 và 20/50 [58].

Nghiên cứu của tác giả Xueli Chen tại Trung Quốc, phẫu thuật 192 bệnh nhân (305 mắt) thấy tỷ lệ phẫu thuật thành công tại các thời điểm theo dõi sau mổ ở nhóm mang đột biến gen luôn cao hơn nhóm không mang đột biến gen một cách có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), điều này trái ngược với nhận định của các nghiên cứu khác trên thế giới. Tác giả giải thích điều này là do kết quả phẫu thuật phụ thuộc rất lớn vào thời điểm phát hiện của bệnh nhân. Nhóm bệnh nhân có mang đột biến gen CYP1B1 thời gian biểu hiện bệnh trung bình là trước 2 tháng tuổi, sớm hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có đột biến gen là 6 tháng tuổi, do vậy được can thiệp phẫu thuật sớm hơn dẫn tới kết quả phẫu thuật tốt hơn [53].



**Hình 1.19. Tỷ lệ phẫu thuật thành công ở nhóm có và không có đột biến [53]**

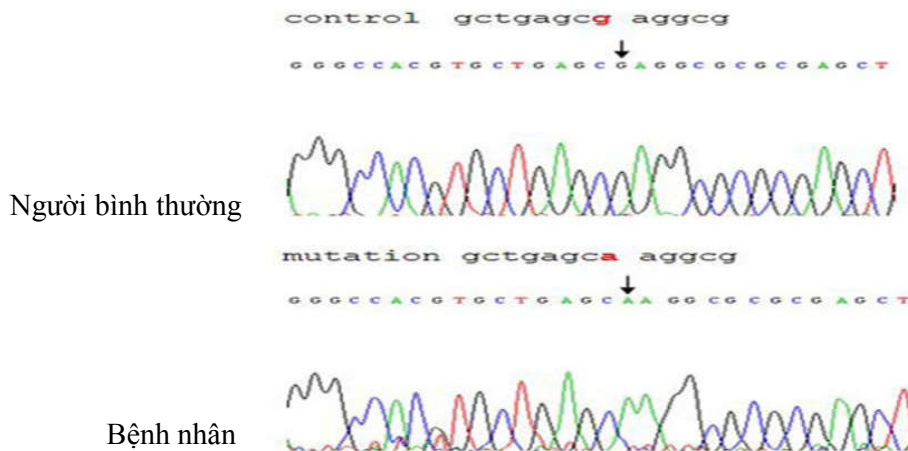
### 1.3. Đột biến CYP1B1 phát hiện ở người lành mang gen bệnh

Từ báo cáo năm 2009 tại Tây Ban Nha đề cập đến đột biến gen CYP1B1 di truyền theo kiểu 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 có quan hệ huyết thống với bệnh nhân.

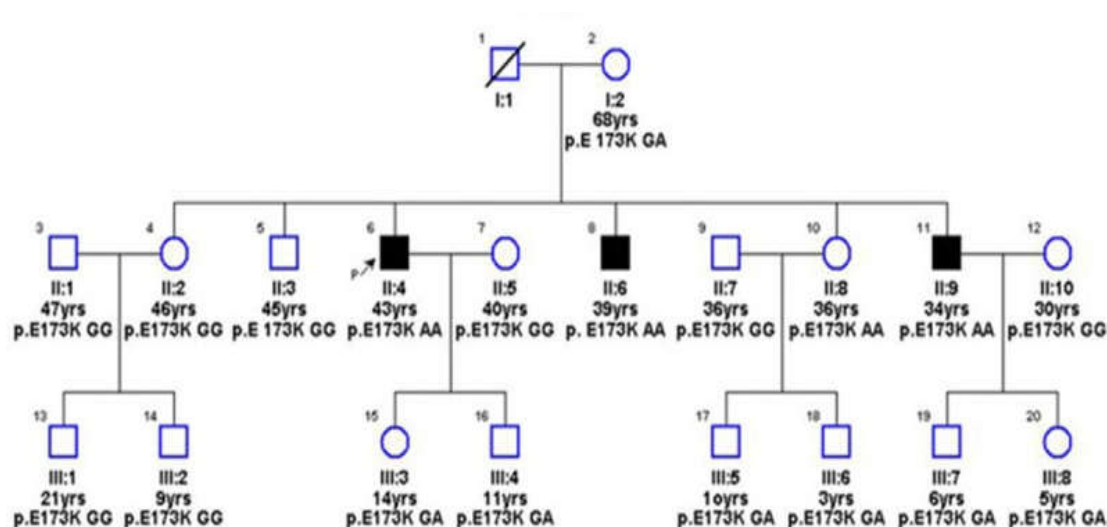
Việc lập phả hệ để xem xét tính chất đột biến gen di truyền giúp ích trong chẩn đoán trước sinh, đưa cho gia đình bệnh nhân những tư vấn di truyền, chẩn đoán bệnh sớm nhằm nâng cao chất lượng dân số nói chung và chất lượng điều trị bệnh nói riêng.

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.



**Hình 1.20. Hình ảnh giải trình tự gen của đột biến p.E173K**

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 [59].



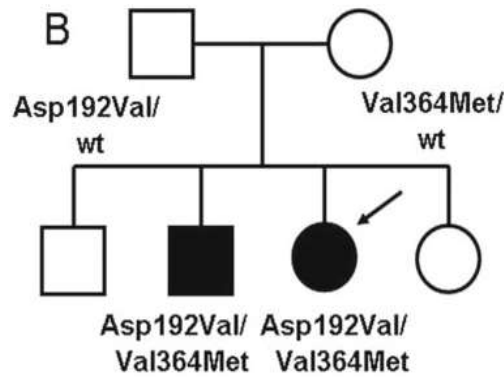
**Hình 1.21. Phả hệ gia đình bệnh nhân mang đột biến gen p.E173K**

Cả 3 bệnh nhân mang đột biến gen đều biểu hiện bệnh nặng và kết quả điều trị kém, thị lực chỉ đạt tối đa 20/100, có 1 mắt mất chức năng hoàn toàn, thị lực sáng tối âm tính (ST-), 1 mắt chỉ thấy bóng bàn tay (BBT).

**Bảng 1.4. Lâm sàng và điều trị của bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát trong phả hệ**

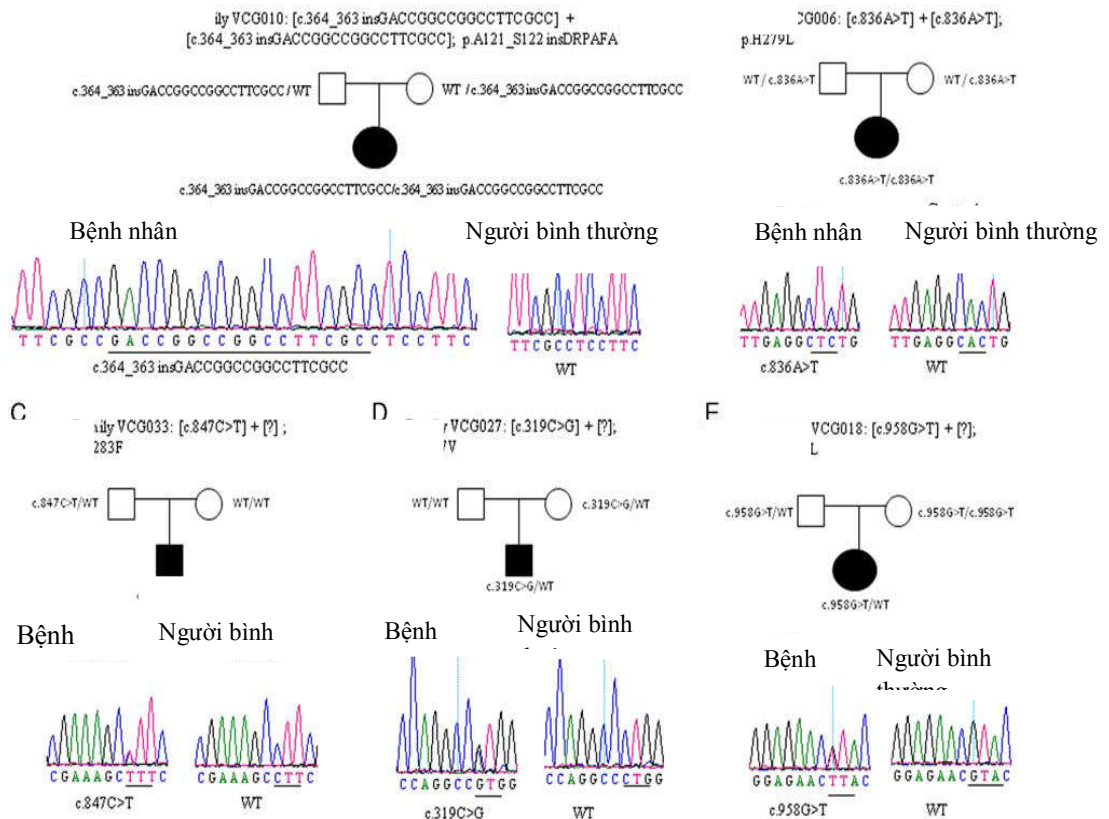
Mã số	Giới	Tuổi	Thị lực	Nhãn áp (mmHg)	Lõm đĩa	Giai đoạn bệnh	Rung giật nhãn cầu	Phẫu thuật
II: 4	Nam	43	ST-/20/200	50/25	1,0/1,0	Muộn 2 mắt	2 mắt	2 mắt
II: 6	Nam	39	20/100/20/100	53/17	1,0/1,0	Muộn 2 mắt	2 mắt	2 mắt
II: 9	Nam	34	BBT/20/100	25/18	0,9/0,5	Muộn/bình thường	2 mắt	2 mắt

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 thái dị hợp tử đều không biểu hiện bệnh. Khi di truyền cho con mang 2 đột biến ở trạng thái dị hợp tử biểu hiện bệnh [10].



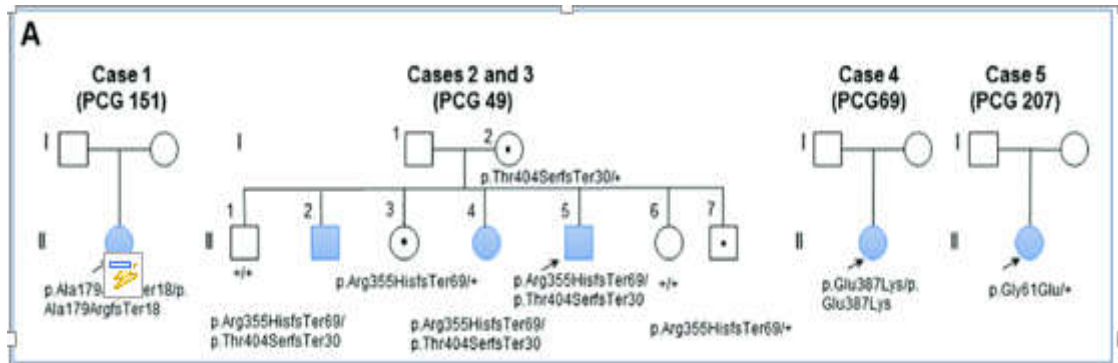
**Hình 1.22. Phả hệ gia đình Nhật Bản mang đột biến Asp192Val và Val364Met**

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.



**Hình 1.23. Phả hệ 5 gia đình bệnh nhân Việt Nam mang đột biến gen CYP1B1**

Năm 2017, nghiên cứu của Maria 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.



**Hình 1.24. Phả hệ các gia đình bệnh nhân tại Tây Ban Nha [60]**

Gia đình bệnh nhân mã số 49 có 3 người con mắc bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát mang đột biến gen CYP1B1 ở trạng thái dị hợp tử kết hợp p.Thr404SerfsTer30/p.Arg355HisfsTer69. Mẹ bệnh nhân là người lành mang gen bệnh ở trạng thái dị hợp tử p.Thr404SerfsTer30 di truyền cho ba bệnh nhân này. Hai người con khác trong gia đình mang đột biến p.Arg355HisfsTer69 giống ba người anh chị em, như vậy đột biến p.Arg355HisfsTer69 có thể là đột biến tế bào sinh dưỡng, phát sinh trong quá trình tạo giao tử. Qua nghiên cứu cũng cho thấy bệnh nhân mã số 151 mang đột biến gen ở trạng thái đồng hợp, bệnh nhân mã số 69 mang đột biến dị hợp tử kết hợp và bệnh nhân mã số 207 chỉ mang một đột biến dị hợp đều biểu hiện bệnh, các phả hệ đều không thấy có sự di truyền từ bố mẹ sang con cái của họ [60].

## 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 có cùng huyết thống với bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1.

- 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.

#### 2.1.1. 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  $\geq 25$ mmHg (nhãn áp kế Maklakov) hoặc  $\geq 22$ mmHg (nhãn áp kế Icare)

Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng

Đường kính ngang giác mạc to bất thường  $\geq 12$ mm

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

**2.1.2. 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**

**2.3.1. Thiết kế nghiên cứu:** phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang.

### **2.3.2. Cỡ mẫu và chọn mẫu nghiên cứu**

Bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát là bệnh di truyền hiếm gặp nên lấy cỡ mẫu thuận tiện.

Qua thời gian tiến hành nghiên cứu thu thập được:

86 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.

29 thành viên có cùng huyết thống với bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 trong 15 gia đình tham gia nghiên cứu gồm 13 người bố, 13 người mẹ và 3 người em ruột của bệnh nhân.

50 người khỏe mạnh để làm mẫu đối chứng.

### **2.3.3. Phương tiện nghiên cứu**

#### **2.3.3.1. Dụng cụ, trang thiết bị**

##### **Dùng thăm khám mắt:**

Bảng thị lực

Bộ đo nhãn áp kế Maklakov sử dụng quả cân 10g, máy đo nhãn áp Icare Compa Amsler

Máy sinh hiển vi đèn khe

Kính soi góc tiền phòng Goldmann một mặt gương

Máy soi đáy mắt, máy thị trường, máy chụp OCT, máy Retcam

Máy chụp ảnh

***Dùng để xác định đột biến gen:***

Ống lấy máu chống đông EDTA

Pipet, đầu côn

Ống Eppendorf 1,5 ml và ống Facol

Máy Gene Amp PCR System 9700 (USA)

Tủ lạnh sâu: -30°C; -80°C (SANYO)

Máy điện di: Mupid (Nhật Bản)

Máy soi gel và chụp ảnh tự động: Chemidoc EQ-Bio-Rad (USA)

Máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm để bàn Eppendorf (Đức)

Lò vi sóng (Samsung)

Máy đọc trình tự gen ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (USA)

Tủ ấm

***2.3.3.2. Hoá chất***

***Hóa chất dùng để tách chiết DNA:*** dung dịch Lysis buffer, dung dịch K, dung dịch SDS 10%, Proteinase K (10mg/mL), dung dịch phenol:chloroform:isoamyl với tỷ lệ 25:24:1, dung dịch chloroform:isoamyl với tỷ lệ 24:1, Ethanol 100% và ethanol 70%, Sodium acetate 3M, pH=5,2, dung dịch hòa tan DNA để bảo quản.

***Hóa chất để thực hiện kỹ thuật PCR (Invitrogen):*** 10x buffer, dNTP 10 mM, Taq polymerase, các cặp mồi (xuôi và ngược).

***Hóa chất để điện di sản phẩm PCR trên gel agarose:*** agarose, dung dịch TBE 10X (Tris; acid boric; EDTA), Loading buffer 10X, Ethidium bromide.

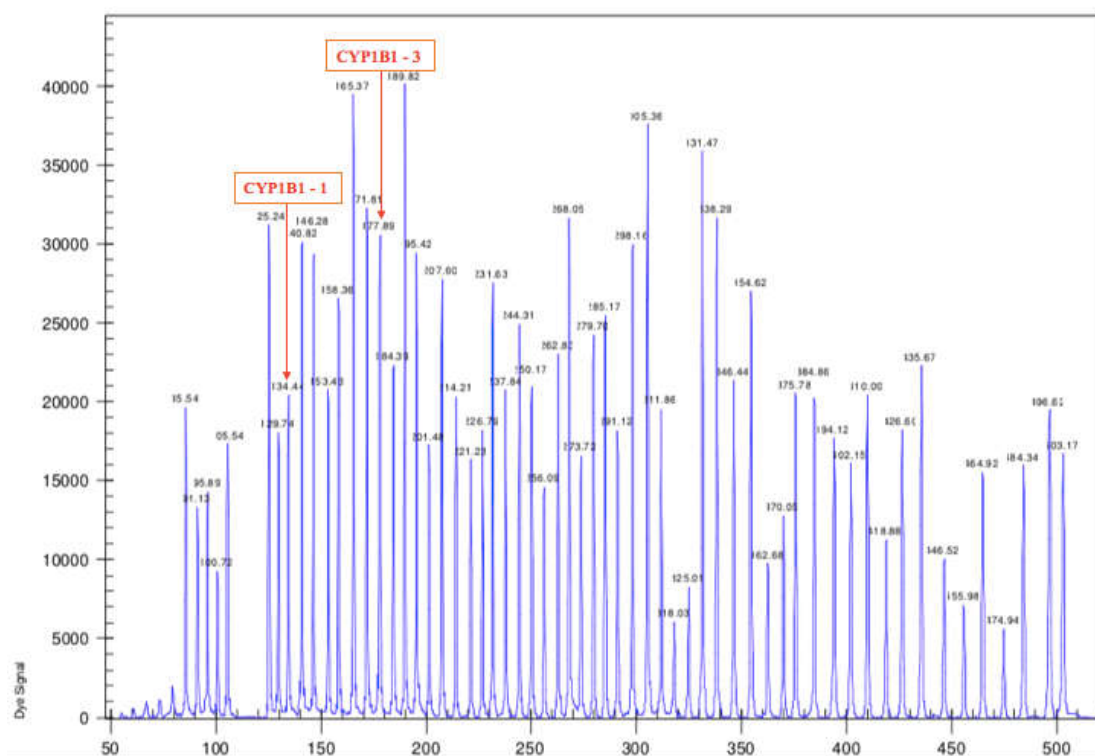
***Hóa chất để tinh sạch sản phẩm PCR từ gel agarose (QIAGEN):*** dung dịch QC, dung dịch Sodium acetat, dung dịch Isopropanol, dung dịch QG, cột QIA.

***Hóa chất để đọc trình tự gen:*** big dye, cột lọc, SAM và Terminator Solution.

**Kit MLPA để xác định đột biến xóa đoạn và lặp đoạn:** nghiên cứu này sử dụng kit MLPA (MRC- Holland). Kit gồm các probe sử dụng trong chẩn đoán đột biến gen CYP1B1 gọi là P128-CYP450. Hỗn hợp probe này bao gồm các probe đặc hiệu cho gen CYP1B1. Ngoài ra, có 50 probe đặc trưng cho gen của người cũng được sử dụng trong hỗn hợp để làm đối chứng và 2 probe cho nhiễm sắc thể X và Y để xác định giới tính. Vị trí và kích thước của các probe được mô tả như bảng 2.1.

**Bảng 2.1. Tên, kích thước và vị trí của các sản phẩm PCR trong Kit MLPA P128-CYP450 (MRC- Holland)**

STT	Tên probe	Vị trí của probe trên gen	Kích thước (base pair)
1	CYP1B1-1	Exon 1	136
2	CYP1B1-3	Exon 3	178



**Hình 2.1. Kết quả MLPA sử dụng Kit MLPA P128-CYP450**

Trục hoành biểu hiện kích thước sản phẩm PCR tăng dần theo chiều từ trái sang phải. Trục tung thể hiện nồng độ của các sản phẩm PCR tỉ lệ thuận với chiều cao của các đỉnh. Bệnh nhân có đột biến xóa đoạn đồng hợp tử khi không xuất hiện đỉnh tương ứng với exon bị xóa đoạn và đột biến xóa đoạn dị hợp tử khi chiều cao đỉnh bằng  $\frac{1}{2}$  so với chiều cao đỉnh của mẫu đối chứng.

### **2.3.4. Các bước tiến hành nghiên cứu**

#### **2.3.4.1. Chẩn đoán bệnh nhân và lập phá hệ gia đình**

Tất cả các bệnh nhân đều được hỏi, khám bệnh theo một mẫu bệnh án thống nhất.

**Hỏi bệnh:** khai thác đầy đủ các thông tin họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, lý do đến khám, tiền sử cá nhân và gia đình, thời gian phát hiện bệnh, các phương pháp điều trị trước đây.

#### **Khám bệnh:**

Các triệu chứng cơ năng: chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng, co quắp mi.

Thử thị lực: trẻ lớn thử bằng bảng Landolt, trẻ bé thử bằng hình, nhận biết đồ vật, bảng Lea greating.

Đo nhãn áp: đo bằng nhãn áp kế Icare. Ở trẻ nhỏ cần đo nhãn áp khi ngủ hoặc dưới gây mê.

Khám các dấu hiệu lâm sàng:

- Mi mắt: có xu hướng khép lại nhằm hạn chế ánh sáng vào mắt.
- Kết mạc có cương tụ, có viêm không, có sẹo mỡ cũ.
- Vùng rìa giác củng mạc có giãn lồi hay không.
- Giác mạc: đánh giá mức độ đục trong (trong hoàn toàn, đục nhẹ, đục trắng), đo đường kính ngang - dọc, vết rạn màng Descemet (vết Haab).
- Củng mạc: mỏng và giãn, giãn dây Zinn gây lệch thể thủy tinh.

- Đánh giá độ sâu tiền phòng. Soi góc tiền phòng bằng kính soi góc Goldmann một mặt gương qua đó quan sát góc tiền phòng rộng hay hẹp, tình trạng bám của mống mắt, bất thường góc.

- Đánh giá tình trạng đồng tử, thể thủy tinh.

- Soi đáy mắt đánh giá tình trạng đĩa thị, tỷ lệ teo lõm đĩa, đánh giá tình trạng mạch máu võng mạc và dịch kính.

Dấu hiệu cận lâm sàng - siêu âm A: đo chiều dài trục nhãn cầu.

Dấu hiệu toàn thân: đối với glôcôm bẩm sinh nguyên phát thường không có các dị tật bẩm sinh tại mắt và toàn thân kèm theo.

### **Phân loại giai đoạn bệnh (theo Al-Hazmi) [40]**

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 giác mạc 13-14mm, giác mạc phù đục.

Giai đoạn nặng: nhãn áp >35mmHg, đường kính giác mạc >14mm, giác mạc đục trắng.

### **Lập phả hệ gia đình**

#### *2.3.4.2. 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 từ mẫu máu của bệnh nhân.

DNA được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch để thực hiện phản ứng PCR.

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. Nếu cả 50 người khỏe mạnh không có mang đột biến giống bệnh nhân thì kết luận đây là đột biến. Nếu có bất kỳ trường hợp nào có đột biến giống bệnh nhân thì loại bỏ đột biến này mà xem xét như một đa hình gen.

#### *2.3.4.3. Quy trình phát hiện người lành mang gen bệnh trên các thành viên gia đình có quan hệ huyết thống với bệnh nhân*

Tách chiết DNA từ mẫu máu của người nhà bệnh nhân.

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 đối với các thành viên mang gen đột biến.

#### *2.3.4.4. Quy trình kỹ thuật nghiên cứu*

##### ***Quy trình lấy mẫu***

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.

##### ***Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi***

DNA được tách chiết từ máu ngoại vi theo phương pháp phenol/chloroform

##### ***Phương pháp quang phổ***

Dựa vào tỷ lệ  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  để kiểm tra độ tinh sạch của DNA. Nếu  $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1,8/2$  thì DNA được coi là tinh sạch.

### ***Kỹ thuật PCR để khuếch đại DNA***

Toàn bộ 3 exon của gen CYP1B1 được khuếch đại với các cặp mồi đặc hiệu [88]. Trình tự các cặp mồi được trình bày ở bảng 2.2.

**Bảng 2.2. Trình tự mồi dùng cho phản ứng PCR**

<b>Mồi</b>	<b>Trình tự đoạn mồi (5'-3')</b>	<b>Kích thước (bp)</b>
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'	

Thành phần của phản ứng PCR - thể tích 20 $\mu$ l gồm: 100ng DNA, 5pmol primer, 200  $\mu$ mol/l dNTP, 2 đơn vị enzym Taq polymerase và 2 $\mu$ l bufer II 20. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C-7 phút, 35 chu kỳ [94°C-1phút, 55°C-1phút, 72°C-1phút], 72°C - 7phút.

***Kỹ thuật giải trình tự gen:*** tinh sạch sản phẩm PCR. Giải trình tự gen theo quy trình, sử dụng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

***Quy trình thực hiện:*** tinh sạch sản phẩm PCR. Phân tích 0,1 thể tích DNA trên gel agarose chứa 1 $\mu$ g/ml ethidium bromide. Trộn hỗn hợp trong ống Eppendorf gồm: mastemix, Terminator ready Reaction Mix, primer và sản phẩm PCR. Mỗi phản ứng PCR sequencing sử dụng duy nhất một mồi. Chạy mẫu với chu trình nhiệt tối ưu. Tinh chế sản phẩm bằng ABI phenol/chloroform. Thu tủa DNA bằng ly tâm. Loại bỏ Ethanol. Để khô. Sản phẩm được chạy trên máy sequencer ABI. Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự trên GenBank (National center for biotechnology information,

NCBI) và phân tích theo phương pháp ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems).

### ***Kỹ thuật tiến hành phản ứng MLPA***

+ Bước 1: Biến tính DNA

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

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

• Chuẩn bị hỗn hợp lai:

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

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

+ Bước 3: Nối 2 đầu probe

• Chuẩn bị dung dịch đệm gắn probe: các dung dịch hóa chất cần vortex nhẹ cho đều trước khi pha dung dịch đệm. Thành phần gồm có: dung dịch đệm A 3ml, dung dịch đệm B 3ml, nước 25ml và Enzym ligase 65 1ml.

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

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

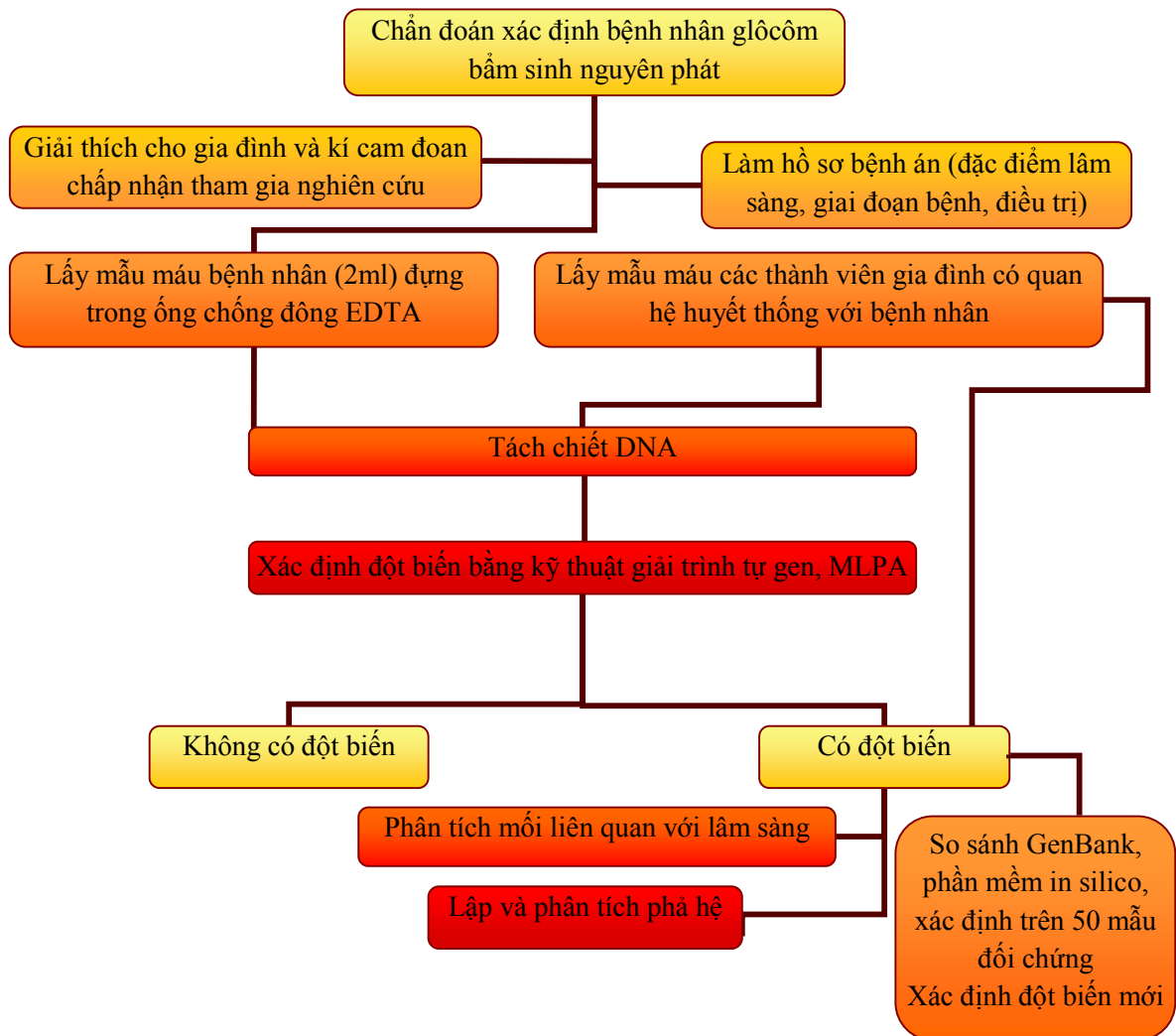
• Dung dịch đệm phản ứng PCR: 4ml dung dịch đệm PCR, 26ml nước. Cho thêm vào hỗn hợp 10ml sản phẩm lai, đưa vào máy giữ ở 60°C.



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

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

### Sơ đồ nghiên cứu



#### 2.3.4.5. Chỉ số, biến số nghiên cứu và tiêu chí đánh giá kết quả

##### **Chỉ số và biến số nghiên cứu**

**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  $\leq 1$  tháng, 1-6 tháng và  $> 6$  tháng. Giới, số mắt bị bệnh.

Đo chỉ số nhãn áp, tính trung bình và phân thành 3 nhóm  $< 25$ mmHg, 25-35mmHg,  $> 35$ mmHg.

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  $< 13$ mm, 13-14mm,  $> 14$ mm.

Từ đó chia bệnh thành 3 giai đoạn nhẹ, trung bình, nặng dựa 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 bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát.

Lựa chọn các thành viên gia đình có quan hệ huyết thống với bệnh nhân mang đột biến gen. 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.

#### *2.3.4.6. 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 thông qua giá trị OR (tỉ suất chênh) và khoảng tin cậy 95% của OR. 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 bệnh nhân.

Các gia đình bệnh nhân có thể rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia. Đại diện gia đình bệnh nhân được thông báo về kết quả xét nghiệm, đồng thời giải thích về khả năng điều trị và phòng bệnh.

Các thông tin của bệnh nhân và gia đình sẽ được đảm bảo bí mật (các thông tin về bệnh nhân, bao gồm cả phần hỏi bệnh, khám bệnh và kết quả xét nghiệm chỉ được nhóm nghiên cứu tiết lộ cho bệnh nhân và người đại diện gia đình của bệnh nhân).

Nghiên cứu được tiến hành hoàn toàn vì mục đích khoa học, lợi ích của bệnh nhân và gia đình bệnh nhân.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 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.

**Bảng 3.1. Tuổi phát hiện bệnh**

Tuổi phát hiện bệnh	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
ngay khi sinh - 1 tháng tuổi	50	58,2
>1 tháng tuổi - 6 tháng tuổi	23	26,7
>6 tháng tuổi	13	15,1
Tổng	86	100

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  $2,58 \pm 3,59$  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 tuổi.

##### 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  $\chi^2$ ).

### **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 của 86 bệnh nhân nghiên cứu là  $2986,1 \pm 433,6$ g, nhỏ nhất là 700g, lớn nhất là 3800g.

#### **Tiền sử gia đình**

Trong số 86 bệnh nhân khai thác tiền sử gia đình chúng tôi thấy:

- 1 gia đình có 2 anh em trai cùng bị bệnh chiếm tỷ lệ 1,16%.
- 3 gia đình có tiền sử ông hoặc bà tiếp xúc chất độc màu da cam.
- Khi hỏi về tiền sử mang thai thấy 5/85 bà mẹ mắc bệnh khi mang thai (chiếm 5,9%), trong đó: 3 bà mẹ bị cúm, 1 bà mẹ bị 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 ở cả hai mắt là 60 bệnh nhân (chiếm 69,8%) nhiều hơn số bệnh nhân biểu hiện bệnh ở 1 mắt (chiếm 30,2%) một cách có ý nghĩa thống kê với  $p=0,000$  (Test  $\chi^2$ ).

Trong số 26 bệnh nhân mắc bệnh 1 mắt, có 13 bệnh nhân biểu hiện bệnh ở mắt phải (chiếm 50%), 13 bệnh nhân biểu hiện bệnh ở mắt trái (chiếm 50%), như vậy tình trạng mắc bệnh mắt phải hay mắt trái là như nhau trong nhóm bị bệnh một mắt ( $p>0,05$  – Test  $\chi^2$ ).

### **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.

**Bảng 3.2. Phân bố mắt theo giai đoạn bệnh**

Giai đoạn bệnh	Mắt phải		Mắt trái		Chung	
	Số mắt	%	Số mắt	%	Số mắt	%
Nhẹ	1	1,4	3	4,1	4	2,7
Trung bình	46	63,0	47	64,4	93	63,7
Nặng	26	35,6	23	31,5	49	33,6
Tổng	73	100,0	73	100,0	146	100,0

Trong số 146 mắt có 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  $\chi^2$ ).

### 3.1.6. Triệu chứng cơ năng

**Bảng 3.3. Tỷ lệ các triệu chứng cơ năng**

Triệu chứng cơ năng	Số mắt	Tỷ lệ (%)
Chói	117	80,1
Chảy nước mắt	120	82,2
Sợ ánh sáng	124	84,9
Nhìn mờ	111	76,0
Tổng	146	100

Trong số 146 mắt nghiên cứu, dấu hiệu cơ năng hay gặp nhất là sợ ánh sáng chiếm 84,9%, tiếp đến là dấu hiệu 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:** nhãn áp trung bình của nhóm nghiên cứu là  $27,11 \pm 8,41$  mmHg, cao nhất là 55 mmHg và thấp nhất là 9 mmHg.

**Chiều dài trục nhãn cầu:** chiều dài trung bình trục nhãn cầu của nhóm nghiên cứu là  $23,52 \pm 3,28$ mm, dài nhất là 33,10mm và ngắn nhất là 15,70mm.

**Kết mạc:** kết mạc cương tụ gặp ở 55/146 mắt (chiếm 37,7%).

**Vùng rìa cứng giác mạc:** dẫn lối gặp ở 54 mắt (chiếm 37,0%).

**Giác mạc:** trong số 146 mắt nghiên cứu khi đánh giá về mức độ trong - đục của giác mạc thấy có 43 mắt giác mạc trong (29,4%), giác mạc đục gặp ở 103 mắt (70,6%) trong đó đục nhẹ chiếm 38,4% và đục trắng chiếm 32,2%.

**Bảng 3.4. Tình trạng giác mạc của nhóm nghiên cứu**

Tình trạng đục giác mạc	Số mắt	Tỷ lệ (%)
Trong	43	29,4
Đục nhẹ	56	38,4
Đục trắng	47	32,2
Tổng	146	100

Ở 146 mắt nghiên cứu đường kính ngang giác mạc trung bình là  $13,06 \pm 0,85$ mm, lớn nhất là 16,0mm và nhỏ nhất là 11,5mm. Đường kính dọc giác mạc trung bình là  $12,20 \pm 0,82$ mm, lớn nhất là 15,0mm và nhỏ nhất là 11,0mm.

Chỉ có 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%) thấy toàn bộ các mắt quan sát được đều thấy tiền phòng sâu, chân móng mắt bám cao và không quan sát được các thành phần của góc.

56 mắt giác mạc đục mờ quan sát thấy tiền phòng sâu nhưng không soi rõ góc tiền phòng.

**Đĩa thị:** nghiên cứu quan sát được tình trạng đĩa thị của 61/146 mắt bị bệnh (39,7%), mức độ lõm đĩa trung bình là  $0,72 \pm 0,21$  (0,2 - 0,9).

### 3.2. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 và mối liên quan với lâm sàng

#### 3.2.1. Kết quả tách chiết DNA

DNA của các bệnh nhân, cùng các đối chứng nam và nữ được tách chiết theo quy trình phenol/chloroform. Sau khi tách chiết, các mẫu DNA được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nano-drop.

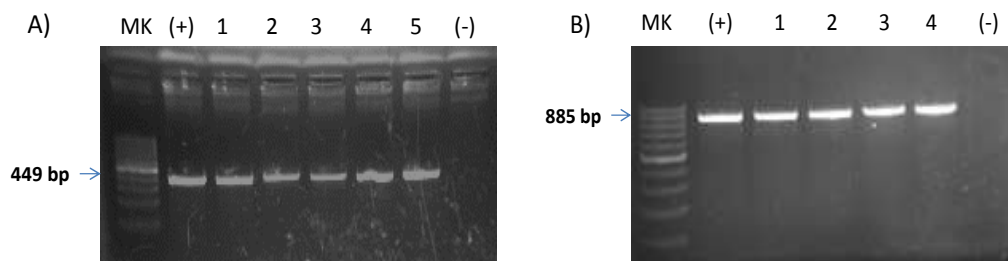
Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu DNA đều có độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280nm nằm trong khoảng 1,7–2,0 và nồng độ mẫu tách chiết đạt từ 101,0–233,2ng/ $\mu$ L khi đo trên máy Nanodrop ở bước sóng 260/280. Như vậy, những mẫu DNA được tách chiết đều đảm bảo chất lượng, đủ điều kiện cho các thí nghiệm tiếp theo (Phụ lục 5).

#### 3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 bằng kỹ thuật giải trình tự

##### 3.2.2.1. Kết quả PCR

##### *Kết quả khuếch đại gen CYP1B1*

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen CYP1B1 để khuếch đại DNA sau tách chiết từ mẫu máu của bệnh nhân.



**Hình 3.1. Sản phẩm PCR exon 2 (A), exon 3 (B) của gen CYP1B1 (+) mẫu đối chứng dương, (-) mẫu đối chứng âm, (1-5) mẫu bệnh nhân, (MK) Marker**



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

#### *3.2.2.2. Phân bố đột biến điểm gen CYP1B1*

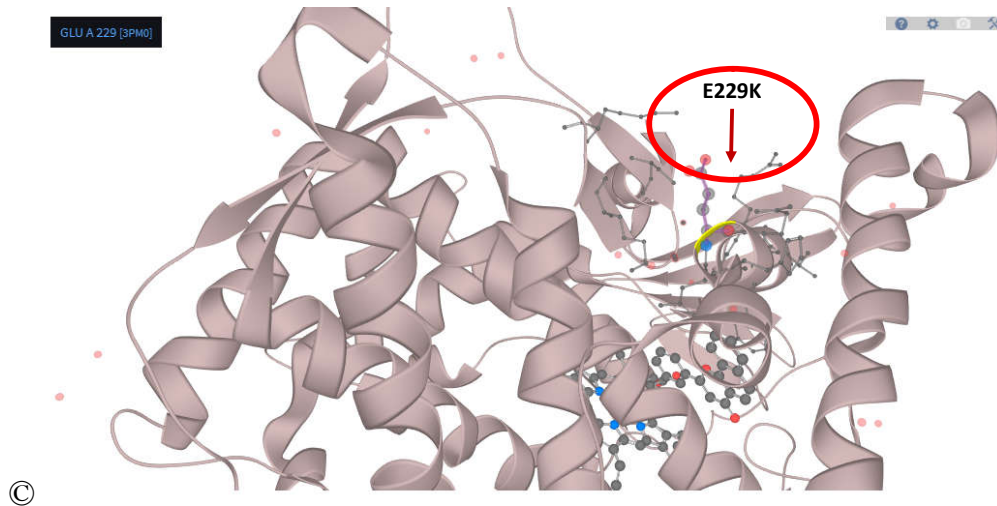
Nghiên cứu bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ chiều dài gen CYP1B1 đã phát hiện được 17 bệnh nhân mang đột biến điểm, với 12 vị trí đột biến khác nhau trên DNA.

Phân bố 12 đột biến điểm trên gen như sau: đột biến điểm được tìm thấy chủ yếu trên exon 2 với 11/12 đột biến chiếm tỷ lệ 91,7%. Có 1 đột biến trên exon 3 chiếm tỷ lệ 8,3%.

Có 12 đột biến vị trí điểm được phát hiện trong tổng số 18 bệnh nhân không có quan hệ huyết thống mang đột biến với 25 allen. Trong đó đột biến sai nghĩa p.E229K chiếm tỷ lệ allen cao nhất với 6/24 trường hợp (25%), sau đó đột biến p.Q86K 4/24 trường hợp (16,7%). Đột biến p.Q159X tạo mã kết thúc sớm và p.D218H được tìm thấy ở 3/24 trường hợp (12,5%). Các đột biến còn lại chỉ được tìm thấy ở 1 trường hợp.

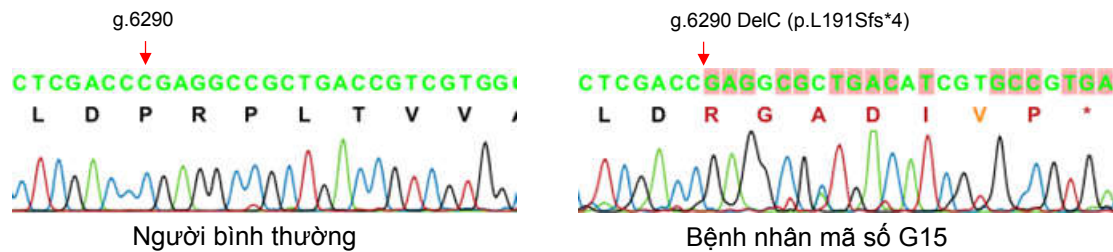
#### *3.2.2.3. Các đột biến điểm trên gen CYP1B1*

Trong số các đột biến điểm có 3 đột biến gen CYP1B1 đã được công bố gây bệnh trên ngân hàng dữ liệu GeneBank là p.G61E, p.V198I, p.E229K, 9 đột biến điểm mới được phát hiện là p.Q86K, p.Q159X, p.Q164X, p.D218H, p.L191Sfs\*4, p.A133T, p.L27Q, p.D242N, p.G365E. Tất cả các đột biến mới này không tìm thấy trên 50 mẫu DNA đối chứng của người bình thường.



**Hình 3.2. Hình ảnh cấu trúc gen *CYP1B1* với đột biến p.E229K**

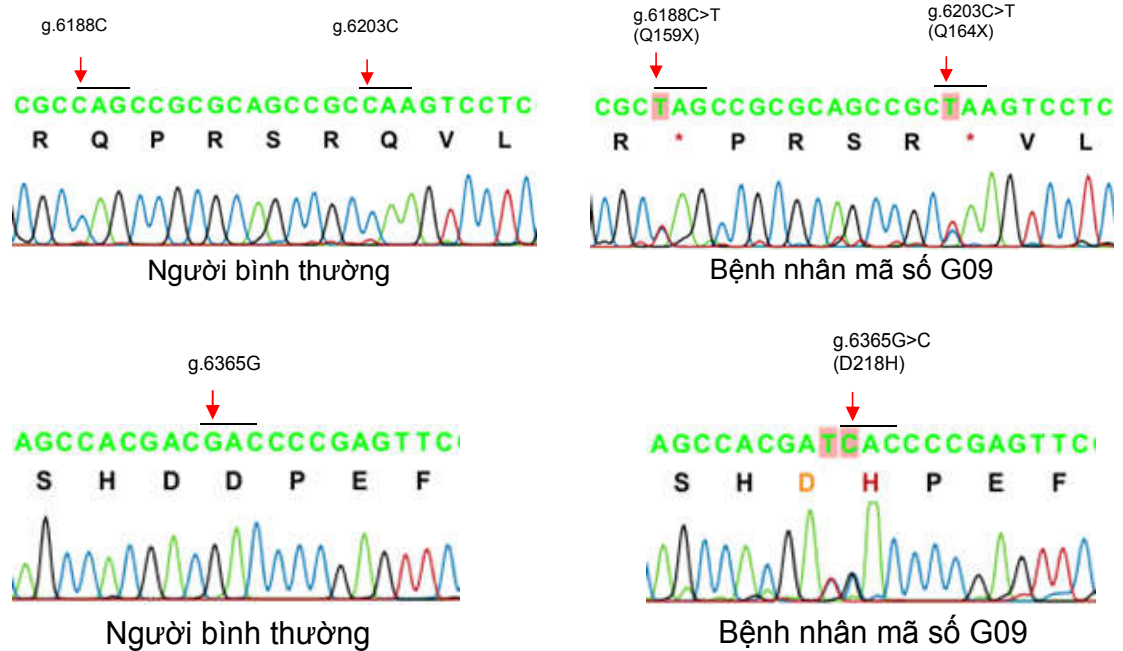
**Hình ảnh minh họa bệnh nhân có đột biến mới xóa 1 nucleotid**



**Hình 3.3. Hình ảnh đột biến gen của bệnh nhân mã G15**

Đây là hình ảnh giải trình tự exon 2 thấy bệnh nhân mã số G15 có đột biến mất 1 nucleotid C tại vị trí nucleotid 571 trên cDNA. Hệ quả của đột biến mất 1 nucleotid này là sự thay đổi khung dịch mã, biến đổi acid amin thứ 191 Leucine thành Serine.

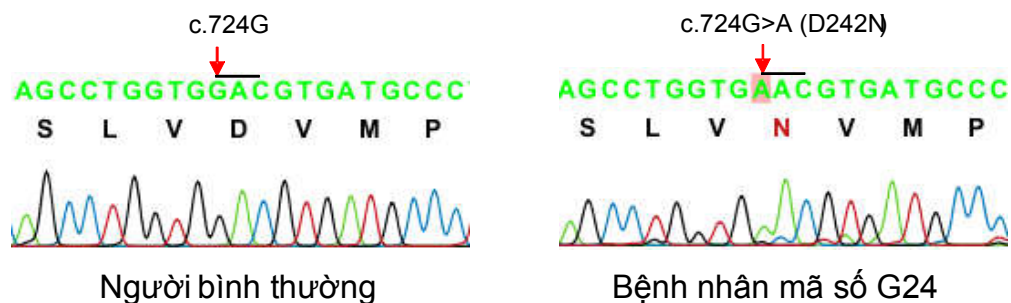
**Hình ảnh minh họa bệnh nhân có 03 đột biến mới, trong đó 2 đột biến vô nghĩa, 01 đột biến sai nghĩa.**



**Hình 3.4. Hình ảnh đột biến gen của bệnh nhân mã G09**

Đây là hình minh họa cho một bệnh nhân có đột biến vô nghĩa. Giải trình tự exon 2 gen CYP1B1 phát hiện bệnh nhân mã số G09 có đột biến thay thế nucleotid tại vị trí nucleotid 475 và vị trí nucleotid 490, C thành T dẫn đến codon 159 CAG mã hóa Glutamine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG.

**Hình ảnh minh họa bệnh nhân có đột biến mới sai nghĩa**



**Hình 3.5. Hình ảnh đột biến gen của bệnh nhân mã G24**

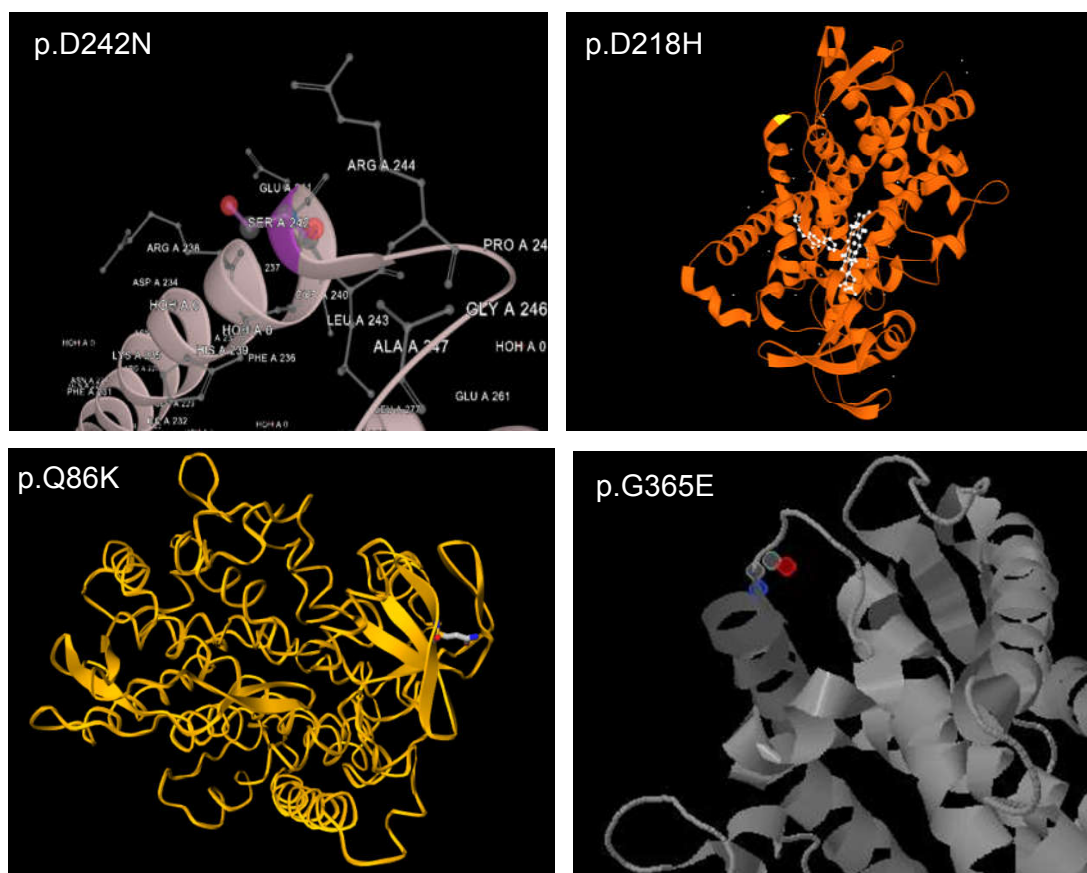
Đây là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến p.D242N tại exon 2 gen CYP1B1 bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh mẫu DNA bệnh nhân với DNA mẫu chứng, phát hiện đột biến thay thế nucleotid G thành A tại vị trí 724 trên cDNA, dẫn đến sự thay đổi acid amin Aspartate thành Asparagine tại codon 242. Đây là đột biến mới chưa được công bố.

#### 3.2.2.4. Kết quả dự đoán gây bệnh của các đột biến

**Bảng 3.5. Kết quả dự đoán gây bệnh của đột biến điểm mới gen CYP1B1**

STT	cDNA	Thay đổi acid amin	Số trường hợp		Phân tích <i>in silico</i>		
			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

Bảng 3.7 cho thấy kết quả phân tích *in silico* dự đoán khả năng gây bệnh của các đột biến mới trên gen CYP1B1. Các đột biến mới có khả năng gây bệnh gồm p.L27Q, p.Q86K, p.D218H, p.D242N, p.G365E (điểm 0,992-1,000). Ngoài ra các đột biến mới p.L191Sfs\*4 gây thay đổi khung dịch mã và đột biến p.Q159X, p.Q164X tạo mã kết thúc sớm cũng là các đột biến gây bệnh. Đột biến mới p.A133T được dự báo là lành tính với điểm 0,244.



**Hình 3.6. Hình ảnh cấu trúc gen CYP1B1 với 04 đột biến mới (p.D242N, p.D218H, p.Q86K, p.G365E)**

Ngoài 12 đột biến mô tả trên, nghiên cứu còn tìm thấy các đa hình gen đã công bố trước đây: p.R48G, p.A119S và p.L432V (bảng 3.8).

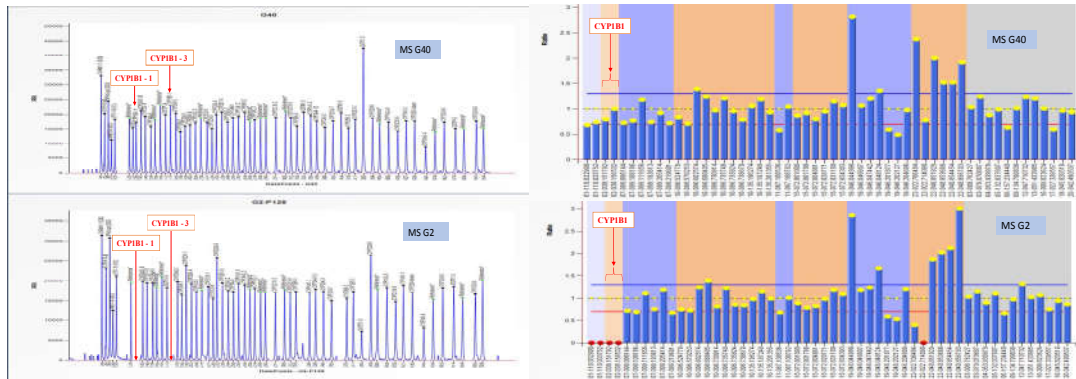
**Bảng 3.6. Các đa hình SNP của gen CYP1B1 trên bệnh nhân nghiên cứu**

Exon	Đột biến		Số bệnh nhân		Tần suất alen(%)	Chú thích
	cDNA	Acid amin	Dị hợp	Đồng hợp		
2	c.142C>G	p.R48G	30	3	C(68,8%) G(21,2%)	rs10012
2	c.355G>T	p.A119S	15	4	G(86,5%) T(13,5%)	rs1056827
3	c.1294C>G	p.L432V	12	0	C(92,9%) G(7,1%)	rs1056836

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

Tất cả các bệnh nhân đều được tiến hành kỹ thuật MLPA để xác định đột biến đồng hợp tử xóa đoạn hoặc đột biến dị hợp tử xóa đoạn. Bệnh nhân có đột biến xóa đoạn đồng hợp tử khi không xuất hiện đỉnh tương ứng với exon bị xóa đoạn và đột biến xóa đoạn dị hợp tử khi chiều cao đỉnh bằng  $\frac{1}{2}$  so với chiều cao đỉnh của mẫu đối chứng.

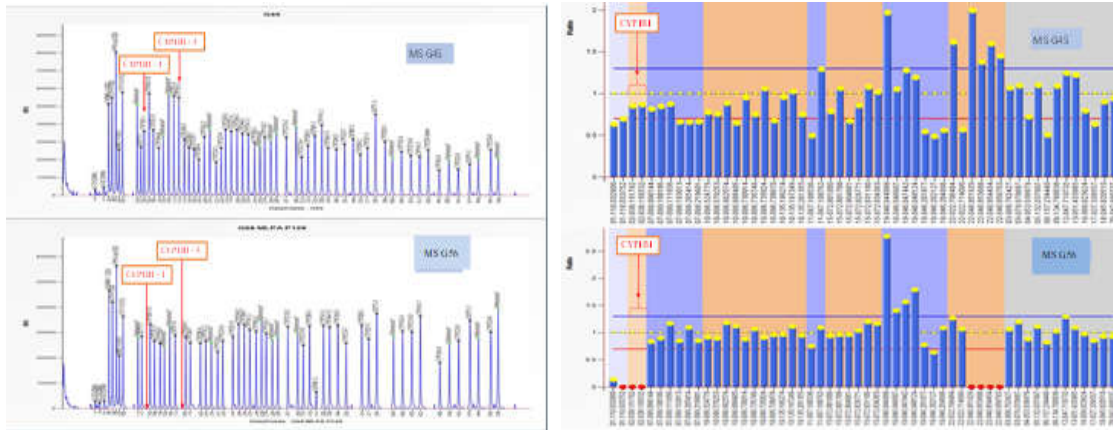
Nghiên cứu đã phát hiện 2/86 trường hợp có đột biến xóa đoạn, chiếm tỷ lệ 2,3%.



**Hình 3.7. Hình ảnh MLPA (hình trái) và kết quả tính toán (Relative Peak Area) bằng phần mềm coffalyser (hình phải) của bệnh nhân G40 và G02.**

Kết quả MLPA cho thấy bệnh nhân mã số G40 không có đột biến xóa đoạn trong khi đó bệnh nhân G02 bị đột biến xóa đoạn hoàn toàn gen *CYP1B1* bởi không xuất hiện các đỉnh tương ứng với các exon 1-3 của gen *CYP1B1* khi so sánh với kết quả của mẫu bệnh nhân MS G40.





**Hình 3.8. 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.**

Kết quả MLPA cho thấy bệnh nhân mã số G45 không có đột biến xóa đoạn trong khi đó bệnh nhân G56 bị đột biến xóa đoạn gen exon 1 đến exon 3 gen CYP1B1 bởi không xuất hiện các đỉnh tương ứng với các exon 1-3 của gen CYP1B1 khi so sánh với kết quả của mẫu bệnh nhân G45.

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. Tỷ lệ đột biến chung của gen CYP1B1**

Bằng 2 phương pháp giải trình tự gen và MLPA nghiên cứu đã xác định được 19/86 bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 chiếm tỷ lệ 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%).

**Bảng 3.7. Đặc điểm bệnh nhân mang đột biến trên gen CYP1B1**

Mã số	Exon	Đột biến		Dạng đột biến	Thể đột biến	Chú thích	Tuổi phát hiện	Triệu chứng cơ năng	Nhãn áp (mmHg)		Dấu hiệu thực thể							
		cDNA	Acid amin						Giác mạc		Đường kính ngang giác mạc (mm)		Tiền phòng		Mức độ lõm đĩa			
									MP	MT	MP	MT	MP	MT	MP	MT		
																	MP	MT
G02	2			Xóa đoạn toàn bộ exon1-3	Đồng hợp	Đột biến mới	2,5 tháng	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	38	35	Đục trắng	Đục trắng	13	13				
G08	2	c.256C>A	Q86K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	Ngay sau sinh	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	33	29	Đục	Trong	15	14	sâu	sâu	0,7	0,7
G09	2	c.475C>T	Q159X	Vô nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	1 tháng	MP: Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	25	12	Đục	Trong	12,5	12	sâu	sâu	0,8	
	2	c.652G>C	D218H	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới												
G10	2	c.475C>T	Q159X	Vô nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	Ngay sau sinh	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	24	26	Đục	Đục	12,8	12,5	sâu	sâu		
	2	c.652G>C	D218H	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới												
G11	2	c.256C>A	Q86K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	3 tháng		24	24	Đục trắng	Đục trắng	13,5	13,5	sâu	sâu	0,9	0,7
	2	c.475C>T	Q159X	Vô nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới												
G15	2	c.571DelC	L191Sfs*4	Thay đổi khung dịch mã	Đồng hợp	Đột biến mới	3 tuần	Chảy nước mắt, sợ ánh sáng	48	33	Đục trắng	Đục trắng	13	13				
G19	2	c.397G>A	A133T	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	Ngay sau sinh	Chói, sợ ánh sáng	22	38	Đục trắng	Đục trắng	12	12				
G20	2	c.80T>A	L27Q	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	2 tháng	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	9	12	Đục	Đục	12	12	sâu	sâu	0,9	0,7
	2	c.182G>A	G61E	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh												
G21	2	c.256C>A	Q86K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	3 tháng	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	32	42	Đục trắng	Đục trắng	14	14				
	2	c.592G>A	V198I	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh												



Mã số	Exon	Đột biến		Dạng đột biến	Thể đột biến	Chú thích	Tuổi phát hiện	Triệu chứng cơ năng	Nhãn áp (mmHg)		Dấu hiệu thực thể							
		cDNA	Acid amin						Giác mạc		Đường kính ngang giác mạc (mm)		Tiền phòng		Mức độ lõm đĩa			
									MP	MT	MP	MT	MP	MT	MP	MT		
																	MP	MT
G24	2	c.685G>A	E229K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh	Ngay sau sinh	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	25	26	Đục trắng	Đục trắng	13	13				
	2	c.724G>A	D242N	Sai nghĩa	Đồng hợp	Đột biến mới												
G40	2	c.652G>C	D218H	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	Ngay sau sinh	MT:Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	23	24	Đục trắng	Đục	14	14	sâu			
	2	c.685G>A	E229K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh												
G43	2	c.256C>A	Q86K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	3,5 tháng	Chói, chảy nước mắt	24	40	Trong	Đục	12	12	sâu	sâu		
G44	3	c.1094G>A	G365E	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến mới	Ngay sau sinh	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	28	27	Đục	Đục	14	14	sâu	sâu	0,9	0,9
G56				Xóa đoạn toàn bộ exon1-3	Đồng hợp	Đột biến mới	Ngay sau sinh	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	28	23	Đục trắng	Đục trắng	14	14				
G70	2	c.685G>A	E229K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh	Ngay sau sinh	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	23	29	Đục	Đục	13,2	12,8	sâu	sâu	0,7	0,4
G74	2	c.685G>A	E229K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh	Ngay sau sinh	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	30	40	Trong	Trong	14,5	14	sâu	sâu	0,6	0,6
G84	2	c.685G>A	E229K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh	6 tháng	MP:Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	12		Trong		13		sâu		0,7	
G85	2	c.685G>A	E229K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh	Ngay sau sinh	Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	32	36	Đục trắng	Đục trắng	14	14				
G86	2	c.685G>A	E229K	Sai nghĩa	Dị hợp	Đột biến gây bệnh	Ngay sau sinh	MT:Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng	23	36	Trong	Đục trắng	14	14	sâu			

\*MP: mắt phải, MT: mắt trái

Trong nghiên cứu này, có 2 bệnh nhân là anh em ruột nên khi đánh giá các dạng đột biến ở những bệnh nhân không có quan hệ huyết thống, số bệnh nhân đột biến là 18 trong tổng số 85 bệnh nhân, phân bố như sau:

**Bảng 3.8. Tỷ lệ các dạng đột biến gen CYP1B1**

	Loại đột biến					Không đột biến	Tổng số
	Sai nghĩa	Vô nghĩa	Xóa đoạn	Lặp đoạn	Thay đổi khung dịch mã		
Số bệnh nhân (n)	15	3	2	0	1	64	85
%	17,6	3,5	2,4	0	1,2	75,3	100

18 bệnh nhân trong nghiên cứu mang 21 dạng đột biến khác nhau, trong đó đột biến sai nghĩa phát hiện được ở 15/85 bệnh nhân là đột biến hay gặp nhất (17,6%). Đột biến vô nghĩa phát hiện được ở 3/85 bệnh nhân (3,5%). Đột biến xóa đoạn gặp ở 2 bệnh nhân (2,4%) và đột biến làm thay đổi khung dịch mã ở 1 bệnh nhân (1,2%). Nghiên cứu không phát hiện trường hợp nào mang đột biến dạng lặp đoạn.

### 3.2.5. 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:

### 3.2.5.1. Mối liên quan với thời gian phát hiện bệnh

**Bảng 3.9. Mối liên quan giữa thời gian phát hiện bệnh và đột biến gen**

Tình trạng đột biến	Số bệnh nhân	Thời gian phát hiện bệnh (tháng)	Sớm nhất (tháng)	Muộn nhất (tháng)
		Trung bình±SD		
Đột biến	18	1,21±1,75	Ngay khi sinh	6
Không đột biến	67	2,99±3,88	Ngay khi sinh	11
Chung	85	2,61±3,60	Ngay khi sinh	11
p=0,006 (T-Test)				

Thời gian phát hiện bệnh của nhóm bệnh nhân có mang đột biến gen CYP1B1 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).

### 3.2.5.2. Mối liên quan với giới tính

**Bảng 3.10. Mối liên quan giữa giới tính và tình trạng đột biến gen**

Tình trạng đột biến		Giới tính		Tổng	p
		Nam	Nữ		
Đột biến	n	13	5	18	
	%	25,0%	15,2%	21,2%	
Không đột biến	n	39	28	67	0,279 (Test $\chi^2$ )
	%	75,0%	84,8%	78,8%	
Tổng	n	52	33	85	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Tỷ lệ đột biến của nam là 25,0% cao hơn tỷ lệ đột biến của nữ là 15,2%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05 - Test  $\chi^2$ ).

### 3.2.5.3. Mối liên quan giữa tiền sử với tình trạng đột biến gen CYP1B1

**Bảng 3.11. Mối liên quan giữa tiền sử mắc bệnh của mẹ khi mang thai với tình trạng đột biến gen CYP1B1**

		Tình trạng mắc bệnh của mẹ khi mang thai		Tổng	p
		Có	Không		
Nhóm	Đột biến	n 3	15	18	0,062 (Test Fisher Exact)
		% 60,0%	18,8%	21,2%	
Nhóm	Không đột biến	n 2	65	67	
		% 40,0%	81,2%	78,8%	
Tổng		n 5	80	85	
		% 100,0%	100,0%	100,0%	

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 mẹ không bị bệnh khi mang thai là 18,8%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p=0,062$  (Test Fisher Exact).

### 3.2.5.4. Mối liên quan giữa tình trạng đột biến gen với số mắt bị bệnh

**Bảng 3.12. Mối liên quan giữa tình trạng đột biến gen với số mắt bị bệnh**

		Phân loại số mắt				Tổng	p
		1 mắt		2 mắt			
Nhóm	Đột biến	n 1	5,6%	17	94,4%	18	0,009 (Test $\chi^2$ )
		% 3,8%		28,8%		21,2%	
Nhóm	Không đột biến	n 25	37,3%	42	62,7%	67	
		% 96,2%		71,2%		78,8%	
Tổng		n 26	30,6%	59	69,4%	85	100%
		% 100,0%		100,0%		100,0%	
OR						10,12	
Khoảng tin cậy 95%						1,27–80,73	

Tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 trong nhóm bệnh nhân bị bệnh cả hai mắt là 28,8% cao hơn tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 trong nhóm bệnh nhân bị bệnh một mắt là 3,8% một cách có ý nghĩa thống kê với  $p=0,009$  (Test  $\chi^2$ ).

Khả năng xuất hiện bệnh ở 2 mắt trong nhóm 18 bệnh nhân mang đột biến CYP1B1 cao gấp 10,12 lần nhóm 67 bệnh nhân không mang đột biến (OR=10,12, với khoảng tin cậy 95% 1,27–80,73).

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

#### Giai đoạn bệnh

**Bảng 3.13. Mối liên quan giữa giai đoạn bệnh với tình trạng đột biến gen**

		Phân loại giai đoạn			Tổng	p
		Nhẹ	Trung bình	Nặng		
Nhóm	Đột biến	n	1	12	22	0,000 (Fisher Exact - Test)
		%	25,0%	12,9%	46,8%	
	Không đột biến	n	3	81	25	
		%	75,0%	87,1%	53,2%	
Tổng	n	4	93	47	144	
	%	100%	100%	100%	100%	

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

**Bảng 3.14. Mối liên quan giữa nhãn áp với đột biến gen CYP1B1**

Tình trạng đột biến	Số mắt	Nhãn áp trung bình (mmHg)	Giá trị thấp nhất (mmHg)	Giá trị cao nhất (mmHg)
Đột biến	34	28,03±8,89	9	48
Không đột biến	109	26,74±8,27	10	55
Chung	143	27,05±8,41	9	55
p=0,438 (T-Test)				

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

**Bảng 3.15. Mối liên quan giữa đường kính giác mạc với đột biến gen**

Tình trạng đột biến	Số mắt	Đường kính giác mạc trung bình (mm)		Giá trị thấp nhất(mm)		Giá trị cao nhất(mm)	
		Ngang	Dọc	Ngang	Dọc	Ngang	Dọc
Đột biến	35	13,22±0,87	12,47±0,75	11,5	11	15,0	14
Không đột biến	109	12,99±0,84	12,10±0,82	11,5	11	16,0	14
Chung	144	13,04±0,85	12,19±0,82	11,5	11	16,0	14
		p=0,156	p=0,018	(T-Test)			

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, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (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, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,018, T-Test).

### Chiều dài trục nhãn cầu

**Bảng 3.16. Mối liên quan giữa chiều dài trục nhãn cầu với đột biến gen**

Tình trạng đột biến	Số mắt	Chiều dài trục nhãn cầu (mm)	Giá trị thấp nhất (mm)	Giá trị cao nhất (mm)
Đột biến	35	23,21±2,95	18,8	33,1
Không đột biến	109	23,64±3,42	15,7	33,0
Chung	144	23,53±3,30	15,7	33,1
p=0,523 (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, kết quả như sau:

**Bảng 3.17. Mối liên quan giữa mức độ lõm đĩa với đột biến gen CYP1B1**

Tình trạng đột biến	Số mắt	Mức độ lõm đĩa	Giá trị thấp nhất	Giá trị cao nhất
Đột biến	14	0,73±0,14	0,4	0,9
Không đột biến	47	0,72±0,23	0,2	0,9
Chung	61	0,72±0,21	0,2	0,9
p=0,821 (T-Test)				

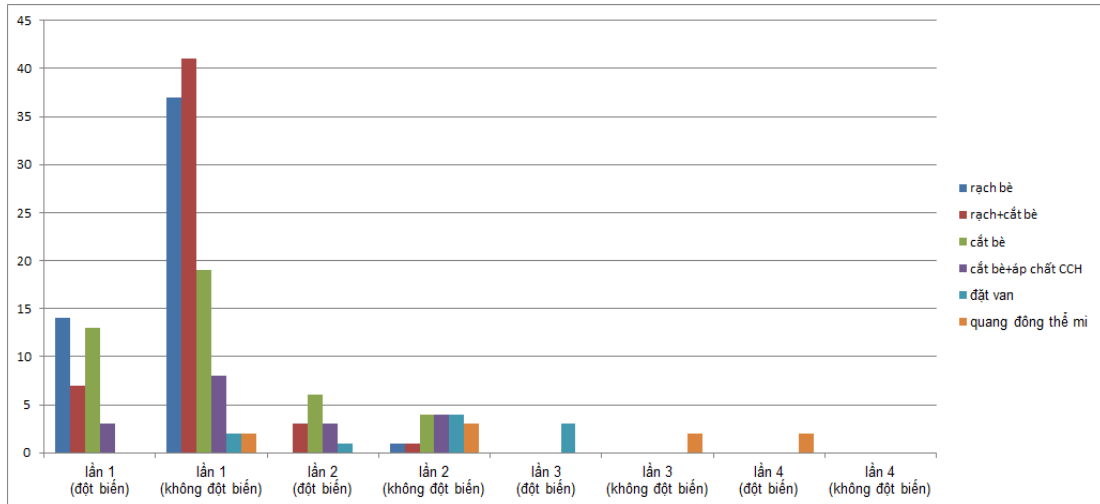
Mức độ lõm đĩa trung bình của nhóm có đột biến gen là 0,73±0,14 không khác biệt so với mức độ lõm đĩa trung bình của nhóm không đột biến là 0,72±0,23 ( $p>0,05$ , T-Test).

**Phẫu thuật****Bảng 3.18. Mối liên quan giữa số lần phẫu thuật với tình trạng đột biến**

		Số lần phẫu thuật				Tổng	
		1 lần	2 lần	3 lần	4 lần		
Nhóm	Đột biến	n	24	7	1	2	34
		%	70,6%	20,6%	2,9%	5,9%	100%
	Không đột biến	n	93	15	2	0	110
		%	84,5%	13,6%	1,8%	0%	100%
Tổng		n	117	22	3	2	144
		%	81,2%	15,3%	2,1%	1,4%	100%
0,047 (Fisher Exact - Test)							

Tỷ lệ số mắt phải mổ lần 2, lần 3 của nhóm đột biến lần lượt là 20,6%, 2,9% cao hơn tỷ lệ phải mổ lần 2, lần 3 của nhóm không đột biến tương ứng là 13,6%, 1,8%. Bên cạnh đó ở nhóm đột biến có 2 mắt của cùng 1 bệnh nhân phải mổ lại lần 4 chiếm 5,9%, nhóm không có đột biến không có bệnh nhân nào phải mổ lại lần 4. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p=0,047$  (Fisher Exact-Test).





**Hình 3.9. Mối liên quan giữa phương pháp phẫu thuật với đột biến gen**

Các phương pháp phẫu thuật bao gồm rạch bì, cắt rạch bì, cắt bì 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  $p > 0,05$  (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:

**Bảng 3.19. Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh với tình trạng đột biến**

		Lâm sàng		Tổng	p
		Ngay sau sinh	Các trường hợp còn lại		
<b>Đột biến</b>	n	8	10	18	0,503 (Test $\chi^2$ )
		44,4%	55,6%	100%	
	%	<b>25,0%</b>	18,9%	21,2%	
<b>Không đột biến</b>	n	24	43	67	
		35,8%	64,2%	100%	
	%	75,0%	81,1%	78,8%	
<b>Tổng</b>	n	32	53	85	
		37,6%	62,4%	100%	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
<b>OR</b>					
(khoảng tin cậy 95%)				1,43 (0,50–4,12)	

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% có chứa 1.

**Bảng 3.20. Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh và số mắt bị bệnh với tình trạng đột biến**

		Lâm sàng		Tổng	p
		Ngay sau sinh + 2 mắt	Các trường hợp còn lại		
<b>Đột biến</b>	n	10	8	18	0,031
	%	55,6%	44,4%	100%	
<b>Không đột biến</b>	n	19	48	67	(Test $\chi^2$ )
	%	28,4%	71,6%	100%	
<b>Tổng</b>	n	29	56	85	
	%	34,1%	65,9%	100%	
<b>OR</b>		3,16			
(khoảng tin cậy 95%)		(1,08–9,21)			

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% không chứa 1.

**Bảng 3.21. Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh, số mắt bị bệnh và giai đoạn bệnh với tình trạng đột biến**

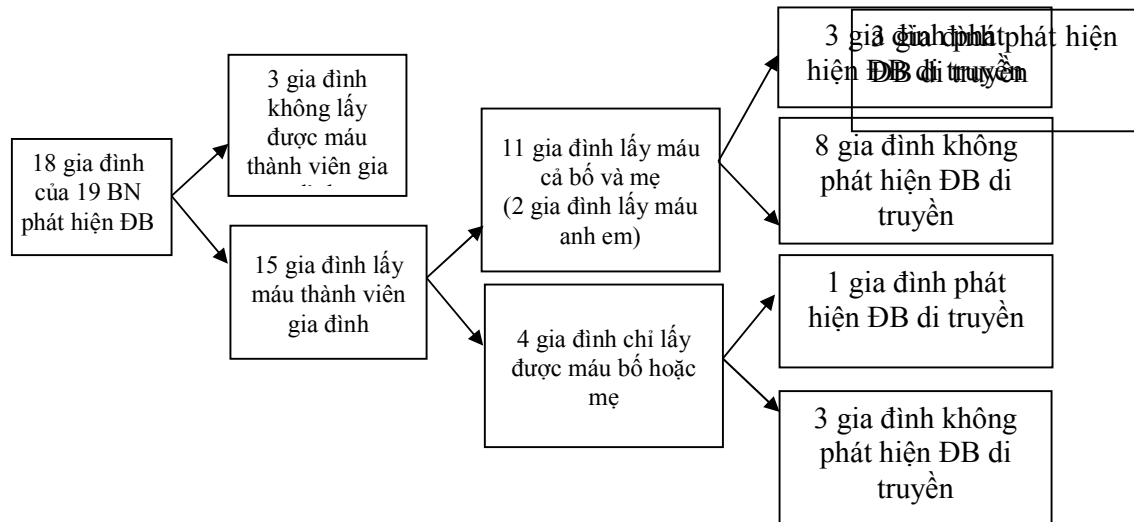
			Lâm sàng		Tổng	p
			Ngay sau sinh + 2mắt + giai đoạn nặng	Các trường hợp còn lại		
<b>Đột biến</b>	n	7	38,9%	11 61,1%	18 100%	0,002 (Test $\chi^2$ )
	%		<b>53,8%</b>	15,3%	21,2%	
<b>Không đột biến</b>	n	6	9,0%	61 91,0%	67 100%	
	%		46,2%	84,7%	78,8%	
<b>Tổng</b>	n	13	15,3%	72 84,7%	85 100%	
	%		100,0%	100,0%	100,0%	
<b>OR</b> (khoảng tin cậy 95%)			6,47 (1,83–22,93)			

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% không chứa 1.

### 3.3. Kết quả phát hiện người lành mang gen

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 lành mang gen bệnh. 1 người em trai bệnh nhân mang đột biến và biểu hiện glôcôm bẩm sinh nguyên phát giống anh trai mình.



**Bảng 3.22. Tỷ lệ phát hiện đột biến gen CYP1B1 di truyền qua các thế hệ**

Gia đình	Di truyền	Không di truyền	Tổng
<b>Lấy được máu bố và mẹ BN</b>	3	8	11
	27,3%	72,3%	100%
<b>Lấy được máu bố hoặc mẹ BN</b>	1	3	4
<b>Không lấy được máu bố hoặc mẹ BN</b>			3
<b>Tổng số</b>	4	11	18

Như vậy 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:

**Bảng 3.23. Đột biến gen CYP1B1 của các thành viên gia đình bệnh nhân**

Mã số	Bệnh nhân		Người lành mang gen bệnh					
			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:	Dị hợp
							p.E229K	
								Em gái: không đột biến

Ngoài ra, chúng tôi phát hiện các đa hình gen trên các thành viên gia đình bệnh nhân khác.

**Bảng 3.24. Kết quả phát hiện đa hình gen một số gia đình bệnh nhân**

Mã số	Bệnh nhân		Người lành mang gen bệnh			
			Bố bệnh nhân		Mẹ bệnh nhân	
	Đa hình gen	Thể	Đa hình gen	Thể	Đa hình gen	Thể
G08	p.R48G	Đồng hợp	p.R48G	Dị hợp	p.A119S	Dị hợp
	p.A119S	Đồng hợp	p.A119S	Dị hợp		
G11	p.L432V	Dị hợp	Không		p.L432V	Dị hợp
G21	p.L432V	Dị hợp	Không		Không	
G43	p.L432V	Dị hợp	Không		p.L432V	Dị hợp

Kết quả trên cho thấy, người bố và người mẹ có truyền cả đột biến và đa hình gen cho con của họ.

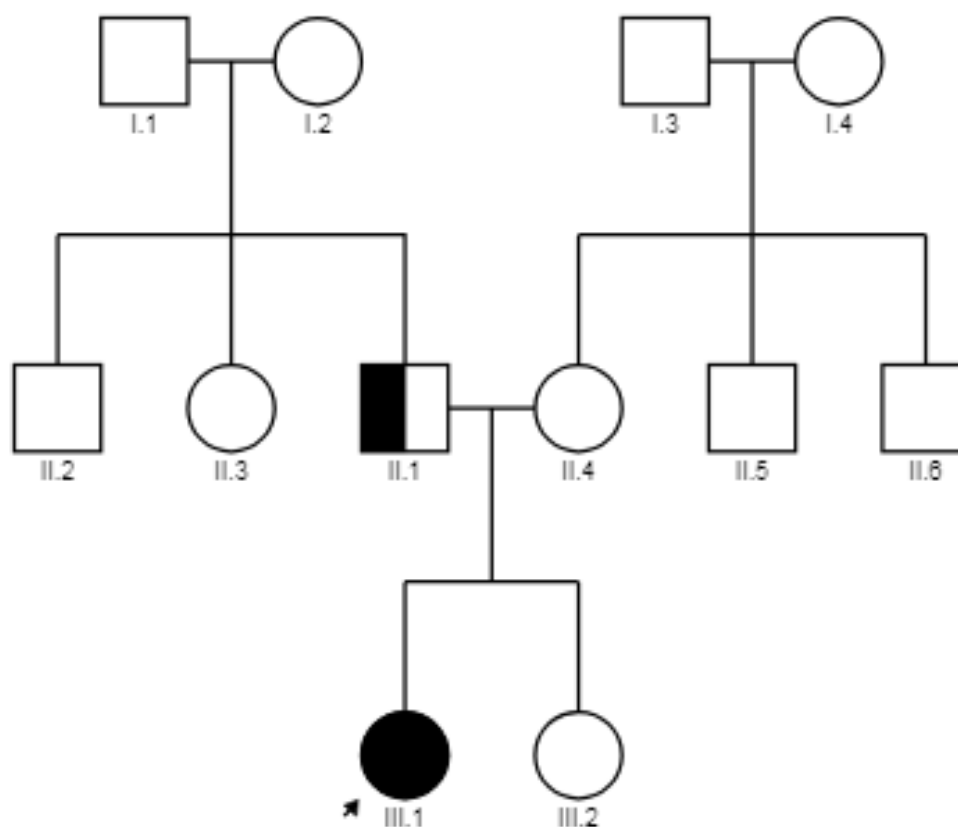
### **3.3.1. Phả hệ có di truyền đột biến**

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.



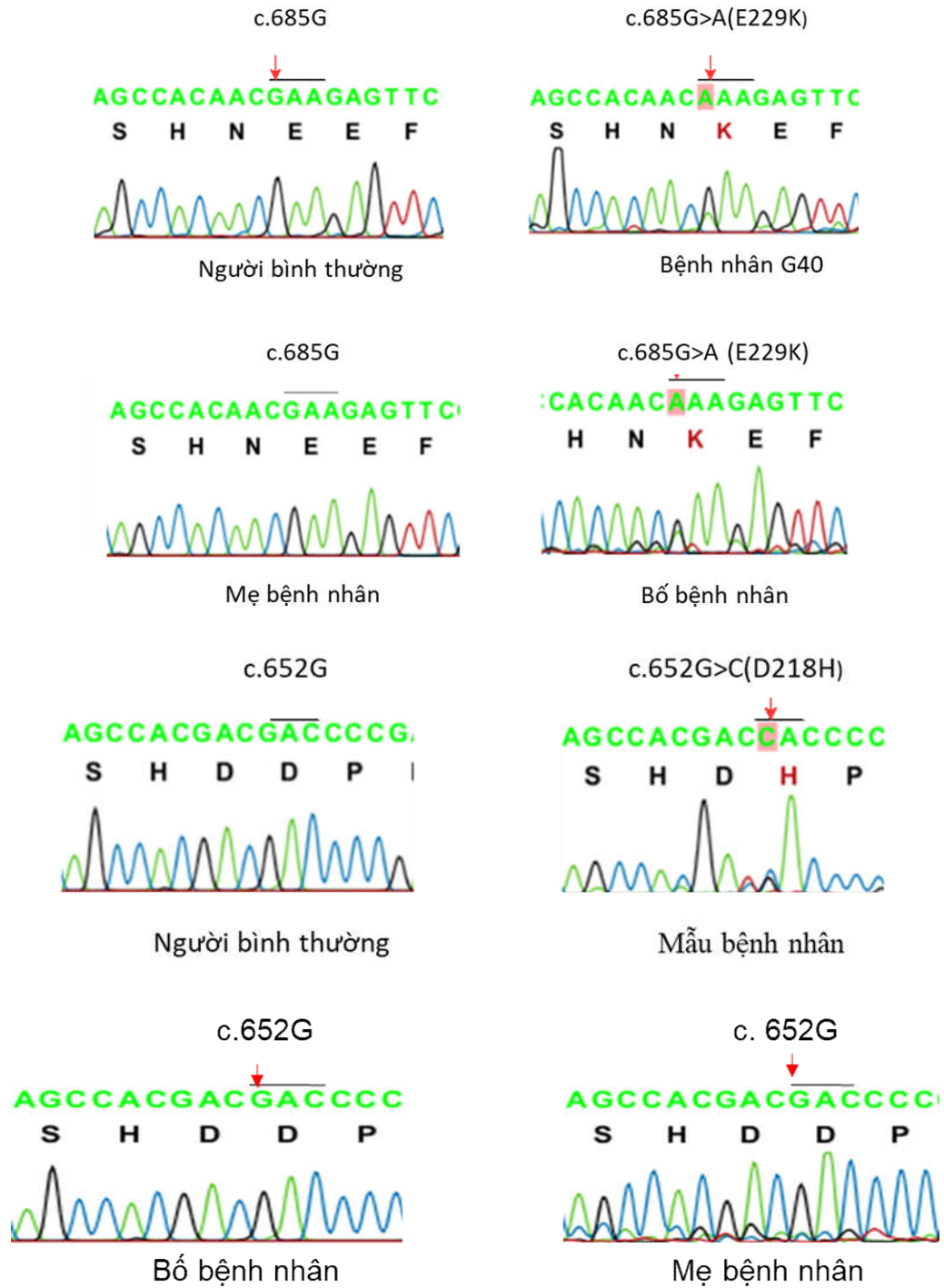
**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G40**



**Hình 3.10. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G40**

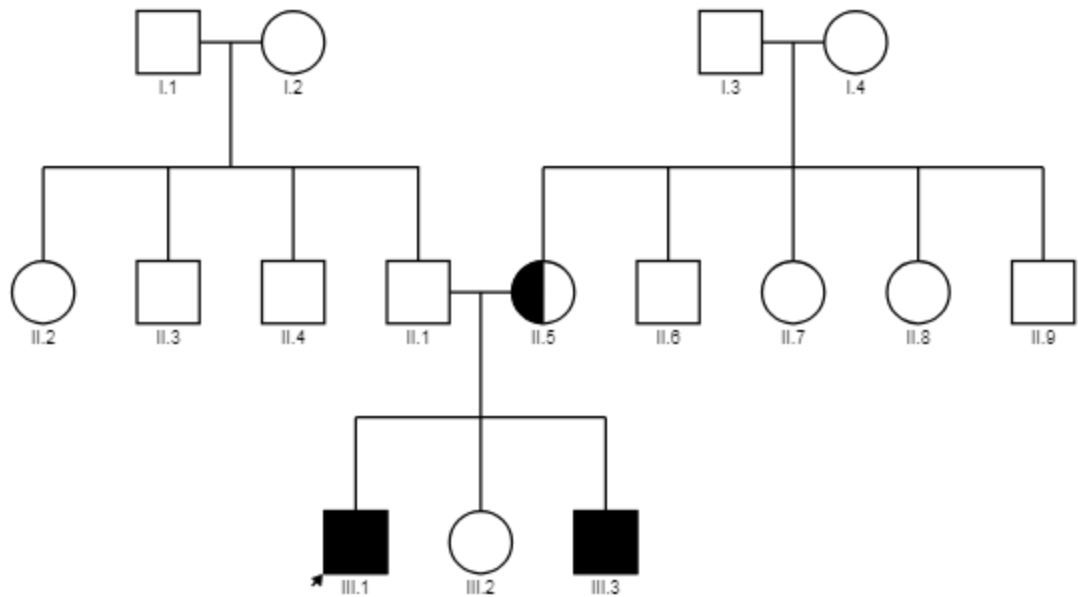
Kết quả giải trình tự gen:

- Bệnh nhân mang 1 đột biến gen p.E229K dị hợp tử và 1 đột biến dị hợp tử kết hợp p.D218H
- Bố bệnh nhân cũng mang đột biến p.E229K thể dị hợp tử.
- Mẹ bệnh nhân không phát hiện đột biến.
- Bố, mẹ bệnh nhân không phát hiện đột biến p.D218H.



**Hình 3.11. Hình ảnh đột biến gen của gia đình bệnh nhân mã số G40**

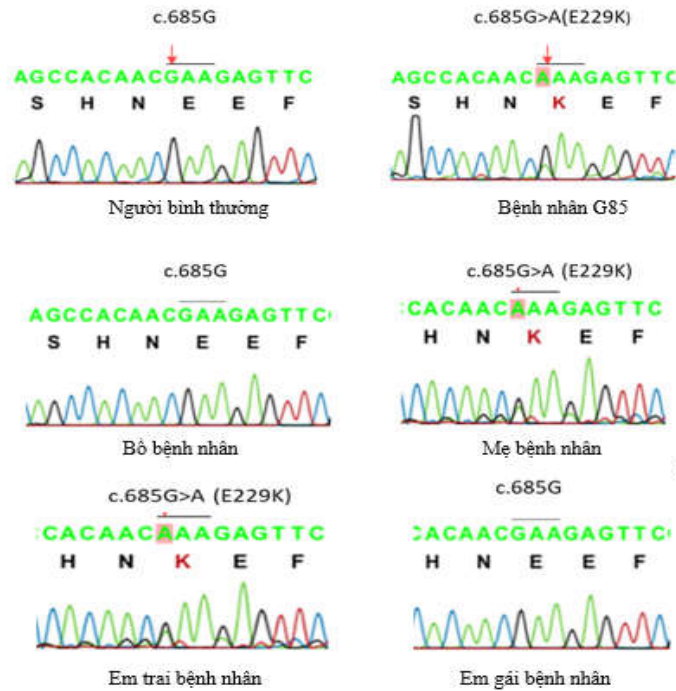
**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G85**



**Hình 3.12. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G85**

Kết quả giải trình tự gen thấy:

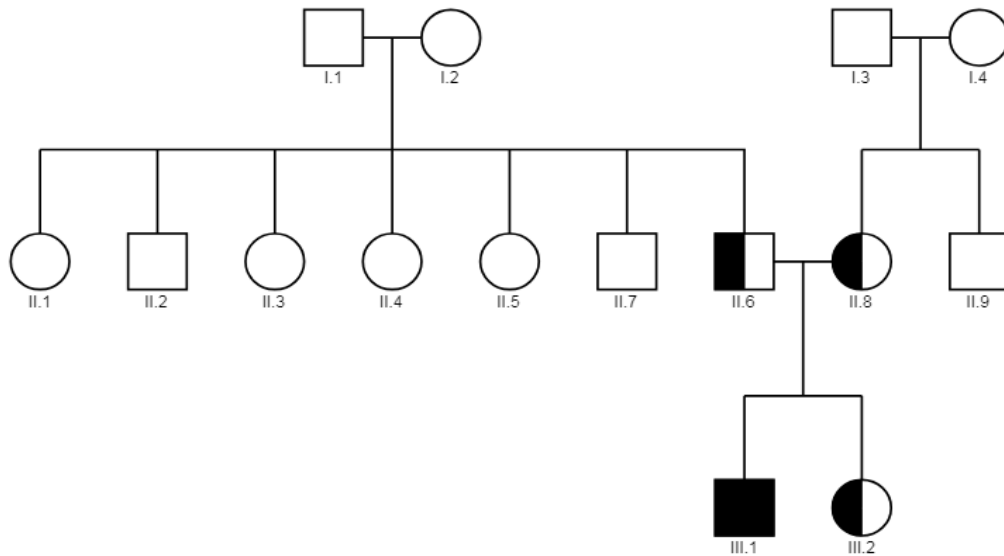
- Bệnh nhân mang 1 đột biến gen p.E229K dị hợp tử
- Em trai bệnh nhân cũng mang 1 đột biến gen p.E229K dị hợp tử và biểu hiện bệnh giống bệnh nhân
- Mẹ bệnh nhân cũng mang đột biến p.E229K thể dị hợp tử.
- Bố và em gái bệnh nhân không phát hiện đột biến và không mắc bệnh.



**Hình 3.13. Hình ảnh đột biến gen của gia đình bệnh nhân mã số G85**

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

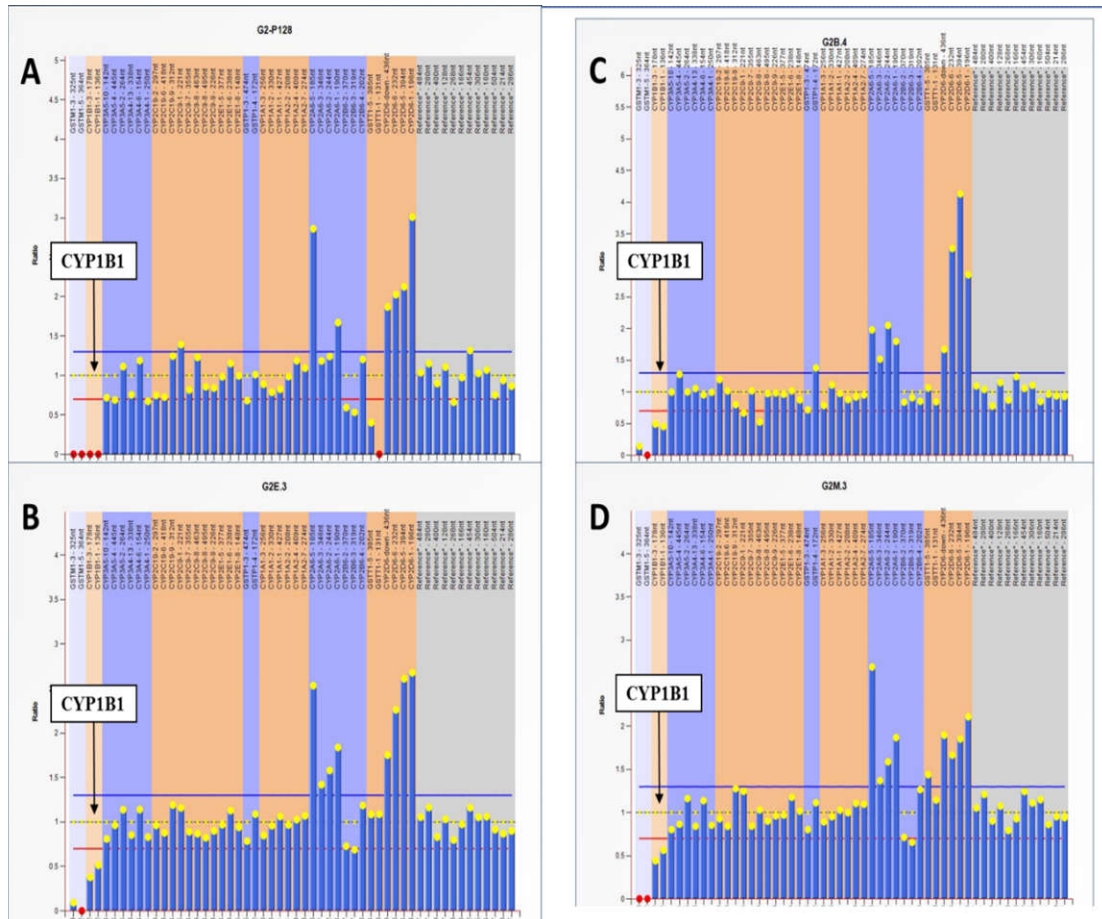
**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G02:**



**Hình 3.14. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G02**

Kết quả MLPA cho thấy:

- Bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn đồng hợp tử exon 1-3
- Bố, mẹ và em gái bệnh nhân là người lành mang đột biến xóa đoạn dị hợp tử exon 1-3.



**Hình 3.15. Hình ảnh MLPA của các thành viên gia đình bệnh nhân mã số G02. Các đỉnh tương ứng với vị trí exon 1, exon 3 của gen CYP1B1.**

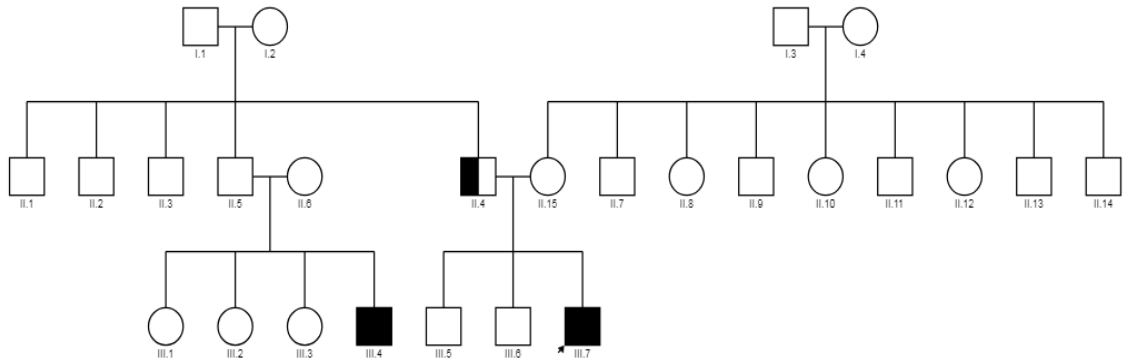
*A. Hình ảnh xóa đoạn đồng hợp tử exon 1-3 gen CYP1B1 của bệnh nhân G02.*

*B. Hình ảnh xóa đoạn dị hợp tử exon 1-3 gen CYP1B1 của em gái bệnh nhân G02.*

*C. Hình ảnh xóa đoạn dị hợp tử exon 1-3 gen CYP1B1 của bố bệnh nhân G02.*

*D. Hình ảnh xóa đoạn dị hợp tử exon 1-3 gen CYP1B1 của mẹ bệnh nhân G02.*

**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G56**



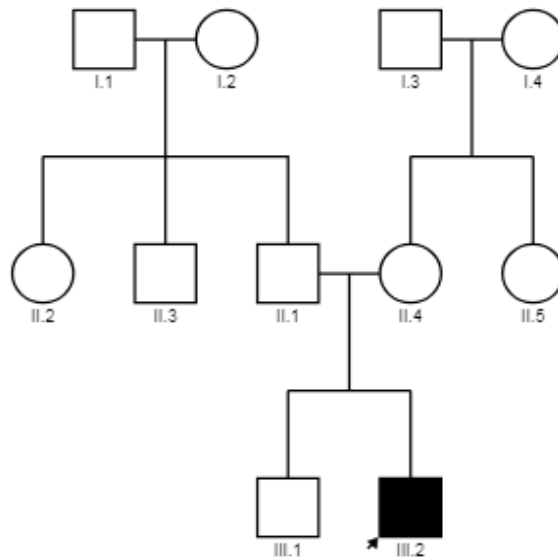
**Hình 3.16. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G56**

Kết quả MLPA cho thấy bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn đồng hợp tử exon 1-3. Bố bệnh nhân là người lành mang đột biến xóa đoạn dị hợp tử 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 được đột biến di truyền từ bố mẹ. Tuy nhiên, phát hiện một số đa hình gen có di truyền từ bố mẹ.

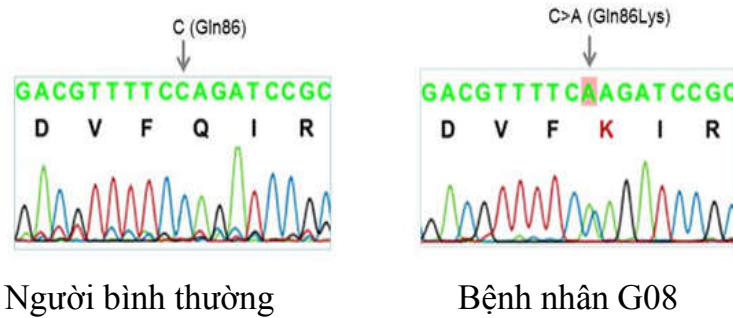
**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G08**



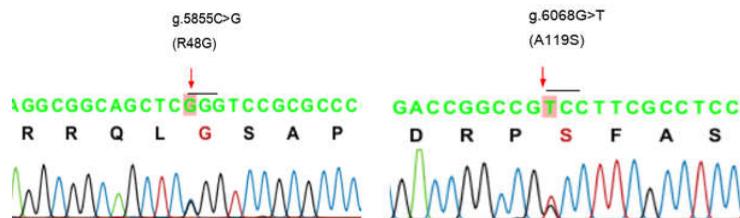
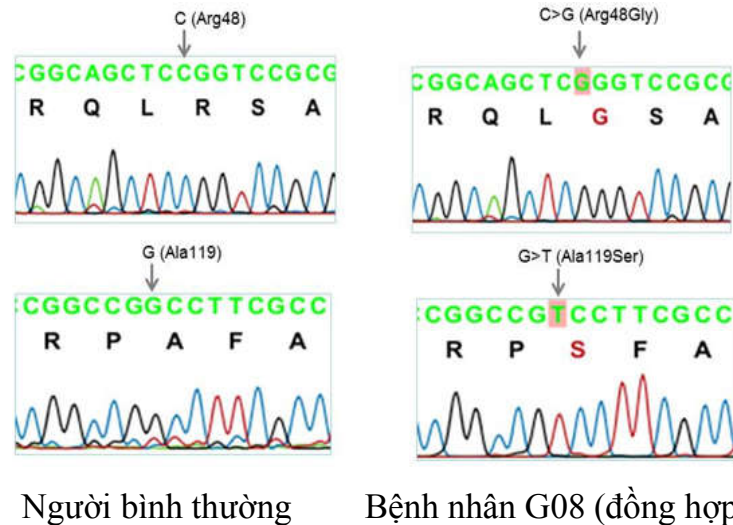
**Hình 3.17. Phả hệ gia đình bệnh nhân G08**

Kết quả giải trình tự gen thấy:

- Bệnh nhân mang 1 đột biến gen p.Q86K dị hợp tử và 2 đa hình đơn p.R48G, p.A119S đồng hợp tử.
- Bố mẹ và anh trai bệnh nhân (10 tuổi) không phát hiện đột biến.
- Đa hình đơn p.R48G thể dị hợp phát hiện được ở bố bệnh nhân, đa hình đơn p.A119S thể dị hợp tử phát hiện được ở cả bố và mẹ bệnh nhân

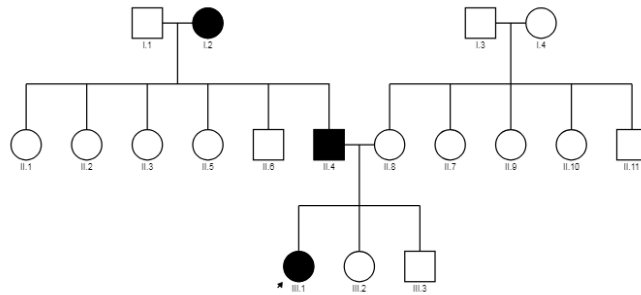


**Hình 3.18. Hình ảnh đột biến p.Q86K ở bệnh nhân G08**



**Hình 3.19. Hình ảnh đa hình gen ở gia đình bệnh nhân G08**

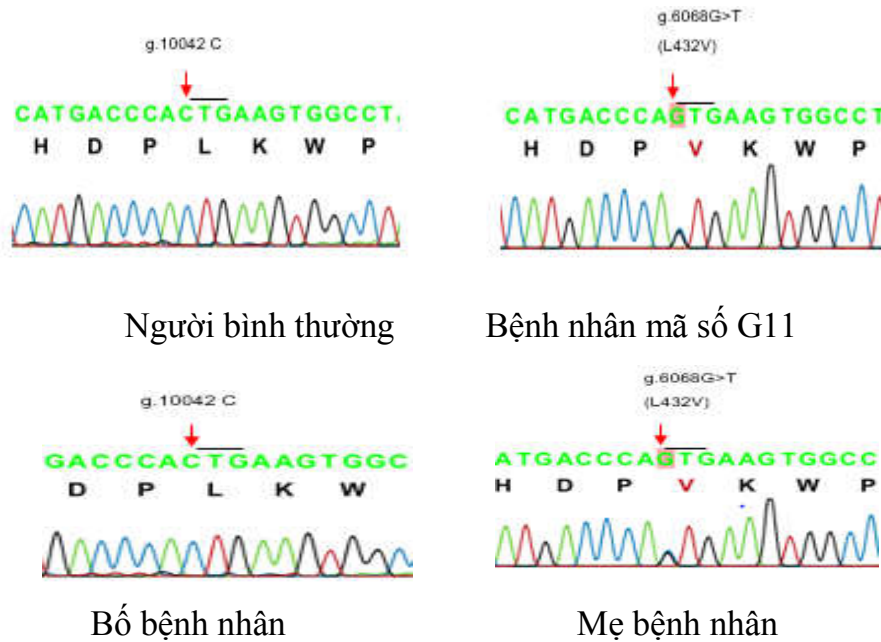
**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G11**



**Hình 3.20. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G11**

Kết quả giải trình tự gen thấy:

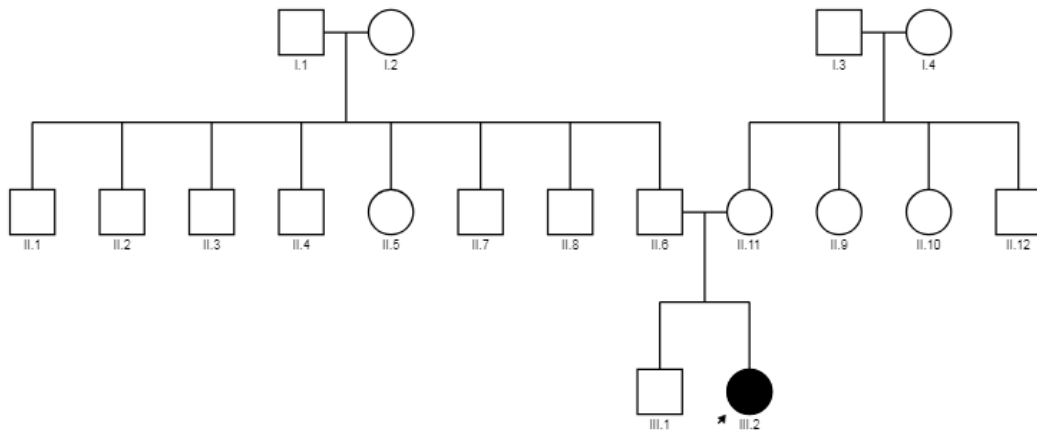
- Bệnh nhân mang 1 đột biến p.Q86K và đột biến tạo mã kết thúc sớm p.Q159X, cả hai đột biến này đều là đột biến mới và ở trạng thái dị hợp tử. Bệnh nhân mang đa hình đơn p.L432V dị hợp.
- Bố và bà nội bệnh nhân bị mù do glôcôm.
- Mẹ, em trai và em gái bệnh nhân bình thường. Mẹ bệnh nhân mang đa hình gen p.L432V.



**Hình 3.21. Đa hình gen p.L432V ở gia đình G11**



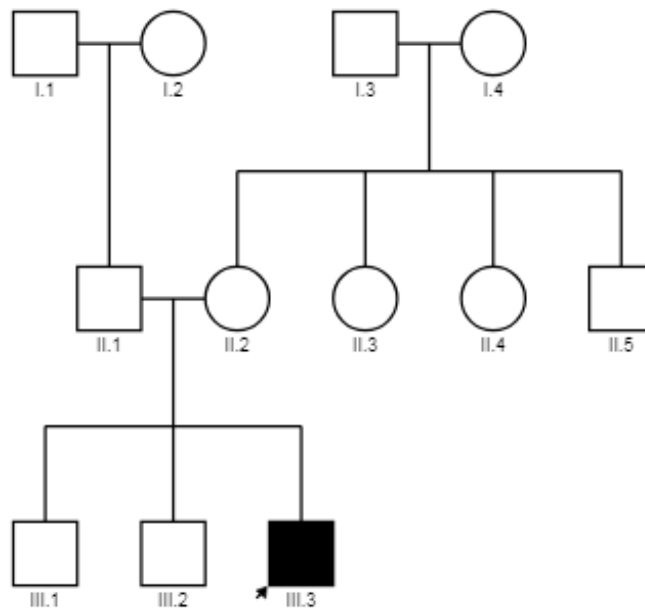
**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G19**



**Hình 3.22. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G19**

Bệnh nhân (III.2) mang đột biến p.A133T ở trạng thái dị hợp tử là đột biến mới phát sinh. Bố (II.6), mẹ (II.11) và anh trai bệnh nhân (III.1) đều không mang đột biến này.

**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G20**



**Hình 3.23. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G20**

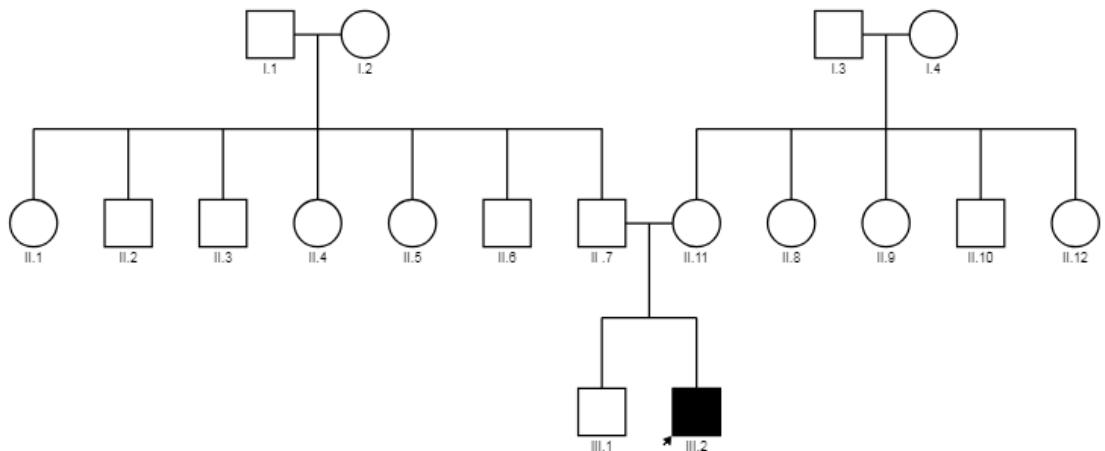
Kết quả giải trình tự gen thấy:

- Bệnh nhân mang 2 đột biến gen **CYP1B1** dạng dị hợp tử p.L27Q và p.G61E.

- Bà nội bệnh nhân có tiền sử tiếp xúc chất độc màu da cam, bố bệnh nhân bị cận thị rất nặng tuy nhiên cả bố mẹ bệnh nhân đều không phát hiện mang gen đột biến. Mẹ bệnh nhân có sử dụng thuốc trầm cảm trong khi mang thai bệnh nhân.

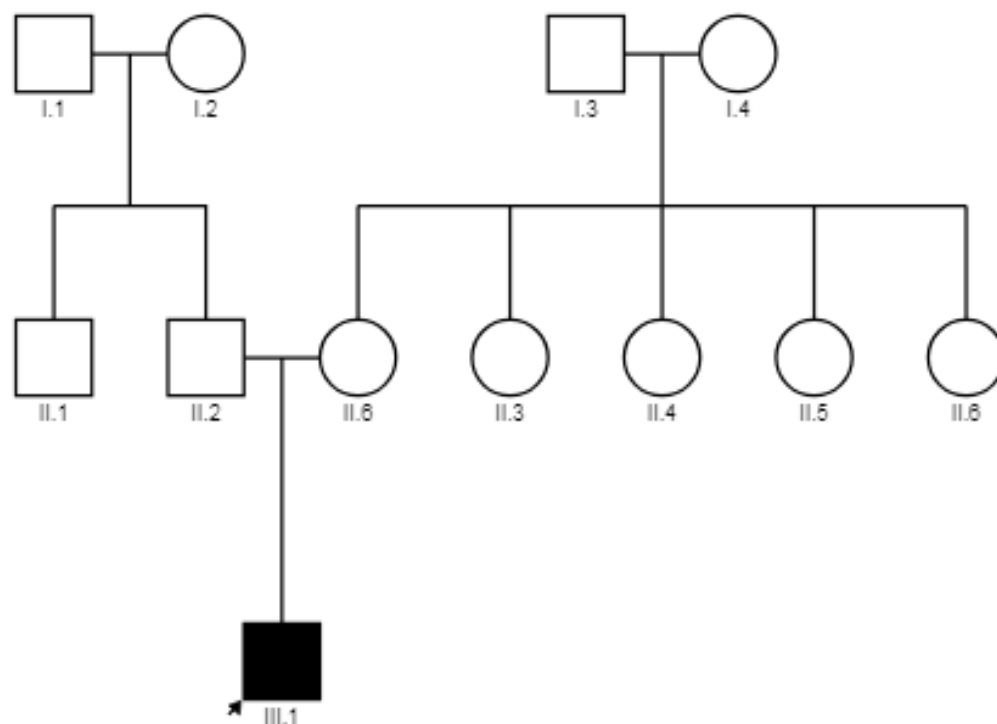
**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G21**

Ở phả hệ gia đình G21, bệnh nhân (III.2) là thành viên duy nhất mang đột biến điểm p.Q86K kết hợp với một đột biến điểm khác p.V198I, cả hai đột biến này đều ở trạng thái dị hợp tử. Bệnh nhân mang đa hình gen p.L432V dạng dị hợp tử. Làm xét nghiệm máu bố mẹ không phát hiện đột biến nào. Anh trai bệnh nhân (III.1) hoàn toàn bình thường.



**Hình 3.24. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G21**

**\* Phả hệ gia đình bệnh nhân G24**



**Hình 3.25. Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G24**

Bệnh nhân mã số 24 là con một trong gia đình, mang đột biến p.D242N ở trạng thái đồng hợp tử, phối hợp với đột biến p.E229K trạng thái dị hợp. Không tìm thấy đột biến di truyền ở bố mẹ bệnh nhân. Gia đình bệnh nhân có tiền sử di truyền tình trạng mù màu vàng, cam, xanh lá cây. Ông nội, bố và chú ruột bệnh nhân đều không phân biệt được những màu này.

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Một số đặc điểm của bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát

##### 4.1.1. Sự phân bố bệnh nhân theo tuổi phát hiện bệnh

Bệnh glôcôm bẩm sinh thường biểu hiện rất sớm trong năm đầu đời ở trẻ. Nghiên cứu của chúng tôi trong tổng số 86 bệnh nhân mắc bệnh có 58,2% trẻ được phát hiện bệnh khi dưới 1 tháng tuổi, trong đó 47,7% gia đình thấy bất thường ở mắt trẻ ngay lúc mới sinh và muộn nhất là 11 tháng. Thời gian phát hiện bệnh trung bình là  $2,58 \pm 3,59$  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 [61]. 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 [62]. Một nghiên cứu khác trên 116 bệnh nhân dưới 3 tuổi ở Trung Quốc cho thấy tuổi phát hiện bệnh trung bình là 4 tháng tuổi [63].

##### 4.1.2. Sự phân bố bệnh nhân theo giới

Trong 86 bệnh nhân, tỷ lệ nam là 61,6% cao gấp 1,6 lần nữ là 38,4%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p=0,031$ . Kết quả tương đương với nghiên cứu của Đỗ Tấn, tỷ lệ nam:nữ là 1,3:1 [61]. Tác giả Yuhong Chen và cộng sự nghiên cứu thấy tỷ lệ giới trong bệnh này ở Trung Quốc giữa nam:nữ là 3:1 [64]. Trong khi đó một nghiên cứu khác tại Mỹ cho thấy không có sự khác biệt về giới cụ thể tỷ lệ 55,3% nam và 44,7% nữ [6].

So sánh với các nghiên cứu trên thế giới về tỷ lệ giới tính thì nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự, bệnh nhân nam mắc bệnh nhiều hơn bệnh nhân nữ tuy chênh lệch không nhiều.

Tỷ lệ bệnh nhân nam cao hơn ở Việt Nam cũng như ở Trung Quốc có thể do trẻ nam thường được gia đình quan tâm hơn trẻ nữ hoặc do có sự mất cân bằng giới tính trong dân số (trẻ nam mới sinh nhiều hơn trẻ nữ). Tuy nhiên, theo lý thuyết tỷ lệ mắc bệnh ở trẻ nam và nữ gần bằng nhau vì bệnh glôcôm do đột biến gen lặn trên nhiễm sắc thể thường gây nên.

#### **4.1.3. Tiền sử bệnh nhân và gia đình**

Trong số 86 bệnh nhân, 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**

Theo y văn, tỷ lệ bệnh xảy ra cả hai mắt trong glôcôm bẩm sinh nguyên phát từ 65%-80% [1]. Ở nghiên cứu này, số bệnh nhân biểu hiện bệnh cả hai mắt là 60 bệnh nhân (chiếm 69,8%) nhiều hơn số bệnh nhân biểu hiện bệnh ở 1 mắt là 26 bệnh nhân (chiếm 30,2%). Trong số 26 bệnh nhân bị bệnh một mắt, số lượng biểu hiện bệnh ở mắt phải và mắt trái là như nhau (chiếm 50%).

Như vậy 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% [62]. Nghiên cứu tại Trung Quốc năm 2008 tỷ lệ 2 mắt:1 mắt là 2:1 [63].

#### **4.1.5. Giai đoạn bệnh của mắt bệnh nhân**

146 mắt nghiên cứu được phân thành 3 giai đoạn bệnh (theo Al-Hazmi) dựa vào đặc điểm về nhãn áp, đường kính và mức độ đục giác mạc [40].

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 [61].

#### **4.1.6. Triệu chứng cơ năng**

Các mắt bệnh glôcôm có triệu chứng cơ năng hay gặp nhất là sợ ánh sáng (84,9%), chói (80,1%), chảy nước mắt (82,2%). 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 [65].

#### **4.1.7. Dấu hiệu thực thể**

Kết quả nhãn áp trung bình của nghiên cứu đo bằng nhãn áp kế Icare là  $27,11 \pm 8,41$  mmHg, thấp nhất là 9 mmHg, cao nhất là 55 mmHg. Nghiên cứu tại Ai Cập (2018) cho thấy khi đo nhãn áp bằng Tonopen, nhãn áp trung bình của nhóm bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát là  $30,1 \pm 6,3$  mmHg, thấp nhất là 19 mmHg cao nhất là 43 mmHg [66]. Nhãn áp trung bình của nhóm 39 bệnh nhân Tây Ban Nha (69 mắt) là  $25,4 \pm 7,1$  mmHg (nhãn áp kế Perkins) [65].

Nghiên cứu dùng siêu âm A để đo chiều dài trục nhãn cầu của bệnh nhân, kết quả thu được như sau: chiều dài trục nhãn cầu trung bình là  $23,52 \pm 3,28$  mm, dài nhất là 33,10 mm, ngắn nhất là 15,70 mm. Tuy nhiên đây là dấu hiệu ít chính xác vì trẻ thường quấy khóc khi siêu âm dẫn đến sai số khi đo.

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 mờ 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. Các nghiên cứu của các tác giả trước đây như Kluys Ken, Aminlary thường đánh giá đường kính giác mạc theo chiều ngang. Đường kính ngang giác mạc trung bình khi trẻ mới sinh là 10-10,5mm và tăng thêm 0,5-1mm sau một năm, trong năm đầu nếu đường kính ngang lớn hơn 12mm là dấu hiệu rất nghi ngờ của glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Trong nghiên cứu của chúng tôi đường kính ngang giác mạc trung bình của 146 mắt đo được trong nghiên cứu là  $13,06 \pm 0,85$ mm, 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  $12,80 \pm 1,10$ mm, lớn nhất là 16mm, nhỏ nhất là 11mm [66]. Rạn màng Descemet của giác mạc hay gọi là vết Haabs là vết trắng ngang khi ở trung tâm hoặc song song với rìa khi ở chu biên giác mạc. 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% [62], [67].

Nghiên cứu quan sát được tiền phòng ở một số bệnh nhân đều thấy tiền phòng sâu, tuy nhiên việc soi góc tiền phòng ở trẻ nhỏ khó khăn vì nhãn cầu trẻ rất nhỏ, soi góc được tiến hành ngay trước khi phẫu thuật để hạn chế số lần gây mê cho bệnh nhân.

Tình trạng đĩa thị được ghi nhận ở 61/146 mắt bị bệnh (39,7%). Mức độ lõm đĩa trung bình là  $0,72 \pm 0,21$ , nhỏ nhất là 0,2, lớn nhất là 0,9. Trong nghiên cứu 206 mắt của 114 bệnh nhân của châu Âu và Anh, kết quả cũng tương tự, mức độ lõm đĩa trung bình là  $0,57 \pm 0,12$ , nhỏ nhất là 0,3, lớn nhất là 0,9, nghiên cứu ở Morocco là  $0,67 \pm 0,2$  [66], [62].

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

### **4.2.1. Tình trạng đột biến gen CYP1B1**

#### **4.2.1.1. Tỷ lệ đột biến gen CYP1B1**

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu xác định đột biến gen cho 86 bệnh nhân bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ gen CYP1B1 để phát hiện đột biến điểm và MLPA để phát hiện đột biến xóa đoạn thấy 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%, tuy nhiên có khác biệt so với các vùng lãnh thổ khác nhau trên thế giới.

Theo tổng kết của Chouiter L. năm 2017, trên thế giới từ năm 2011 đến năm 2016 có 19 nghiên cứu về đột biến gen CYP1B1 được thực hiện với tổng số 1220 bệnh nhân kết luận tỷ lệ phát hiện đột biến gen CYP1B1 trung bình là 41,6%. Trong đó, 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, tiếp đến là châu Âu (34,7%), châu Á (21,3%), tỷ lệ thấp nhất ở Mỹ (14,9%) [41].

Tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn nhiều so với vùng Trung Đông và Địa Trung Hải. Theo nghiên cứu tại Ả rập Saudi của Osama M. Badeeb (2014) tiến hành trên 34 bệnh nhân thấy tỷ lệ đột biến là 27/34 bệnh nhân (79,4%). Qua đánh giá đặc điểm bệnh nhân thấy tỷ lệ đột biến rất cao do tình trạng kết hôn cận huyết gây nên, tỷ lệ này ở



nhóm kết hôn cận huyết là 21/23 bệnh nhân (91%) và nhóm không có kết hôn cận huyết là 6/11 bệnh nhân (54,5%) [68]. Cũng trong năm này, một nghiên cứu khác của Bouyacoub Y. trên 18 bệnh nhân ở Tunisia cho thấy tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 là 55% [69]. Nghiên cứu tại Maroc (2010) ở 90 bệnh nhân thấy tỷ lệ đột biến là 47,77% (43/90 bệnh nhân) [62]. Trong nghiên cứu này chúng tôi không có trường hợp nào kết hôn cận huyết, đây cũng phù hợp với phong tục tập quán của Việt Nam nên tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 không cao.

Ở châu Âu, tỷ lệ đột biến gen trong nghiên cứu của Sitorus năm 2003 ở 9 bệnh nhân thuộc các nước Đức, Ý, Hungari, Anh và Thổ Nhĩ Kỳ là 22,2% [70]. Tại Pháp, Colomb E. đã chỉ ra rằng tỷ lệ đột biến gen này là 48% (15/31 bệnh nhân) [71]. Nghiên cứu của Campos-Mollo E. ở Tây Ban Nha (2009) cũng cho thấy tỷ lệ tương tự 34% trong số 38 bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát [65].

Ở châu Á, tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 là khoảng 20%. Nghiên cứu của Yukihiro Mashima tại Nhật Bản (2001) tiến hành trên 65 bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát thấy tỷ lệ đột biến gen CYP1B1 là 13/65 bệnh nhân (20%) [72]. Tỷ lệ này ở nghiên cứu trên 12 bệnh nhân Indonesia cao hơn là 33,3% [70]. Năm 2011, nghiên cứu tại Hàn Quốc đã phát hiện 22 bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 trong số 85 bệnh nhân chẩn đoán bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát chiếm tỷ lệ 25,9% [24]. Cùng năm này, nghiên cứu trên 54 bệnh nhân ở Ả rập phát hiện 41 trường hợp đột biến gen CYP1B1 (75,9%) [73]. Trong nghiên cứu tại Nam Triều Tiên (2012) đã phát hiện 63/85 trường hợp mang đột biến gen (74,1%) [74]. Nghiên cứu mới đây tại Trung Quốc (2014) ở 238 bệnh nhân cho thấy tỷ lệ đột biến gen là 17,2%, trong đó có 9 đột biến mới [64].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng như nghiên cứu của Đỗ Tấn năm 2016 ở 30 bệnh nhân Việt Nam là 16,7% [61].

**Bảng 4.1. Kết quả phát hiện tỷ lệ đột biến ở bệnh nhân châu Á**

Nghiên cứu	Chen X. (2014)	Sitorus R. (2003)	Mashima Y. (2001)	Đỗ Tấn (2016)	Nghiên cứu này (2018)
N	n=192	n=12	n=65	n=30	n=86
Quốc gia	Trung Quốc	Indonesia	Nhật Bản	Việt Nam	Việt Nam
Tỷ lệ phát hiện đột biến	21/192 (17,2%)	4/12 (33,3%)	13/65 (20%)	5/30 (16,7%)	19/86 (22,1%)

#### 4.2.1.2. Vị trí đột biến trên gen CYP1B1

Theo thống kê của Li, đột biến gen CYP1B1 trên bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát chủ yếu là đột biến điểm trên exon 2 và exon 3 [75].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, đột biến chủ yếu được phát hiện trên exon 2 với 11/12 đột biến (91,7%) và chỉ có 1 đột biến trên exon 3 (chiếm 8,3%). Kết quả này cũng 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 (p.H279L, p.L283F, p.L107V, p.V320L và p.A121\_S122insDRPAFA) [76]. Từ đó có thể nhận định rằng đột biến điểm trên gen CYP1B1 ở bệnh nhân 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 môi 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.

Theo tổng kết năm 2010, trong 52 nghiên cứu được báo cáo đã phát hiện 542 bệnh nhân mang 147 đột biến khác nhau trên gen CYP1B1. Trong số 1007 đột biến phát hiện được có 2 đột biến ở vùng không mã hóa thuộc exon 1; 489 đột biến phát hiện được ở exon 2 và 516 đột biến phát hiện được ở exon 3 [75]. Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp giải trình tự gen chúng tôi không phân tích đột biến điểm nằm trong vùng không mã hóa gen CYP1B1.

Theo tổng kết của Chouiter L. năm 2017, trên thế giới từ năm 2011 đến năm 2016 có 19 nghiên cứu về đột biến gen CYP1B1 được thực hiện với tổng số 1220 bệnh nhân phát hiện 99 đột biến trong đó 47,1% đột biến trên exon 2 và 52,9% đột biến trên exon 3 [77].

Trong nghiên cứu của Chen X. trên 192 bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát Trung Quốc cũng phát hiện 18 đột biến và trong đó 11/18 đột biến trên exon 2 và 7/18 đột biến trên exon 3 [78].

#### *4.2.1.3. Các loại đột biến gen CYP1B1*

Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật giải trình tự đã phát hiện 17/86 trường hợp có đột biến gen CYP1B1, trong đó có 9 đột biến mới, 3 đột biến sai nghĩa và 3 đa hình nucleotid đã công bố trước đây. Ngoài ra chúng tôi phát hiện thêm 2/86 trường hợp có đột biến xóa đoạn bằng kỹ thuật MLPA.

Theo hai nghiên cứu thống kê về tình hình nghiên cứu đột biến gen CYP1B1 của Li từ trước năm 2010 và Chouiter L. đến năm 2017, có 6 dạng đột biến hay gặp trên gen CYP1B1. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện được 4 dạng đột biến, hay gặp nhất vẫn là dạng đột biến sai nghĩa (missense) 17,7% so với 66,8%, tiếp đến là đột biến vô nghĩa (nonsense) chiếm 3,5% so với 3,55%, đột biến xóa đoạn (deletion) chiếm 2,4% so với 14,12%, đột biến lệch khung dịch mã (frameshift) chỉ gặp ở 1 bệnh nhân chiếm tỷ lệ 1,2%.

Chúng tôi không phát hiện trường hợp nào có đột biến lặp đoạn (duplication) và đột biến thêm/mất nucleotid (deletion/insertion).

Trong nghiên cứu này, 12 đột biến điểm gen CYP1B1 được phát hiện bằng kỹ thuật giải trình tự. Trong đó, 10/12 đột biến sai nghĩa (83,3%), 2/12 đột biến vô nghĩa và 1/12 đột biến xóa nucleotid. Kết quả này cũng tương đồng với các tác giả trên thế giới.

Theo các nghiên cứu tại Úc tỷ lệ đột biến sai nghĩa là khoảng 72,7% tổng số đột biến phát hiện được. Theo những nghiên cứu ở châu Á, tỷ lệ đột biến loại này dao động khoảng từ 60% đến 97% trong tổng số đột biến gen CYP1B1 cụ thể ở Nhật là 66,8%; Indonesia là 62,5%; Ả rập là 96,5% và Iran là 90%.

Bằng kỹ thuật MLPA, chúng tôi phát hiện 2/85 trường hợp có đột biến xóa đoạn. Các nghiên cứu trên thế giới cũng chỉ ra một số các dạng đột biến khác cũng được tìm thấy nhưng tỷ lệ rất thấp như đột biến xóa đoạn, lặp đoạn, đột biến vô nghĩa hay thêm nucleotide [75]. Trong nghiên cứu của Đỗ Tấn trên bệnh nhân Việt Nam có 4 đột biến sai nghĩa (4/5 đột biến) và 1 trường hợp là đột biến thêm đoạn (1/5 đột biến) [61]. Nghiên cứu của Chen X. trên bệnh nhân Trung Quốc phát hiện 19 đột biến trong đó 16/19 đột biến sai nghĩa (chiếm 84,2%), 2/19 đột biến vô nghĩa tạo mã kết thúc sớm và 1/19 đột biến dịch khung [27].

Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện đột biến p.E229K chiếm tỷ lệ cao nhất với 7/86 trường hợp và đột biến mới phổ biến nhất là p.Q86K với 4/86 trường hợp.

Theo tổng kết của Li, 3 đột biến phổ biến ở người châu Á là p.Val364Met, p.Arg390His và p.Leu385Phe [75]. Theo tổng kết của Chouiter L. năm 2017, đột biến p.Val320Leu dường như chỉ xuất hiện ở Việt Nam, tuy

nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi không tìm thấy các đột biến trên [77].

Phân tích *in silico* sử dụng phần mềm dự đoán kiểu hình protein, chúng tôi thấy đột biến p.L27Q, p.Q86K, p.D218H, p.D242N, p.G365E được dự đoán có khả năng gây bệnh (điểm 0,992-1,000). Ngoài ra các đột biến mới p.L191Sfs\*4 gây dịch khung dịch mã và 2 đột biến p.Q159X, p.Q164X tạo mã kết thúc sớm cũng là các đột biến gây bệnh. So sánh hệ gen giữa các loài cho thấy các vị trí 27, 86, 218, 242 và 365 đều có độ bảo toàn cao. Tuy nhiên muốn khẳng định các đột biến trên là đột biến gây bệnh cần phải có nghiên cứu *in vitro* hoặc trên mô hình động vật.

Bên cạnh đó, chúng tôi cũng tìm thấy 3 đột biến sai nghĩa đã được công bố trước đây là p.G61E, p.V198I và p.E229K.

Đột biến p.V198I cũng được tìm thấy trên bệnh nhân Nhật Bản, trong khi đột biến p.E229K được tìm thấy trên bệnh nhân Iran và gợi ý gây ra kiểu hình nặng [79], [80].

Ngoài ra, nghiên cứu của chúng tôi cũng tìm được 3 dạng đa hình thái đã được công bố trước đây là p.R48G, p.A119S trên exon 2 và p.L432V trên exon 3. Những đột biến này đều nằm trong vùng chức năng của protein CYP1B1 [81].

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

Bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát được xác định là một thể bệnh di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể thường, phổ biến ở trẻ em [5]. Các nghiên cứu đã xác định có mối liên quan giữa tình trạng đột biến gen CYP1B1 với đặc điểm lâm sàng cũng như kết quả điều trị của bệnh [11].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tổng số có 86 bệnh nhân trong đó hai bệnh nhân là anh em ruột trong một gia đình và có cùng đột biến gen nên 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.

#### 4.2.2.1. Mối liên quan với thời gian xuất hiện bệnh

Nghiên cứu thấy thời gian phát hiện bệnh trung bình trong nhóm bệnh nhân có mang đột biến gen *CYP1B1* là trước 2 tháng tuổi ( $1,21 \pm 1,75$  tháng) sớm hơn nhóm không mang đột biến ( $2,99 \pm 3,88$  tháng) một cách có ý nghĩa thống kê với  $p=0,006$ . Khi so sánh với các nghiên cứu khác cũng cho kết quả tương tự.

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 [58].

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 ( $p=0,0009$ ) [54].

Nghiên cứu của Wool Suh (2012) tiến hành trên 85 bệnh nhân Hàn Quốc phát hiện 22 bệnh nhân (25,9%) mang đột biến *CYP1B1* và 63 bệnh nhân không mang mang đột biến. Trong đó có 61,1% bệnh nhân xuất hiện triệu chứng đầu tiên trong vòng 6 tháng tuổi [55].

Nghiên cứu của Xueli Chen tại Trung Quốc (2013) trên 238 bệnh nhân cho thấy tuổi trung bình xuất hiện bệnh ở nhóm mang đột biến là 2 tháng sớm hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với tuổi trung bình của nhóm không mang đột biến là 6 tháng ( $p=0,028$ ) [53].

Nghiên cứu của Christiane Al-Haddad (2016) tại Liban tiến hành trên 18 bệnh nhân đã phát hiện 6 bệnh nhân có đột biến gen *CYP1B1* (33%), tuổi phát hiện bệnh trung bình là 1,5 tháng. Khi so sánh tuổi xuất hiện bệnh trung bình giữa hai nhóm thấy ở nhóm có đột biến gen là 0,8 tháng sớm hơn một

cách có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có đột biến gen là 5,7 tháng ( $p=0,01$ ) [56].

Như vậy ở bệnh nhân biểu hiện bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát càng sớm càng cần được xét nghiệm đột biến gen CYP1B1 giúp tìm hiểu thêm về nguyên nhân gây bệnh.

#### *4.2.2.2. Mối liên quan với giới tính*

Trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ đột biến của bệnh nhân nam là 25,0% cao hơn tỷ lệ đột biến của nữ là 15,2%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng tỷ lệ đột biến giữa hai giới không khác biệt.

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, tuy nhiên sự khác biệt về giới tính ở hai nhóm trong các nghiên cứu này đều không khác biệt có ý nghĩa thống kê [53], [54].

#### *4.2.2.3. 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.

Nghiên cứu phát hiện 3 gia đình có tiền sử tiếp xúc Dioxin. Một trường hợp ông nội bệnh nhân có tiền sử tiếp xúc với chất độc màu da cam sinh ra bố bệnh nhân không bị bệnh mà mang gen CYP1B1 đột biến ở trạng thái dị hợp tử kết hôn với mẹ bệnh nhân cũng mang một gen đột biến ở trạng thái dị hợp. Bệnh nhân sinh ra mang đột biến gen đồng hợp biểu hiện bệnh cả

hai mắt giai đoạn nặng. Một trường hợp khác bà nội bệnh nhân có tiền sử tiếp xúc với chất độc màu da cam. Bà nội và bố bệnh nhân đều bị glôcôm tuy nhiên không phát hiện đột biến gen CYP1B1. Bệnh nhân là cháu nội mang đột biến gen CYP1B1 và biểu hiện bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát. 1 trường hợp bà nội bệnh nhân tiếp xúc chất độc da cam, sinh ra bố bệnh nhân cận thị rất nặng và bệnh nhân bị bệnh.

Theo các nghiên cứu trước đây, chất độc màu da cam (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) là yếu tố đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới đề cập đến là nhạy cảm với cDNA gây đột biến gen CYP1B1 [82], [83], [84]. Nghiên cứu của Takeuchi (2009) cũng đã tiến hành gây đột biến thành công trên chuột khi cho tiếp xúc với chất độc màu da cam, chuột con sinh ra có biểu hiện bệnh mờ đục cả hai mắt, tuy nhiên do số lượng phát hiện ít nên cần nghiên cứu sâu hơn về vấn đề này [85].

#### *4.2.2.4. 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.

Tỷ lệ đột biến trong nhóm bệnh nhân bị bệnh cả hai mắt cao hơn nhóm bệnh nhân bị bệnh một mắt có ý nghĩa thống kê với  $p=0,009$  và khả năng xuất hiện bệnh ở 2 mắt trong nhóm bệnh nhân mang đột biến cao gấp 10,12 lần so với nhóm bệnh nhân không mang đột biến. Đây là yếu tố liên quan chặt chẽ và quan trọng giữa bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát và đột biến gen CYP1B1.

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 ( $p=0,087$ ) [55].

Nghiên cứu của Christiane Al-Haddad (2016), tỷ lệ bệnh xuất hiện ở 2 mắt là 4/6 bệnh nhân ở nhóm đột biến cao hơn ở nhóm không có đột biến là 4/12 bệnh nhân, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p=0,32$ ) [56].

#### *4.2.2.5. Mối liên quan với đặc điểm lâm sàng và điều trị*

Để đánh giá mối liên quan giữa giai đoạn bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát với đột biến gen CYP1B1, các nghiên cứu trên thế giới đã chia bệnh thành 3 mức độ nhẹ, trung bình, nặng [57]. Nhóm nghiên cứu cũng tiến hành phân loại giai đoạn bệnh như trên thu được kết quả 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 so với tỷ lệ đột biến của nhóm bệnh nhân ở giai đoạn trung bình (12,9%) và giai đoạn nhẹ (25%) với  $p=0,000$ .

Đường kính ngang trung bình của giác mạc ở nhóm có đột biến gen là  $13,22\pm 0,87\text{mm}$  cao hơn so nhóm không đột biến  $12,99\pm 0,84\text{mm}$ , tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ). Trong khi đó đường kính dọc trung bình của giác mạc ở nhóm có đột biến gen là  $12,47\pm 0,75\text{mm}$  cao hơn so nhóm không đột biến  $12,10\pm 0,82\text{mm}$ , sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p=0,018$ ).

Nhãn áp trung bình của nhóm có đột biến gen là  $28,03\pm 8,89\text{mmHg}$  cao hơn so với nhãn áp trung bình của nhóm không có đột biến gen  $26,74\pm 8,27\text{mmHg}$ , tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ).

Mức độ lõm đĩa trung bình của nhóm có đột biến gen là  $0,73\pm 0,14$  không khác biệt so với mức độ lõm đĩa trung bình của nhóm không đột biến  $0,72\pm 0,23$  ( $p>0,05$ ).

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  $p=0,986$ ) [53].

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) ( $p=0,004$ ) [54].

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 [8].

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 ( $0,57\pm 0,19$  và  $0,62\pm 0,3$ ) 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 ( $p=0,32$ ) [56].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi đánh giá về số lần phẫu thuật cũng như cách thức phẫu thuật giữa hai nhóm có và không có đột biến thấy tỷ lệ số mắt phải mổ lần 2, lần 3 của nhóm đột biến lần lượt là 20,6%, 2,9% cao hơn tỷ lệ phải mổ lần 2, lần 3 của nhóm không đột biến tương ứng là 13,6% và 1,8%. Đặc biệt ở nhóm đột biến có 2 mắt của cùng 1 bệnh nhân phải mổ lại lần 4 (chiếm 5,9%), nhóm không có đột biến không có bệnh nhân nào phải mổ lại lần 4. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p=0,047$ .

Các nghiên cứu khác nhau trên thế giới cũng đề cập đến mối liên quan giữa phương pháp phẫu thuật, số lần phẫu thuật, kết quả thị lực, nhãn áp, khúc

xạ sau mổ với nhóm bệnh nhân có và không có đột biến gen, số lượng đột biến gen, loại đột biến gen ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát.

Tổng kết về số lần phẫu thuật và phương pháp phẫu thuật, trong nghiên cứu của Orna Geyer (2011) chỉ ra rằng tỷ lệ mắt cần phẫu thuật lại ở nhóm 17 bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 là 23/28 mắt (82%) cao hơn nhóm không mang đột biến là 12/30 mắt (40%) ( $p=0,001$ ). Kết quả phẫu thuật lại ở nhóm bệnh nhân này cũng phù hợp với thời gian xuất hiện bệnh sớm hơn và đặc điểm lâm sàng nặng hơn so với nhóm không có đột biến gen [54].

Nghiên cứu của Wool Suh (2012) tại Hàn Quốc phát hiện tỷ lệ phẫu thuật lần 2 ở 22 bệnh nhân mang đột biến gen là 22,7% nhiều hơn nhóm không mang đột biến gen là 17,5%, tuy nhiên các khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ các loại phẫu thuật (phẫu thuật góc, phẫu thuật góc phối hợp cắt bè, phẫu thuật đặt van dẫn lưu tiền phòng cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 3 nhóm nghiên cứu ( $p=0,002$ ). 64,4% bệnh nhân ở nhóm không đột biến được phẫu thuật góc (rạch bè hoặc mở bè) trong khi đó phẫu thuật được lựa chọn cho 68,7% số bệnh nhân có đột biến là cắt bè hoặc đặt van dẫn lưu tiền phòng, sự khác biệt này có nghĩa thống kê với  $p=0,027$  [55].

Nghiên cứu của Christiane Al-Haddad (2016) cho thấy số lần phẫu thuật của nhóm có đột biến cao hơn nhóm không đột biến (1,8 và 1,4 lần) tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p=0,15$ . Đặc biệt có một bệnh nhân mang đột biến 1793delC tạo mã kết thúc ở vị trí acid amin 464 (p.S464X) biểu hiện bệnh lúc 2 ngày tuổi, 2 mắt lồi mắt trâu rất nặng, phẫu thuật rất nhiều lần bao gồm cắt rạch bè và đặt van [56].

Đánh giá về kết quả phẫu thuật, nghiên cứu của Reddy (2004) phát hiện 2 bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn đều có kết quả phẫu thuật rất kém, chỉ làm hạ nhãn áp còn thị lực dưới đếm ngón tay 1 mét. Ngược lại, 2 bệnh

nhân mang đột biến sai nghĩa ở trạng thái đồng hợp tử kết quả thị lực sau mổ rất tốt là 20/40 và 20/50 [58].

Nghiên cứu của tác giả Xueli Chen tại Trung Quốc năm 2014, phẫu thuật 192 bệnh nhân (305 mắt) thấy tỷ lệ phẫu thuật thành công tại các thời điểm theo dõi sau mổ ở nhóm mang đột biến gen luôn cao hơn nhóm không mang đột biến gen một cách có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), điều này trái ngược với nhận định của các nghiên cứu khác trên thế giới. Tác giả giải thích điều này là do kết quả phẫu thuật phụ thuộc rất lớn vào thời điểm phát hiện của bệnh nhân. Nhóm bệnh nhân có mang đột biến gen CYP1B1 thời gian biểu hiện bệnh trung bình là trước 2 tháng tuổi, sớm hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có đột biến gen là 6 tháng tuổi, do vậy được can thiệp phẫu thuật sớm hơn dẫn tới kết quả phẫu thuật tốt hơn [53].

Wool Suh (2012) tại Hàn Quốc so sánh giữa nhóm không có đột biến gen (63 bệnh nhân), nhóm mang 1 đột biến gen (11 bệnh nhân) và nhóm mang 2 đột biến gen (11 bệnh nhân) thấy kết quả nhãn áp không điều chỉnh sau phẫu thuật và dùng thuốc ở nhóm mang 2 đột biến gen lên tới 45,5% cao hơn hẳn 2 nhóm kia là 4,8% và 0% ( $p = 0,000$ ). 58,7% bệnh nhân đạt kết quả nhãn áp điều chỉnh ( $< 21 \text{ mmHg}$ ) sau phẫu thuật ở nhóm không đột biến tốt hơn kết quả này ở nhóm đột biến là 22,7% ( $p = 0,008$ ) [55].

Nghiên cứu của Christiane Al-Haddad chỉ ra mức độ tật khúc xạ ở 2 nhóm là như nhau: nhóm đột biến có 4 mắt cận thị nhẹ đến trung bình ( $< -6,00 \text{ D}$ ), 3 mắt cận nặng ( $> -6,00 \text{ D}$ ) và 4 mắt viễn thị, 1 mắt không đo được khúc xạ do giác mạc đục; nhóm không đột biến gen có 7 mắt cận nhẹ đến trung bình, 4 mắt cận nặng và 3 mắt viễn thị, 2 mắt không đo được khúc xạ. Kết quả thị lực kém sau mổ ( $< 20/400$ ) như nhau ở 2 nhóm [56].

Như vậy các nghiên cứu đều chỉ ra có mối liên quan chặt chẽ giữa giai đoạn bệnh của bệnh nhân với tình trạng đột biến gen CYP1B1, bệnh nhân biểu hiện bệnh nặng có khả năng cao mang đột biến gen hơn nhóm bệnh nhân nhẹ và trung bình. Đường kính và mức độ đục giác mạc là yếu tố quan trọng liên quan nhất đến tình trạng đột biến gen. Bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 cũng phải mổ lại nhiều lần hơn so với nhóm không đột biến.

Bên cạnh đó khi xét đến mối liên quan của sự kết hợp các đặc điểm lâm sàng với tình trạng đột biến gen CYP1B1 thấy khả năng đột biến gen cao hơn ở nhóm càng mang nhiều yếu tố phối hợp như bệnh biểu hiện sớm ngay sau sinh, ở cả hai mắt và giai đoạn nặng. Từ đó giúp đưa ra lời khuyên với bệnh nhân khi được gia đình đưa đến với càng nhiều đặc điểm lâm sàng như trên càng cần làm xét nghiệm tìm đột biến trên gen CYP1B1.

#### **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 [41].

Đột biến gen CYP1B1 được phát hiện trên một bệnh nhân cụ thể được gọi là đột biến đích. Đột biến đích thường ở dạng đồng hợp tử gây bệnh hoặc là phối hợp các đột biến dị hợp tử gây bệnh (bố mẹ mang các đột biến gen gây bệnh khác nhau ở dạng dị hợp tử).

Sau khi xác định đột biến đích, chúng tôi tiếp tục khuếch đại vùng exon chứa đột biến đích trên thành viên gia đình có quan hệ huyết thống với bệnh nhân (bố mẹ, anh chị em ruột). Đối với trường hợp bệnh nhân có đột

biến xóa đoạn gen, chúng tôi tiến hành phân tích MLPA để xác định người lành mang gen.

Nghiên cứu tiến hành lấy máu xét nghiệm 29 thành viên của 15 gia đình bệnh nhân bao gồm 13 người bố, 13 người mẹ, 3 người em ruột của bệnh nhân. Thấy 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% [60], tuy nhiên thấp hơn nghiên cứu của Đỗ Tấn 100% phát hiện di truyền [61].

Chúng tôi thấy trong tổng số các thành viên gia đình có quan hệ huyết thống với bệnh nhân có 6 người được xác định là người lành mang gen bệnh: 3 trong số 13 người bố, 2 trong số 13 người mẹ và 1 trong số 3 người em. 1 người em mang gen đột biến như người anh và có biểu hiện bệnh.

#### **4.3.1. Các 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 G02, G40, G56 và G85.

2 gia đình G40 và G85 mang đột biến điểm p.E229K đã được phát hiện trong các nghiên cứu trên thế giới trước đây, di truyền dạng dị hợp tử. Gia đình G40 mang đột biến mới p.D218H không di truyền.

2 gia đình G02 và G56 mang đột biến xóa đoạn toàn bộ exon 1 và exon 3 là đột biến mới phát hiện, di truyền dạng đồng hợp tử.

**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 [86].

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) [9]. 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 [42].

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 [71], [87].

Cũng theo báo cáo của tác giả Colomb Evelyne về 2 bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát, đột biến p. E229K ở trạng thái dị hợp tử, phân tích chuỗi của vùng mã hóa ở những bệnh nhân này không cho thấy đột biến nào khác. Đột biến này làm thay đổi vị trí tiền hóa được bảo tồn trong chuỗi CYP1B1 [61].

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 nối 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 [77].

Một báo cáo thứ hai cũng xác định p.E229K như alen hypomorphic (alen 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 [62]. 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 [77].

**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. Aspartate là acid amin mang điện tích âm bị đột biến thành Histidine mang điện tích dương, đột biến nhiều khả năng sẽ làm ảnh hưởng đến việc tạo xoắn alpha và dẫn đến thay đổi cấu trúc protein. Vị trí đột biến tại vùng vỏ ngoài protein do vậy sẽ làm ảnh hưởng đến khả năng gắn và tương tác với cơ chất của enzyme.

Gia đình bệnh nhân mã số G40 có 2 người con. Theo phả hệ gia đình (hình 3.10), bệnh nhân (III.1) là chị cả, phát hiện bệnh ngay từ khi mới sinh, bị bệnh cả 2 mắt, nhãn áp >23mmHg (Icare). Bệnh nhân đã được mổ mỗi mắt 2 lần, phẫu thuật thất bại ở mắt phải dẫn đến tình trạng teo nhãn cầu mắt chức năng hoàn toàn, mắt trái nhãn áp điều chỉnh được tuy nhiên thị lực chỉ ở mức bóng bàn tay. Em gái bệnh nhân (III.2) tại thời điểm nghiên cứu 6 tháng tuổi, chưa phát hiện bệnh. Bố mẹ bệnh nhân bình thường, không phát hiện bệnh. Bố bệnh nhân (II.1) có 1 người em trai (II.2) và 1 em gái (II.3) bình thường; mẹ bệnh nhân (II.4) có 2 người em trai (II.5 và II.6) không phát hiện bệnh. Ông bà nội ngoại của bệnh nhân không phát hiện bệnh.

Phân tích trình tự gen bệnh nhân phát hiện 2 đột biến missen dị hợp tử là p.E229K và đột biến mới p.D218H. Bố 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. Mẹ bệnh nhân không phát hiện đột biến p.E229K. Bố, mẹ bệnh nhân không phát hiện đột biến p.D218H. Trong trường hợp này, cả bố và con đều



mang đột biến dị hợp tử p.E229K, bố không biểu hiện bệnh, con có biểu hiện bệnh. Có thể lý giải kết quả này do trên bệnh nhân có sự liên kết 2 đột biến p.D218H và p. E229K dẫn đến biểu hiện bệnh cả hai mắt nặng và kết quả điều trị thất bại ở bệnh nhân.

Theo quy luật di truyền bệnh nhân mang kiểu gen Aa, kiểu gen bố là Aa và mẹ là AA:

P:        Aa        x        AA

F:        50%AA     50%Aa

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. Theo phả hệ (hình 3.12) bệnh nhân (III.1) là anh cả, phát hiện bệnh ngay từ khi mới sinh, bị bệnh cả 2 mắt, nhãn áp >32mmHg (Icare). Em trai bệnh nhân (III.3) cũng phát hiện bệnh khi mới sinh cả 2 mắt. 2 bệnh nhân phẫu thuật đều thất bại dẫn đến một mắt mất chức năng hoàn toàn, một mắt thị lực chỉ được bóng bàn tay. Em gái bệnh nhân (III.2) chưa phát hiện bệnh. Bố mẹ bệnh nhân bình thường, không phát hiện bệnh. Ông bà nội ngoại và các cô chú của bệnh nhân không phát hiện bệnh.

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.

Như vậy phả hệ này không tuân theo quy luật di truyền Mendel 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 [71], [87]. Bệnh nhân và em trai cần được tư vấn di truyền trước hôn nhân.

**Đột biến xóa đoạn gen *CYP1B1*:** khi làm xét nghiệm MLPA thấy hai bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn hoàn toàn cả exon 1-exon 3 đều ở trạng thái đồng hợp tử, đây là đột biến mới phát hiện. Hai bệnh nhân đều biểu hiện bệnh rất nặng, tuy đã 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.

Gia đình bệnh nhân mã số G02 có 2 anh em. Bệnh nhân (III.1) là anh, phát hiện bệnh khi 2,5 tháng tuổi, bị bệnh cả 2 mắt, nhãn áp >32mmHg (Icare). Hiện tại bệnh nhân 14 tuổi, đường kính giác mạc mắt phải to 13mm, mắt trái teo nhãn cầu. Bệnh nhân đã được phẫu thuật 4 lần bằng nhiều phương pháp tuy nhiên kết quả thất bại dẫn đến hai mắt mất chức năng hoàn toàn.

Em gái bệnh nhân (III.2) không biểu hiện bệnh. Bố mẹ bệnh nhân bình thường, không phát hiện bệnh. Ông bà nội ngoại của bệnh nhân không phát hiện bệnh.

Ông nội bệnh nhân có tiền sử tiếp xúc với chất độc màu da cam năm 1972, sinh ra bố bệnh nhân năm 1973.

Di truyền tuân theo quy luật di truyền Mendel

P:        Aa        x        Aa

F:        50% aa     50% Aa

Như vậy, bố, mẹ và em gái bệnh nhân là người lành mang gen bệnh có kiểu gen Aa. Bố mẹ bệnh nhân cần làm chẩn đoán trước sinh khi có ý định sinh thêm con. Em gái bệnh nhân 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. Theo phả hệ (hình 3.16) bệnh nhân (III.7) là em trai út, phát hiện mang đột biến xóa đoạn toàn bộ exon 1-exon 3 ở trạng thái đồng hợp tử lặn. Hai anh trai của bệnh nhân không biểu hiện bệnh. Hiện tại hai mắt bệnh nhân mất chức năng hoàn toàn. Con chú ruột của bệnh nhân (III.4) cũng bị glôcôm bẩm sinh nguyên phát như bệnh nhân và cũng mù hai mắt, tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi chưa lấy được mẫu máu của chú và em họ bệnh nhân để phân tích đột biến gen. Bố mẹ, ông bà nội ngoại của bệnh nhân không phát hiện bệnh.

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**

Phân tích 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. Trong đó:

Đột biến điểm p.Q86K là đột biến mới 2 gặp ở 4 bệnh nhân: G08, G11, G21 và G43.

Đột biến điểm p.D218H là đột biến mới gặp ở bệnh nhân G09.

Đột biến điểm p.D242N là đột biến mới gặp ở bệnh nhân G24.

Đột biến điểm p.A133T là đột biến mới gặp ở bệnh nhân G19.

Đột biến điểm p.G365E là đột biến mới gặp ở bệnh nhân G44.

Đột biến điểm p.L27Q là đột biến mới và đột biến đã được công bố trước đây p.G61E gặp ở bệnh nhân G20.

Đột biến điểm p.E229K trên exon 2 gặp ở 4 bệnh nhân G24, G70, G74 và G84.

**Đột biến p.Q86K:** đột biến p.Q86K là đột biến thay thế acid amin Glutamine không mang điện tích thành Lysine mang điện tích dương. Đây là đột biến mới phổ biến nhất gặp ở 4/86 trường hợp. Phân tích *in silico* sử dụng phần mềm dự đoán kiểu hình protein thấy đột biến được dự đoán với khả năng gây bệnh cao với 0,995 điểm.

Vị trí 86 là vị trí cấu trúc gấp beta của protein. Đột biến ảnh hưởng đến điện tích có thể ảnh hưởng đến việc hình thành cấu trúc beta, do đó ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein.

Ở phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G08 (hình 3.17), bệnh nhân (III.2) là con thứ hai trong gia đình, bệnh khởi phát bệnh lúc mới sinh ở cả 2 mắt, dấu hiệu lâm sàng nặng với mức nhãn áp là 35mmHg.

Phân tích trình tự gen của bệnh nhân này phát hiện 1 đột biến mới p.Q86K dị hợp tử và 2 đa hình đơn p.R48G, p.A119S đồng hợp tử. Tiền sử thai nghén không có gì đặc biệt. Gia đình bệnh nhân không có người bệnh tăng nhãn áp. Bố mẹ và anh trai bệnh nhân (10 tuổi) không phát hiện đột biến. Đa hình đơn p.R48G thể dị hợp phát hiện được ở bố bệnh nhân, đa hình đơn p.A119S thể dị hợp tử phát hiện được ở cả bố và mẹ bệnh nhân như vậy bố, mẹ bệnh nhân di truyền đa hình đơn cho bệnh nhân. Tuy không tìm thấy di truyền đột biến p.Q86K trong gia đình số G08, có thể đột biến p.Q86K của bệnh nhân là đột biến mới sinh, nhưng bệnh nhân mang đột biến (kiểu gen Aa) và có thể di truyền đột biến này cho thế hệ sau. Cần tư vấn di truyền cho bệnh nhân trước khi kết hôn.

Ở phả hệ gia đình bệnh nhân mã số G11 (hình 3.20), bệnh nhân (III.1) khởi phát bệnh lúc 3 tháng tuổi với hai mắt đục trắng, nhãn áp 24mmHg. Bệnh nhân mang đột biến p.Q86K và đột biến tạo mã kết thúc sớm p.Q159X, cả hai đột biến này đều là đột biến mới và ở trạng thái dị hợp tử. Đột biến này gây bệnh và có khả năng di truyền cho thế hệ sau vì vậy bệnh nhân cần được tư vấn di truyền trước khi sinh con.

Bà nội bệnh nhân có tiền sử tiếp xúc chất độc màu da cam. Bố bệnh nhân (II.4) và bà nội (I.2) cũng bị glôcôm dẫn đến mù cả hai mắt tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi không tìm thấy đột biến gen CYP1B1 ở bố bệnh nhân.

Đa hình đơn p.L432V thể dị hợp tử được phát hiện ở bệnh nhân và mẹ bệnh nhân (II.8), vậy mẹ bệnh nhân di truyền đa hình đơn p.L432V cho bệnh nhân. Các thành viên khác trong phả hệ không ai có bệnh như bệnh nhân. Như vậy, có thể gia đình bệnh nhân mang một đột biến gen khác phối hợp gây bệnh mà chưa được tìm thấy trong nghiên cứu này.

Ở phả hệ gia đình G21, bệnh nhân khởi phát bệnh lúc 3 tháng tuổi với hai mắt đục trắng, nhãn áp mắt phải 32mmHg, nhãn áp mắt trái 42mmHg. Bệnh nhân mang đột biến điểm p.Q86K kết hợp với một đột biến điểm khác p.V198I, cả hai đột biến này đều ở trạng thái dị hợp tử. Đột biến p.V198I lần đầu được tìm thấy trong nghiên cứu của Mashima Y. (2001) tại Nhật Bản đã được chứng minh là đột biến gây bệnh không thấy xuất hiện ở 120 mẫu chứng trong nghiên cứu này [72]. Như vậy bệnh nhân G21 mang đột biến gây bệnh dạng dị hợp tử kết hợp có khả năng di truyền cho thế hệ sau vì vậy bệnh nhân cần được tư vấn di truyền trước khi sinh con.

Ở phả hệ gia đình bệnh nhân mã số 43, bệnh nhân khởi phát bệnh lúc 3,5 tháng tuổi, bị bệnh cả 2 mắt, mắt trái nặng hơn mắt phải với nhãn áp tương ứng là 40mmHg mắt trái và 24mmHg mắt phải. Tiền sử thai nghén của bệnh nhân không có gì đặc biệt. Không tìm thấy đột biến từ bố và mẹ bệnh nhân nhưng phát hiện bệnh nhân mang đa hình đơn p.L432V thể dị hợp tử di truyền từ mẹ.

Qua nghiên cứu cho thấy đột biến mới p.Q86K chưa thấy di truyền từ đời bố mẹ sang con, đột biến này ở trạng thái dị hợp tử kết hợp với một đột biến khác gây bệnh.

Bên cạnh đó, cần nghiên cứu thêm về đa hình đơn p.L432V là đa hình hay đi kèm với đột biến này hoặc tìm một yếu tố tác động của đột biến gen khác phối hợp gây bệnh chưa được phát hiện trong nghiên cứu này.

**Đột biến p.D242N:** là đột biến thay thế acid amin Aspartate thành Asparagine tại vị trí acid amin 242. Aspartate mang điện tích âm bị thay thế bởi Asparagine không mang điện tích, vị trí này nằm giữa xoắn alpha helix do vậy đột biến ảnh hưởng đến điện tích sẽ ảnh hưởng đến cấu trúc xoắn. Vị trí xoắn này nằm ở vỏ ngoài nên ảnh hưởng đến sự gắn và tương tác với cơ chất. Đột biến này được xác định là đột biến mới có khả năng gây bệnh với 1,000 điểm.

Phân tích phả hệ bệnh nhân mã số G24, mang đột biến p.D242N ở trạng thái đồng hợp tử, phối hợp với đột biến p.E229K trạng thái dị hợp. Bệnh nhân biểu hiện bệnh rất nặng với thị lực sau mổ chỉ đạt bóng bàn tay 0,1m. Không tìm thấy đột biến di truyền ở bố mẹ bệnh nhân nên có thể đánh giá đây là đột biến mới phát sinh ở bệnh nhân. Bên cạnh đó, gia đình bệnh nhân có tiền sử di truyền tình trạng mù màu vàng, cam, xanh lá cây. Ông nội, bố và chú ruột bệnh nhân đều không phân biệt được những màu này. Bệnh mù màu là do đột biến gen lặn nằm trên nhiễm sắc thể X không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể Y, vì vậy đây là hiện tượng di truyền giới tính. Bệnh nhân là nam nên cũng mang đặc điểm này, tuy nhiên đánh giá màu sắc ở bệnh nhân gặp khó khăn vì thị lực của bệnh nhân rất kém. Bệnh nhân cần được tư vấn di truyền khi kết hôn và sinh con.

**Đột biến p.G365E:** là đột biến thay thế acid amin Glycine thành Glutamic. Glycine là acid amine đơn giản và đẳng điện bị thay thế bởi Glutamic acid mang điện tích âm. Vị trí 365 là vị trí không có cấu trúc đặc biệt nhưng nằm gần vị trí khởi đầu chuỗi xoắn alpha và nằm tại vùng vỏ protein. Do vậy đột biến này nhiều khả năng ảnh hưởng đến chức năng của

CYP1B1 và gây bệnh. Đột biến này cũng được xác định là đột biến mới có khả năng gây bệnh bằng phần mềm với 1,000 điểm.

Bệnh nhân mã số G44 mang đột biến p.G365E ở trạng thái dị hợp tử, bệnh xuất hiện ngay sau sinh với nhãn áp >27mmHg. Nghiên cứu không phát hiện đột biến di truyền ở bố mẹ bệnh nhân, nên có thể đây là đột biến mới phát sinh và nghi ngờ có một đột biến ở gen khác phối hợp gây bệnh. Bệnh nhân cần được làm thêm các xét nghiệm gen khác để tìm nguyên nhân bệnh và tư vấn di truyền trước khi kết hôn.

**Đột biến p.A133T:** đột biến p.A133T là đột biến thay thế acid amin Alanine thành Threonine tại vị trí 133. Đây là vị trí acid amin gần với nhân Hem nên sẽ ảnh hưởng đến chức năng của protein. Tuy nhiên khi phân tích *in silico* đột biến mới p.A133T được dự báo là lành tính với điểm 0,244.

Bệnh nhân mã số G19 mang đột biến gen này ở trạng thái dị hợp tử, xuất hiện bệnh ngay sau sinh với biểu hiện bệnh cả hai mắt. Bệnh nhân đã được phẫu thuật tuy nhiên kết quả thị lực hiện tại chỉ ở mức đếm ngón tay 1,5m. Anh trai bệnh nhân không bị bệnh. Bố mẹ bệnh nhân không phát hiện mang gen bệnh. Trong cả hệ gia đình không phát hiện ai có biểu hiện bệnh như bệnh nhân. Bệnh nhân là người mang đột biến cần được tư vấn di truyền trước khi kết hôn.

**Đột biến p.L27Q và p.G61E:** đột biến p.L27Q là đột biến mới phát hiện lần đầu ở Việt Nam. Phân tích *in silico* thấy đây là đột biến gây bệnh với 0,992 điểm.

Đột biến p.G61E là đột biến gây bệnh đã được tìm thấy trong các nghiên cứu trên thế giới trước đây [25].

Đột biến p.G61E được xác định là đột biến hay gặp nhất ở Ả rập 43/62 bệnh nhân chiếm 69,3%, ở Iran tỷ lệ phát hiện đột biến này là 30/104 bệnh nhân (29%), ở Thổ Nhĩ Kỳ gặp ở 5/35 bệnh nhân (14,3%) và ở Kuwait 9/17

bệnh nhân (52,9%) [88], [87], [89], [90]. Một nghiên cứu của Badeeb OM về sự di truyền đột biến gen này thấy đột biến p.G61E được tìm thấy ở dạng đồng hợp tử 16/17 trường hợp (chiếm 63%) và 1 trường hợp ở dạng dị hợp tử [91]. Nghiên cứu thực nghiệm của Jansson năm 2001 trên *E-coli* đã chứng minh khi có đột biến p.G61E sẽ làm giảm khả năng hoạt động của CYP1B1 60% và gây ra bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát [92].

Bệnh nhân mã số G20(III.3) trong phả hệ (hình 3.23) là con thứ ba trong gia đình có 3 anh em trai, biểu hiện bệnh ở mắt trái lúc 2 tháng tuổi, mắt phải bệnh nhân không có bệnh. Hiện tại thị lực mắt trái bệnh nhân đếm ngón tay 1m. Hai anh trai bệnh nhân không có biểu hiện bệnh.

Bệnh nhân được phát hiện mang 2 đột biến gen CYP1B1 dạng dị hợp tử p.L27Q và p.G61E. Hai anh trai bệnh nhân (III.1 và III.2) không có biểu hiện bệnh. Bà nội bệnh nhân (I.2) có tiền sử tiếp xúc chất độc màu da cam sinh ra bố bệnh nhân (II.1) bị cận thị rất nặng tuy nhiên cả bố mẹ bệnh nhân đều không phát hiện mang gen đột biến. Mẹ bệnh nhân (II.2) trong thời gian mang thai bệnh nhân có sử dụng thuốc trầm cảm. Trên bệnh nhân này không phát hiện bằng chứng di truyền nhưng có tiền sử tiếp xúc Dioxin, đây được coi là một yếu tố nhạy cảm với đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Có thể bệnh nhân mang đột biến mới phát sinh. Như vậy bệnh nhân bị bệnh là do mang đột biến gen ở trạng thái dị hợp tử kết hợp, cần tư vấn di truyền trước khi kết hôn.

**Đột biến p.E229K:** là đột biến missense, dị hợp tử được phát hiện di truyền ở gia đình bệnh nhân mã số G40 và G85. Tuy nhiên trong 4 gia đình mã số G24, G70, G74 và G84 không thấy có sự di truyền.

Glôcôm bẩm sinh nguyên phát là một căn bệnh di truyền với nguyên nhân di truyền đã được thiết lập qua chế độ lặn nhiễm sắc thể thường tuy



nhiên một số trường hợp cũng không phát hiện di truyền. Sự phối hợp đột biến ở nhiều gen cũng đã được đề cập đến là nguyên nhân gây bệnh ở glôm bảm sinh nguyên phát như MYOC, yếu tố phiên mã liên quan đến ngã ba C1 (FOXC1) và yếu tố tăng trưởng beta-binding protein 2 (LTBP2). Thêm vào đó, đột biến gen ty thể cũng được cho là có liên quan đến sinh bệnh học của nó.

Các đột biến được phát hiện trên các bệnh nhân G70, G74, G84 đều là đột biến dị hợp tử. Điều này trái ngược với lý thuyết di truyền gen lặn nhiễm sắc thể thường của Melden. Tuy nhiên, có nhiều báo cáo của các tác giả cũng cho thấy có phát hiện đột biến dị tử ở bệnh nhân glôm bảm sinh nguyên phát và nhiều lý giải cho hiện tượng này.

Tác giả Muneeb Fraiq cho rằng nếu đột biến có độ thâm rất thấp thì trạng thái dị hợp tử có thể không gây bệnh ở bệnh nhân nhưng nếu đột biến có hại độ thâm cao, ở vùng trọng điểm của gen CYP1B1 thì có thể gây bệnh. Tác giả này cũng suy đoán về vai trò của các gen khác trong phát triển và sinh bệnh học của bệnh. Những gen này có thể có các tương tác chức năng và có thể chúng phối hợp với nhau dẫn đến sự phát triển của cấu trúc góc tiền phòng gây bệnh glôm bảm sinh nguyên phát [93].

Một báo cáo gần đây chỉ ra rằng, một sự thay đổi của con đường dopamin có thể làm trầm trọng thêm các triệu chứng nhẹ ở mắt kết hợp với một khiếm khuyết gen CYP1B1. Ngoài ra, gen CYP1B1 có đặc điểm là cảm ứng bởi xenobiotics, vì vậy, khởi phát của bệnh tăng nhãn áp ở những người mang đột biến có thể do tiếp xúc với một số yếu tố môi trường thuộc loại này [70].

Trong nghiên cứu của tác giả Chen Y (2008), 11 bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 dạng dị hợp tử. Tác giả giả định rằng, có các đột biến phối hợp khác gây bệnh mà các đột biến này có thể không được phát hiện do nằm trong vùng promoter hoặc vô hiệu hóa biểu hiện [63].

Tác giả Ni Li cũng biện luận trong nghiên cứu của mình về các đột biến dị hợp tử trên bệnh nhân là do có thể một số đột biến bị bỏ qua do hạn chế của phương pháp xét nghiệm, có thể trình tự các đột biến nằm trong vùng không mã hóa của gen hoặc có khả năng đột biến ở một gen khác kết hợp [42].

Những đột biến trong gen CYP1B1 đã được mô tả như nguyên nhân di truyền cơ bản chủ yếu cho phần lớn các trường hợp bệnh nhân bị glôcôm bẩm sinh nguyên phát ở các quốc gia Ả Rập Saudi [73]. Tuy nhiên trong kết quả phân tích phả hệ của chúng tôi, di truyền chỉ xảy ra ở 4 gia đình phát hiện đột biến. Giả thiết đặt ra là đột biến ở các bệnh nhân không di truyền là đột biến *de novo* (đột biến tế bào mầm, mới phát sinh) [34].

Tác giả Lim SH (2013) đã nghiên cứu trên bệnh nhân bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát ở Mỹ phát hiện hai cặp song sinh của một gia đình mang những thay đổi dị hợp tử cho 1 đột biến không có trong cả cha lẫn mẹ, ông cho rằng khả năng là đột biến *de novo* [94].

Các đột biến mới p.L191Sfs\*4 gây dịch khung dịch mã và đột biến p.Q159X, p.Q164X tạo mã kết thúc sớm cũng là các đột biến gây bệnh nhưng chưa tìm thấy sự di truyền qua các thế hệ.

## KẾT LUẬN

Qua tiến hành nghiên cứu xác định đột biến gen CYP1B1 trên 86 bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát và 29 thành viên gia đình bệnh nhân chúng tôi rút ra kết luận như sau:

### **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 của gen CYP1B1.

- Có mối liên quan giữa lâm sàng và tình trạng đột biến gen CYP1B1

Bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 có tuổi khởi phát sớm trước 2 tháng tuổi (trung bình là 1,21 tháng tuổi).

Bệnh nhân mang đột biến gen thường biểu hiện bệnh ở cả hai mắt chiếm 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.

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.

## **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. Một 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 CYP1B1.

## **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.

- 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 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.

## HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

1. 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.
2. 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.
3. Cần thực hiện chẩn đoán trước sinh đối với tất cả các trường hợp bố và hoặc mẹ là người lành mang gen bệnh để xác định thai nhi có bị bệnh hay không để từ đó tư vấn cho gia đình về việc đình chỉ thai nghén hoặc có kế hoạch điều trị sớm để hạn chế biến chứng mù lòa cho trẻ.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC  
CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

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

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Như Hôn (2012), *Nhãn khoa*, tập 1, ed, Nhà xuất bản y học, 465 - 474.
2. Shields M. B. (1982), *Primary congenital glaucoma*, Third edition, Williams and Wilkins, USA, 220-233.
3. Thylefors B., Negrel A. D. (1994), The global impact of glaucoma, *Bull WHO*, **72**, 323-326.
4. Nguyễn Như Quang (1982), Đặc điểm lâm sàng bệnh glôcôm bẩm sinh và phẫu thuật cắt bè cứng mạc, *Nhãn khoa*, **1**, 65-70.
5. Robert N. Weiss, Shaffer, Daniel I. (1970), Congenital and pediatric glaucomas, *Mosby, St. Louis*, 37.
6. Lim SH1, Tran-Viet KN, Yanovitch TL et al (2013 Mar), CYP1B1, MYOC, and LTBP2 mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States., *Am J Ophthalmol* , **155(3)**, 508-517.
7. Mei Yang, Xiangming Guo, Xing Liu et al (2009), Investigation of CYP1B1 mutations in Chinese patients with primary congenital glaucoma, *Mol Vis.*, **15**, 432–437.
8. Ji Hyun Lee, Chang-Seok Ki, Hee-Jung Kim et al (2011), Analysis of copy number variation using whole genome exon-focused array CGH in Korean patients with primary congenital glaucoma, *Mol Vis.* , **17**, 3583–3590.
9. Mukesh Tanwar, Tanuj Dada, Ramanjit Sihota et al (2009), Mutation spectrum of CYP1B1 in North Indian congenital glaucoma patients, *Mol Vis.*, **15**, 1200–1209.



10. Fuse N., Miyazawa A., Takahashi K. et al (2010), Mutation spectrum of the CYP1B1 gene for congenital glaucoma in the Japanese population, *Jpn J Ophthalmol.*, **54(1)**, 1-6.
11. A. O. Khan, M. A. Aldahmesh, J. Y. Mohamed et al (2012), CYP1B1 analysis of unilateral primary newborn glaucoma in Saudi children, *J AAPOS*, **16(6)**, 571-2.
12. A. K. Mandal, D. Chakrabarti (2011), Update on congenital glaucoma, *Indian J Ophthalmol*, **59 Suppl**, S148-57.
13. Von Muralt (1869), Ueber Hydrophthalmus cangenitus PhD dissertation.
14. Seefelder R. (1920), Hydrophthalmus als Folge einer Entwicklungsanomalie der Kammerbucht, *Graefes Arch Ophthalmol*, **103**, 1-13.
15. BARKAN O. (1949 Jan), Technic of goniotomy for congenital glaucoma., *Arch Ophthal.*, **41(1)**, 65-82.
16. Worst JGF (1966), The pathogenesis of congenital glaucoma, *Royal Van Gorcum Publishers, Assen, Netherlands*.
17. Anderson DR (1972), Pathology of the glaucomas, *Br J Ophthalmol.*, **56**, 146-157.
18. Anderson DR (1979), The pathogenesis of primary congenital glaucoma, *Third Meeting of Pan-American Glaucoma Society, Miami, FL, 29 Feb 1979*.
19. Anderson DR (1982), Discussion of Quigley HA in Childhood glaucoma, *Ophthalmology*, **89**, 225-226.
20. Hansson H. A., Jerndal T. (1971), Scanning electron microscopic studies of the development of the iridocorneal angle in human eyes, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **10**, 252-265.

21. Maumenee A. E. (1958), The pathogenesis of congenital glaucoma: a new theory, *Trans Am Ophthalmol Soc*, **56**, 507-570.
22. Hoskins H. D. Jr., Shaffer R. N., Hetherington J. (1984), Anatomical classification of the development of glaucomas, *Arch Ophthalmol*, 102:1331.
23. M. Sarfarazi, I. Stoilov (2000), Molecular genetics of primary congenital glaucoma, *Eye (Lond)*, **14 (Pt 3B)**, 422-8.
24. H. J. Kim, W. Suh, S. C. Park et al (2011), Mutation spectrum of CYP1B1 and MYOC genes in Korean patients with primary congenital glaucoma, *Mol Vis*, **17**, 2093-101.
25. K. Kaur, A. K. Mandal, S. Chakrabarti (2011), Primary Congenital Glaucoma and the Involvement of CYP1B1, *Middle East Afr J Ophthalmol*, **18(1)**, 7-16.
26. Genome Decoration Page/NCBI.
27. X. Chen, Y. Chen, B. J. Fan et al (2016), Screening of the LTBP2 gene in 214 Chinese sporadic CYP1B1-negative patients with primary congenital glaucoma, *Mol Vis*, **22**, 528-35.
28. K. K. Abu-Amero, E. A. Osman, A. Mousa et al (2011), Screening of CYP1B1 and LTBP2 genes in Saudi families with primary congenital glaucoma: genotype-phenotype correlation, *Mol Vis*, **17**, 2911-9.
29. R. Sharafieh, A. H. Child, P. T. Khaw et al (2013), LTBP2 gene analysis in the GLC3C-linked family and 94 CYP1B1-negative cases with primary congenital glaucoma, *Ophthalmic Genet*, **34(1-2)**, 14-20.
30. M. Plasilova, I. Stoilov, M. Sarfarazi et al (1999), Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma, *J Med Genet*, **36(4)**, 290-4.

31. J. C. Zenteno, E. Hernandez-Merino, H. Mejia-Lopez et al (2008), Contribution of CYP1B1 mutations and founder effect to primary congenital glaucoma in Mexico, *J Glaucoma*, **17(3)**, 189-92.
32. T. R. Sutter, Y. M. Tang, C. L. Hayes et al (1994), Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2, *J Biol Chem*, **269(18)**, 13092-9.
33. Y. M. Tang, Y. Y. Wo, J. Stewart et al (1996), Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene, *J Biol Chem*, **271(45)**, 28324-30.
34. Stoilov I., Akarsu A. N., Sarfarazi M. (1997), Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21, *Hum. Molec. Genet*, **6**, 641-647.
35. M. Sarfarazi, A. N. Akarsu, A. Hossain et al (1995), Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity, *Genomics*, **30(2)**, 171-7.
36. Stoilov I., Akarsu A. N., Alozie I. et al (1998), Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1, *Am. J. Hum. Genet*, **62**, 573-584.
37. Schwartzman M. L., Balazy M., Masferrer J. et al (1987), 12(R)-hydroxyicosatetraenoic acid: a cytochrome-P450-dependent arachidonate metabolite that inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the cornea, **84(22)**, 8125-9.
38. Hà Huy Tiến (1978), Các glôcôm bẩm sinh, *Nhãn khoa nước ngoài*.

39. Vũ Thị Bích Thủy (1988), *Phẫu thuật cắt - rạch bè để điều trị glôcôm bẩm sinh* Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
40. A. Al-Hazmi, A. Awad, J. Zwaan et al (2005), Correlation between surgical success rate and severity of congenital glaucoma, *Br J Ophthalmol*, **89(4)**, 449-53.
41. L. Chouiter, S. Nadifi (2017), Analysis of CYP1B1 Gene Mutations in Patients with Primary Congenital Glaucoma, *J Pediatr Genet*, **6(4)**, 205-214.
42. Ni Li, Yong Zhou, Liang Du et al (2011), Overview of Cytochrome P450 1B1 gene mutations in patients with primary congenital glaucoma, *Experimental Eye Research*, **93**, 572-579.
43. Kiranpreet Kaur, Anil K Mandal và Subhabrata Chakrabarti (2011), Primary Congenital Glaucoma and the Involvement of CYP1B1, *Middle East Afr J Ophthalmol.*, **18**, 7-16.
44. Morse SA Lee HH, Olsvik O (1997), Nucleic acid amplification technologies: application to disease diagnosis, *Eaton Publishing*, 49-60.
45. Hames BD McPherson MJ, Taylor GR (1995), Optimizing PCR, trong Oxford University Press, chủ biên, *PCR 2- A practical approach*, 1-22.
46. Sorscher DH (1997), DNA amplification techniques, trong Humana Press, chủ biên, *Molecular Diagnostics*, 98-101.
47. Reece RJ (2004), Polymerase chain reaction, trong John Wiley & Sons Ltd, chủ biên, *Analysis of Genes and Genomes*, 153-82.
48. Thompson MW Worton RG (1988), Genetics of Duchenne muscular dystrophy, *Annu Rev Genet*, **22** 601-29.
49. Koolman J (2005), DNA sequencing, *Color Atlas of Biochemistry 2nd edition*, 260-2.

50. T. Lalic, R. H. Vossen, J. Coffa et al (2005), Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA, *Eur J Hum Genet*, **13(11)**, 1231-4.
51. McElgunn CJ Schouten JP, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002), Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Res*, 30(12):e57.
52. Taylor GR Sellner LN (2004), MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions, *Human Mutation*, **23**, 413-9.
53. X. Chen, Y. Chen, L. Wang et al (2014), CYP1B1 genotype influences the phenotype in primary congenital glaucoma and surgical treatment, *Br J Ophthalmol*, **98(2)**, 246-51.
54. O. Geyer, A. Wolf, E. Levinger et al (2011), Genotype/phenotype correlation in primary congenital glaucoma patients from different ethnic groups of the Israeli population, *Am J Ophthalmol*, **151(2)**, 263-71 e1.
55. W. Suh, C. Kee (2012), A clinical and molecular genetics study of primary congenital glaucoma in South Korea, *Br J Ophthalmol*, **96(11)**, 1372-7.
56. C. Al-Haddad, M. Abdulaal, R. Badra et al (2016), Genotype/Phenotype Correlation in Primary Congenital Glaucoma Patients in the Lebanese Population: A Pilot Study, *Ophthalmic Genet*, **37(1)**, 31-6.
57. S. G. Panicker, A. K. Mandal, A. B. Reddy et al (2004), Correlations of genotype with phenotype in Indian patients with primary congenital glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45(4)**, 1149-56.

58. A. B. Reddy, K. Kaur, A. K. Mandal et al (2004), Mutation spectrum of the CYP1B1 gene in Indian primary congenital glaucoma patients, *Mol Vis*, **10**, 696-702.
59. L. Chen, L. Huang, A. Zeng et al (2015), CYP1B1 gene mutations with incomplete penetrance in a Chinese pedigree with primary congenital glaucoma: a case report and review of literatures, *Int J Clin Exp Med*, **8(8)**, 14538-41.
60. M. T. Garcia-Anton, J. J. Salazar, R. de Hoz et al (2017), Goniodysgenesis variability and activity of CYP1B1 genotypes in primary congenital glaucoma, *PLoS One*, **12(4)**, e0176386.
61. T. Do, W. Shei, P. T. Chau et al (2016), CYP1B1 and MYOC Mutations in Vietnamese Primary Congenital Glaucoma Patients, *J Glaucoma*, **25(5)**, e491-8.
62. L. Hilal, S. Boutayeb, A. Serrou et al (2010), Screening of CYP1B1 and MYOC in Moroccan families with primary congenital glaucoma: three novel mutations in CYP1B1, *Mol Vis*, **16**, 1215-26.
63. Y. Chen, D. Jiang, L. Yu et al (2008), CYP1B1 and MYOC mutations in 116 Chinese patients with primary congenital glaucoma, *Arch Ophthalmol*, **126(10)**, 1443-7.
64. Chen X1, Chen Y, Wang L et al (2014 Feb), CYP1B1 genotype influences the phenotype in primary congenital glaucoma and surgical treatment, *Br J Ophthalmol.*, **98(2)**, 246-51.
65. E. Campos-Mollo, M. P. Lopez-Garrido, C. Blanco-Marchite et al (2009), CYP1B1 mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma: phenotypic and functional variability, *Mol Vis*, **15**, 417-31.

66. T. H. Mokbel, E. M. El Hefney, S. M. Hagra et al (2018), Childhood glaucoma profile in Dakahelia, Egypt: a retrospective study, *Int J Ophthalmol*, **11(4)**, 674-680.
67. K. Mohanty, M. Tanwar, R. Dada et al (2013), Screening of the LTBP2 gene in a north Indian population with primary congenital glaucoma, *Mol Vis*, **19**, 78-84.
68. O. M. Badeeb, S. Micheal, R. K. Koenekoop et al (2014), CYP1B1 mutations in patients with primary congenital glaucoma from Saudi Arabia, *BMC Med Genet*, **15**, 109.
69. Y. Bouyacoub, S. Ben Yahia, N. Abroug et al (2014), CYP1B1 gene mutations causing primary congenital glaucoma in Tunisia, *Ann Hum Genet*, **78(4)**, 255-63.
70. R. Sitorus, S. M. Ardjo, B. Lorenz et al (2003), CYP1B1 gene analysis in primary congenital glaucoma in Indonesian and European patients, *J Med Genet*, **40(1)**, e9.
71. E. Colomb, J. Kaplan và H. J. Garchon (2003), Novel cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) mutations in patients with primary congenital glaucoma in France, *Hum Mutat*, **22(6)**, 496.
72. Y. Mashima, Y. Suzuki, Y. Sergeev et al (2001), Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42(10)**, 2211-6.
73. Abu-Amero KK1, Osman EA, Mousa A et al (2011 Nov 12), Screening of CYP1B1 and LTBP2 genes in Saudi families with primary congenital glaucoma: genotype-phenotype correlation, *Mol Vis*, **17**, 2911-9.

74. Suh W1, Kee C. (2012 Nov), A clinical and molecular genetics study of primary congenital glaucoma in South Korea., *Br J Ophthalmol.*, **96(11)**, 1372-7.
75. Li N, Zhou Y, Du L et al (2011), Overview of Cytochrome P450 1B1 gene mutations in patients with primary congenital glaucoma, *Experimental Eye Research*, **93(5)**, 572-579.
76. Do Tan, Shei W, Pham Thi Minh Chau et al (2016), CYP1B1 and MYOC Mutations in Vietnamese Primary Congenital Glaucoma Patients, *Journal of Glaucoma*, **25(5)**, 491-498.
77. Chouiter L, Nadifi S (2017), Analysis of CYP1B1 Gene Mutations in Patients with Primary Congenital Glaucoma, *J Pediatr Genet*, **6(4)**, 205-214.
78. Chen X, Chen Y, Wang L et al (2014), CYP1B1 genotype influences the phenotype in primary congenital glaucoma and surgical treatment, *The British Journal of Ophthalmology*, **98(2)**, 246-251.
79. Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y et al (2001), Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42(10)**, 2211-6.
80. Fereshteh Chitsazian, Betsabeh Khoramian Tusi, Elahe Elahi (2007), CYP1B1 Mutation Profile of Iranian Primary Congenital Glaucoma Patients and Associated Haplotypes, *The Journal of Molecular Diagnostics*, **9(3)**, 382 - 393.
81. Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I et al (1998), Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1, *American Journal of Human Genetics*, **62(3)**, 573-584.



82. A. Banerjee, S. Chakraborty, A. Chakraborty et al (2016), Functional and Structural Analyses of CYP1B1 Variants Linked to Congenital and Adult-Onset Glaucoma to Investigate the Molecular Basis of These Diseases, *PLoS One*, **11(5)**, e0156252.
83. M. Faiq, R. Sharma, R. Dada et al (2013), Genetic, Biochemical and Clinical Insights into Primary Congenital Glaucoma, *J Curr Glaucoma Pract*, **7(2)**, 66-84.
84. D. L. Spencer, S. A. Masten, K. M. Lanier et al (1999), Quantitative analysis of constitutive and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced cytochrome P450 1B1 expression in human lymphocytes, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8(2)**, 139-46.
85. A. Takeuchi, M. Takeuchi, K. Oikawa et al (2009), Effects of dioxin on vascular endothelial growth factor (VEGF) production in the retina associated with choroidal neovascularization, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50(7)**, 3410-6.
86. K. G. Michels-Rautenstrauss, C. Y. Mardin, M. Zenker et al (2001), Primary congenital glaucoma: three case reports on novel mutations and combinations of mutations in the GLC3A (CYP1B1) gene, *J Glaucoma*, **10(4)**, 354-7.
87. F. Chitsazian, B. K. Tusi, E. Elahi et al (2007), CYP1B1 mutation profile of Iranian primary congenital glaucoma patients and associated haplotypes, *J Mol Diagn*, **9(3)**, 382-93.
88. B. A. Bejjani, D. W. Stockton, R. A. Lewis et al (2000), Multiple CYP1B1 mutations and incomplete penetrance in an inbred population segregating primary congenital glaucoma suggest frequent de novo events and a dominant modifier locus, *Hum Mol Genet*, **9(3)**, 367-74.

89. S. Bagiyeva, G. Marfany, O. Gonzalez-Angulo et al (2007), Mutational screening of CYP1B1 in Turkish PCG families and functional analyses of newly detected mutations, *Mol Vis*, **13**, 1458-68.
90. S. Alfadhli, A. Behbehani, A. Elshafey et al (2006), Molecular and clinical evaluation of primary congenital glaucoma in Kuwait, *Am J Ophthalmol*, **141(3)**, 512-6.
91. Badeeb OM, Micheal S, Koenekoop RK et al (2014), CYP1B1 mutations in patients with primary congenital glaucoma from Saudi Arabia, *BMC Med Genet*, **15**, 109.
92. I. Jansson, I. Stoilov, M. Sarfarazi et al (2001), Effect of two mutations of human CYP1B1, G61E and R469W, on stability and endogenous steroid substrate metabolism, *Pharmacogenetics*, **11(9)**, 793-801.
93. M. A. Faiq, R. Dada, R. Qadri et al (2015), CYP1B1-mediated Pathobiology of Primary Congenital Glaucoma, *J Curr Glaucoma Pract*, **9(3)**, 77-80.
94. S. H. Lim, K. N. Tran-Viet, T. L. Yanovitch et al (2013), CYP1B1, MYOC, and LTBP2 mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States, *Am J Ophthalmol*, **155(3)**, 508-517 e5.

## BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Số hiệu bệnh nhân:.....Số bệnh án:.....

### I. Hành chính

- Họ và tên bệnh nhân:.....
- Ngày tháng năm sinh:...../...../.....
- Giới: Nam  Nữ
- Dân tộc:.....
- Địa chỉ:.....
- Điện thoại:.....
- Họ tên bố:..... Tuổi:..... Dân tộc:.....
- Nghề nghiệp:..... Trình độ văn hóa:.....
- Họ tên mẹ:..... Tuổi:..... Dân tộc:.....
- Nghề nghiệp:..... Trình độ văn hóa:.....
- Ngày lấy máu xét nghiệm:...../...../.....

### II. Lí do vào viện:.....

### III. Bệnh sử

- Thời gian phát hiện:..... Hoàn cảnh phát hiện bệnh:..... Diễn biến:.....
- Quá trình điều trị:.....
- Số lần phẫu thuật:.....
- Kết quả điều trị: .....

### III. Tiền sử

- Bản thân:  
Con thứ mấy:..... Đẻ thường  /mổ  /forceff  Cân nặng khi sinh:.....  
Phát triển tinh thần vận động:..... Bệnh toàn thân:.....  
Bệnh tại mắt khác:.....
- Gia đình và thai nghén:  
Mẹ mắc bệnh khi mang thai: có  bệnh gì..... thời điểm...../không   
Bố/ mẹ tiếp xúc với hóa chất độc hại/tia xạ:.....

### IV. Khám bệnh

- Cơ năng:  
MP: chói  chảy nước mắt  MT: chói  chảy nước mắt   
sợ ánh sáng  mờ  sợ ánh sáng  mờ

thời điểm xuất hiện:.....mức độ:.....      thời điểm xuất hiện:.....mức độ:.....

2. Thực thể:

Mi mắt

Kết mạc

Củng mạc và vùng rìa

Giác mạc: - Đường kính

- Tính chất

- Dẫn lời

- Vết Habb's

Tiền phòng

Soi góc tiền phòng

Đồng tử

Mống mắt

Thể thủy tinh

Dịch kính

Gai thị

Võng mạc

3. Chức năng và cận lâm sàng

Thị lực (loại bảng.....)

Nhãn áp (loại nhãn áp kế.....)

Thị trường

Siêu âm

	MP	MT
Mi mắt	.....	.....
Kết mạc	.....	.....
Củng mạc và vùng rìa	.....	.....
Giác mạc: - Đường kính	.....	.....
- Tính chất	.....	.....
- Dẫn lời	.....	.....
- Vết Habb's	.....	.....
Tiền phòng	.....	.....
Soi góc tiền phòng	.....	.....
Đồng tử	.....	.....
Mống mắt	.....	.....
Thể thủy tinh	.....	.....
Dịch kính	.....	.....
Gai thị	.....	.....
Võng mạc	.....	.....
	MP	MT
Thị lực (loại bảng.....)	.....	.....
Nhãn áp (loại nhãn áp kế.....)	.....	.....
Thị trường	.....	.....
Siêu âm	.....	.....

## **V. Chẩn đoán:**

## **VI. Kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 trên bệnh nhân**

## **VII. Kết quả phát hiện đột biến gen trên các thành viên gia đình có quan hệ huyết thống với bệnh nhân bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát**

## **VIII. Phả hệ**

**BỘ Y TẾ**  
**BỆNH VIỆN MẮT TRUNG ƯƠNG - TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**  
\*\*\*\*\*

**Thông tin cho đối tượng nghiên cứu và đơn tình nguyện tham gia nghiên cứu**

**Xác định đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát**

Cơ quan chủ trì: **Bệnh viện Mắt Trung ương**  
**Trung tâm nghiên cứu Gen - Protein - Trường Đại**  
**học Y Hà Nội**

Mã đối tượng:

## THÔNG TIN DÀNH CHO ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Anh/chị được mời tham gia tự nguyện vào một nghiên cứu xác định đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát và phát hiện người lành mang gen bệnh.

Trước khi đồng ý tham gia vào thử nghiệm này, anh/chị cần biết rõ các rủi ro và lợi ích để có thể đưa ra quyết định sau khi đã hiểu rõ. Quá trình này còn được gọi là “Chấp thuận tham gia nghiên cứu”. Phiếu chấp thuận này thông báo cho anh/chị biết về thử nghiệm mà anh/chị có thể muốn tham gia. Xin đọc kỹ các thông tin và bàn bạc với bất kỳ ai, có thể là với bạn hoặc với người thân mà anh/chị muốn nghe ý kiến. Nếu có thắc mắc, vui lòng hỏi bác sĩ nghiên cứu hoặc nhân viên nghiên cứu để được giải đáp. Một khi anh/chị đã hiểu rõ về nghiên cứu và các xét nghiệm sẽ cần làm, anh/chị sẽ được yêu cầu ký tên vào phiếu này để tham gia nghiên cứu. Quyết định tham gia vào nghiên cứu của anh/chị hoàn toàn là tự nguyện, nghĩa là anh/chị tự ý quyết định tham gia hoặc không tham gia nghiên cứu này. Anh/chị cũng có quyền ngừng tham gia nghiên cứu bất kỳ lúc nào mà không cần đưa ra lý do. Nếu quyết định không tham gia nghiên cứu, anh/chị có thể trao đổi với bác sĩ.

### 1. Các vấn đề liên quan đến nghiên cứu

Mục tiêu nghiên cứu:

3. Xác định đột biến gen CYP1B1 trên bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại Bệnh viện Mắt Trung ương từ năm 2014 đến năm 2017.
4. Mô tả phân bố đột biến gen CYP1B1 trong nhóm bệnh nhân nghiên cứu.

Khoảng thời gian dự kiến: 2014-2017

Phương pháp tiến hành:

### 2. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng vào nghiên cứu:

1. Tiêu chuẩn lựa chọn: tất cả bệnh nhân được chẩn đoán xác định bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại Bệnh viện Mắt trung ương, đồng ý tham gia nghiên cứu.

- Nhóm nghiên cứu :

- + 60 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát.
- + Các thành viên trong dòng họ có cùng huyết thống với bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1. Do tỷ lệ phát hiện đột biến gen CYP1B1 trong các nghiên cứu trước đây khoảng 20%, vì vậy dự kiến khoảng 15 đến 20 gia đình của bệnh nhân phát hiện được đột biến gen CYP1B1.

2. Tiêu chuẩn loại trừ khỏi nghiên cứu : bệnh nhân không tự nguyện tham gia nghiên cứu
3. Người đánh giá các thông tin cá nhân và y khoa để chọn lọc bạn/người thân tham gia vào nghiên cứu này: Bệnh viện Mắt Trung ương
4. Những người sẽ tham gia vào nghiên cứu: Cán bộ Bệnh viện Mắt Trung ương và Trung tâm nghiên cứu Gen - protein - Trường Đại học Y Hà Nội.
5. Miêu tả những rủi ro hoặc bất lợi: hiếm xảy ra.
6. Miêu tả lợi ích của đối tượng hoặc những người khác: có quyền được tiếp cận với các dữ liệu mà những người có trách nhiệm mô tả trong tờ thông tin. Được thông báo về kết quả kết quả xác định đột biến gen CYP1B1 của bệnh nhân và những người thân tham gia vào nghiên cứu (nếu có). Được tư vấn di truyền về bệnh.
7. Những khoản nào được chi trả trong nghiên cứu: bệnh nhân không phải chi trả bất cứ khoản tiền nào liên quan đến việc lấy mẫu máu và xác định đột biến gen CYP1B1.
8. Trình bày lưu giữ mật các hồ sơ nhưng có thể nhận dạng được chủ thể
9. Chỉ rõ rằng cơ quan quản lý có thể kiểm tra hồ sơ của đối tượng
10. Vấn đề bồi thường/ hoặc điều trị y tế nếu có thương tích xảy ra (Ở đâu có thể có các thông tin khác)
11. Người để liên hệ khi có câu hỏi
  - Về nghiên cứu
  - Về quyền của đối tượng nghiên cứu
  - Trong trường hợp có thương tích liên quan đến nghiên cứu

Nêu rõ rằng sự tham gia là tình nguyện, không bị phạt nếu từ chối tham gia và chủ thể có thể thôi không tham gia nữa vào bất kỳ thời điểm nào mà không bị mất quyền lợi

.....



## ĐƠN TÌNH NGUYỆN

Tôi, xác nhận rằng

Tôi đã đọc các thông tin đưa ra cho nghiên cứu: "xác định đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát" và tôi đã được các cán bộ nghiên cứu giải thích về nghiên cứu này và các thủ tục đăng ký tình nguyện tham gia vào nghiên cứu.

- Tôi đã có cơ hội được hỏi các câu hỏi về nghiên cứu này và tôi hài lòng với các câu trả lời và giải thích đưa ra.
- Tôi đã có thời gian và cơ hội để cân nhắc tham gia vào nghiên cứu này.
- Tôi đã hiểu được rằng tôi có quyền được tiếp cận với các dữ liệu mà những người có trách nhiệm mô tả trong tờ thông tin.
- Tôi hiểu rằng tôi có quyền rút khỏi nghiên cứu vào bất cứ thời điểm nào vì bất cứ lý do gì.

Tôi đồng ý rằng các bác sỹ chăm sóc sức khoẻ chính sẽ được thông báo về việc tôi tham gia trong nghiên cứu này.

Đánh dấu vào ô thích hợp (quyết định này sẽ không ảnh hưởng khả năng bạn tham gia vào nghiên cứu):

Có

Không

Tôi đồng ý tham gia trong nghiên cứu này.

Ký tên của người tham gia .....	Ngày/tháng/năm ...../...../.....
Nếu cần,	
Ký tên của người làm chứng .....	Ngày/tháng/năm ...../...../.....
Viết tên của người làm chứng .....	

## PHỤ LỤC 1

### *Trình tự đoạn gen CYP1B1*

1 aaaacccgga ggagcgggat ggcgcgcttt gactctggag tgggagtggg agcgagcgt 61  
tctgcgactc cagttgtgag agccgcaagg gcatgggaat tgacgccact caccgacccc 121  
cagtctcaat ctcaacgctg tgaggaaacc tcgactttgc caggtcccca agggcagcgg 181  
ggctcggcga gcgaggcacc cttctccgtc cccatcccaa tccaagcgt cctggcactg 241  
acgacgcaa gagactcgag tgggagttaa agcttccagt gagggcagca ggtgtccagg 301  
ccgggctg cgggttctgt tgacgtcttg ccctaggcaa aggtcccagt tccttctcgg 361  
agccggctgt cccgcgccac tggaaaccgc acctccccgc aggtcagtct gtctgccgag 421  
gcgctgcccg gcgacctctt cagatggatt attacaggta gcgggtggcg tggtaggtac 481  
tttaaaggaa atcaagcgc accgcctcga tgcccgcagc gttgtcccca gattgcagga 541  
accgttacgc gccttgccgg gaggggaagg gtttggcgct gggttacagc gaggtgaaa 601  
cacgcccctt ctcttctcca agggagagtg ggttggggat ggggaagggc gtcttcggcc 661  
atctctccag agagtcagct ccgacctctc cacccaacgg cactcagtcc ccagaggctg 721  
gggtagggc gtggggcgcc cgctcctgtc tctgcacccc tgagtgtcac gccttctcct 781  
ctctgtcccc agcatgggca ccagcctcag cccgaacgac ccttggccgc taaacccgct 841  
gtccatccag cagaccacgc tcctgctact cctgtcggtg ctggccactg tgcattgtgg 901  
ccagcggctg ctgaggcaac ggaggcggca gctccggctc gcgcccccg gcccgtttgc 961  
gtggccactg atcgaaaacg cggcggcggg gggccaggcg gctcacctct cgttcgctcg 1021  
cctggcggcg cgtacggcg acgttttcca gatccgcctg ggcagctgcc ccatagtggg 1081  
gctgaatggc gagcgcgcca tccaccaggc cctgggtgag cagggtcgg ccttcgccga 1141  
ccggccggcc ttcgcctcct tccgtgtggt gtccggcggc cgcagcatgg ctttcggcca 1201  
ctactcggag cactggaagg tgcagcggcg cgcagcccac agcatgatgc gcaacttctt 1261  
cacgcgccag ccgcgcagcc gccaaagtct cgagggccac gtgtgagcg aggcgcgca 1321  
gctggtggcg ctgctggtgc gcgccagcgc ggaocggcgc tcctcgcacc cgaggccgct 1381  
gaccgtcgtg gccgtggcca acgtcatgag tgcogtgtgt ttcggctgcc gctacagcca 1441  
cgacgacccc gagtccgctg agctgctcag ccacaacgaa gagtccggc gcacggtggg 1501  
cgcgggcagc ctggtggacg tgatgccctg gctgcagtac tcccccaacc cggcgcgca 1561  
cgttttccgc gaattcgagc agctcaaccg caacttcagc aacttcaccc tggacaagt 1621  
cttgaggcac tgcgaaagcc ttcggcccgg ggcgcacccc cgcgacatga tggacgcctt 1681  
tactctctct gcgaaaaga aggcggcggg ggactcgcac ggtggtggcg cgcggctgga 1741  
tttgagaaac gtaccggcca ctatcactga catcttcggc gccagccagg acaccctgtc 1801  
caccgcgctg cagtggctgc tcctcctctt caccaggtaa agcctctggg aggcgtgggc 1861  
caggtctttt ctctctgaa aaaggcggag tagagacaga atatgctgag tttgcaagca 1921  
gggccccggg tttggggtt cgctccaggt cccaccctt caaaaccaag atcgcgtcgg 1981  
taaagggact cacagtgagg gctgcgacac gcgcacgcgc cccaccagc ggtgccccga 2041  
cccctccggt ctctatctt gtctctatcg tcccctcccc tgcttgcgag tgagaacaca 2101  
tttgcaaaga ccctccacc ccccgaaaa acaagagttt ttaaagtctt ggagatgagc 2161  
cctgatctct ctctccctgg cgcattacaa tcagaactgg aatagttccg aaagaaaagg 2221  
taatgtcata aatatgttaa acacagcagc ctctcctagg ctagtccctg gcgtgcatcc 2281  
gaggccgccc agccctggcg ctaaaagcgg gccgcccgtc agggctttgt tccaggccaa 2341  
ggaagcccat ggaggccggg ccagccgaca ggtaaccgc acagaaactt tcagaaggcg 2401  
gccacaacta gcgggcagcg ctaggtttat aaaacctccg cgctaggagt ttgagaaatg 2461  
ccggggtaga agacaagaag cagtcacttt tacgaaagca gtagtagcatt cagaaaggca 2521  
gatgggatat ccaggaggcg cctgcagacg tttctggccc ctgcgcttgg ctgagttagc 2581  
ggacccccctg atgccacgt tggctctctac taagcacgga ttcaacaggt ccctggtgtc 2641  
gggttgccag atttgcaaaa agaaaagtaa gttttacacg ggaatactca cactaaaaga 2701  
ttagcccttg ttgatctgaa atccatattt aactgggccc cctgtagtat ttactgtgga 2761

aacactatcc ctaggggcaa atgtttcgca aggcaaattt tgattgccga agagaccaga 2821  
aatcctgggt ttgtgtcatt tcttgagca caagtgagca gttggagatg ctgaatctgc 2881  
aggcgccaca gaaaggtggt tggaaggcag agaatgactc tttccttatt aaaatccact 2941  
gcaatctata tttccttaga tactgtacag ctaccttcac aaatataaag tttctgtata 3001  
cttaaaatgg ctttttagta ttaaaatcat agaaacaccc atggtgggtg agggagaggc 3061  
agaaatcgaa taaagaaaag tcaaccagag atcagggaaa aggaaatccc ggaataggtt 3121  
ccatagggtt ttgtgcatcc gcagataggc attttaactt ttgaaacggc ctttgttttt 3181  
cattagaacc acaatagtcc tccgagtact ccaattaggc ggcaaaaaga aataaaacaa 3241  
tttgagggtc actttcaatt caatagtctg atactttttt tttccttttt agtgaagaaga 3301  
cgtatgacag ggcttgcaaa attacacgat ctgtttttgt atatacgttt tattgacgca 3361  
gtcatgccca ttcatttata cattgtcgat ggctgcggtc actctacaac acaaggcaga 3421  
gcagagtagt gcaacaaaga gggtttggtc cacaaagtct aaaatagata ctctctggct 3481  
ctccccacca tacatgtttc tatgaaaaaa gttggcagac tcctgcaata taatgttgaa 3541  
gaagcgattc taaaaataac tccacttcat cacatacgtg tatacatttt ttttcggagt 3601  
tgcaaaacaat cagttacttg ttttttgact tctaactctt tgactcaagg tagtggacat 3661  
ttctaactct ttaatattta ttttggtaat ttttgatggc tataatagat tttgctatga 3721  
taatgtatag ttatatataa tcatttattg aactttaatg ttggtcattg gccttgattg 3781  
catttttaaa atttttattt taattttatg tatttactta ccttagagac agggctctac 3841  
taccttacc aggctggtcc caaactcctg ggctcaagca gttctcccgc cgctgtctgg 3901  
caggtagctg gggctacagg cgtgtaccac catgcctggc taatttttag aatttttagt 3961  
cctgtttggt ttacatattt ttgtatctct taaattattt tctgaaaata catttctagg 4021  
catggattac tgggtttaaa atgaggcggg aagaggttac cttcatgtct cttgcctcgt 4081  
attaagattt tgttttttaa aaagattgta tcagtttgta tcatcaacag tgaataagta 4141  
ctacagtttg taccataatt ttatgaacat tgggtatttg ctttcaaatt taaaaatac 4201  
agtatgtagc tttatccatc aggacaccaa ttatctttgt ataaaatgag aacagcatgt 4261  
ctgttggaat tgtccagggg aatgaggggg aaaaaaatt tactttcaca ttgtaacttt 4321  
cgtgggccct gggtgctttt gcctttgtag attccttata ctataaaaaa attaaaaatt 4381  
aaatttcatg actaccctga tataaagatg aatgcattaa aatgatgat gaaaatattt 4441  
tcttctaact aaaagtgagt ttttttaggt ctgaagattg taaaagacgt aaaaatattt 4501  
tcatgggccc ctaaaagtg ttgtgagccc taggcactgt ccctgcggtg cccaatggaa 4561  
aagtcagcct tatctactat tgtgcttttt gaggctggga aaacttaaga gttttttgac 4621  
ttataatggg aaagacagca ttagtcatgc aaggcctatt acaggaaata taattcttaa 4681  
agtccatctt gtaatttagt gagaaattag gaagctggtt tagatttttt tcccagaaat 4741  
attaatttag tcaactgagct agatagccta ttttaagaaaa agtggaaata aaataaatta 4801  
taatgtgctt tctagatgaa ataagaattt tgctcacttg cttttctctc tccacattaa 4861  
acaccaaaca ggtatcctga tgtgcagact cgagtgcagg cagaattgga tcaggtcgtg 4921  
gggagggacc gtctgccttg tatgggtgac cagcccaacc tgcctatgt cctggccttc 4981  
ctttatgaag ccatgcgctt ctccagctt gtgcctgtca ctattcctca tgccaccact 5041  
gccaacacct ctgtcttggg ctaccacatt cccaaggaca ctgtggtttt tgtcaaccag 5101  
tggctctgta atcatgacct actgaagtgg cctaaccggg agaactttga tccagctcga 5161  
ttcttggaca aggatggcct catcaacaag gacctgacca gcagagtgat gattttttca 5221  
gtgggcaaaa ggcggtgcat tggcgaagaa ctttctaaga tgcagctttt tctcttcac 5281  
tccatcctgg ctcaccagtg cgatttcagg gccaaaccaa atgagcctgc gaaaatgaat 5341  
ttcagttatg gtctaaccat taaaccaag tcatttaaaag tcaatgtcac tctcagagag 5401  
tccatggagc tccttgatag tgctgtccaa aatttacaag ccaaggaaac ttgccataa 5461  
gaagcaagag gcaagctgaa attttagaaa tattcacatc ttcggagatg aggagtaaaa 5521  
ttcagttttt ttccagttcc tcttttgtgc tgcttctcaa ttagcgttta aggtgagcat 5581  
aaatcaactg tccatcaggt gaggtgtgct ccataccag cggttcttca tgagtagtgg 5641  
gctatgcagg agcttctggg agattttttt gagtcaaaga cttaaagggc ccaatgaatt 5701  
attatataca tactgcatct tggttatttc tgaaggtagc attctttgga gttaaaatgc 5761

acatatagac acatacaccc aaacacttac accaaactac tgaatgaagc agtatttttg 5821  
taaccaggcc atttttggtg ggaatccaag attggtctcc catatgcaga aatagacaaa 5881  
aagtatatta acaaagttt cagagtatat tgttgaagag acagagacaa gtaatttcag 5941  
tgtaaagtgt gtgattgaag gtgataaggg aaaagataaa gaccagaaat tcccttttca 6001  
ccttttcagg aaaataactt agactctagt atttatgggt ggatttatcc ttttgccttc 6061  
tggatatactt ccttactttt aaggataaat cataaagtca gttgctcaa aagaaatcaa 6121  
tagttgaatt agtgagtata gtgggggtcc atgagttatc atgaatttta aagtatgcat 6181  
tattaaattg taaaactcca aggtgatgtt gtacctctt tgcttgcaa agtacagaat 6241  
ttgaattatc agcaaagaaa aaaaaaaaaag ccagccaagc tttaaattat gtgaccataa 6301  
tgtactgatt tcagtaagtc tcataggta aaaaaaaaaag tcaccaataa gtgtgaaata 6361  
tattacttaa ctgtccgtaa gcagtatatt agtattatct tgttcaggaa aaggttgaat 6421  
aatatatgcc ttgtataata ttgaaaattg aaaagtacaa ctaacgcaac caagtgtgct 6481  
aaaaatgagc ttgattaaat caaccaccta tttttgacat ggaaatgaag cagggtttct 6541  
tttcttact caaattttg cgaatctcaa aattagatcc taagatgtgt tcttattttt 6601  
ataacatctt tattgaaatt ctatttataa tacagaatct tgttttgaataaacctaat 6661  
taatataatta aaattccaaa ttcattggcat gcttaaattt taactaaatt ttaaagccat 6721  
tctgattatt gagttccagt tgaagttagt ggaaatctga acattctcct gtggaaggca 6781  
gagaaatcta agctgtgtct gcccaatgaa taatggaaaa tgccatgaat tacctggatg 6841  
ttctttttac gaggtgacaa gagttgggga cagaactccc attacaactg accaagtttc 6901  
tcttctagat gattttttga aagttaacat taatgcctgc tttttgaaa gtcagaatca 6961  
gaagatagtc ttggaagctg tttggaaaag acagtggaga tgaggtcagt tgtgtttttt 7021  
aagatggcaa ttactttggt agctgggaaa gcataaagct caaatgaaat gtatgcattc 7081  
acatttagaa aagtgaattg aagtttcaag ttttaaagtt cattgcaatt aaacttccaa 7141  
agaaagttct acagtgtcct aagtgtcaag tgcttattac attttattaa gcttttttga 7201  
atctttgtac caaaatttta aaaaaggag tttttgatag ttgtgtgtat gtgtgtgtgg 7261  
ggtgggggga tggaagaga aaagagagaa aactgaaaa gaaggaaaga tggtaaaca 7321  
ttttcccact cattctgaat taattaattt ggagcacaaa attcaaagca tggacattta 7381  
gaagaaagat gtttggcgta gcagagttaa atctcaataa ggctattaaa aaagtctaca 7441  
acatagcaga tctgtttgtt ggtttggaat attaaaaaac ttcattgtaattttattttta 7501  
aatttcatag ctgtacttct tgaatataaa aatcatgcc agtattttta aaggcattag 7561  
agtcaactac acaaagcagg cttgcccagt acatttaaat tttttggcac ttgccattcc 7621  
aaaatattat gcccaccaa ggctgagaca gtgaatttgg gctgctgtag cctatttttt 7681  
tagattgaga aatgtgtagc tgcaaaaata atcatgaacc aatctggatg cctcattatg 7741  
tcaaccaggt ccagatgtgc tataatctgt ttttacgtat gtaggccag tcgtcatcag 7801  
atgcttgccg caaaaggaaa gctgtgttta tatggaagaa agtaaggtgc ttggagtta 7861  
cctggcttat ttaatatgct tataacctag ttaaagaaag gaaaagaaa caaaaaacga 7921  
atgaaaataa ctgaatttgg aggctggagt aatcagatta ctgctttaat cagaaaccct 7981  
cattgtgttt ctaccggaga gagaatgtat ttgctgacaa ccattaaagt cagaagtttt 8041  
actccaggtt attgcaataa agtataatgt ttattaaatg cttcatttgt atgtcaaagc 8101  
ttgactcta taagcaaatt gcttttttcc aaaacaaaaa gatgtctcag gtttgttttg 8161  
tgaattttct aaaagctttc atgtcccaga acttagcctt tacctgtgaa gtgttactac 8221  
agccttaata ttttcttagt agatctatat tagatcaaat agttgcatag cagtatatgt 8281  
taatttgtgt gtttttagct gtgacacaac tgtgtgatta aaaggatac tttagtagac 8341  
atttataact caaggatacc ttcttattta atcttttctt atttttgtac tttatcatga 8401  
atgcttttag tgtgtgcata atagctacag tgcatagttg tagacaaagt acattctggg 8461  
gaaacaacat ttatatgtag ctttactgt ttgatatacc aaattaaanaaaaattgtat 8521  
ctcattactt atactgggac accattacca aaataataaa aatcactttc ataactttg

## PHỤ LỤC 2

*Các nghiên cứu về đột biến gen CYP1B1 gây bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại các nước khác nhau tính đến năm 2010*

<b>Tác giả</b>	<b>Các nước</b>	<b>Số BN</b>
Stoilovetal, 1997	Thổ Nhĩ Kỳ	5
Stoilovetal, 1998	Tây Ban Nha, Mỹ, Pháp, Canada, Anh, Thổ Nhĩ Kỳ	17
Bejjanietal, 1998	Ả rập	24
Plasilovaetal, 1999	Slovakia	20
Martinetal, 2000	Canada	2
Bejjanietal, 2000	Ả rập	10
Michels-Rautenstrausetal, 2001	Thổ Nhĩ Kỳ, Đức, Cộng hòa Liban	1
Mashimaetal, 2001	Nhật Bản	13
Kakiuchi-Matsumotoetal, 2001	Nhật Bản	2
Belmoudenetal, 2002	Maroc	11
Stoilovetal, 2002	Braxin	26
Reddyetal, 2003	Ấn độ	37
Chakrabartietal, 2003	Ấn độ	2
Colombetal, 2003	Angieri, Pháp, Bồ Đào Nha	15
Sitorusetal, 2003	Indonesia-Sudan, Thổ Nhĩ Kỳ, Ý	6
Reddyetal, 2004	Ấn độ	24
Curryetal, 2004	Ecuado	2
Panickeretal, 2004	Ấn độ	1
Senaetal, 2004	Braxin, Mỹ	4
Messina-Baasetal, 2007	Mexico	4
Hollanderetal, 2006	Asian, Tây Ban Nha, Trung Đông	4
Strometal, 2006	Mỹ	1
Chavarria-Soleyetal, 2006	CostaRica, Nga, Thổ Nhĩ Kỳ, Đức, Thụy Sĩ, Mỹ, Ả rập	26
Alfadhlietal, 2006	Kuwait	12

Brinkmannetal, 2006a	Hà Lan	1
Nirmaladevietal, 2006a	Ấn độ	1
Brinkmannetal, 2006b	Hà Lan	1
Nirmaladevietal, 2006b	Ấn độ	1
Jiangetal, 2007	Trung Quốc	7
El-Ashryetal, 2007	Ả rập	5
Ramprasadetal, 2007	Ấn độ	6
Chitsazianetal, 2007	Iran	72
Dimasietal, 2007	Anh, Ý, Ấn độ	8
Bagiyevaetal, 2007	Thổ Nhĩ Kỳ	15
Huangetal, 2007	Trung Quốc	1
Chenetal, 2008	Trung Quốc	20
Firasatetal, 2008	Pakistan	3
Zentenoetal, 2008	Mexico	2
Sivadoraietal, 2008	Di-gan	7
Campos-Molloetal, 2009	Tây Ban Nha	14
Yangetal, 2009	Trung Quốc	6
Tanwaretal, 2009a	Ấn độ	23
El-Gayaretal, 2009	Oman	8
López-Garridoetal, 2009	Tây Ban Nha	1
Tanwaretal, 2009b	Ấn độ	9
Weisschuhetal, 2009	Đức	7
DellaPaoleraetal, 2010	Braxin	9
Huangetal, 2009	Trung Quốc	1
Surietal, 2009	Iran	13
Fuseetal, 2010	Nhật Bản	4
Hilaletal, 2010	Maroc	19
Bar-Yosefetal, 2010	Israel	9

### PHỤ LỤC 3

*Các vị trí đột biến gen CYP1B1 ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát*

*(UD: Đột biến chưa xác định; NR:SNP mới)*

Vị trí	Vị trí trên DNA	N	%	Protein	Loại đột biến	dbSNP
Exon 1	3130C>T	2	0,18	Vùng không mã hóa	Vùng không mã hóa	NR
Exon 2	3834insA	11	1,00	Lệch khung dịch mã	Thêm Nu	NR
Exon 2	3860C>T	2	0,18	Q19X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	3876T>G	2	0,18	L24R	Sai nghĩa	NR
Exon 2	3905del23	2	0,18	Không thay đổi dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	3913C>T	1	0,09	Q37X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	3929C>T	1	0,09	Q42X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	3956insC	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Thêm Nu	NR
Exon 2	3960C>T	1	0,09	P52L	Sai nghĩa	NR
Exon 2	3964delC	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	3972delC	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	3976G>A	6	0,55	W57X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	3976G>C	1	0,09	W57C	Sai nghĩa	NR
Exon 2	3979delA	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	3985C>G	1	0,09	I60M	Sai nghĩa	NR
Exon 2	3987G>A	207	18,85	G61E	Sai nghĩa	rs28936700
Exon 2	3988delA	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4004del8	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR

Vị trí	Vị trí trên DNA	N	%	Protein	Loại đột biến	dbSNP
Exon 2	4035T>C	2	0,18	L77P	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4046T>A	2	0,18	Y81N	Sai nghĩa	rs9282671
Exon 2	4048C>A	2	0,18	Y81X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4052delG	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4081delC	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4089T>C	1	0,09	V95A	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4122C>A	1	0,09	A106D	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4124C>G	4	0,36	L107V	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4133C>T	12	1,09	Q110X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4148G>C	2	0,18	A115P	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4154C>T	1	0,09	R117W	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4155G>C	1	0,09	R117P	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4157C>T	2	0,18	P118S	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4168ins18 <sup>a</sup>	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Thêm Nu	NR
Exon 2	4196del5	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4200T>G	4	0,36	M132R	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4206T>C	1	0,09	F134S	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4236A>C	1	0,09	Q144P	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4236A>G	1	0,09	Q144R	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4238del10	4	0,36	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4259delAT	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4280C>T	1	0,09	Q159X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4292C>T	1	0,09	R163C	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4306insT	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Thêm Nu	NR



Vị trí	Vị trí trên DNA	N	%	Protein	Loại đột biến	dbSNP
Exon 2	4322G>A	8	0,73	E173K	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4322G>T	1	0,09	E173X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4330delTG	3	0,27	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4335T>G	2	0,18	L177R	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4335T>C	1	0,09	L177P	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4339delG	24	2,19	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4340delG	34	3,10	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4342delG	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4373T>C	1	0,09	F190L	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4375C>A	2	0,18	F190L	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4379G>T	1	0,09	D192Y	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4380A>T	4	0,36	D192V	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4383C>T	4	0,36	P193L	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4397G>A	2	0,18	V198I	Sai nghĩa	rs59472972
Exon 2	4410C>A	1	0,09	A202D	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4413A>G	1	0,09	N203S	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4430T>C	1	0,09	C209R	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4449G>T	3	0,27	S215I	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4490G>A	29	2,64	E229K	Sai nghĩa	rs57865060
Exon 2	4499G>C	1	0,09	G232R	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4520A>C	4	0,36	S239R	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4523delC	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4530dup16/del6	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Lặp/Mất Nu	NR
Exon 2	4531del22	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR

Vị trí	Vị trí trên DNA	N	%	Protein	Loại đột biến	dbSNP
Exon 2	4547C>T	1	0,09	Q248X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4578C>A	3	0,27	F261L	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4589G>T	1	0,09	E262X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4602del9	4	0,36	Không thay đổi dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4611dup9	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Duplication	NR
Exon 2	4633delC	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4635delT	5	0,46	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 2	4640C>G	1	0,09	H279D	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4645C>A	3	0,27	C280X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4646G>T	3	0,27	E281X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4650G>A	1	0,09	S282N	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4664G>A	1	0,09	A287S	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4668insC	6	0,55	Lệch khung dịch mã	Thêm Nu	NR
Exon 2	4673insC	4	0,36	Lệch khung dịch mã	Thêm Nu	NR
Exon 2	4677A>G	6	0,55	D291G	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4680e4681TG>AA	1	0,09	M292K	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4761A>G	1	0,09	N319S	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4763G>T	2	0,18	V320L	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4776insAT	4	0,36	Lệch khung dịch mã	Thêm Nu	NR
Exon 2	4791G>T	5	0,46	G329V	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4791G>A	2	0,18	G329D	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4793e4794GC>TT	1	0,09	A330F	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4812C>A	1	0,09	S336Y	Sai nghĩa	NR

Vị trí	Vị trí trên DNA	N	%	Protein	Loại đột biến	dbSNP
Exon 2	4825G>T	1	0,09	Q340H	Sai nghĩa	NR
Exon 2	4828G>A	1	0,09	W341X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 2	4838delCTC	1	0,09	Không thay đổi khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Intron 2/Exon 3	4849del	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	7899del12	1	0,09	Không thay đổi khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	7900C>T	2	0,18	R355X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 3	7900delCG	4	0,36	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	7901del13	30	2,73	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	7925T>A	2	0,18	V363D	Sai nghĩa	NR
Exon 3	7927G>A	17	1,55	V364M	Sai nghĩa	NR
Exon 3	7930G>T	2	0,18	G365W	Sai nghĩa	rs55771538
Exon 3	7934delG	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	7939C>T	3	0,27	R368C	Sai nghĩa	NR
Exon 3	7940G>A	87	7,92	R368H	Sai nghĩa	rs28936414
Exon 3	7940G>T	2	0,18	R368L	Sai nghĩa	NR
Exon 3	7945delC	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	7957G>A	8	0,73	D374N	Sai nghĩa	rs28936413
Exon 3	7959C>G	2	0,18	D374E	Sai nghĩa	NR
Exon 3	7970T>A	1	0,09	L378Q	Sai nghĩa	NR
Exon 3	7990C>T	14	1,28	L385F	Sai nghĩa	NR
Exon 3	7996G>A	65	5,92	E387K	Sai nghĩa	rs55989760
Exon 3	7999G>A	3	0,27	A388T	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8005C>T	23	2,09	R390C	Sai nghĩa	NR

Vị trí	Vị trí trên DNA	N	%	Protein	Loại đột biến	dbSNP
Exon 3	8005C>A	4	0,36	R390S	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8006G>A	74	6,74	R390H	Sai nghĩa	rs56010818
Exon 3	8033T>G	1	0,09	I399S	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8035C>T	3	0,27	P400S	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8037dup10	39	3,55	Lệch khung dịch mã	Lặp đoạn	NR
Exon 3	8047dup10	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Lặp đoạn	NR
Exon 3	8104A>T	1	0,09	N423Y	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8111insG	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Thêm Nu	NR
Exon 3	8127C>G	1	0,09	D430E	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8131C>G	1	0,09	L432V	Sai nghĩa	rs1056836
Exon 3	8139G>A	1	0,09	W434X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 3	8147C>T	7	0,64	P437L	Sai nghĩa	rs56175199
Exon 3	8162C>G	1	0,09	P442R	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8165C>G	3	0,27	A443G	Sai nghĩa	rs4986888
Exon 3	8167C>T	1	0,09	R444X	Tạo mã kết thúc	NR
Exon 3	8168G>A	9	0,82	R444Q	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8170T>A	2	0,18	F445I	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8171T>G	1	0,09	F445C	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8171T>C	2	0,18	F445S	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8182delG	11	1,00	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	8209del5ins11	1	0,09	Lệch khung dịch mã	Mất/Thêm Nu	NR
Exon 3	8214dup27	3	0,27	Lệch khung dịch mã	Lặp đoạn	NR
Exon 3	8214delAG	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR

<b>Vị trí</b>	<b>Vị trí trên DNA</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Protein</b>	<b>Loại đột biến</b>	<b>dbSNP</b>
Exon 3	8234G>A	2	0,18	G466D	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8240dup27	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Lặp đoạn	NR
Exon 3	8242C>T	53	4,83	R469W	Sai nghĩa	rs28936701
Exon 3	8246G>A	2	0,18	C470Y	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8249T>G	2	0,18	I471S	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8297T>C	2	0,18	L487P	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8329A>G	1	0,09	N498D	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8333A>G	1	0,09	E499G	Sai nghĩa	NR
Exon 3	8341delA	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	8354del20	2	0,18	Lệch khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	8373del6	2	0,18	Không thay đổi khung dịch mã	Xóa đoạn	NR
Exon 3	8405G>A	4	0,36	R523K	Sai nghĩa	NR
UD	UD	89	8,11	UD	UD	UD

#### PHỤ LỤC 4

Vị trí	Vị trí trên DNA	Protein	Loại đột biến	Quốc gia
Exon 2	3987G > A	p.Gly61Glu	Sai nghĩa	Lebanon Morocco Tunisia Saudi Arabia
Exon 2	958G > T	p.Val320Leu	Sai nghĩa	Vietnam South Korea
Exon 3	8242C > T	p.Arg469Trp	Sai nghĩa	Lebanon Morocco Saudi Arabia
Exon 2	182G > A	p.Gly61Glu	Sai nghĩa	Iran Portugal Saudi Arabia
Exon 2	4322G > A	p.Glu173Lys	Sai nghĩa	China Morocco
Exon 3	7927G > A	p.Val364Met	Sai nghĩa	South Korea Morocco
Exon 3	7940G > A	p.Arg368His	Sai nghĩa	Brazil India Morocco South Korea
Exon 3	8147C > T	p.Pro437Leu	Sai nghĩa	India Brazil Saudi Arabia
Exon 3	8165C > G	p.Ala443Gly	Sai nghĩa	India Brazil Saudi Arabia
Đột biến mới	8263 T > C	p.Ser476Pro	Đột biến mới	India Brazil
Đột biến mới	8037_8046dup10	p.Thr404fsX30	Đột biến mới	India Brazil
Đột biến mới	8214_8215delAG	p.Val460fs	Đột biến mới	India Brazil
Exon 2	317C > A	p.Ala106Asp	Sai nghĩa	Portugal United States
Exon 3	1159G > A	p.Glu387Lys	Sai nghĩa	Portugal United States
Exon 3	8006G > A	p.Arg390His	Sai nghĩa	Pakistan Saudi Arabia Korea
Exon 2	4490G > A	p.Glu229Lys	Sai nghĩa	Lebanon Pakistan
Exon 2	685 g > A	p.Glu229Lys	Sai nghĩa	Saudi Arabia Iran
Exon 3	8168G > A	p.Arg444Gln	Sai nghĩa	Korea Lebanon
Exon 2	535delG	p.Ala179fs	Lệch khung dịch mã	Portugal Tunisia
Exon 3	7996G > A	p.Glu387Lys	Sai nghĩa	Europe Hungary

## PHỤ LỤC 5

*Bảng nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA được tách chiết từ mẫu máu bệnh nhân nghiên cứu*

<b>Mã số</b>	<b>Nồng độ DNA(ng/μL)</b>	<b>Độ tinh sạch (A<sub>260/280</sub>)</b>	<b>Mã số</b>	<b>Nồng độ DNA (ng/μL)</b>	<b>Độ tinh sạch (A<sub>260/280</sub>)</b>
<b>G01</b>	171,6	1,89	<b>G44</b>	151,6	1,80
<b>G02</b>	153,4	1,8	<b>G45</b>	147,3	1,96
<b>G03</b>	145,7	1,91	<b>G46</b>	132,2	1,75
<b>G04</b>	124,7	1,85	<b>G47</b>	122,6	1,86
<b>G05</b>	117,4	1,87	<b>G48</b>	157,8	1,80
<b>G06</b>	110,0	1,97	<b>G49</b>	140,6	1,83
<b>G07</b>	137,1	1,99	<b>G50</b>	150,4	1,75
<b>G08</b>	140,7	1,9	<b>G51</b>	153,6	1,80
<b>G09</b>	123,0	1,91	<b>G52</b>	140,6	1,91
<b>G10</b>	167,5	1,88	<b>G53</b>	180,5	1,93
<b>G11</b>	203,3	1,9	<b>G54</b>	170,8	1,75
<b>G12</b>	201,5	1,86	<b>G55</b>	151,6	1,85
<b>G13</b>	233,2	1,89	<b>G56</b>	133,7	1,81
<b>G14</b>	101,0	1,93	<b>G57</b>	146,9	1,92
<b>G15</b>	136,2	1,9	<b>G58</b>	146,5	1,83
<b>G16</b>	125,6	1,91	<b>G59</b>	132,4	1,76
<b>G17</b>	112,4	1,84	<b>G60</b>	166,7	1,81
<b>G18</b>	132,2	1,86	<b>G61</b>	180,6	1,92
<b>G19</b>	122,6	1,76	<b>G62</b>	106,8	1,75
<b>G20</b>	157,8	1,81	<b>G63</b>	192,1	1,80
<b>G21</b>	140,6	1,92	<b>G64</b>	153,6	1,91
<b>G22</b>	150,4	1,83	<b>G65</b>	140,6	1,86
<b>G23</b>	146,5	1,75	<b>G66</b>	180,5	1,93

<b>G24</b>	132,4	1,86	<b>G67</b>	160,2	1,75
<b>G25</b>	166,7	1,80	<b>G68</b>	142,9	1,93
<b>G26</b>	135,5	1,83	<b>G69</b>	151,6	1,75
<b>G27</b>	112,6	1,86	<b>G70</b>	133,7	1,83
<b>G28</b>	135,7	1,90	<b>G71</b>	146,9	1,75
<b>G29</b>	142,9	1,73	<b>G72</b>	157,6	1,80
<b>G30</b>	151,6	1,88	<b>G73</b>	140,5	1,91
<b>G31</b>	180,8	1,90	<b>G74</b>	135,7	1,93
<b>G32</b>	200,4	1,96	<b>G75</b>	142,9	1,75
<b>G33</b>	147,3	1,78	<b>G76</b>	151,6	1,83
<b>G34</b>	114,6	1,93	<b>G77</b>	146,5	1,81
<b>G35</b>	106,8	1,75	<b>G78</b>	132,4	1,92
<b>G36</b>	192,1	1,80	<b>G79</b>	166,7	1,83
<b>G37</b>	153,6	1,91	<b>G80</b>	201,5	1,9
<b>G38</b>	140,6	1,93	<b>G81</b>	233,2	1,86
<b>G39</b>	180,5	1,75	<b>G82</b>	101,0	1,89
<b>G40</b>	160,2	1,83	<b>G83</b>	142,9	1,78
<b>G41</b>	152,4	1,86	<b>G84</b>	151,6	1,93
<b>G42</b>	135,7	1,93	<b>G85</b>	180,8	1,75
<b>G43</b>	142,9	1,75	<b>G86</b>	153,6	1,80