

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ THOM

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN
TRÊN BỆNH NHÂN U NGUYÊN BÀO
THẦN KINH ĐỆM**

Chuyên ngành : Hóa sinh

Mã số : 62720112

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2019

Công trình được hoàn thành tại:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. ĐẶNG THỊ NGỌC DUNG

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án Tiến sĩ Y học cấp trường tổ chức tại Trường Đại học Y Hà Nội

Vào hồi:.....ngày.....tháng.....năm 2019

Luận án có thể được tìm thấy tại:

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

ĐẶT VẤN ĐỀ

U nguyên bào thần kinh đệm (UNBTKĐ) phát triển từ tế bào thần kinh đệm chưa biệt hóa hoặc biệt hóa thấp trong não, 100% là ác tính và được WHO xếp vào nhóm u ác tính độ IV; tỷ lệ mắc mới hàng năm khoảng 3,2/100000 dân, chiếm tỷ lệ cao nhất trong các loại u não ác tính nguyên phát (46,6%), bệnh tiến triển rất nhanh, người mắc UNBTKĐ có thời gian sống trung bình chỉ 6 tháng đến 1 năm mặc dù đã được điều trị rất tích cực, tỷ lệ sống sau 5 năm rất thấp chỉ khoảng 5,5%. Cơ chế sinh bệnh UNBTKĐ được biết đến đa phần là do đột biến gen, gây rối loạn thông tin di truyền trong tế bào, tế bào tăng sinh, không ngừng phân chia phát sinh khối u, ung thư. Sinh bệnh UNBTKĐ có liên quan đến đột biến nhiều gen: gen kháng ung thư như gen TP53, PTEN, gen sinh ung thư như: EGFR, FGFR, IDH, MGMT, ATRX, TERT, hoặc xóa 1p/19q..., nhưng tập trung nghiên cứu đột biến một số gen như gen TP53, EGFR, FGFR, vì đột biến các gen TP53, EGFR, FGFR ngoài có tỷ lệ đột biến cao còn được chứng minh đóng vai trò quan trọng trong cơ chế sinh bệnh phân tử và định hướng điều trị của bệnh u nguyên bào thần kinh đệm. Nghiên cứu đột biến gen TP53, EGFR, FGFR... là một trong những cơ sở cho nghiên cứu điều trị đích của bệnh UNBTKĐ, và rất cần thiết với các thầy thuốc lâm sàng để đưa ra tiên lượng và hướng điều trị tốt nhất cho người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm. Tại Việt nam chưa thấy có nghiên cứu về vấn đề này. Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi thực hiện đề tài, với mục tiêu:

- 1. Xác định đột biến gen TP53, EGFR, FGFR trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm.*
- 2. Phân tích một số đặc điểm của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen.*

Bố cục của luận án

Luận án có 137 trang, bao gồm:

Đặt vấn đề: 03 trang;

Chương 1-Tổng quan: 48 trang;

Chương 2- Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 11 trang;

Chương 3 - Kết quả nghiên cứu: 39 trang;

Chương 4 - Bàn luận: 33 trang;

Kết luận: 02 trang;

Hướng nghiên cứu tiếp: 01 trang.

Kết quả luận án được trình bày trong 32 bảng, và 41 hình.

Luận án sử dụng 106 tài liệu tham khảo trong đó 9 tiếng Việt, và 97 tiếng Anh.

Chương 1

TỔNG QUAN

Tổng thể về điều tra mắc UNBTKĐ trên thế giới chưa đồng đều, ví dụ ở Mỹ năm nào cũng có nghiên cứu báo cáo về tình hình mắc bệnh, hay ở Anh, Phần lan, Đan mạch thường 5 năm báo cáo một lần..., song ở các châu lục khác, như châu Á hay châu Phi, thống kê về bệnh còn lẻ tẻ và rất ít. Qua các báo cáo cho thấy tỷ lệ mắc UNBTKĐ không giống nhau giữa các châu lục, ở các nước Châu Âu và Mỹ có tỷ lệ mắc cao hơn các nước châu Á, tại Mỹ tỉ lệ mắc mới hàng năm là 3,2/100000 dân, tỷ lệ mắc cao nhất là ở Anh (4,64/100.000 dân/năm), và các nước Bắc Âu số người mắc bệnh giao động từ 3,3 - 5,1/100.000 đối với nam giới và 2,1-3,5/100.000 phụ nữ. Tỷ lệ mắc bệnh rất thấp ở Hàn quốc 0,66/100000 dân/năm, và người da trắng có tỷ lệ mắc bệnh cao hơn người da màu . Tại Việt Nam chưa thấy có báo cáo về tỷ lệ mắc u nguyên bào thần kinh đệm trong cả nước, theo thống kê của Lê Xuân Trung và Nguyễn Như Bằng năm 1975, u nguyên bào thần kinh đệm chiếm 18% trong 408 ca mô u não tại bệnh viện Việt Đức. Nghiên cứu của Kiều Đình Hùng (2006), trong các loại u thần kinh đệm ác tính thì UNBTKĐ chiếm tỷ lệ cao nhất 62,7%. Theo Dương Chạm Uyên, Dương Đại Hà (2013), u tế bào thần kinh đệm chiếm 39,2% (trong đó UNBTKĐ là nhiều nhất), cao nhất trong các loại u não và thần kinh trung ương. Nhìn chung bệnh u nguyên bào thần kinh đệm ngày càng

gia tăng, gặp nhiều ở tuổi trung niên trở lên, nam mắc bệnh cao hơn nữ, rất ác tính và tỉ lệ sống thường rất thấp, khoảng 5,5% sống qua 5 năm ... Có nhiều yếu tố được cho là gây UNBTKĐ, trong đó có đột biến một số gen TP53, EGFR, FGFR được chứng minh ở nhiều nghiên cứu. Ngày nay, các nhà khoa học đã nhận thấy rằng TP53 đóng vai trò quan trọng trong tất cả các dạng ung thư ở người. Đột biến gen TP53 được tìm thấy ở hơn 50% bệnh nhân ung thư trên toàn thế giới. Ở bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, đột biến gen TP53 có tỷ lệ khá cao, khoảng 81% gặp ở thể thứ phát và 27% ở thể nguyên phát. Trong đó, các đột biến hay gặp trên u nguyên bào thần kinh đệm là các đột biến điểm từ exon 5 đến exon 8 gen TP53, đa số là đột biến sai nghĩa; tập trung chủ yếu ở 3 bộ ba mã hoá codon -175, -248, -273, và -282. Các dạng đột biến này được chứng minh có vai trò quan trọng đối với quá trình tiến triển và xâm lấn của ung thư. Theo nghiên cứu của Wang và cộng sự, đột biến gen TP53 có liên quan đến đáp ứng với thuốc temozolomid (loại thuốc thường được sử dụng trong điều trị u não) [8]. Do đó, việc xác định đột biến gen TP53 trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán, tiên lượng và điều trị nhằm kéo dài thời gian sống cho người bệnh. Khoảng 40% - 50% bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm có đột biến gen EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), đột biến gen EGFR có liên quan đến tỷ lệ sống còn của bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, hay gặp nhất là các đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 và đột biến điểm trên các exon này. Tỷ lệ đột biến điểm exon 2 đến 7 gen EGFR trên người mắc UNBTKĐ khoảng 14,4%, trong đó đột biến ở exon 2 là 0,8% ; exon 3 là 3,8%, exon 7 là 5,3%, exon 8 là 1,5% ; exon 15 là 2,2% ; exon 21 là 0,8%. Các đột biến đã được chứng minh phát sinh khối u bằng thử nghiệm trên chuột, và còn được ghi nhận tăng tính nhạy cảm với một số thuốc điều trị như Temozolomid,... Đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 (xóa đoạn dạng EGFRvIII) của gen EGFR là thường gặp ở bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, những bệnh nhân mang đột biến dạng này có thời gian sống thấp hơn người bệnh không có đột biến, nhưng lại nhạy với hóa chất điều trị (Temozolomide). Do vậy xác định đột biến gen EGFR là cần thiết cho dự đoán thời gian sống còn của bệnh

nhân UNBTKĐ, và lựa chọn điều trị sau phẫu thuật cho bệnh nhân mắc u nguyên bào thần kinh đệm. Gen FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) mã hóa cho protein có chức năng thụ thể màng tế bào có nguồn gốc biểu mô, trung mô. Các protein này đóng vai trò quan trọng trong suốt quá trình phát triển và trưởng thành của tế bào. Hai đột biến hay gặp trên gen FGFR1 là đột biến điểm xảy ra trên exon 12 và exon 13 gây thay đổi acid amin tại vị trí N546K và R576W trên phân tử protein FGFR. Các đột biến này làm tăng ái lực của thuốc điều trị với thụ thể và trở thành một trong những đích tác dụng của các thuốc điều trị ức chế hoạt tính tyrosine kinase trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm. Và để điều trị có hiệu quả, việc xác định đột biến gen liên quan đến tính đáp ứng thuốc, đóng vai trò quan trọng quyết định thành công của phương pháp. Như vậy, xét nghiệm gen không thể thiếu đối với các bác sỹ lâm sàng khi triển khai các liệu pháp điều trị đối với bệnh nhân. Trong khuôn khổ nghiên cứu của đề tài, chúng tôi tập trung xác định các đột biến trên exon 7+8 gen TP53, exon 2 đến exon 7 gen EGFR và exon 12, 13 gen FGFR, vì các đột biến gặp nhiều hơn trên các exon này.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: 70 bệnh nhân được chẩn đoán xác định là u nguyên bào thần kinh đệm tại Bệnh viện Việt Đức dựa trên đặc điểm lâm sàng và kết quả giải phẫu bệnh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- *Cách tiến hành chọn mẫu nghiên cứu*

+ Lập danh sách người bệnh từ khoa Giải Phẫu Bệnh, Bệnh viện Việt Đức (từ hệ thống phần mềm của bệnh viện) → Lựa chọn tiêu bản mô bệnh học và mẫu mô đúc paraffin tương ứng với danh sách đã lập được → Soi tiêu bản mô bệnh học xác định vùng lấy mô, đục lấy mô đã khoanh vùng trên khối mô đúc trong paraffin, tương ứng vùng soi trên tiêu bản có hình ảnh tế bào u rõ, ít tổ chức hoại tử nhất (do Bác sĩ Trưởng khoa Giải Phẫu Bệnh, Bệnh viện Việt Đức thực hiện dựa vào tiêu chuẩn phân loại mô bệnh học u NBTKĐ của WHO năm 2007),

cho vào ống eppendorf đậy nắp kín → Đánh mã số cho từng mẫu mô nghiên cứu sau khi đã lấy được mẫu mô → Lưu trữ và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

+ Chọn bệnh án tại phòng lưu trữ bệnh án theo số các mẫu mô đã chọn được trước đó, và lấy thông tin nghiên cứu khác từ bệnh án → Thu thập các thông tin về đặc điểm thời gian sống chết của bệnh nhân bằng hỏi người thân của bệnh nhân qua điện thoại.

- **Kỹ thuật tách DNA:** các mẫu mô sau khi lấy, được loại bỏ paraffin bằng xylen, sau đó được tách DNA theo phương pháp phenol:chloroform. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tách chiết được xác định trên máy Nano-Drop, những mẫu DNA đạt giá trị OD 260nm /OD 280nm từ 1,8 đến 2,0 và nồng độ ≥ 25 ng/ μ l được sử dụng để phân tích.

- **Kỹ thuật PCR:** PCR được sử dụng để nhân bản các exon nghiên cứu trên các gen TP53, EGFR, FGFR với các cặp mồi đặc hiệu:

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gen	Exon	Trình tự mồi	Kích thước sản phẩm base pair (bp)	Hãng sản xuất
TP53	7+8	Mồi xuôi 5'- GGTGGGAGTAGATGGAGCC-3' Mồi ngược 5'-ATGCCCAATTGCAGGTAAA -3'	495	IDT Mỹ
EGFR	2	Mồi xuôi 5'- GG ACC TTG AGG GAT TGT TT-3' Mồi ngược 5'- CTT CAA GTG GAA TTC TGC CC-3'	312	IDT Mỹ
	3	Mồi xuôi 5'- TTAGGGTTCAACTGGGCGTC-3' Mồi ngược: 5'- AGCCTTCTCCGAGGTGGAAT-3'	321	IDT Mỹ
	7	Mồi xuôi 5'-GCT TTC TGA CGG GAG TCA AC-3' Mồi ngược 5'-AGA CAG AGC GGG AAC AGG AT-3'	296	IDT Mỹ
	8	Mồi xuôi 5'-CT TCC ATC ACC CCT CAA GA-3' Mồi ngược 5'-CTC AGC AGC CGA GAA CAA-3'	261	IDT Mỹ
	Bộ 10 exon	Các mồi exon 2,3,4,5,6,7,8,13,16,23 trong 1 kit		MRC Hà

				Lan
FGFR	12	Mũi xuôi 5'-GCAGATGCATCCAGATGGTA-3' Mũi ngược 5'-TCTCCATTCATGGCCACATA-3'	617	IDT Mỹ
	13	Mũi xuôi 5'-TGTGAAGAAGAACAAGCCTGC-3' Mũi ngược 5'-AGAACTCCGTGAGATCGTGC-3'	527	IDT Mỹ

- Nguồn gốc mũi: các cặp mũi nhân bản các exon 2, 3, 7, 8 gen EGFR; exon 12, 13 gen FGFR do Trung tâm Gen - Protein Trường Đại học Y Hà Nội thiết kế, mũi nhân bản exon 7+8 gen TP53 dựa theo công thức mũi trong nghiên cứu Roger H. Frankel (1992), mũi nhân bản gen dạng EGFRvIII của hãng MRC Hà Lan thiết kế.

+ Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10 μ l) gồm: 5 μ l *Taq* polymerase; 0,5 μ l mũi xuôi; 0,5 μ l mũi ngược; 1,0 μ l DNA và 3 μ l H₂O.

+ Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/5 phút, 35 chu kỳ [95°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/5 phút], 72°C/5 phút. Bảo quản mẫu ở 15°C.

- Kỹ thuật giải trình tự gen

Sau khi nhân bản, sản phẩm PCR được tinh sạch, và sau đó được giải trình tự bằng phương pháp BigDye terminator sequencing (*Applied Biosystems, Foster city, USA*). Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự của gen EGFR trên GeneBank và xác định các đột biến điểm trên các exon của các gen nghiên cứu bằng phần mềm CLC Main Workbench 6.0.1.

- **Kỹ thuật MLPA:** được sử dụng để xác định xóa đoạn gen dạng EGFRvIII, dùng các cặp mũi đặc hiệu để nhân bản các exon cần nghiên cứu, sau đó sử dụng điện di mao quản để xác định số bản sao các exon. Phân tích kết quả bằng công cụ Coffalyser chuyên biệt (được cung cấp

bởi hãng MRC - Hà lan): dựa vào số lượng các bản sao của các exon đã nhân bản được, để xác định có xóa đoạn EGFRvIII, cần tính trung bình cộng số lượng bản sao của các exon 2+3+4+5+6+7 chia cho trung bình cộng số lượng bản sao của các exon 1+8+13+16+23 của gen EGFR (gọi là tỷ lệ EGFRvIII). Tỷ lệ EGFRvIII dưới 0,8 đã được coi là chứa biến thể xóa đoạn EGFRvIII.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu:

* Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê y học dựa vào phần mềm SPSS 19.0. Sử dụng Test T-student: các bảng có $n > 5$; Test Fisher Exact: các bảng có $n \leq 5$.

2.4. Đạo đức trong nghiên cứu:

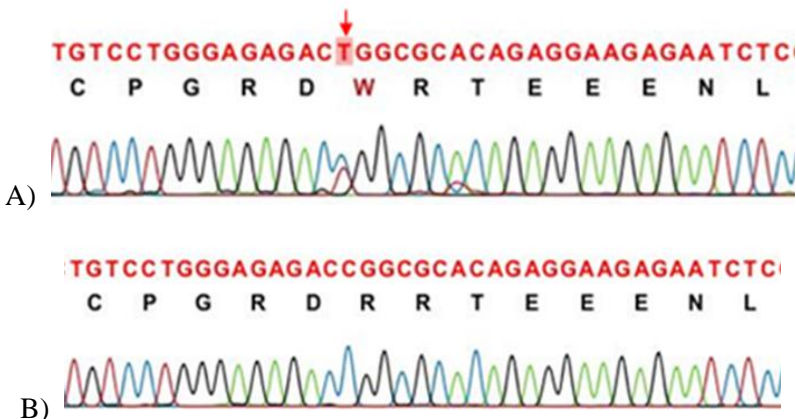
Đề tài đã được thông qua Hội đồng Đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội, theo quyết định số 187/HĐĐĐĐHYHN tháng 2/2016.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xác định đột biến trên gen TP53, EGFR, FGFR

* *Kết quả đột biến vị trí p.R282W trên exon 8 gen TP53*



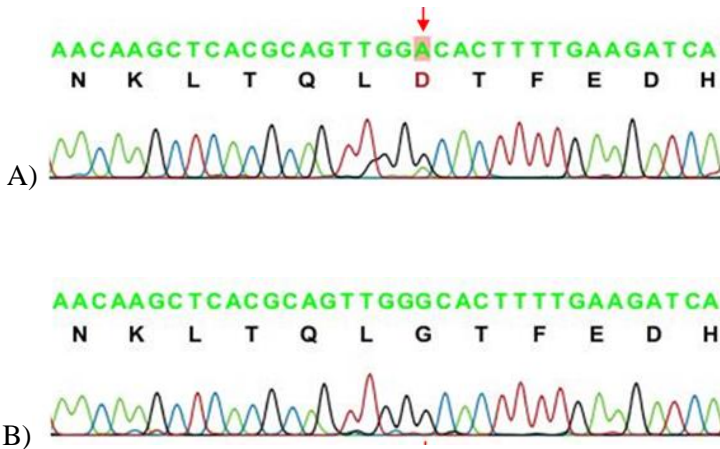
Hình 1. Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 8 gen TP53 có chứa đột biến điểm p.R282W

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB31.

B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB5

Kết quả giải trình tự rõ nét, các đỉnh tín hiệu rõ ràng, không bị nhiễu, tín hiệu nền thấp. Tại vị trí 846 trên gen dưới đỉnh C xuất hiện đỉnh T, chứng tỏ có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 846C>T dẫn đến ở vị trí codon thứ 282 bộ ba CGG mã hóa cho Arginine chuyển thành bộ ba TGG mã hóa cho Tryptophan, ký hiệu p.R282W.

*** Kết quả đột biến vị trí p.G42D trên exon 2 gen EGFR**



Hình 2. Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 2 gen EGFR chứa đột biến điểm p.G42D

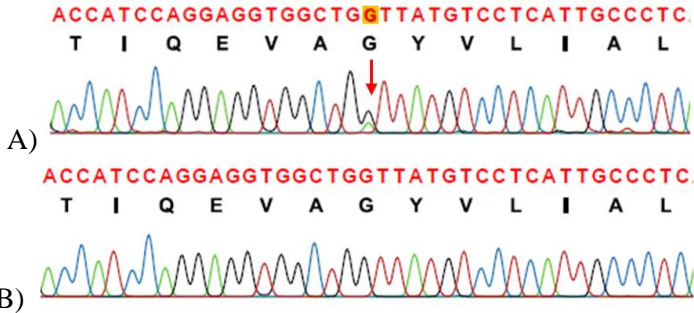
A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB26.

B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB20

Đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 124G>A dẫn đến bộ ba thứ 42 GGC mã hóa cho Glycine chuyển thành GAC mã hóa Asparagine,

làm thay đổi kiểu hình trên phân tử protein vị trí p.G42D.

* **Kết quả đột biến vị trí p.G87D trên exon 3 gen EGFR**



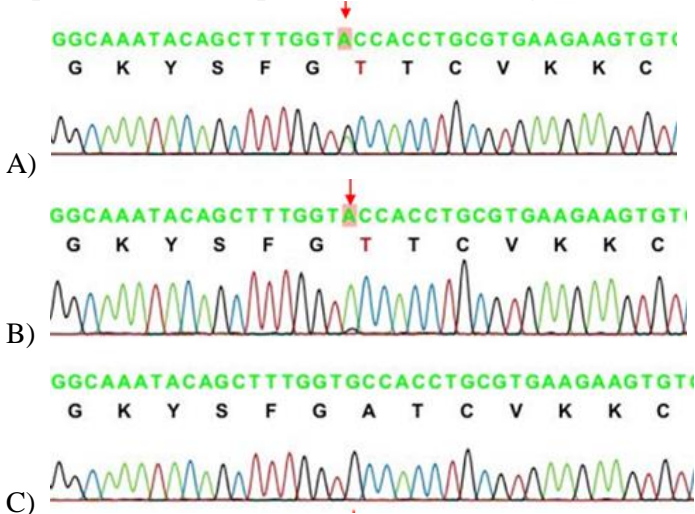
Hình 3. Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 3 gen EGFR chứa đột biến điểm p.G87D

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB69.

B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB68

Đột biến nucleoid 259G>A làm thay đổi acid amin glycine có bộ ba mã hóa là GGT thành aspartate có bộ ba mã hóa là GAT tại vị trí 87 trên phân tử protein của EGFR, ký hiệu p.G87D.

* **Kết quả đột biến vị trí p.A289T trên exon 7 gen EGFR**



Hình 4. Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p.A289T

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB26

B) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB27

C) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB25

Đột biến thay thế nucleotid 866G>A dẫn đến bộ ba thứ 289 GCC mã hóa cho Alanine chuyển thành ACC mã hóa Threonine, ký hiệu p.A289T.

Giải trình tự 70 mẫu bệnh phẩm của 70 bệnh nhân UNBTKĐ xác định đột biến điểm trên exon 2, exon 3, exon 7 và exon 8 của gen EGFR, kết quả:

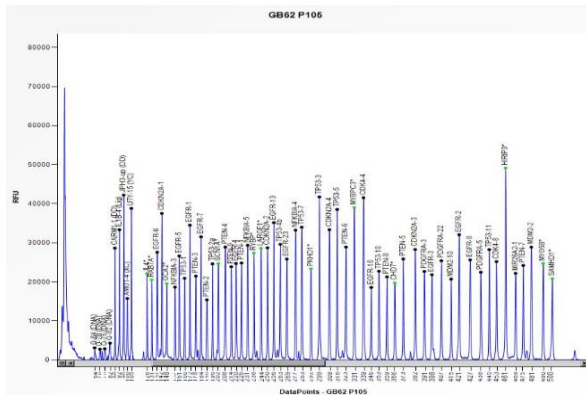
Bảng 3. Kết quả đột biến điểm trên exon 2,3,7 gen EGFR

STT	Mã số người bệnh	Exon	Thay đổi nucleotid	Thay đổi acid amin	Tên acid amin thay đổi
1	GB23, GB24, GB26	2	c.124G> A	p.G42D	Glycine > Aspartat
2	GB25		c.183C> A	p.L62I	Leucine > Isoleucine
3	GB4, GB33, GB34, GB49 GB52, GB53	3	c.386A>C	p.K129N	Lysine > Arginine
4	GB69		c.259G>A	p.G87D	Glycine > Aspartate
5	GB6, GB8, GB10	7	c.814 C>T	p.P272S	Proline > Serine
6	GB17		c.785C>T	p.D262D	Aspartat > Aspartat
7	GB24		c.820 C>T	p.T274M	Threonine> Methionine
			c.877 A>T	p.K293X	Lysine > termination
8	GB26, GB27		c.866 G>A	p.A289T	Alanine > Threonine
9	GB41, GB47, GB55, GB59. GB61, GB62, GB67		c.851 A>C	p.K284N	Lysine > Asparagine

Phát hiện thấy 4/70 mẫu có đột biến điểm trên exon 2 gen EGFR, chiếm tỉ lệ 5,7%: trong đó 3/70 mẫu có đột biến tại vị trí p.G42D (4,3%), 1/70 mẫu có đột biến tại vị trí p.L62I (1,4%). 7/70 mẫu phát hiện thấy đột biến trên exon 3 gen EGFR, chiếm tỉ lệ 10,0%: trong đó 6/70 đột biến tại vị trí p.K129N (8,6%), 1/70 đột biến tại vị trí p.G87D (1,4%). 14/70 mẫu phát hiện thấy đột biến trên exon 7 gen EGFR, chiếm tỉ lệ 20%: trong đó 7/70 mẫu đột biến tại vị trí p.K284N (10,0%), 3/70 đột biến tại vị trí p.P272S (4,3%), có 2/70 mẫu đột biến tại vị trí p.A289T (2,9%), 1/70 mẫu đột biến tại vị trí p.D262D (1,4%), 1/70 mẫu đột biến tại vị trí p.T274M (1,4%), 1/70 mẫu đột biến tại vị trí p.K293X (1,4%).

*** Kết quả xác định đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR bằng phương pháp MLPA**

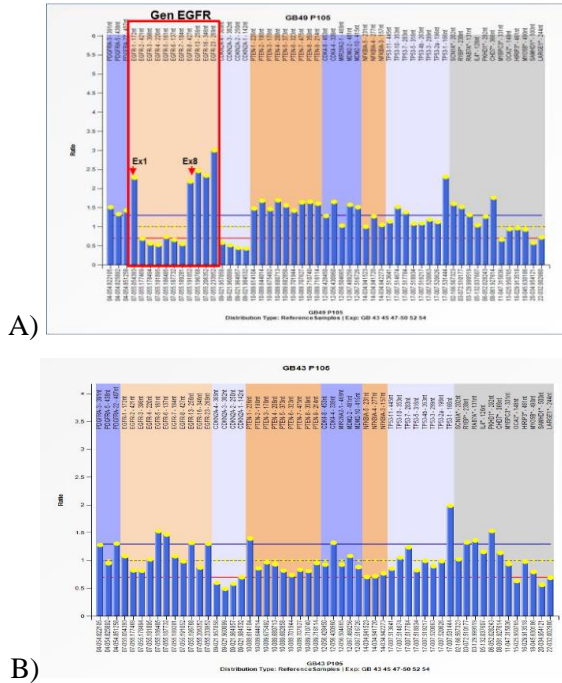
+ Kết quả chạy điện di mao quản sản phẩm xác định xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR



Hình 5. Hình ảnh điện di mao quản sản phẩm PCR xác định xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR của người bệnh mã số GB62 (mẫu nam)

Hình ảnh điện di mao quản của mã người bệnh GB62 cho thấy hình ảnh các đỉnh rõ, đạt tiêu chuẩn phân tích kết quả. Có 70 mẫu chạy điện di và kết quả hình ảnh điện di của 70 mẫu nghiên cứu đạt yêu cầu để phân tích kết quả.

+ Kết quả phân tích số bản sao của các exon từ 2 đến 7 gen EGFR



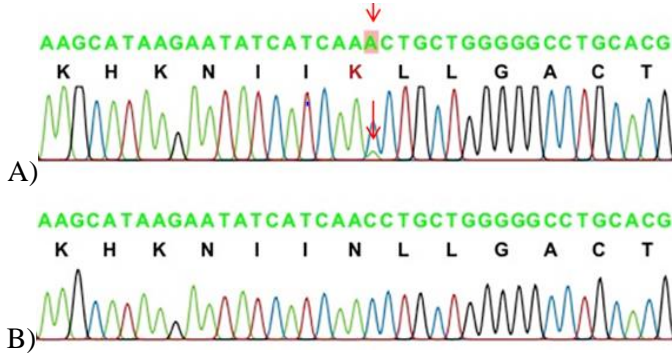
Hình 6. Kết quả phân tích xác định đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB49

B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB43

Các cột màu xanh biểu thị số bản sao của các exon. Ở các mẫu bệnh GB2, GB49 có trung bình cộng số bản sao của các exon 2+3+4+5+6+7 gen EGFR nhỏ hơn 0,8 so với trung bình cộng số bản sao của các exon 1+8+13+16+23 gen EGFR, chúng tôi có xóa đoạn gen ở các mẫu bệnh GB2, GB49. 70 mẫu bệnh UNBTKĐ sau phân tích, kết quả có 6 mẫu phát hiện có đột biến xóa đoạn gen (tỉ lệ 8,6%), trong đó 5/6 mẫu có xóa đoạn EGFRvIII (chiếm 7,2%), có 1/6 mẫu có xóa đoạn từ exon 4 đến exon 7 (chiếm 1,4%).

*** Kết quả đột biến vị trí p.N546K trên exon 12 gen FGFR**



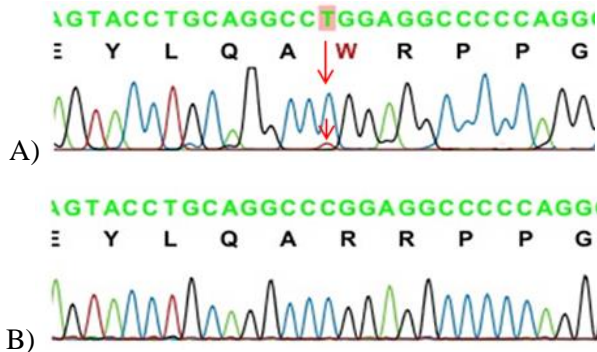
Hình 7. Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 12 gen FGFR chứa đột biến điểm p.N546K

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB48

B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB49

Đột biến tại vị trí g.56504C>T bên dưới tín hiệu của đỉnh C, có xuất hiện tín hiệu của đỉnh A, đột biến làm thay đổi mã bộ ba AAA mã hóa cho acid amin Asparagine, thành AAC mã hóa cho acid amin Lysine trên phân tử protein tại vị trí p.N546K. Mẫu GB49 không phát hiện thấy đột biến dạng này.

*** Kết quả đột biến vị trí p.R576W trên exon 13 gen FGFR**



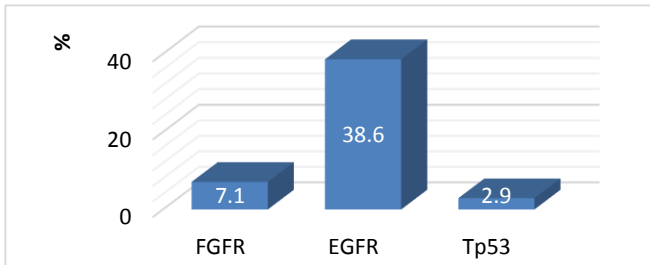
Hình 8. Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 13 gen FGFR chứa đột biến điểm p.R576W

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB52

B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB48

Tại vị trí g.57837C>T trên exon 13 gen FGFR, dưới tín hiệu của đỉnh C, có xuất hiện tín hiệu của đỉnh T chứng tỏ có đột biến nucleotid C thành T, làm thay đổi mã bộ ba CGG mã hóa cho acid amin Arginine, thành TGG mã hóa cho Triptophan, tại codon 576 trên phân tử protein, kí hiệu là p.R576W. Giải trình tự 70 mẫu xác định đột biến điểm trên exon 12 và exon 13 của gen FGFR, kết quả 5/70 (7,1%) mẫu phát hiện thấy đột biến trên gen FGFR, dạng đột biến chiếm cao nhất là R576W trên exon 13 (60%), 01 đột biến dạng A575V trên exon 13 (20%), 01 đột biến dạng N546K trên exon 12 (20%).

*** Tổng hợp các đột biến trên 3 gen nghiên cứu: TP53, EGFR, FGFR**



Hình 9. Tỷ lệ đột biến trên các gen nghiên cứu

Phát hiện thấy 7,1% đột biến trên exon 12 và exon 13 gen FGFR; 38,6% đột biến trên exon từ 2 đến 7 gen EGFR; 2,9% đột biến trên exon 8 gen TP53.

4.3. Một số đặc điểm của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen

Bảng 4. Phân bố về giới của người bệnh UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến gen

Loại gen	Giới	Tình trạng gen				p
		Đột biến		Không đột biến		
		n	%	n	%	
FGFR	Nam	1	20,0	44	67,7	0,05
	Nữ	4	80,0	21	32,3	
EGFR	Nam	22	81,5	23	53,5	0,02
	Nữ	5	18,5	20	46,5	
TP53	Nam	0	0,0	45	66,2	0,12

	Nữ	2	100,0	23	33,8	
--	----	---	-------	----	------	--

Giới nữ phát hiện thấy đột biến gen FGFR cao hơn nam giới, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, ($p = 0,05$). Giới nam phát hiện thấy đột biến gen EGFR cao hơn nữ giới, ($p < 0,05$). Cả 2 trường hợp đột biến exon 8 gen TP53 đều là nữ giới, chưa thấy ở nam giới.

Bảng 5. Tỷ lệ thể bệnh nguyên phát và thứ phát

Thể bệnh	n	%
Nguyên phát	64	91,4
Thứ phát	6	8,6
Tổng	70	100

91,4 % u nguyên bào thần kinh đệm thuộc thể nguyên phát và 8,6% là thứ phát.

Khi khảo sát các thông tin về thời gian sống chết của bệnh nhân, có 45 người bệnh có đầy đủ các thông tin này, do vậy từ bảng 6, tổng số bệnh nhân phân tích là 45 người.

Bảng 6. Thời gian trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật (A); thời gian sống trung bình sau phẫu thuật (B); thời gian sống trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi chết (C) của thể nguyên phát và thể thứ phát

Thời gian	Thể bệnh	n	($\bar{X} \pm SD$)	Min - Max	p
Phát hiện bệnh trước phẫu thuật (A)	Nguyên phát	39	3,0 \pm 3,8	0 - 16	0,000
	Thứ phát	6	13,2 \pm 14,1	3 - 41	
	Chung	45	4,3 \pm 6,9	0 - 41	
Sống sau phẫu thuật (B)	Nguyên phát	39	9,7 \pm 8,4	0 - 33	0,14
	Thứ phát	6	13,2 \pm 5,8	5 - 19	
	Chung	45	10,1 \pm 8,2	0 - 33	

Phát hiện bệnh đến khi chết (C)	Nguyên phát	39	12,6 ± 8,6	1 - 35	0,001
	Thứ phát	6	26,5 ± 11,5	17 - 49	
	Chung	45	14,5 ± 10,1	1 - 49	

Thể nguyên phát so với thứ phát: thời gian trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật (A) ngắn hơn, $p < 0,001$; thời gian sống trung bình sau phẫu thuật (B) ngắn hơn, tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$; thời gian sống trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi chết (C) ngắn hơn, $p < 0,001$.

Bảng 7. Phân bố thời gian sống sau phẫu thuật của thể nguyên phát và thể thứ phát

Thời gian (tháng)	Nguyên phát		Thứ phát		Chung		
	n	%	n	%	n	%	
≤ 6	16	41,0	1	16,7	17	37,8	
> 6 – 12	10	25,6	1	16,7	11	24,4	
> 12 - 24	9	23,1	4	66,6	13	28,9	
> 24 - 36	4	10,3	0	0,0	4	8,9	
> 36	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Tổng	39	100,0	6	100,0	45	100,0	
P	0,016						

Thể thứ phát có 16,7% trư ờ ng hợ p chế t trư ở c 6 tháng sau phẫu thuật ít hơn nừ rệ t so với thể nguyên phát có tới 41% chế t trư ở c 6 tháng sau phẫu thuật. Có 66,6% thể thứ phát sống đ ư ợ c từ 12 đ ế n 24 tháng sau phẫu thuật nhiều hơn nừ rệ t so với 23,1% củ a thể nguyên phát ($p = 0,016$).

Bảng 8. Phân bố thời gian sống của người bệnh sau phẫu thuật phát hiện thấy đột biến 1 trong 3 gen, có điều trị xạ trị, hóa chất

Thời gian	Đột biến gen
-----------	--------------

(tháng)	Có điều trị		Không điều trị		Chung	
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0,0	9	69,2	9	42,9
> 6 - 12	4	50,0	3	23,1	7	33,3
> 12 - 24	3	37,5	0	0,0	3	14,3
> 24 – 36	1	12,5	1	7,7	2	9,5
> 36	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Tổng	8	100,0	13	100,0	21	100,0
p	0,001					

Người bệnh mang đột biến của 1 trong 3 gen FGFR, hoặc gen EGFR, hoặc gen TP53 có điều trị so với người mang đột biến không được điều trị: thời gian sống sau phẫu thuật dài hơn, ($p = 0,001$). Chết trước 6 tháng ít hơn: 0% so với 69,2% ($p = 0,001$); sống kéo dài từ 6 đến 12 tháng nhiều hơn: 50% so với 23,1% ($p = 0,001$).

Chương 4 BÀN LUẬN

4.1. Tình trạng đột biến của các gen TP53, EGFR, FGFR

4.1.1. Đột biến ở gen TP53

Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện thấy đột biến điểm R282W trên exon 8 gen TP53, giống kiểu đột biến mà nghiên cứu của Shoji Shiraishi M.D đã công bố; các kiểu đột biến khác như R273C, R267W ở nghiên cứu của Shoji Shiraishi M.D, và kiểu đột biến C275Y ở nghiên cứu của Roger H. Frankel, chúng tôi chưa phát hiện được, nhưng chúng tôi lại xác định được kiểu đột biến R306X. Điều này có thể do các đột biến trên các exon của gen trong bệnh UNBTKĐ không hoàn toàn giống nhau ở những người bệnh sống trong các vùng địa lý, kinh tế, xã hội khác nhau. Hoặc có thể số mẫu nghiên cứu của chúng tôi chưa nhiều, nên chưa xác định được đầy đủ về kiểu đột biến như

các nghiên cứu khác đã công bố. Số lượng đột biến là 2/70 (2,9%), ít hơn so với nghiên cứu của Shoji Shiraishi M.D đã công bố năm 2002, với đột biến chung trên gen TP53 bệnh UNBTKĐ là 31%, trong đó 7,3% đột biến trên exon 8, có 3 kiểu đột biến là R273C, R267W, R282W; và nghiên cứu của Roger H. Frankel (1992), đã báo cáo kết quả có 15/37 (40,5%) trường hợp UNBTKĐ xuất hiện đột biến trên gen TP53, trong đó 5,4% có đột biến trên exon 8, cả 2 trường hợp đột biến ở exon 8 đều có kiểu đột biến p.C275Y. Đột biến gen TP53 trong UNBTKĐ thường xảy ra ở người UNBTKĐ thứ phát, gặp ít hơn ở UNBTKĐ nguyên phát, kết quả đột biến gen TP53 ở người bệnh UNBTKĐ trong nghiên cứu của chúng tôi ít hơn với các công bố trên thế giới, vì chủ yếu người bệnh UNBTKĐ trong nghiên cứu của chúng tôi là nguyên phát, tỷ lệ đột biến gặp ít là phù hợp, tuy nhiên cả 2 trường hợp có đột biến gen TP53 đều thuộc nhóm nguyên phát, vì số UNBTKĐ thứ phát của chúng tôi chỉ gặp là 8,6% nên chưa thấy có đột biến; tương tự kết luận của Ohgaki. H và cộng sự: xác định tần số biến đổi gen, hiệu quả của điều trị với thời gian sống của bệnh nhân UNBTKĐ: 715 người mắc UNBTKĐ được chẩn đoán, các đột biến TP53 trong UNBTKĐ thứ phát chiếm 57% ở các codon 248 và 273, trong khi đó ở UNBTKĐ nguyên phát, đột biến đã được phân phối đồng đều hơn, với tỷ lệ ít hơn.

4.1.2. Đột biến từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR.

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, 10 dạng đột biến điểm trên gen EGFR của người bệnh UNBTKĐ được phát hiện bao gồm 8 đột biến sai nghĩa (G42D, L62I, G87D, K129N, P272S, T274M, A289T, K284N); 1 đột biến không làm thay đổi acid amin trên phân tử protein (D262D) và 1 đột biến vô nghĩa (K293X). Trong đó, bốn dạng đột biến điểm chiếm tỷ lệ cao nhất lần lượt là K284N (exon 7), K129N (exon 3), G42D (exon 2), P272S (exon 7) và A289T (exon 7). Đột biến A289T đã được công bố trong nghiên cứu của Jeffrey C Lee và cộng sự (2006) với tần suất đột biến cao kết hợp với nhiều kiểu đột biến xảy ra tại codon 289 như A289V; A289D. Các dạng đột biến còn lại phát hiện được trong nghiên cứu đều là các đột biến mới. Vị trí đột biến

cũng thay đổi và có sự khác biệt so với nghiên cứu của Jeffrey C Lee (p.G42D so với p.D46N và p.L62I so với p.G63R). Sự khác biệt về chủng tộc, màu da hay vị trí địa lý có thể là nguyên nhân gây nên sự sai khác trong vị trí đột biến và kiểu đột biến ở exon 2, exon 3 và exon 7 gen EGFR trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm, cũng có thể các đột biến thường mang tính cá thể, sự khác nhau về vị trí đột biến trên các gen của mỗi cá thể đã được các ghi nhận qua nhiều nghiên cứu, do tính đáp ứng của mỗi cá thể với tác nhân gây bệnh là khác nhau, nên bệnh do đột biến gen thường thấy đột biến trên nhiều gen và ở nhiều vị trí khác nhau trên gen. Gen EGFR, một gen có chức năng chung là mã hóa thụ thể trên bề mặt tế bào, nhận tín hiệu để hoạt hóa hoạt động tế bào, do vậy tổn thương tương ứng ở các vùng khác nhau có thể gây ra một sai lạc ở nhóm tế bào đặc hiệu ở một bộ phận nào đó trong cơ thể: trong ung thư phổi hay ung thư vú các đột biến hay gặp ở vùng mã hóa protein EGFR vùng nội bào, còn ở UNBTKĐ thì các đột biến hay xảy ra ở vùng mã hóa cho protein EGFR ngoại bào. Các vị trí đột biến L858R ở exon 21 gen EGFR hay gặp trong ung thư phổi, hoặc trong ung thư vú, nhưng ở ung thư vú có thể gặp các kiểu đột biến khác nữa như G719S, G719A, G719C, S768I, L861Q.... Hoặc ngay trên người bệnh UNBTKĐ, ở exon 7 gen EGFR cũng thấy nhiều đột biến tại nhiều vị trí khác nhau, như T263P, A289V, A289D, A289T, các đột biến được quan sát thấy có tương quan chặt chẽ với sự nhân lên quá mức của protein EGFR, qua xác định bằng nhuộm hoá mô miễn dịch. Ngoài ra, bằng kỹ thuật MLPA, nghiên cứu của chúng tôi đã xác định được dạng đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 trên gen EGFR của bệnh nhân UNBTKĐ tại Việt Nam, như vậy kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với báo cáo của các nghiên cứu đã công bố, đột biến xóa đoạn hay gặp với gen EGFR là xóa từ exon 2 đến exon 7. Cùng sử dụng phương pháp MLPA để xác định xóa đoạn gen EGFR như nhau, nhưng kết quả nghiên cứu của chúng tôi có tỉ lệ xóa đoạn thấp hơn so với nghiên cứu của Judith Jeuken: 16,3% (17/104) trường hợp mắc UNBTKĐ có xóa đoạn gen dạng EGFRvIII, có thể do số mẫu

ngiên cứu của chúng tôi ít hơn, nên có kết quả đột biến xóa đoạn thấp hơn.

Như vậy, tỷ lệ đột biến trên gen EGFR chung là 38,6%; khi tính riêng rẽ (vì một số mẫu mang đột biến kép, 2 đột biến trên 2 exon khác nhau) đột biến trên exon 7 gặp nhiều nhất (20,0%); thứ hai là đột biến điểm trên exon 3 (10,0%), tiếp theo là đột biến xóa đoạn gen (8,6%), thấp nhất là đột biến điểm trên exon 2 (5,7%), kết quả này phù hợp như công bố của Jeffrey C Lee: gen EGFR có đột biến điểm trên exon 7 là cao nhất. Kết quả về tỷ lệ đột biến gen EGFR trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Naoki Shinojima, tỉ lệ đột biến EGFR ở bệnh nhân UNBTKĐ là 46% trong đó tỉ lệ đột biến EGFRvIII là 45%, có thể lý giải là do số mẫu nghiên cứu còn chưa đủ lớn, hoặc do đặc điểm của đột biến ở các địa dư khác nhau sẽ khác nhau về lượng và kiểu đột biến.

4.1.3. Đột biến trên gen FGFR

Nghiên cứu của chúng tôi bước đầu đã xác định được hai loại đột biến điểm là N546K tương ứng vùng mã hóa của exon 12 và R576W tương ứng vùng mã hóa của exon 13 trên gen FGFR với tỷ lệ 7,1%, chúng tôi bệnh nhân mắc UNBTKĐ ở Việt Nam phát hiện thấy đột biến gen FGFR tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới. Đột biến trên gen FGFR thường gặp trong một số bệnh ung thư như: ung thư vú, đại tràng, phổi ... và u nguyên bào thần kinh đệm. Trong đó một số điểm đột biến trên gen FGFR1 được tìm thấy trong u nguyên bào thần kinh đệm là N546K, N544K, R576W, R574W; Việc tìm ra được các đột biến tương đồng trên gen FGFR của bệnh nhân UNBTKĐ tại Việt Nam, với các đột biến của các bệnh nhân UNBTKĐ trên thế giới cũng là một thuận lợi lớn cho việc áp dụng các thành công trong nghiên cứu điều trị bệnh UNBTKĐ của các nước trên thế giới với các bệnh nhân mắc u nguyên bào thần kinh đệm tại Việt Nam; và xác định các đột biến gen sẽ giúp bác sĩ lâm sàng định hướng tốt hơn trong điều trị cũng như tiên lượng và quản lý bệnh nhân. Tuy tỉ lệ phát hiện còn thấp, có thể do số mẫu nghiên cứu còn ít hoặc cũng có thể do các chủng tộc khác

nhau, nên tỷ lệ đột biến cũng có thể khác nhau, nhưng cũng là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu về tình trạng đột biến trên gen FGFR của bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, từ đó nghiên cứu thử nghiệm tính đáp ứng với thuốc điều trị khi có đột biến gen FGFR, mục đích cuối cùng là kéo dài thời gian sống cho người bệnh.

Tóm lại, bằng các phương pháp giải trình tự gen và phương pháp MLPA, nghiên cứu của chúng tôi đã bước đầu xác định được một số đột biến trên gen FGFR, EGFR và TP53 của người mắc u nguyên bào thần kinh đệm ở Việt Nam, trong đó đột biến gặp nhiều nhất ở gen EGFR với tỷ lệ 38,6%: (chủ yếu là đột biến điểm, đột biến xóa đoạn chỉ chiếm 8,6%), thứ hai là đột biến trên gen FGFR với tỷ lệ là 7,1%; thấp nhất là đột biến gen TP53 với 2,9%.

4.2. Một số đặc điểm của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chủ yếu gặp là UNBTKĐ nguyên phát (91,4%), chỉ gặp rất ít trường hợp u thứ phát (8,6%) trên tổng số 70 bệnh nhân, kết quả này phù hợp với phân loại của WHO năm 2016 là u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát chiếm 90% trong tổng số các u nguyên bào thần kinh đệm, còn u nguyên bào thần kinh đệm thứ phát chỉ chiếm 10%. Trung bình tuổi mắc của thể thứ phát thấp hơn thể nguyên phát, tương đương với công bố của WHO, người mắc UNBTKĐ thứ phát hay gặp ở lứa tuổi trẻ hơn, tuy vậy sự khác biệt về tuổi giữa hai thể của chúng tôi chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), có thể do số lượng thể thứ phát trong nghiên cứu còn ít.

Khi nghiên cứu sự phân bố thời gian sống chết của bệnh nhân, chúng tôi khảo sát được 45 bệnh nhân có đủ các thông tin nghiên cứu, kết quả cho thấy có sự khác biệt rất rõ về thời gian tiến triển bệnh, thời gian sống từ khi mắc bệnh đến khi chết của hai thể bệnh nguyên phát và thứ phát. Thời gian trung bình từ khi phát hiện mắc bệnh đến khi phẫu thuật của thể bệnh nguyên phát là $3,0 \pm 3,8$ tháng, ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với thể bệnh thứ phát là $13,2 \pm 14,1$ tháng (với $p = 0,000$); tương đồng với kết quả đã công bố của WHO năm 2016, thời gian

tiến triển lâm sàng bệnh UNBTKĐ thể nguyên phát ngắn hơn thể thứ phát, tuy nhiên kết quả của chúng tôi với thể nguyên phát còn thấp hơn ($3,0 \pm 3,8$ tháng so với 4 tháng), thể thứ phát cũng thấp hơn ($13,2 \pm 14,1$ tháng so với 15 tháng). Sự phân bố thời gian sống sau phẫu thuật cho thấy: thể thứ phát có 16,7% trường hợp chết trong khoảng 6 tháng sau phẫu thuật ít hơn rõ rệt so với thể nguyên phát có tới 41% chết trong thời gian đó sau phẫu thuật; có 66,6% thể thứ phát sống được từ 12 đến 24 tháng sau phẫu thuật nhiều hơn rõ rệt so với 23,1% của thể nguyên phát ($p = 0,016$). Điều này cũng chứng tỏ kết quả điều trị bệnh UNBTKĐ ở nước ta có nhiều tiến bộ, có thể do cập nhật được các phương pháp điều trị mới, hoặc do ý thức điều trị của người bệnh cũng tốt hơn, nên thời gian sống đã kéo dài hơn nhiều.

Qua sự phân bố thời gian sống của người có đột biến gen được điều trị trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tác động của điều trị hỗ trợ sau phẫu thuật bằng xạ trị hay hóa chất hoặc cả hai đều rất đáng kể với người mắc UNBTKĐ, thời gian sống đã kéo dài hơn và tỷ lệ người sống ở khoảng thời gian trên 6 tháng đến trên 12 tháng cũng cao hơn, tuy số người bệnh sống được trên 2 năm sau phẫu thuật vẫn còn rất hạn chế, nhưng thời gian sống sót tổng thể tính từ khi mắc bệnh đến khi chết của người UNBTKĐ cũng kéo dài hơn và tỷ lệ sống kéo dài hơn cũng khá cao. Không có người bệnh nào có đột biến gen được điều trị xạ trị hoặc hóa chất chết trước 6 tháng sau phẫu thuật. Mặc dù kết quả điều trị và thời gian sống sau điều trị của người bệnh UNBTKĐ còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như vị trí khối u nông sâu, sức đề kháng bệnh theo lứa tuổi trẻ hay già... Nicola Montano đã công bố: bệnh nhân UNBTKĐ mang đột biến dạng EGFRvIII được phẫu thuật sau đó xạ trị kèm dùng thuốc Temozolomid (TMZ) hỗ trợ đã có kết quả tỷ lệ sống sót dài hơn đáng kể so với người không mang đột biến này, nghiên cứu của chúng tôi phần nào đã chứng tỏ người mang đột biến gen trong UNBTKĐ có đáp ứng tốt với xạ trị và hóa chất điều trị, với kết quả người phát hiện đột biến gen được điều trị đã có thời gian sống kéo dài

hơn so với người thấy đột biến gen mà không được điều trị, có ý nghĩa thống kê.

Kết quả nghiên cứu đột biến trên gen TP53, EGFR, FGFR trong bệnh UNBTKĐ của chúng tôi có thể giúp ích cho người bệnh trong việc áp dụng các phương pháp điều trị đã thành công trên thế giới vào điều trị cho người bệnh tại Việt Nam, giúp bác sỹ lâm sàng lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp và tiên lượng cho người bệnh, ngoài ra còn có ý nghĩa là cơ sở cho các nghiên cứu về đột biến gen khác của người UNBTKĐ như đột biến gen IDH, MGMT mà chúng tôi chưa có điều kiện để nghiên cứu, nhất là các nghiên cứu điều trị đích đang rất có triển vọng hiện nay.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu tiến hành trên 70 người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm sau phẫu thuật tại bệnh viện Việt Đức, sử dụng phương pháp giải trình tự gen xác định đột biến điểm và phương pháp nhân bản gen bằng đầu dò đa môi xác định đột biến xoá đoạn gen ở các mẫu mô sau phẫu thuật của người mắc UNBTKĐ, nghiên cứu đã xác định tình trạng đột biến gen TP53, EGFR, FGFR ở 70 bệnh nhân, từ kết quả thu được chúng tôi có một số kết luận:

1. Đột biến gen TP53, EGFR, FGFR ở người mắc u nguyên bào thần kinh đệm

Tính trên tổng số 70 bệnh nhân, nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện được so với các nghiên cứu đã công bố trên thế giới:

+ Đột biến ở exon 8 gen TP53 thấp hơn (2,9%): với kiểu đột biến p.R282W giống đã công bố, kiểu đột biến p.R306X là phát hiện mới.

+ Đột biến ở exon 2 đến exon 7 của gen EGFR thấp hơn (38,6%): đột biến điểm chiếm 32,9%; đột biến xoá đoạn gen chiếm 8,6%. Kiểu đột biến p.A289T giống các công bố, còn lại là các kiểu đột biến

p.G42D, p.L62I, p.G87D, p.K129N, p.D262D, p.P272S, p.T274M, p.K284N, p.K293X là những phát hiện mới.

+ Đột biến ở exon 12 và exon 13 gen FGFR thấp hơn (7,1%); kiểu đột biến p.N546K, p.R576W giống với các công bố, kiểu p.A575V là phát hiện mới.

2. Đặc điểm của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen

+ Tính trên tổng số mẫu 70 bệnh nhân: phát hiện 91,4% là UNBTKĐ nguyên phát; 8,6% u thứ phát;

+ Tính trên tổng số 45 bệnh nhân có đủ các thông tin về thời gian sống chết và điều trị: Thời gian trung bình từ khi phát hiện mắc bệnh đến khi phẫu thuật của thể bệnh nguyên phát ngắn hơn so với thể bệnh thứ phát ($3,0 \pm 3,8$ tháng so với $13,2 \pm 14,1$ tháng, $p = 0,000$). Thời gian sống trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi chết của thể bệnh thứ phát dài hơn so với thể bệnh nguyên phát (là $26,5 \pm 11,5$ tháng so với $12,6 \pm 8,6$ tháng, $p = 0,001$). Có 16,7% thể thứ phát chết trước 6 tháng sau phẫu thuật ít hơn đáng kể so với 41% thể nguyên phát; 66,6% thể thứ phát sống được từ 12 đến 24 tháng sau phẫu thuật nhiều hơn rõ rệt so với 23,1% của thể nguyên phát, ($p = 0,016$).

Người bệnh phát hiện mang đột biến của 1 trong 3 gen FGFR, hoặc gen EGFR, hoặc gen TP53 sau phẫu thuật được điều trị xạ trị hoặc hoá chất hoặc cả hai, có thời gian sống dài hơn người bệnh mang đột biến không được điều trị, ($p = 0,001$). Người UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến được điều trị so với thấy đột biến không được điều trị: Có ý nghĩa thống kê, ($p = 0,001$).

- + Chết trước 6 tháng : 0% so với 69,2%
- + Sống kéo dài từ 6 đến 12 tháng : 50% so với 23,1%
- + Sống được từ 12 đến 24 tháng : 37,5% so với 0%
- Chưa tìm thấy mối liên quan giữa các gen đột biến ở người UNBTKĐ.

HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP

Nghiên cứu tiên cứu dọc các bệnh nhân UNBTK từ khi bắt đầu vào viện, phẫu thuật, xác định đột biến gen, điều trị sau phẫu thuật, tư vấn điều trị, đánh giá hiệu quả điều trị của từng phương pháp: xạ trị, hoá trị bằng Telomozid trên toàn quốc.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Nguyễn Thị Thơm, Trần Quốc Đạt, Trần Huy Thịnh, Đặng Thị Ngọc Dung, Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn, Kiều Đình Hùng (2017). Xác định đột biến gen EGFR trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số đặc biệt tháng 9 năm 2017, tr. 131 - 135.
2. Nguyễn Thị Thơm, Trần Quốc Đạt, Trần Huy Thịnh, Đặng Thị Ngọc Dung, Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn, Kiều Đình Hùng (2017). Xác định đột biến trên exon 12 và exon 13 gen FGFR bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số 1 tháng 11 năm 2017, tr. 178-181.
3. Nguyễn Thị Thơm, Trần Quốc Đạt, Trần Huy Thịnh, Đặng Thị Ngọc Dung, Hà Xuân Hợp, Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn, Kiều Đình Hùng (2018). Xác định đột biến exon 3 gen EGFR trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số 1 tháng 5 năm 2018, tr. 79-82.
4. Kiều Đình Hùng, Nguyễn Thị Thơm, Trần Quốc Đạt, Đặng Thị Ngọc Dung, Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn (2019). Mutation analysis of EGFR và FGFR gen in glioblastoma patients in Viet Nam, *Tạp chí Y dược học Quân sự*, Số 1 tháng 1 năm 2019, 46 – 51.
5. Nguyễn Thị Thơm, Trần Quốc Đạt, Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn, Kiều Đình Hùng, Phùng Thị Phương Chiêm, Đặng Thị Ngọc Dung (2019). Xác định đột biến xoá đoạn gen EGFR trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số 2 tháng 04 năm 2019, tr. 15-18.

**MINISTRY OF EDUCATION MINISTRY OF
HEALTH
AND TRAINING**

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



NGUYEN THI THOM

**GENETIC MUTATION RESEARCH
ON PATIENTS WITH GLIOBLASTOMA**

Specializes in : Medical Biochemistry

Research number: 62720112

SUMMARY OF MEDICAL DOCTERATE THESIS

HANOI – 2019

**Research completed in:
HA NOI MEDICAL UNIVERSITY**

Scientific supervisors:

Assoc. Prof. MD. DANG THI NGOC DUNG

Scientific reviewer 1:

Scientific reviewer 2:

Scientific reviewer 3:

The Thesis will be defended in front of The Council for
Philosophy Doctor in Medicine at Hanoi Medical University
At:.....

The Thesis can be found at:

- The National Library
- Hanoi Medical University Library

INTRODUCTION

Glioblastoma (GB) develops from glial cells in the brain which are not differentiated or are partially differentiated. Glioblastoma is 100% malignant and was categorized by WHO as one of the grade IV tumors. The ratio of unique people having Glioblastoma is 3.2 over 100,000, comprising the highest level in all Glioblastoma multiform tumors (46.6%). The tumour spreads quickly, as evidenced by the fact that patients suffering from Glioblastoma multiform can only typically live for 6 months to a year on average, despite being treated, the rate of surviving after 5 years only comprises of 5.5%. The developing mechanism of Glioblastoma multiform is mostly from genes mutation, causing disorder in genetic makeup which inturn leads to an indefinite proliferation of tumors and cancer cells. The development of Glioblastoma and gene mutation is heavily correlated; tumor suppressor genes such as TP53, PTEN, and proto-oncogene cells such as: EGFR, FGFR, IDH, MGMT, ATRX, TERT, or wiping 1p/19q.... The research will focus on gene mutations from genes such as TP53, EGFR, FGFR, since mutations from TP53, EGFR, FGFR are not only more likely to occur, but also play a detrimental role in the developing mechanism of the molecules and the treatment direction of Glioblastoma. Gene mutation research on TP53, EGFR, FGFR... is one of the foundations of curing Glioblastoma and also important to clinical doctors to determine the dosage of the medicines and to determine the direction of treatment for Glioblastoma patients. This research on Glioblastoma will be the first one done in Vietnam. Based on the aforementioned reasons, we introduce this thesis with two goals in mind:

1. To identify the gene mutations on TP53, EGFR, FGFR causing Glioblastoma.

2. To analyze some key characteristics of Gene-mutated Glioblastoma patients.

Dissertation structure

This dissertation consists of 137 pages, including:

Introduction: 03 pages;

Chapter 1 - Overview: 48 pages;

Chapter 2 - Subjects and methods of research: 11 pages;

Chapter 3 - Research results: 39 pages ;

Chapter 4 - Discussion: 33 pages;

Conclusion: 02 pages;

Recommendation : 01 page;

Dissertation results are presented in 32 tables and 41 figures.

The dissertation used 106 reference materials comprising 9 Vietnamese and 97 English ones.

CHAPTER 1: OVERVIEW

The amount of overall research on Glioblastoma around the world is very spread out and inconsistent. In developed countries, there are researches and medical reports on the state of the disease in the country. For example, in the US, annual reports are conducted, or once every 5 years in the UK, Finland and Denmark... Alternatively, in developing regions such as South-East Asia and Africa, the statistics about Glioblastoma are sporadic and scattered. According to those reports, it is observed that the morbidity rate Glioblastoma differs between every region. In European countries and the US, the morbidity is higher

than in Asian countries. In the US, the rate of unique infection reported is 3.2 people in every 100.000 people, the highest infection rate is in the UK (4,64 people in every 100.000 people), and in North Europe the rate fluctuates between 3.3 people in every 100.000 men and 2.1 to 3.5 people every 100.000 women. The morbidity rate of Glioblastoma is significantly lower than the aforementioned regions: 0.66 people in 100.000 people each year, and white people had a higher rate of having the disease than people of color. In Vietnam, there has not been any statistical report on the rate of Glioblastoma infection nationwide. According to Lê Xuân Trung and Nguyễn Như Bằng in 1975, Glioblastoma consists of 17% in 408 brain tumor surgeries in Việt Đức hospital. Kiều Đình Hùng's research in 2016 stated that Glioblastoma comprises the highest percentage of 62.7% in all cases of Gliomas. According to Dương Chạm Uyên, Dương Đại Hà (2013), Glioblastoma takes up 39.2%, the highest rate of infection in all brain tumors and central neural system. In general, the rate of Glioblastoma is increasing slowly, primarily in middle-aged or older people, men have higher rates of infection than women. The disease is malignant and has a low-survival rate at around 5.5% of living past the first 5 years of having the disease ... There are multiple elements considered to cause Glioblastoma and one of the most proven causes is the mutation of TP53, EGFR, FGFR genes, as shown in many researches in this topic. Nowadays, scientists are well-aware of the fact that TP53 plays a very important role in all types of cancer in human beings. TP53 mutation is found in 50% of cancer patients all around the world. In glioblastoma patients, the rate of TP53 mutation is very high, 81% are seen in secondary glioblastoma and 27% in primary glioblastoma, in addition, the

common mutations in glioblastoma are mutation points from exon 5 to exon 8 of TP53, which are mostly Missense mutation; which are found primarily in 3 sequences of genetic encode codon-175, codon-248, and codon-282. The aforementioned types of mutation are proven to have a crucial role in the development process and the inflection of cancer. According to Wang et al, TP53 mutation are related to the reaction to Temozolomide (common medicine used to treat brain tumor). Thus, the identification of TP53 mutation in glioblastoma is very significant in diagnosing, dosing and long-term treatment to prolong patients' life span.

Around 40 to 50% of EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) mutation is seen in glioblastoma patients, which correlates to the patients' chance of surviving in glioblastoma patients. The most frequently encountered mutation in EGFR is the deletion of genes from exon 2 to exon 7 and all the mutation points in the exons. The rate of point mutation exon 2 to exon 7 in EGFR in glioblastoma patients is approximately 14.4%, in which exon 2 mutation takes up 0.8%; 3.8% in exon 3; 5.3% in exon 7; 1.5% in exon 8; 2.2% in exon 5; and 0.8% in exon 21. The aforementioned mutations are proven to be recurring the tumors, as experimented on mice, and additionally, increase the susceptibility to some chemotherapy drug like Temozolomide ... Deletion mutation from exon 2 to exon 7 (deletion type EGFRvIII) in EGFR gene is very common in glioblastoma patients; patients with this type of mutation have a lower survival chance than patients without this type of mutation, but they are more susceptible to temozolomide. Therefore, this strengthens the fact that the identification of EGFR is also very crucial to the

prediction in glioblastoma patients' life span and to the direction of patients' recovery after surgery.

FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) encodes and binds all the epithelial protein and mesenchymal protein receptor. These proteins have an important role throughout the cultivation and growth progress of cells. The frequent mutation encountered in FGFR1 gene is point mutations which occur on exon 12 and exon 13, causing fluctuation in the amino acid at N546K and R576W on FGFR protein molecule. The mutations increase the affinity of the drugs to the receptors and become one of the main function of all tyrosine kinase suppressants drugs on glioblastoma patients. For the treatment to advance further, the identification of gene mutations that are related to the affinity of the drugs is detrimental to the success of the operation. To conclude, gene examination is indispensable to clinical doctors when commencing the treatment operation. In the research, the gene points exon 7 and 8 on TP53, exon 2 to exon 7 in EGFR and exon 12, 13 on FGFR will be examined, considering that mutations are more likely to occur on those exons

CHAPTER 2: SUBJECTS AND METHODS OF RESEARCH

2.1. Subjects of the study: 70 patients were diagnosed with glioblastoma at Viet Duc Hospital based on clinical characteristics and anatomical results.

2.2. Research Methods:

- The method of conducting research samples
- + A list of patients was made from the Department of Anatomy, Viet Duc Hospital (from the hospital's software system). Histopathology samples and corresponding paraffin tissue block were selected with the created list of patients. The

histopathology samples were examined to determine the area of tissue that will be used for further inspection. The selected area of the tissue on the Paraffin tissue block corresponding to the area of selection with clear visuals on the templates, preferably the area with the least group of necrosis was collected (operated by the Head Doctor of the Department of Pathology, Viet Duc Hospital, based on the standard of classification of tissue of WHO in 2007). The tissues were put in a tightly sealed Eppendorf tube, the tissue samples were encoded and preserved at room temperature.

+ The medical reports at the archive room were chosen in correspondence to the encoding of the chosen tissue samples and different research information from the reports, information and characteristics of the patient's well-being were gathered by questioning the patients' close relatives.

- DNA separation technique: After gathering all the tissue samples, paraffin was removed using xylene, followed by the separation of DNA using the phenol: chloroform extraction protocol. The concentration and purity of the separated DNA were calculated using Nano-Drop, DNAs that exceeded OD 260nm/ OD 280nm from 1,8 to 2,0 and concentration ≥ 25 ng/ μ l was used for analyzing.

- PCR technique: PCR was used to clone the exon used for research on genes such as TP53, EGFR, FGFR with specially encoded pairs of primers.

Table 1. Pairs of primers used in the research

Gene	Exons	Primer sequence	Product size base pair (bp)	Manufacturer

TP53	7+8	FP (Forward Primer) 5'- GGTTGGGAGTAGATGGAGCC-3' RP (Backward primer) 5'- ATGCCCAATTGCAGGTAAA -3'	495	IDT America
EGFR	2	FP: 5'- GG ACC TTG AGG GAT TGT TT-3' RP: 5'- CTT CAA GTG GAA TTC TGC CC-3'	312	IDT America
	3	FP: 5'- TTAGGGTTCAACTGGGCGTC-3' RP: 5'- AGCCTTCTCCGAGGTGGAAT-3'	321	IDT America
	7	FP: 5'-GCT TTC TGA CGG GAG TCA AC-3' RP:5'-AGA CAG AGC GGG AAC AGG AT-3'	296	IDT America
	8	FP: 5'-CT TCC ATC ACC CCT CAA GA-3' RP: 5'-CTC AGC AGC CGA GAA CAA-3'	261	IDT America
	Group of 10 exon	Primer exons 2,3,4,5,6,7,8,13,16,23 included in the SALSA MLPA P105-D2 kit		MRC America Netherlands
FGFR	12	FP: 5'-GCAGATGCATCCAGATGGTA-3' RP: 5'-TCTCCATTCATGGCCACATA-3'	617	IDT America
	13	FP: 5'-TGTGAAGAAGAACAAGCCTGC-3' RP: 5'-AGAACTCCGTGAGATCGTGC-3'	527	IDT America

+ PCR reaction component (volume of 10 μ l) included: 5 μ l Taq polymerase; 0.5 μ l of forward primer; 0.5 μ l reverse primer; 1.0 μ l DNA and 3 μ l H₂O.

+ Thermal cycle of PCR: 94°C/5 minutes, 35 cycles [95°C/30 seconds, 55°C/30 seconds, 72°C/5 minutes], 72°C/5 minutes. The samples were preserved at 15°C.

DNA sequencing technique

After cloning, the products of PCR were purified then sequenced using the BigDye terminator sequencing technique (Applied Biosystems, Foster city, USA). The EGFR gene sequence from the sample was compared with the sequence of genes on GeneBank followed by identification and analysis of the point mutations of EGFR exons using CLC Main Workbench 6.0.1.

- MLPA technique: This technique was used to identify the deletion of EGFRvIII genes, using specialized pair of primers to

clone the required exons, then capillary electrophoresis was used to quantify the number of exon clones. Next, the results were analyzed using a specialized version of Coffalyser (provided by MRC- Netherlands). With the quantification of the clones in consideration, to identify the deletion of genes EGFRvIII, the average number of clones of exons 2+3+4+5+6+7 was divided by the average of the average number of clones of exon 1+8+13+16+23 in EGFR gene (the ratio was named EGFRvIII ratio). If the EGFRvIII ratio was under 0.8; it would be considered that EGFR contains the distortion of deletion mutation EGFRvIII.

2.3 Data processing methods:

* The data was processed using the method of medical statistical analysis on SPSS 19.0 software. The T-student Test method was also used: tables with $n > 5$; Test Fisher Exact: tables with $n \leq 5$.

2.4. Ethics in research:

The topic has been approved by the Ethics Council of Hanoi Medical University, according to No. 187/HDCDDHYHN of February 2016.

CHAPTER 3: RESEARCH RESULTS

3.1. Results of the identification of mutations in TP53, EGFR and FGFR genes

* Result of translocated mutation point R282W on exon 8 gene TP53



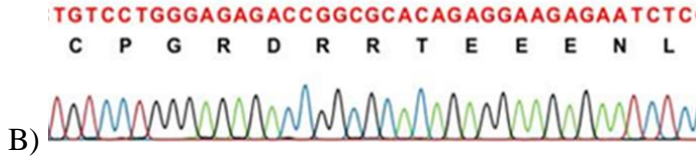


Figure 1. Results of the exon 8 sequence of TP53 containing point mutation p. R282W

A) Representative sample with mutation of Glioblastoma patient code GB31.

B) Representative sample without mutation of Glioblastoma patient code GB5

Sequence results were clear, signal vertexes were clear with little to no interference signals, low background signals. Position 846 on the gene below the vertex C appears vertex T indicated that the heterozygous mutant substituted nucleotide 846C> T led to the position of the 282nd codon triad of CGG encoded for Arginine transformed into the TGG encoded triad for Tryptophan, symbol p. R282W.

*** Result of translocated mutation p. G42D on exon 2 of EGFR**

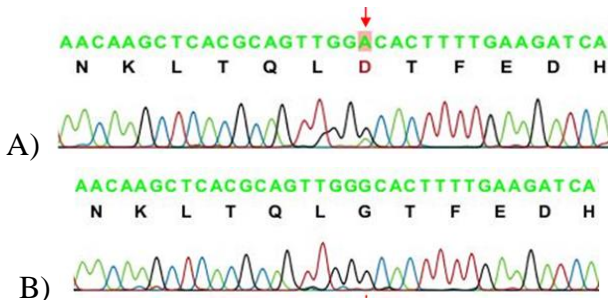


Figure 2. Results of exon 2 EGFR sequencing containing p. G42D point mutation

A) Representative sample with mutations of glioblastoma patient encodes GB26.

B) Representative sample without mutations of glioblastoma patient encode GB20

Heterozygote mutation had replaced nucleotide 124G>A leading to the triad no.42 GGC encoded Glycine to transform

into GAC, to then encoded Asparagine, causing the change in the shape of the protein molecule of position p. G42D.

*** Result of translocated mutation p. G87D on exon 3 EGFR gene**

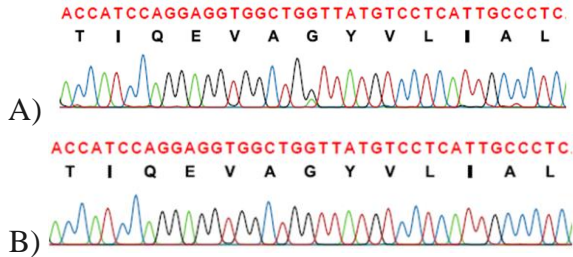


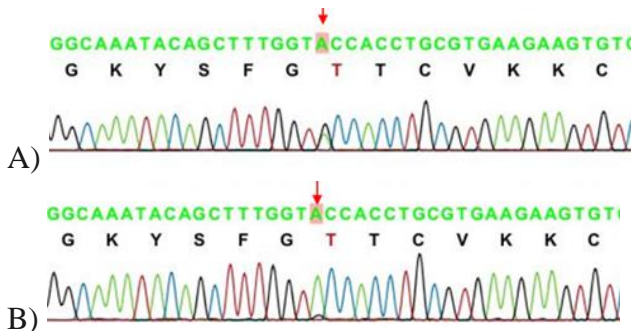
Figure 3. Results of the exon 3 sequence of EGFR containing point mutation at p. G87D

A) Representative sample with mutations of glioblastoma, patient encode GB69.

B) Representative sample without mutation of glioblastoma, patient encode GB68

The mutation of nucleoid 259G>A caused the change in glycine amino acid with triple encoder GGT transformed into aspartate. Aspartate with the triple encoder GAT at position 87 on the molecule of EGFR, coded p.G87D

*** Result of translocated mutation p. A289T on exon 7 EGFR gene**



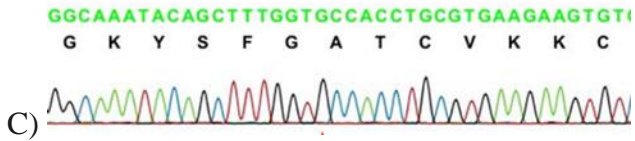


Figure 4. Results of the exon 7 sequence on EGFR containing point mutation at p. A289T

- A) *Representative sample with mutations of glioblastoma, patient code GB26*
 B) *Representative sample with mutation of glioblastoma, patient code GB27*
 C) *Representative sample without mutations of glioblastoma, patient code GB25*

The mutation replaced nucleotide 866G>A led to the triple encoder no 289 GCC encoded Alanine to transform into ACC. ACC then encoded Threonine, coded p. A289T.

The sequencing of 70 tissue samples of 70 glioblastoma patients had identified the point mutation on exon 2, exon 3, exon 7, and exon 8 of gene EGFR, as shown in table 3.

Table 3. Result of point mutation on exon 2,3,7 EGFR gene

N o	Patient code	Exon	Nucleotide Transformation	Amino Acid transformation	Amino acid name after transformation
1	GB23, GB24, GB26	2	c.124G> A	p.G42D	Glycine > Aspartat
2	GB25		c.183C> A	p.L62I	Leucine > Isoleucine
3	GB4, GB33, GB34, GB49 GB52, GB53	3	c.386A>C	p.K129 N	Lysine > Arginine
4	GB69		c.259G>A	p.G87D	Glycine > Aspartate
5	GB6, GB8, GB10	7	c.814 C>T	p.P272S	Proline > Serine
6	GB17		c.785C>T	p.D262 D	Aspartat > Aspartat
7	GB24		c.820 C>T	p.T274 M	Threonine> Methionine
8	GB26, GB27		c.877 A>T	p.K293 X	Lysine > termination
9	GB41, GB47, GB55, GB59. GB61, GB62, GB67		c.866 G>A	p.A289T	Alanine > Threonine
			c.851 A>C	p.K284N	Lysine > Asparagine

The research detected point mutations on exon 2 EGFR gene in 4/70 samples, accounting for 5.7% of all mutations: of which 3/70 samples had mutations at position p. G42D (4.3%), 1/70 samples had mutations at position p. L62I (1.4%). 7/70 samples had gene mutations on exon 3 EGFR gene, accounting for

10.0%: of which 6/70 mutations were at position p. K129N (8.6%), 1/70 of the mutation in position p. G87D (1.4%). 14/70 samples were detected with mutations on exon 7 EGFR genes, accounting for 20%: of which 7/70 samples mutated at position p. K284N (10.0%), 3/70 had mutations occurred at the location p. P272S (4.3%), there were 2/70 mutated samples at p. A289T position (2.9%), 1/70 mutant samples at position p. D262D (1.4%), 1/70 samples mutated at position p. T274M (1.4%), 1/70 samples mutated at position p. K293X (1.4%).

*** Results regarding the identification of deletion mutation from exon 2 to exon 7 in EGFR using MLPA method**
+ Results of capillary electrophoresis to identify deletion mutation from exon 2 to exon 7 in EGFR

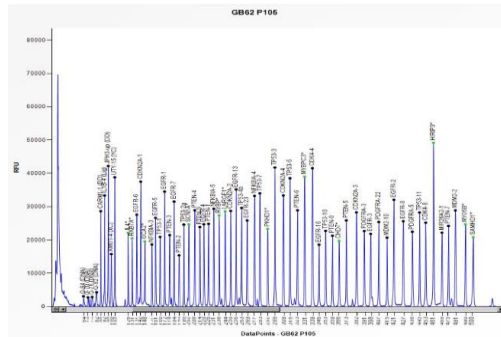


Figure 5. Capillary electrophoresis result of PCR to identify deletion mutation from exon 2 to exon 7 EGFR gene of patient code GB62 (male)

The result of running capillary electrophoresis on patient code GB62 qualified all the standards of analyzable results as it showed all the vertices clearly. There are 70 electrophoreses ran throughout and the results qualify as a good result to be analyzed.

+ Results of analyzing the number of exons 2 to 7 clones in EGFR genes

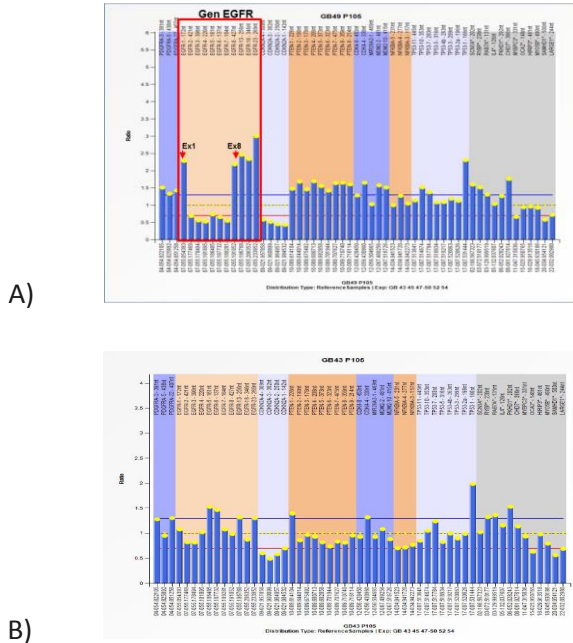


Figure 6. Analysis results from identifying deletion mutation from exon 2 to exon 7 in the EGFR gene

A) Representative sample with mutations of glioblastoma, patient code GB49

B) Representative sample without mutations of glioblastoma, patient code GB43

The blue columns indicate the number of clones of the exons. Samples GB2, GB49 had an average of the number of exons 2 + 3 + 4 + 5 + 6 + 7 clones in EGFR genes 0.8 smaller than the average plus the number of exons 1 + 8 + 13 + 16 + 23 clones in EGFR genes, proving the presence of deletion mutation in GB2 and GB49. In all of the 70 glioblastoma tissue samples post-analysis, the results had 6 samples with mutation deletions (8.6%), of which 5/6 samples had deletions of EGFRvIII gene

(7.2%), 1/6 samples had the presence of gene deletion from exon 4 to exon 7 (1.4%).

* **Results of the exon 12 sequence in FGFR containing point mutation at**

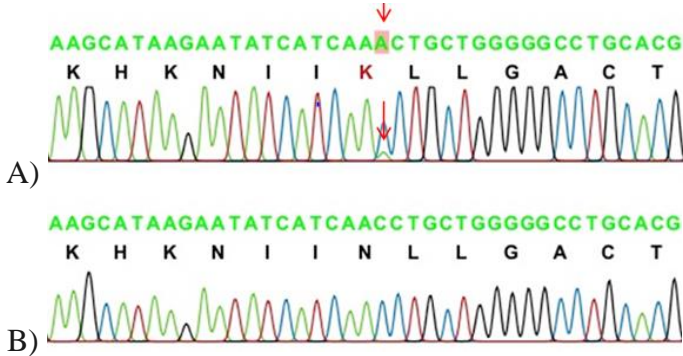


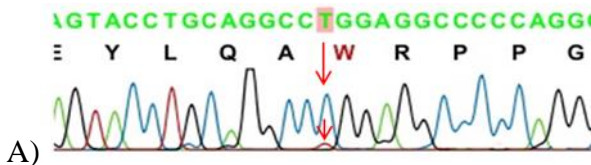
Table 7: Results of the exon 12 gene sequencing on FGFR containing point mutation p. N546K

A) Representative sample with mutation of glioblastoma, patient code GB48

B) Representative sample without mutation of glioblastoma, patient code GB49

Mutation at point g.56504C> T below the signal of vertex C appeared the signal of vertex A, the mutation changed AAA code encoding for amino acid Asparagine into AAC encoded for amino acid Lysine on protein molecule at point p. N546K. GB49 samples did not detect this mutation.

* **Result of translocated mutation at p. G42D on exon 2 EGFR gene**



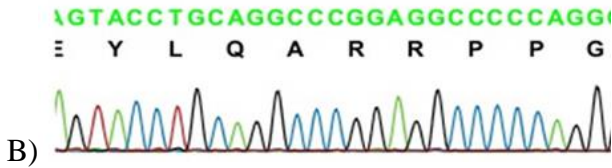


Figure 8: Results of exon 13 on FGFR gene sequencing results containing p. 576W point mutation

A) Representative sample with mutations of glioblastoma, patient code GB52.

B) Representative sample without mutations of glioblastoma, patient code GB48

At point g.57837C>T on exon 13 on FGFR genes, under the signal of vertex C, there were signals of vertex T indicating a C-to-T nucleotide mutation, changing the code of the CGG-encoded triad for acid Amine Arginine, into Tryptophan-encoded TGG at codon 576 on protein molecule p.R576W. Sequencing 70 samples on exon 12 and exon 13 of FGFR gene showed that 5/70 (7.1%) samples have FGFR mutation, the highest rate mutation accounted for was R576W on exon 13 (60%), there was one A575V mutation on exon 13 (20%), one mutation of N546K on exon 12 (20%)

*** Summarizing all mutations on 3 researched genes: TP53, EGFR, FGFR**

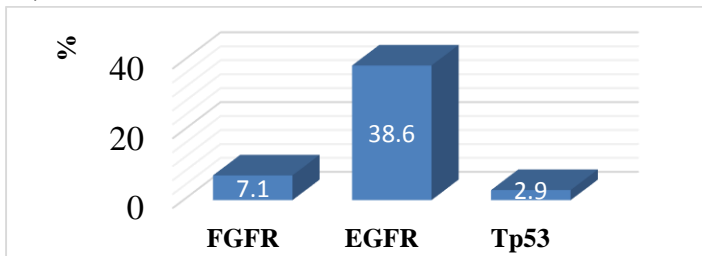


Figure 9. The rate of mutations in the studied genes

We concluded that 7.1% of all cases identified mutations in exon 12 and exon 13 of genes FGFR; 38.6% had mutations in

exon from 2 to 7 EGFR genes; 2.9% identified mutations on exon 8 of gene TP53.

4.3. Some characteristics of glioblastoma patients with genetic mutations

Table 4. Gender distribution of people with UNBD with genetic mutations

Gene	Gender	State of the gene				p
		Mutated		Non-mutated		
		n	%	n	%	
FGFR	Male	1	20.0	44	67.7	0.0
	Female	4	80.0	21	32.3	
EGFR	Male	22	81.5	23	53.5	0.0
	Female	5	18.5	20	46.5	
TP53	Male	0	0.0	45	66.2	0.1
	Female	2	100.0	23	33.8	

We found out that, the mutation rate of FGFR in women was higher than men, the difference was statistically significant ($p = 0.05$). The mutation rate in men higher EGFR than women, ($p < 0.05$). Both cases of the 8 exon mutations of TP53 were female, which was unseen in men.

Table 5. The proportion of primary and secondary glioblastoma

Type	n	%
Primary	64	91.4
Secondary	6	8.6
Total	70	100

91.4% of the cases are primary glioblastoma and 8.6% were secondary glioblastoma.

Table 6. The average time span from disease detection till surgery (A); average life time prolonged after surgery (B);

Average time span from disease detection to death of the primary and secondary bodies(C)

Duration	Type of glioblastoma	n	($\bar{X} \pm$ SD)	Min - Max	P
Disease detection till surgery (A)	Primary	39	3.0 \pm 3.8	0 – 16	0.00 0
	Secondary	6	13.2 \pm 14.1	3 – 41	
	General	45	4.3 \pm 6.9	0 – 41	
Average life span after surgery (B)	Primary	39	9.7 \pm 8.4	0 – 33	0.14
	Secondary	6	13.2 \pm 5.8	5 – 19	
	General	45	10.1 \pm 8.2	0 – 33	
Average lifetime from disease detection until death	Primary	39	12.6 \pm 8.6	1 – 35	0.00 1
	Secondary	6	26.5 \pm 11.5	17 – 49	
	General	45	14.5 \pm 10.1	1 – 49	

Comparing primary glioblastoma to secondary glioblastoma: (A)'s average time from disease detection till surgery were shorter, $p < 0.001$; (B)'s average life time prolonged after surgery was shorter, however there was not any significant correlation, $p > 0.05$; (C)'s average life span from disease detection till death was shorter, $p < 0.001$

Table 7. Distribution of patients' living time prolonged after surgery of the primary and secondary

Duration (/months)	Primary		Secondary		General	
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	16	41.0	1	16.7	17	37.8

> 6 – 12	10	25.6	1	16.7	11	24.4
> 12 - 24	9	23.1	4	66.6	13	28.9
> 24 – 36	4	10.3	0	0.0	4	8.9
> 36	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Sum	39	100.0	6	100.0	45	100.0
P	0.016					

16.7% of patients with secondary glioblastoma dies in 6 months after surgery. The number is significantly lower comparing to the death rate of patients with primary glioblastoma of 41% in 6 months. 66.6% of secondary glioblastoma patients gets their life prolonged for 12-24 months after surgery, which is drastically higher than of the 23.1% of the treated primary glioblastoma patients ($p = 0.016$)

Table 8. Distribution of gene-mutated patients' living time prolonged after surgery with the treatment of radiotherapy and chemicals

Duration (/months)	Gene mutated				Other cases	
	Treated		Untreated			
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0.0	9	69.2	9	42.9
> 6 - 12	4	50.0	3	23.1	7	33.3
> 12 - 24	3	37.5	0	0.0	3	14.3
> 24 – 36	1	12.5	1	7.7	2	9.5
> 36	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Sum	8	100.0	13	100.0	21	100.0
p	0.001					

Patients on treatment with mutations of one of the three FGFR, EGFR, TP53 compared to those with untreated mutations: longer life span after surgery, ($p = 0.001$). Death in 6 months after the disease outbreak: 0% compared to 69.2% ($p =$

0.001). Life prolonged 6 to 12 months longer: 50% compared to 23.1% ($p = 0.001$).

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.1. Mutations of TP53, EGFR, FGFR genes

4.1.1. Mutations in the TP53 gene

Our study has identified the presence of point mutation R282W on exon 8 of TP53 gene, similar to the mutations that were reported by Shoji Shiraishi M.D. Additionally, we discovered the presence of R306X mutation. However, we couldn't discover and identify other types of mutations such as R273C, R267W in the study of Shoji Shiraishi M.D and mutation C275Y in Roger H. Frankel's study. This maybe due to the fact that the mutations in the exons of genes in glioblastoma are not different between people living in different geographical, economic and social areas. Another reason might be that the sample size was too small, resulting in difficulty in identification of all of the mutations in other researches. The number of gene mutations was 2 out of 70 patients (2.9%), less than Shoji Shiraishi's 2002 published research. Shiraishi's research also shows that the rate of general gene mutations of TP53 is 31%, of which 7.3% is mutations on exon 8; 3 mutation types R273C, R267W, R282W. Compared to Roger H Frankel's reseach in 1992, reported 15/37 (40.5%) cases of Tp53 gene mutation occurring in glioblastoma patients, of which 5.4% of the mutations occur on exon 8, both of the mutation cases are type p.C275Y. TP53 mutation in glioblastoma patients are more likely to occur in secondary glioblastoma patients, and the opposite goes for primary glioblastoma, (i.e: TP53 mutation is

less likely to occur in primary glioblastoma patients). The number of glioblastoma patients with TP53 mutation in our study is not as high as other studies in the world because the sample in this study was mainly primary glioblastoma patients, however both of the cases of TP53 mutation of our study are primary glioblastoma patients. Since the number of secondary glioblastoma in our study only comprises of 8.6%, it doesn't prove or disprove any correlation or significance in the difference of secondary and primary glioblastoma on TP53 mutation, similar to Ohgaki H et al's conclusion. Identification of frequency in gene mutation, effectiveness of the treatment and the patients' prolongation of life span: 715 people with glioblastoma are diagnosed, TP53 mutation in secondary glioblastoma patients takes up 57% at codon 248 and 273, while with primary glioblastoma, the mutations are spread out more evenly with a lower ratio.

4.1.2. Gene mutation from exon 2 to exon 7 of EGFR gene

By using gene sequencing techniques, 10 types of point mutations on EGFR were identified as Missense mutations (G42D, L62I, G87D, K129N, P272S, T274M, A289T, K284N). There was one insignificant mutation (K293X) and another one that did not change the amino acid on protein molecules (D262D). Four types of mutation with the highest rate of occurrence were K284N (exon 7), K129N (exon 3), G42D (exon 2), P272S (exon 7) and A289T (exon 7), respectively. Mutation type A289T were reported in Jeffrey C Lee et al's study in 2016 with a very high frequency of mutation, combine with more types of mutations occurring at codon 289 such as A289V; A289D. Other types of mutations found in our study are newly-found mutations. The points of mutation also changed and is

different compared to Jefferey C Lee's research (p. G42D compared to p. D46N and p. L62I compared to p.63R). The differences in races, skin color and geographical location might also be some of the factors that create the variation in the points of mutation and types of mutation in exon 2, 3 and 7 of EGFR. Also, since mutations are usually highly unique, the difference in points of mutation can be different as well, as mentioned in various researches. EGFR is a gene with its' general function being encoding receptors on the cell surface and to receive signals for cell activation. It means that damages to areas of the body can also cause defections in the corresponding areas. For example, in lung cancer or breast cancer, mutations usually occur in extracellular EGFR protein encoding areas. On the other hand, in glioblastoma, mutations usually occur in intracellular EGFR protein encoding areas. The points of mutation L858R on exon 21 of EGFR are more frequently encountered in lung cancer or breast cancer, but other types of mutations can be seen in breast cancer such as G719S, G719A, G719C, S768I, L861Q.... On glioblastoma patients, there are various points of mutation such as T263P, A289V, A289D, A289T on exon 7 of EGFR. These mutations are closely associated with the over-multiplication of EGFR as observed and analyzed using the Histochemical Staining Methods. Moreover, using MLPA protocol, our study has identified gene deletion mutation from exon 2 to exon 7 of EGFR on glioblastoma patients in Vietnam. This result is in agreement with the international studies that were published. While the method of examining EGFRvIII gene deletion on glioblastoma patients was the same as Judith Jeuken's, our result on gene deletion showed a lower rate of occurring compare to

the 16.3% (17/104) reported in that study. This is possibly due to our smaller sample size.

Thus, the mutation rate in EGFR was 38.6%; when calculated separately (some samples carry double mutations, 2 mutations on 2 different exons) mutations on exon 7 are the most encountered (20.0%); the second most encountered is the point mutation on exon 3 (10.0%), followed by the deletion mutation (8.6%), and the lowest is the point mutation on exon 2 (5.7%), the result stays consistent with the report by Jeffrey C Lee which indicate point mutation on exon 7 of EGFR gene being the most common. The results of the EGFR mutation rate in our study were lower than the results of Naoki Shinojima's study: the mutation rate of EGFR in glioblastoma patients was 46%, of which the EGFRvIII mutation rate was 45%. This could be either due to the low number of samples or because of the different characteristics in quality and type of mutations in different geographical areas.

4.1.3. Mutations in the FGFR gene

Our study initially identified two types of point mutations, the N546K corresponding to the encoding region of exon 12 and R576W corresponding to the encoding region of exon 13 in FGFR gene at the rate of 7.1%. Therefore, it can be said that patients with glioblastoma in Vietnam have mutations of FGFR similar to other studies in the world. Mutations in FGFR are common in some cancers such as breast cancer, colon cancer, lung cancer... and glioblastoma, in which some mutations in FGFR1 gene were found in glioblastoma tumors such as N546K, N544K, R576W, R574W. Finding similar mutations in FGFR gene of patients with glioblastoma in Vietnam compared to mutations of patients in the world is also a great advantage for

the adaptation of different treatment methods from other countries to glioblastoma patients in Vietnam. The identification of mutation also helps clinicians build better treatment plans for patients. Despite the low detection rate, the study has established the basis for further research on mutation status in FGFR gene of glioblastoma patients, based on which other studies about the response to treatment drugs when there are FGFR mutations, with the ultimate goal is to prolong the life of patients and be developed.

In summary, using the gene sequencing method and MLPA method, our study has initially identified some mutations in the FGFR, EGFR and TP53 of people with glioblastoma in Vietnam., in which mutations were most encountered in EGFR with the rate of 38.6%: (mainly point mutations, deletion mutation only accounted for 8.6%), followed by mutation in FGFR gene with ratio of 7.1%, and the lowest rate of 2.9% being mutation of TP53 gene.

4.2. Characteristics of gene-mutated glioblastoma patients

The results of our study mainly met with criteria for primary glioblastoma (91.4%), there were only a few cases of secondary glioblastoma (8.6%). This result is consistent with the WHO classification in 2016 as Primary glioblastoma accounts for 90% of all glioblastoma, and secondary glioblastoma is only 10%. On average, the “age” of the secondary glioblastoma tumor is lower than that of the primary, similar to the WHO reports, people who suffer from secondary glioblastoma are usually the younger grown-ups, yet the difference in age between the two types of glioblastoma is not of statistical significance ($p > 0.05$), because of the small sample size. However, the results are very different

in terms of disease progression time and life time from disease detection to death. The average time from detection of disease to surgery of the primary glioblastoma was 3.0 ± 3.8 months, which is significantly shorter than that of secondary glioblastoma which was 13.2 ± 14.1 months ($p = 0.000$). Similar to the published results of WHO in 2016, the clinical progression of primary glioblastoma is shorter than that of the secondary. However, our results with the primary form and secondary glioblastoma life expectancy were lower compared to the 4 months and 15 months respectively as reported by WHO. The distribution of life time after surgery showed that patients with secondary glioblastoma had 16.7% mortality rate in about 6 months after surgery, which is significantly less than that of the primary glioblastoma, with 41% dying in that time after surgical operations; 66.6% of secondary glioblastoma cases survived 12 to 24 months after surgery, which is significantly higher than the 23.1% of primary glioblastoma ($p = 0.016$). This also proves that the results of treatment of glioblastoma in Vietnam have shown signs of progress, possibly due to the update of new treatment methods or better patients' treatment discipline; therefore, the expected lifespan has been much longer.

Through analysis of the life-time distribution of people with therapeutic gene mutations in our study, the effects of adjuvant therapy post-surgery with radiotherapy or chemotherapy or both are significant for patients suffering from glioblastoma. This is evident by the fact that the life time has been prolonged and the rate of patients living over than 6 months to 12 months after surgery is also higher, although the number of patients surviving over 2 years after surgery is still very limited. However, the overall survival time from being diagnosed of glioblastoma

patients is longer and the survival rate is higher. All patients with a genetic mutation treated with radiation or chemotherapy live for at least 6 months after surgery. Although the results of treatment and life time after treatment of patients with glioblastoma depend on many factors such as the location of the tumor, age and disease immunity of each individual, Nicola Montano has reported that glioblastoma patients with EGFRvIII mutation that underwent surgery, followed by radiotherapy and the support of the adjuvant Temozolomid (TMZ) have a significantly longer survival rate than the non-mutant. Our study has partly demonstrated that people with gene-mutated glioblastoma respond well to radiotherapy and chemotherapy, with the result that people with mutated genes have a longer lifespan than those with Genetic mutations that are not treated.

The study of glioblastoma with a mutation on TP53, EGFR, FGFR gene can help doctors in applying well established treatment to treat patients in Vietnam. In addition, it facilitates selection of appropriate treatment methods and prognosis for patients, as well as being a basis for other promising target treatment studies of other gene mutations of people with disabilities such as mutations of IDH and MGMT genes.

CONCLUSION

The research was conducted on 70 Glioblastoma patients after surgery at Viet Duc Hospital, using the gene sequencing method to identify point mutations and the method of gene replication with multiplex probes to identify the mutation of gene deletion in postoperative tissue samples of Glioblastoma patients. The research has identified mutations of TP53, EGFR and FGFR in 70 patients. From achieved results, we can draw some conclusions:

1. Mutations of TP53, EGFR, FGFR in glioblastoma patients

On a total of 70 patients, comparing with researches published in the world, our research has detected that:

+ The mutation on exon 8 of TP53 gene was lower (2.9%) with p.R282W mutation as the same as the type announced and the newly discovered p.R306X mutation

+ The mutation on exon 2 to exon 7 of EGFR gene was lower (38.6%) with point mutations accounted for 32.9%; mutation of gene deletion accounted for 8.6%. The p.A289T mutations were similar to the type announced and the other types including p.G42D, p.L62I, p.G87D, p.K129N, p.D262D, p.P272S, p.T274M, and p.K284N, p.K293X are new findings.

+ Mutations on exon 12 and exon 13 of FGFR gene was lower (7.1%); the p.N546K, p.R576W mutations are similar to announced ones whereas the p.A575V type is newly discovered.

2. Characteristics of patients with genetic mutations

+ On a total of 70 patients: 91.4% of the patients had primary glioblastoma and the rest had secondary glioblastoma.

+ On a total of 45 patients with sufficient information of survival, death and treatment time: The average time from disease detection to surgery of the primary glioblastoma was shorter than that of the secondary glioblastoma (3.0 ± 3.8 months compared to 13.2 ± 14.1 months, $p = 0.000$). The average survival time from disease detection to death of the secondary glioblastoma was longer than that of the primary glioblastoma (26.5 ± 11.5 months compared to 12.6 ± 8.6 months, $p = 0.001$). 16.7% of secondary glioblastoma died for no longer than 6 months after surgery, which is significantly lower than 41% of primary glioblastoma. There was 66% of secondary

glioblastoma surviving from 12 to 24 months after surgery, clearly higher than 23.1% of primary glioblastoma ($p = 0.016$).

Patients with mutations of one of three genes including FGFR, EGFR, or TP53 after surgery, treated with radiotherapy or chemotherapy or both, had a longer lifetime than those with untreated mutations ($p=0.001$). Treated gene-mutated glioblastoma patients had statistic significance ($p = 0.001$) compared to untreated ones.

- + Die in the first 6 months: 0% compared to 69.2%
- + Live for 6 to 12 months: 50% compared to 23.1%
- + Live for 12 to 24 months: 37.5% compared to 0%
- The relationship among mutant genes in glioblastoma patients has not been found yet.

FURTHER RESEARCH DIRECTIONS

The future research will focus on analyzing glioblastoma patients starting from hospilization, gene mutation identification, treatments after surgery, treatment counselling and to evaluate the effectiveness of different treatment methods such as radiotherapy and chemotherapy with Temozolomide.

**LIST OF ARTICLES OF AUTHOR
HAVE DISCLOSURE TO RELATED TO THE THESIS**

1. Nguyen Thi Thom, Tran Quoc Dat, Tran Huy Thinh, Dang Thi Ngoc Dung, Tran Van Khanh, Ta Thanh Van, Kieu Dinh Hung (2017). Identification of egfr mutation in glioblastomas patients, *Viet Nam Medical Journal*, 131 - 135.
2. Nguyen Thi Thom, Tran Quoc Dat, Tran Huy Thinh, Dang Thi Ngoc Dung, Tran Van Khanh, Ta Thanh Van, Kieu Dinh Hung (2017). Identification of exon 13 gen FGFR mutation in glioblastomas patients, *Viet Nam Medical Journal*, 461(1), 178-181.
3. Nguyen Thi Thom, Tran Quoc Dat, Tran Huy Thinh, Dang Thi Ngoc Dung, Ha Xuan Hop, Tran Van Khanh, Ta Thanh Van, Kieu Dinh Hung (2018). Identification of egfr mutation in glioblastomas patients, *Viet Nam Medical Journal*, 466(1), 79-82.
4. Kieu Dinh Hung, Nguyen Thi Thom, Tran Quoc Dat, Dang Thi Ngoc Dung, Tran Huy Thinh, Tran Van Khanh, Ta Thanh Van (2019). Mutation analysis of EGFR and FGFR gen in glioblastoma patients in Viet Nam, *Journal of Military Pharmaco-medicine*, 46 - 51.
5. Nguyen Thi Thom, Tran Quoc Dat, Tran Van Khanh, Ta Thanh Van, Kieu Dinh Hung, Phung Thi Phuong Chiem, Dang Thi Ngoc Dung (2019). Identification the deletion of EGFR gen in glioblastomas patients, *Vietnam Medical Journal*, 477(2), 15-18.