

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ THƠM

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2019

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

BỘ Y TẾ

NGUYỄN THỊ THƠM

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

Chuyên ngành : Hóa sinh

Mã số : 62720112

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

*Người hướng dẫn khoa học:*

**PGS.TS. ĐẶNG THỊ NGỌC DUNG**

**HÀ NỘI - 2019**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Thị Thơm, nghiên cứu sinh khoá 34 Trường Đại học Y Hà Nội, Chuyên ngành Hoá sinh Y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Cô Đặng Thị Ngọc Dung.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ một 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 kết này.

*Hà Nội, ngày 10 tháng 12 năm 2019*

**Người viết cam đoan**

**Nguyễn Thị Thơm**

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Bp	Base pair	Cặp base nitơ
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States	Trung tâm quản lý u não Hoa Kỳ
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Axit Deoxyribonucleic
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	Nucleotid tự do
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor	Thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi
IDH	Isocitrate dehydrogenase	Enzym Isocitrate dehydrogenase
MGMT	Methylguanine DNA methyltransferase	Enzym Methylguanine DNA methyltransferase
MLPA	Multiplex Ligation - dependent Probe Amplification	Khuếch đại DNA đầu dò đa mồi
mRNA	RNA messenger	RNA thông tin
PCR	Polymerase Chain Reaction	Chuỗi phản ứng enzym
TACC	Transforming, Acidic Coiled-Coil Containing Protein	Gen mã hoá Protein Acidic Coiled-Coil Containing
TP53	Tumor protein 53	Gen ức chế khối u TP53
RNA	Ribonucleic Acid	Axit Ribonucleic
RTK	Receptor tyrosin kinase	Thụ thể nội bào
UNBTKĐ		U nguyên bào thần kinh đệm

# MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	4
1.1. Đại cương về u nguyên bào thần kinh đệm.....	4
1.1.1. Tình hình mắc u nguyên bào thần kinh đệm trong nước và trên thế giới .....	4
1.1.2. Phân loại u nguyên bào thần kinh đệm.....	5
1.1.3. Chẩn đoán .....	12
1.1.4. Điều trị .....	13
1.1.5. Dự phòng .....	16
1.2. Nguyên nhân và cơ chế sinh bệnh u nguyên bào thần kinh đệm .....	16
1.2.1. Nguyên nhân gây bệnh .....	16
1.2.2. Cơ chế sinh bệnh trong u nguyên bào thần kinh đệm .....	17
1.3. Đặc điểm người bệnh U nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen và thời gian sống sau điều trị .....	35
1.3.1. Đặc điểm nguyên phát và thứ phát .....	35
1.3.2. Thời gian sống sau điều trị của người UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến gen.....	38
1.4. Kỹ thuật sinh học phân tử xác định đột biến gen trong u nguyên bào thần kinh đệm. ....	43
1.4.1. Kỹ thuật PCR.....	43
1.4.2. Kỹ thuật khuếch đại DNA đầu dò - MLPA.....	46
1.4.3. Kỹ thuật giải trình tự gen.....	50
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	52
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	52
2.1.1. Tiêu chuẩn chọn mẫu.....	52
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	52
2.1.3. Cách tiến hành chọn mẫu nghiên cứu.....	52
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	53

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu .....	53
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu.....	53
2.2.3. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất nghiên cứu: .....	53
2.2.4. Các bước nghiên cứu .....	55
2.3. Thời gian, địa điểm nghiên cứu.....	60
2.3.1. Thời gian nghiên cứu.....	60
2.3.2. Địa điểm nghiên cứu.....	60
2.4. Xử lý số liệu .....	60
2.5. Đạo đức trong nghiên cứu .....	61
2.6. Biện pháp tránh sai số .....	61
2.7. Kinh phí thực hiện đề tài .....	62
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	63
3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.....	63
3.1.1. Đặc điểm về tuổi.....	63
3.1.2. Đặc điểm về giới.....	64
3.2. Kết quả xác định một số đột biến trên gen TP53, EGFR, FGFR ở người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm.....	65
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA từ mẫu mô paraffin. ....	65
3.2.2. Một số hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản các exon nghiên cứu của gen TP53, EGFR, FGFR .....	66
3.2.3. Kết quả giải trình tự gen xác định đột biến trên gen TP53 .....	67
3.2.4. Kết quả xác định đột biến trên gen EGFR.....	68
3.2.5. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến trên exon 12 và exon 13 gen FGFR.....	81
3.2.6. Tổng hợp các đột biến trên 3 gen nghiên cứu: gen TP53, EGFR, FGFR .....	85
3.2.7. Tổng hợp các đột biến kép trên 3 gen nghiên cứu: gen TP53, EGFR, FGFR .....	85
3.3. Một số đặc điểm của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen .....	86

3.3.1. Đặc điểm về tuổi và giới của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen...	86
3.3.2. Đặc điểm về kích thước khối u của người bệnh đột biến gen .....	89
3.3.3. Đặc điểm về thể bệnh nguyên phát và thứ phát.....	90
3.3.4. Phân bố thời gian sống của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen có điều trị xạ trị, hóa chất .....	94
<b>CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>102</b>
4.1. Đặc điểm chung của các đối tượng nghiên cứu .....	103
4.2. Đặc điểm đột biến trên các gen nghiên cứu .....	105
4.2.1. Đặc điểm DNA tách chiết từ mẫu mô paraffin.....	105
4.2.2. Đặc điểm về kết quả PCR nhân bản các exon xác định đột biến điểm của các gen nghiên cứu.....	107
4.2.3. Đặc điểm đột biến điểm trên exon 7, exon 8 gen TP53 .....	108
4.2.4. Đặc điểm đột biến từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR. ....	110
4.2.5. Đặc điểm đột biến điểm trên exon 12, exon 13 gen FGFR.....	116
4.3. Một số đặc điểm của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen .....	118
4.3.1. Đặc điểm tuổi và giới của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen.....	120
4.3.2. Đặc điểm về kích thước khối u ở người thấy đột biến gen trong bệnh UNBTKĐ .....	121
4.3.3. Đặc điểm hai thể bệnh nguyên phát và thứ phát của UNBTKĐ .	121
4.3.4. Đặc điểm về thời gian sống của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen.....	125
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>135</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ</b>	
<b>LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Đặc điểm 2 thể bệnh UNBTKĐ nguyên phát và thứ phát .....	36
Bảng 2.1.	Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu.....	56
Bảng 3.1.	Đặc điểm về tuổi của người bệnh trong nghiên cứu .....	63
Bảng 3.2.	Kết quả phát hiện đột biến điểm trên exon 2,3,7 gen EGFR .....	69
Bảng 3.3.	Tỉ lệ các dạng đột biến trên gen EGFR.....	70
Bảng 3.4.	Kiểu xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR.....	79
Bảng 3.5.	Tổng hợp số lượng đột biến từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR ...	80
Bảng 3.6.	Kết quả phát hiện đột biến điểm trên gen FGFR .....	84
Bảng 3.7.	Các đột biến kép trên 3 gen TP53, EGFR, FGFR.....	85
Bảng 3.8.	Tuổi trung bình của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen .....	86
Bảng 3.9.	Tuổi trung bình của hai giới nam và nữ.....	87
Bảng 3.10.	Đặc điểm về phân bố tuổi ở người bệnh đột biến gen EGFR.....	87
Bảng 3.11.	Đặc điểm về tuổi của người bệnh UNBTKĐ đột biến 1 trong 3 gen nghiên cứu .....	88
Bảng 3.12.	Đặc điểm về giới của người UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến gen .....	88
Bảng 3.13.	Phân bố kích thước khối u của người bệnh đột biến gen FGFR.	89
Bảng 3.14.	Phân bố kích thước khối u của người đột biến gen EGFR .....	89
Bảng 3.15.	Phân bố kích thước khối u của người đột biến một trong 3 gen FGFR - EGFR - TP53 .....	90
Bảng 3.16.	Tỷ lệ thể bệnh nguyên phát và thứ phát .....	90
Bảng 3.17.	Tuổi trung bình của hai thể nguyên phát và thứ phát .....	91
Bảng 3.18.	Thời gian trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật..	91
Bảng 3.19.	Phân bố thời gian từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật của thể nguyên phát và thể thứ phát.....	92
Bảng 3.20.	Phân bố thời gian sống sau phẫu thuật của thể nguyên phát và thể thứ phát.....	92



Bảng 3.21.	Phân bố thời gian từ khi phát hiện bệnh đến khi chết của thể nguyên phát và thể thứ phát .....	93
Bảng 3.22.	Tuổi trung bình của người bệnh đột biến gen. ....	94
Bảng 3.23.	Phân bố thời gian sống sau phẫu thuật của thể nguyên phát và thể thứ phát có điều trị xạ trị, hóa chất.....	95
Bảng 3.24.	Thời gian sống của người bệnh sau phẫu thuật có điều trị .....	95
Bảng 3.25.	Thời gian sống của người bệnh đột biến gen FGFR sau phẫu thuật có điều trị xạ trị, hóa chất.....	96
Bảng 3.26.	Thời gian sống của người bệnh đột biến gen EGFR sau phẫu thuật có điều trị xạ trị, hóa chất.....	97
Bảng 3.27.	Thời gian sống của người bệnh sau phẫu thuật đột biến 1 trong 3 gen, có điều trị xạ trị, hóa chất .....	98
Bảng 3.28.	Thời gian sống của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen FGFR tính từ khi phát hiện mắc bệnh đến lúc chết có điều trị xạ trị, hóa chất .....	99
Bảng 3.29.	Thời gian sống của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen EGFR tính từ khi phát hiện mắc bệnh đến lúc chết có điều trị xạ trị, hóa chất .....	100
Bảng 3.30.	Thời gian sống của người bệnh đột biến 1 trong 3 gen nghiên cứu tính từ khi phát hiện mắc bệnh đến lúc chết có điều trị .....	101

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Các đặc điểm mô học của u tế bào hình hạt nhỏ.....	8
Hình 1.2.	Ảnh chụp MRI và mô bệnh học của UNBTKĐ.....	11
Hình 1.3.	Hình ảnh minh họa sự phân bố và tần suất đột biến gen TP53 trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm. ....	20
Hình 1.4.	Vị trí gen EGFR trên NST số 7.....	21
Hình 1.5.	Các cơ chế kích hoạt và các đường dẫn tín hiệu do EGFR thực hiện.....	22
Hình 1.6.	Vị trí đột biến gen EGFR trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm .....	24
Hình 1.7.	Ảnh nhuộm miễn dịch học của EGFR trong mô UNBTKĐ.....	25
Hình 1.8.	Thời gian sống còn của người bệnh UNBTKĐ .....	26
Hình 1.9.	Vị trí của gen FGFR1 trên NST (A) Vị trí của gen FGFR3 trên NST (B).....	28
Hình 1.10.	Cấu trúc, vị trí hoạt động và con đường tín hiệu thông qua thụ thể yếu tố phát triển nguyên bào sợi FGFRs. ....	29
Hình 1.11.	Hình ảnh đột biến gen FGFRs trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm.....	30
Hình 1.12.	Vị trí của TACC <sub>3</sub> trên NST số 4 .....	33
Hình 1.13.	Kết quả thử nghiệm chất JNJ-42756493 trên chuột có UNBTKĐ. ....	33
Hình 1.14.	Sự thay đổi kích thước khối u và thời gian sống kéo dài của bệnh nhân có đột biến gen FGFR sau điều trị bằng chất ức chế JNJ-42756493. ....	34
Hình 1.15.	(A) So sánh tỷ lệ sống còn của người bệnh UNBTKĐ có đột biến gen dạng EGFR <sub>vIII</sub> và người không có đột biến.....	40
Hình 1.16.	Phản ứng PCR (thành phần và sản phẩm) .....	44
Hình 1.17.	Ảnh kết quả đột biến điểm gen EGFR bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm .....	46
Hình 1.18.	Hình ảnh probe và quy trình phản ứng MLPA .....	48

Hình 1.19.	Hình ảnh điện di xác định đột biến gen dạng EGFRvIII bằng kỹ thuật MLPA.....	49
Hình 1.20.	Ảnh kết quả giải trình tự xác định đột biến gen FGFR.....	51
Hình 2.1.	Hình ảnh kết quả chạy điện di mao quản mẫu DNA chuẩn của người nam.....	58
Hình 3.1.	Đặc điểm về giới của người bệnh trong nghiên cứu.....	64
Hình 3.2.	Hình ảnh minh họa kết quả đo OD của mẫu DNA tách chiết bằng máy Nanodrop 1000.....	65
Hình 3.3.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản các exon nghiên cứu.....	66
Hình 3.4.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 8 gen TP53 có chứa đột biến điểm p.R282W .....	67
Hình 3.5.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 8 gen TP53 chứa đột biến điểm p.R306X .....	68
Hình 3.6.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 2 gen EGFR chứa đột biến điểm p.G42D .....	71
Hình 3.7.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 2 gen EGFR chứa đột biến điểm p.L62I .....	71
Hình 3.8.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 3 gen EGFR chứa đột biến điểm p.G87D .....	72
Hình 3.9.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 3 gen EGFR chứa đột biến điểm p.K129N .....	72
Hình 3.10.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p.T274M.....	73
Hình 3.11.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p.A289T.....	74
Hình 3.12.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p. K293X .....	75
Hình 3.13.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p.K284N .....	75
Hình 3.14.	Hình ảnh điện di mao quản sản phẩm PCR xác định xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR.....	76

Hình 3.15.	Hình ảnh kết quả phân tích xác định đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR.....	78
Hình 3.16.	Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 12 gen FGFR chứa đột biến điểm p.N546K.....	81
Hình 3.17.	Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 13 gen FGFR chứa đột biến điểm p.A575V.....	82
Hình 3.18.	Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 13 gen FGFR chứa đột biến điểm p.R576W.....	83
Hình 3.19.	Tỉ lệ đột biến (A) và tỉ lệ các dạng đột biến (B) trên exon 12, exon 13 của gen FGFR. ....	84
Hình 3.20.	Tỷ lệ đột biến trên các gen nghiên cứu.....	85

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Tế bào thần kinh đệm được xem như là mô liên kết của hệ thần kinh trung ương của con người, với số lượng nhiều gấp 10 đến 50 lần so với số lượng neuron thần kinh. Các tế bào thần kinh đệm được công nhận vai trò thông tin liên lạc trong hệ thần kinh trung ương khi hợp tác với các neuron [1]. U nguyên bào thần kinh đệm (UNBTKĐ) phát triển từ tế bào thần kinh đệm chưa biệt hóa hoặc biệt hóa thấp trong não [2], 100% là ác tính và được WHO xếp vào nhóm u ác tính độ IV [3]; 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 bệnh 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% [4].

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 [5],[6],[7]. Một tế bào bình thường để chuyển dạng sang tế bào ung thư phải trải qua một vài đột biến ở một số gen nhất định. Quá trình này liên quan đến hệ thống gen sinh ung thư và gen kháng ung thư. Bình thường gen sinh ung thư kiểm soát hoạt động tế bào theo hướng tích cực, mã hóa protein truyền những tín hiệu phân bào, khi các gen này bị đột biến sẽ truyền tín hiệu phân bào sai lạc mà cơ thể không kiểm soát được dẫn đến sinh ung thư, ví dụ gen EGFR, FGFR, IDH... Các gen kháng ung thư trái lại mã hóa cho những protein kiểm soát phân bào theo hướng ức chế, làm chu kỳ phân bào dừng ở một pha, thường ở pha G<sub>1</sub>; các gen kháng ung thư còn có chức năng làm biệt hóa tế bào, hoặc mã hóa tế bào chết theo chương trình. Khi các gen kháng ung thư bị bất hoạt do đột biến sẽ làm biến đổi tế bào lành thành ác tính, ví dụ gen TP53, PTEN... [5].

Các nghiên cứu đã chỉ ra sinh bệnh UNBTKĐ có liên quan đến nhiều gen: gen kháng ung thư như gen TP53, PTEN, gen sinh ung thư như: EGFR, FGFR, IDH, MGMT, ATRX, hoặc xóa 1p/19q... [8] 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 [4],[9],[10],[11]. Gen TP53 có vai trò kiểm soát hoạt động sống và chết của tế bào theo chu trình. Đột biến TP53 liên quan chặt chẽ với một tiên lượng xấu cho sự sống còn tổng thể ở những bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, và đột biến TP53 còn làm tăng nhạy cảm với hóa chất temozolomide trong điều trị bệnh, làm tăng tỉ lệ sống còn so với điều trị bằng semustine ở bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm [12],[13]. Gen EGFR và gen FGFR mã hóa tổng hợp các thụ thể màng tế bào có tên gọi protein tyrosin kinase, các thụ thể này có vai trò tiếp nhận và truyền các tín hiệu nội bào theo cơ chế phosphoryl hóa, sản phẩm của chúng sẽ điều hòa sự tăng sinh, sự sống còn, sự biệt hóa và sự vận động tế bào. Hoạt động của các thụ thể được kiểm soát và điều hòa rất chặt chẽ. Sự rối loạn hoạt động của tyrosin kinase do đột biến hay do các biến đổi di truyền khác có thể gây ra mất điều hòa hoạt động của enzym này và hậu quả là tế bào trở nên ác tính [5],[6]. Một số chất ức chế hoạt động bất thường của tyrosin kinase đã được thử nghiệm thành công trong một số ung thư do đột biến gen EGFR, FGFR như: ung thư phổi không tế bào nhỏ, ung thư vú, đại tràng...[14],[15],[16],[17]. Và các chất ức chế EGFR, FGFR hiện đang được thử nghiệm trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, để những thử nghiệm thành công nhất định cần phải xác định được những thay đổi trong cấu trúc phân tử gen EGFR, FGFR. Đây chính là hướng điều trị đích đang rất triển vọng trong điều trị ung thư [18]. 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: ***"Nghiên cứu đột biến gen trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm"***, 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.*

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN

### 1.1. Đại cương về u nguyên bào thần kinh đệm

#### 1.1.1. Tình hình mắc u nguyên bào thần kinh đệm trong nước và trên thế giới

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 [4], tỷ lệ mắc cao nhất là ở Anh (4,64/100.000 dân/năm) [19], 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 gia tăng hàng năm, tăng trung bình hàng năm ở nam giới: 9,2% và phụ nữ: 8,8%, sự gia tăng cao nhất ở nhóm tuổi già nhất, nam là 12,4%, nữ là 10,5% [20], tỷ lệ mắc thấp hơn ở Phần Lan 2,0/100.000 người/năm [21]. Tại Ấn độ hàng năm có từ 5-10/100,000 dân mắc u não và thần kinh trung ương, trong đó tỷ lệ mắc UNBTKĐ chiếm 22,8% [22]. Tỷ lệ mắc bệnh rất thấp ở Hàn quốc 0,66/100000 dân/năm [23]. Nam giới thường mắc UNBTKĐ nhiều hơn nữ giới, và người da trắng có tỷ lệ mắc bệnh cao hơn người da màu [4].

Tại Việt Nam chưa thấy có báo cáo về tỷ lệ mắc u nguyên bào thần kinh đệm trong cả nước, một số các nghiên cứu đã đưa ra kết quả cho thấy tỉ lệ bệnh khá cao: theo thống kê của Lê Xuân Trung và Nguyễn Như Bằng năm 1975, u nguyên bào thần kinh đệm chiếm 18% trong 408 ca mổ u não tại bệnh viện Việt Đức [24]. 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% [25]. Nghiên cứu của Trần Chiến (2011) tỉ lệ mắc u nguyên bào thần kinh đệm là 39,3% trong số các u thần kinh đệm hình sao, nam mắc bệnh cao hơn nữ, tuổi trung bình  $43,03 \pm 3,37$ , tuổi hay gặp nhất từ 51-60 tuổi, thấp nhất 13 tuổi, cao nhất 71 tuổi [26]. Theo Dương Đại Hà và Hà Kim Trung (2014), u nguyên bào thần kinh đệm chiếm 33,3%, có độ tuổi trung bình cao nhất trong các loại u thần kinh đệm [27]. Tất cả các nghiên cứu đều kết luận nam giới mắc bệnh UNBTKĐ cao hơn nữ giới, tỷ lệ mắc tăng theo lứa tuổi [4],[19],[20],[25]. Về độ tuổi mắc ở Việt nam trẻ hơn so với các nước: tuổi trung bình mắc UNBTKĐ là  $43 \pm 3,71$ , tuổi hay gặp nhất từ 51-60 tuổi (28,8%) [26], trong khi đó ở Mỹ tỷ lệ mắc bệnh cao nhất là nhóm trên 75 tuổi chiếm 24,43% [4].

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 [4],[19],[21],[26]...

### ***1.1.2. Phân loại u nguyên bào thần kinh đệm***

Tổ chức não và thần kinh trung ương khá đa dạng, bao gồm nhiều tuyến, nhiều loại tế bào; khi tổn thương cũng rất đa dạng, tùy vị trí, chức năng mà các tế bào đảm nhiệm sẽ gây ra các bệnh lý khác nhau, cùng gọi là u não song với mỗi loại tế bào khi bị bệnh sẽ có biểu hiện một dạng hình thái tổn thương. Dựa vào vị trí tổn thương có thể định hướng bệnh, và dựa vào tổn thương mô bệnh học có thể xác định chính xác tổn thương loại tế bào nào và thuộc thể bệnh nào.

Từ thực tế lâm sàng của bệnh các nhà khoa học đã tổng kết và phân loại các khối u não và thần kinh trung ương theo 2 cách: phân loại theo vị trí khối u và phân loại theo tổn thương mô bệnh học.

### ***1.1.2.1. Phân loại u nguyên bào thần kinh đệm theo vị trí khối u***

Phân loại theo vị trí khối u giúp các bác sĩ định hướng cho chẩn đoán và điều trị, nhất là xác định vị trí cho việc phẫu thuật cắt khối u. Các vị trí khối u được chia thành 3 loại [2]:

Các u trên lều: nằm phía trên của lều tiểu não bao gồm các u thùy não (u thùy trán, thùy đỉnh, thùy thái dương, thùy chẩm), các khối u vùng trung tâm (u nhân xám trung ương, u não thất bên, u thể trai, u hố yên, u não thất III, u tuyến tùng).

Các u dưới lều (u hố sau): bao gồm các u tiểu não, u não thất IV, u thùy giun, thân não, góc cầu tiểu não.

Các vị trí khác: u lỗ bầu dục giữa khe tầng trên và dưới lều, các u lỗ chẩm nằm giữa hố sau và ống sống.

### ***1.1.2.2. Phân loại u nguyên bào thần kinh đệm theo mô bệnh học***

*\* Phân loại u nguyên bào thần kinh đệm theo các thời kỳ*

Năm 1835, lần đầu tiên Virchow đưa ra phân loại u não dựa vào sự giống nhau giữa tế bào u và tế bào não của người trưởng thành để đặt tên cho khối u.

Năm 1926 Bailey và Cushing phân loại u não dựa trên lý thuyết bào thai của Conheim, đã cho rằng các khối u phát triển từ các tế bào thai ngừng phát triển trong nhiều giai đoạn, chồng lên nhau trong nhiều thời kỳ của các tế bào não, đó là cách phân loại theo mô học các khối u của hệ thần kinh [28]. Quan niệm tiên lượng mô học các khối u não này có giá trị với phần lớn các quan niệm và cách phân loại vẫn được dùng hiện nay. Các tác giả đã thấy rằng những bệnh nhân có thời gian sống thêm lâu nhất là những khối u biệt hoá cao nhất so với những u ít biệt hoá. Trong nhiều thập niên sau, rất nhiều cách phân loại khác ra đời tùy theo các nhà mô bệnh học và các phẫu thuật viên thần kinh.

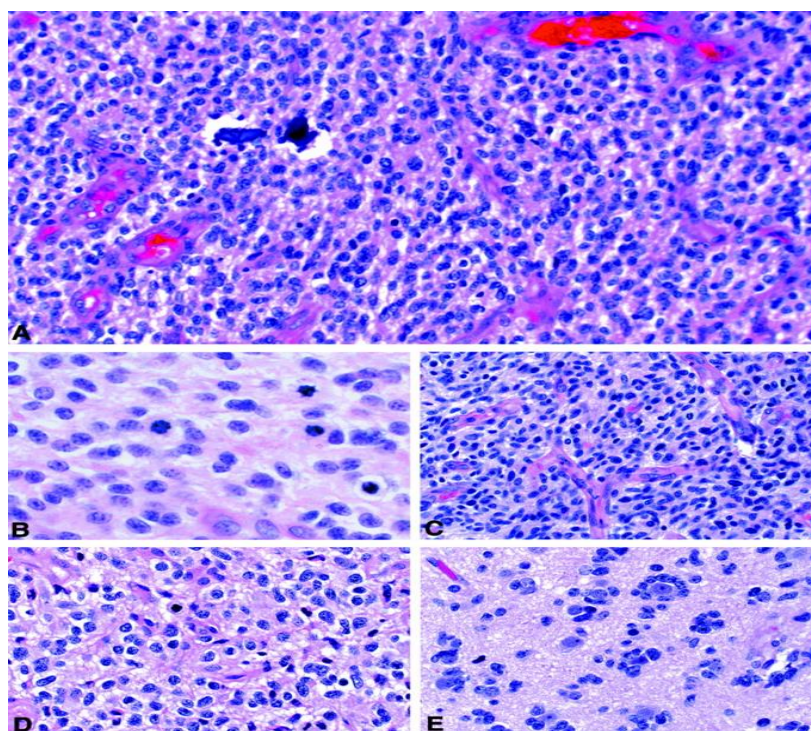
Năm 1949 Kernohan đã đề xuất một cách phân loại mới, dựa trên thuyết tăng sinh: các tế bào u không phải sinh ra từ các tế bào phôi thai ngừng phát triển, mà chính là sự tăng sinh không kiểm soát được của các tế bào bình thường. Từng loại u có thể được phân chia theo độ ác tính tăng dần (I, II, III, IV) tùy theo mức độ không biệt hoá. Việc phân độ dựa vào các chỉ tiêu: số lượng tế bào u gián phân, tỷ lệ phần trăm tế bào u không biệt hoá, biên độ hoại tử, các mạch tăng sinh và mức độ đa hình. Như vậy, phân độ là cách đánh giá tiên lượng dựa vào việc nghiên cứu các nhóm bệnh nhân khác nhau, một công cụ chính trong lựa chọn các liệu pháp điều trị tối ưu [29]. Phân loại của Kernohan trở nên phổ biến vì phản ánh được sự chuyển dạng ác tính của nhiều loại tế bào thần kinh.

Công nghệ sinh học bùng nổ, các nghiên cứu đã phát hiện ra các liên quan của đột biến di truyền đến sự phát sinh khối u, do vậy ngoài phân loại theo mô bệnh học là chính, năm 1993 WHO đã bổ sung thêm một số thay đổi về di truyền học trong một số khối u; đây là sự khác biệt lớn so với tất cả các phân loại u não từ trước đó. U nguyên bào thần kinh đệm thuộc nhóm u tế bào hình sao, độ ác tính cấp độ IV; về tình trạng di truyền: có sự thay đổi di truyền như đột biến của Tp53 và mất 17P, mất 19q hoặc mất nhiễm sắc thể 10, đặc biệt trong nhóm bệnh UNBTKĐ có thêm tiêu chuẩn khuếch đại EGF-R thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì [30].

Sự phát hiện thêm về một số biến thể mô học trong quá trình chẩn đoán và điều trị, kế hoạch xếp loại của WHO đã được cập nhật, được sửa đổi rộng rãi. Nhận biết vai trò của các phương pháp tiếp cận chẩn đoán phân tử đối với phân loại khối u, các đặc điểm di truyền đã được nhấn mạnh hơn, vì vậy phân loại các khối u của hệ thống thần kinh của WHO năm 2000 ra đời, nhằm mục đích được sử dụng và thực hiện cho các cộng đồng nghiên cứu y sinh học trên toàn thế giới. U nguyên bào thần kinh đệm được xếp vào nhóm u tế bào hình sao trong u biểu mô thần kinh, có độ ác tính cao nhất (độ IV), có 3 loại hình

thái lâm sàng là: UNBTKĐ đa hình, UNBTKĐ thể hỗn hợp với sarcom xơ, UNBTKĐ thể tế bào khổng lồ [31].

Năm 2007, do phát hiện thêm một số thực thể lâm sàng mới, WHO phân loại lại các khối u của hệ thống thần kinh trung ương, trong đó UNBTKĐ thuộc nhóm u tế bào sao (astrocytoma), và u nguyên bào thần kinh đệm được chia thành hai loại là UNBTKĐ tế bào khổng lồ và sarcom nguyên bào thần kinh đệm (gliosarcom) [32]. Khác với phân loại năm 2000 gồm ba loại hình tổn thương theo mô bệnh học, thì năm 2007 WHO đã nhóm lại thành hai loại hình tổn thương, tạo điều kiện dễ dàng cho phân loại của các thầy thuốc lâm sàng. Trên lâm sàng phần lớn gặp các tổn thương mô bệnh học là dạng tế bào hình hạt nhỏ.



**Hình 1.1. Các đặc điểm mô học của u tế bào hình hạt nhỏ [32]**

- (A) tính đồng nhất hạt nhân và kích thước tế bào
- (B) hạt nhân hình bầu dục với nhiều hình ảnh phân bào
- (C) nhiều dây mao mạch
- (D) hạt nhân rõ
- (E) vệ tinh.

Việc phân loại theo mô bệnh học rất có giá trị trong chẩn đoán, tiên lượng và điều trị, vì mặc dù cùng là u ở não xong phải sau khi đọc được tiêu bản mô bệnh học tế bào mới xác định được chắc chắn là thuộc thể bệnh nào, đồng thời mỗi loại hình tế bào tổn thương tiến triển sẽ khác nhau, mức độ nặng nhẹ của bệnh phụ thuộc vào mức độ biệt hóa của tế bào u, nếu tế bào u ít và không biệt hóa thì mức độ ác tính rất cao, và có đặc điểm xâm lấn lan tỏa sang các tổ chức xung quanh, sự tăng sinh mạch máu nhiều trong u, hoại tử tổ chức... sẽ ảnh hưởng tới kết quả điều trị của thầy thuốc lâm sàng. Tuy vậy trong thực tế lâm sàng nhiều trường hợp mô bệnh học rất khó phân biệt, do vậy WHO luôn cập nhật trong phân loại để phù hợp chẩn đoán lâm sàng với mô bệnh học, tạo điều kiện thuận lợi cho điều trị và nghiên cứu. Phân loại của WHO năm 2007 được mô tả rất chi tiết và bổ sung thêm nhiều loại hình lâm sàng, do vậy phân loại năm 2007 được sử dụng lâu nhất, so với phân loại năm 1993 và năm 2000. Nhưng phân loại năm 2007 chưa phù hợp với sự thay đổi lớn trong công cuộc đột phá về biến đổi di truyền, nhiều loại bệnh đã càng ngày càng được chứng minh có liên quan nhiều hơn đến đột biến gen, nhất là trong các khối u não, cần bổ sung về di truyền học cho nhiều thể bệnh trong phân loại của u não và thần kinh trung ương, vì vậy WHO cho phép bản cập nhật phân loại năm 2016.

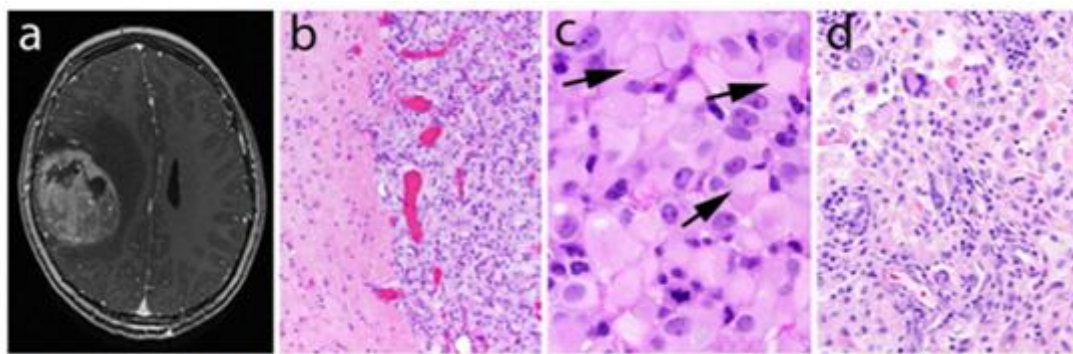
*\* Phân loại u nguyên bào thần kinh đệm của WHO năm 2016 [3].*

2016 WHO đã đưa ra bản cập nhật về phân loại u thần kinh trung ương, có sự khác biệt lớn so với các phân loại trước đây; đó là qui định cách gọi tên cho các loại khối u: bao gồm một tên mô bệnh học, sau đó là các đặc tính di truyền, với các đặc điểm di truyền sau dấu phẩy và tính từ, như: u tế bào thần kinh đệm hình sao lan tỏa, đột biến IDH... Đối với những thực thể có nhiều hơn một yếu tố di truyền, nhiều tính năng phân tử cần thiết được bao gồm trong tên: u tế bào thần kinh đệm ít nhánh, đột biến IDH và xóa 1p/19q. Đối

với một khối u thiếu đột biến di truyền, thuật ngữ hoang dã có thể được sử dụng: u nguyên bào thần kinh đệm, IDH hoang dã. Ngoài ra có một thể khối u gọi là NOS (NOS nghĩa là không được quy định cụ thể) cho phép gọi đối với một số loại khối u khi không có đủ thông tin để có một mã cụ thể hơn hoặc khối u chưa được kiểm tra đầy đủ các tham số di truyền liên quan, nhưng trong trường hợp hiếm có cũng có thể bao gồm các khối u đã được kiểm tra nhưng không cho thấy các thay đổi di truyền chẩn đoán. NOS không định nghĩa một thực thể cụ thể; thay vì nó chỉ ra một nhóm tổn thương mà không thể được phân loại vào bất kỳ nhóm nào được xác định hẹp hơn; ví dụ: u tế bào thần kinh đệm hình sao lan tỏa, không xác định (diffuse astrocytoma, NOS), hoặc u tế bào thần kinh đệm hình sao giảm biệt hóa, không xác định (anaplastic astrocytoma, NOS). Do đó, một danh mục NOS đại diện cho những trường hợp mà không biết về mặt di truyền học và lâm sàng, cần phải nghiên cứu trong tương lai trước khi có thể sàng lọc thêm. Kèm theo phân loại của WHO 2016 vẫn phân chia các mức độ ác tính từ I đến IV tùy thuộc đặc điểm hình thái tế bào u và mức độ biệt hóa tế bào, tế bào u càng ít biệt hóa thì độ ác tính càng cao. U nguyên bào thần kinh đệm được xếp vào nhóm u tế bào thần kinh đệm hình sao lan tỏa và tế bào thần kinh đệm ít nhánh [3]. UNBTKĐ được chia thành 2 thể bệnh chính bao gồm: u nguyên bào thần kinh đệm, IDH hoang dã và u nguyên bào thần kinh đệm, đột biến IDH, cả 2 loại đều có độ ác tính cao nhất (độ IV), và có những tiêu chuẩn rõ về đặc điểm của từng thể bệnh, bao gồm: thể UNBTKĐ, IDH hoang dã (khoảng 90% trường hợp), tương ứng với hầu hết các UNBTKĐ nguyên phát được xác định lâm sàng, thường gặp ở bệnh nhân trên 55 tuổi; và UNBTKĐ, IDH-đột biến (khoảng 10% trường hợp), tương ứng chặt chẽ giữa UNBTKĐ thứ phát với u thần kinh đệm lan tỏa giai đoạn trước đó và phát hiện ở bệnh nhân trẻ tuổi; ngoài ra còn có một thể bệnh không điển hình gọi là UNBTKĐ không xác

định (NOS), một chẩn đoán được dành riêng cho những khối u mà không thể đánh giá về IDH đầy đủ. (WHO 2016).

WHO mô tả hình ảnh trên phim chụp MRI của u nguyên bào thần kinh đệm: là hình ảnh nội địa hóa và phân chia mảng sắc nét, (nhìn thấy trên hình ảnh MR tương phản sau T1) hình 1.2a.



**Hình 1.2. Ảnh chụp MRI và mô bệnh học của UNBTGD.**

*Nguồn: David N. Louis et al, Ellison11 Received: 22 January 2016. 1 3 Acta Neuropathol DOI 10.1007/s00401-016-1545-1.*

Hình ảnh tổn thương mô bệnh học của u nguyên bào thần kinh đệm được mô tả: tổn thương điển hình là u tế bào hình hạt nhỏ, được đặc trưng bởi các khối u nhỏ đồng nhất, nhạt màu, nhân chia và bắt màu đậm, có thể thấy một đường biên giới riêng biệt với não liền kề, có thể xâm lấn xung quanh (hình 1.2b); phức tạp hơn, ngoài các tế bào biểu mô nhỏ, còn xuất hiện nhiều tế bào biểu mô lớn với tế bào bạch cầu ưa acid, các hạt nhân, một tập hợp các tế bào khối u hạt nhân lệch tâm và sự bao phủ cạnh nhân chồng lên nhau (hình 1.2c). Một số hình ảnh cho thấy các đặc điểm của một tiền chất thấp hơn ở các mô lân cận; bao gồm các tế bào khổng lồ kỳ lạ mặc dù không có hoạt động phân bào, rất nhiều hạt bạch cầu ưa acid và các tế bào vàng hình sao xuất hiện. Xen kẽ tế bào u là sự tăng sinh mạch máu và tổ chức hoại tử khối u (hình 1.2d).

Bảng phân loại 2016 của WHO khuyến cáo sử dụng cho tất cả các cơ sở điều trị và nghiên cứu về não và thần kinh trung ương, thay thế cho các



phân loại trước; phân loại này khá thuận lợi trong việc áp dụng điều trị theo từng thể loại, và dễ dàng để báo cáo trong các nghiên cứu, cũng như báo cáo về thực hành lâm sàng; nhưng thực tế áp dụng như thế nào thì trên thế giới cũng như ở Việt nam vẫn chưa thấy có báo cáo. Hiện tại Khoa Giải Phẫu Bệnh, Bệnh viện Việt Đức chưa áp dụng phân loại này trong chẩn đoán. Do vậy chúng tôi sử dụng tiêu chuẩn phân loại UNBTKĐ của WHO năm 2007; về cơ bản mô tả tổn thương giải phẫu bệnh của phân loại 2007 và 2016 không khác biệt.

### ***1.1.3. Chẩn đoán***

#### ***1.1.3.1. Chẩn đoán lâm sàng***

Các triệu chứng u nguyên bào thần kinh đệm phụ thuộc chủ yếu vào kích thước và vị trí khối u trong não. Các triệu chứng có thể do tổn thương mô sinh tồn, do tăng áp nội sọ khi khối u phát triển lớn trong không gian hẹp của hộp sọ. Chúng cũng có thể do sung nề, tích tụ dịch xung quanh khối u gây phù não. Ngoài ra não úng thủy có thể do khối u làm tắc nghẽn sự lưu thông của dịch não tủy khiến chúng tích tụ trong các não thất. Nếu khối u phát triển chậm, xuất hiện triệu chứng từ từ và bộc lộ ra sau một thời gian dài. Các triệu chứng thường gặp nhất bao gồm:

- Hội chứng tăng áp lực hộp sọ (nhức đầu, nôn và buồn nôn, giảm thị lực).
- Các hội chứng thần kinh khu trú (liệt nửa người, rối loạn trí nhớ, rối loạn cảm giác, rối loạn tâm thần, tổn thương dây thần kinh sọ não) [2].
- Động kinh.

#### ***1.1.3.2. Chẩn đoán cận lâm sàng***

Chụp cắt lớp vi tính và cộng hưởng từ là 2 xét nghiệm quan trọng.

Hình ảnh chụp cắt lớp vi tính cho phép xác định được vị trí, kích thước của tổ chức khối u.



Chụp cộng hưởng từ (IRM): định vị được vị trí của u, đánh giá sự tương quan 3 chiều của thương tổn với tổ chức lân cận.

Điện não đồ và soi đáy mắt cũng được sử dụng.

Hình thái mô bệnh học cho phép xác định chính xác các tế bào của u (WHO 2007) (tiêu chuẩn vàng cho chẩn đoán UNBTKĐ).

Xét nghiệm phân tử: xác định các loại đột biến khác nhau trên các gen, các thể của bệnh (nguyên phát - thứ phát).

#### **1.1.4. Điều trị**

Việc điều trị UNBTKĐ vẫn còn khó khăn vì không có phương pháp điều trị hiện đại nào chữa được bệnh. Mặc dù tỷ lệ tử vong chung vẫn rất cao, nhưng những nghiên cứu gần đây dẫn đến sự hiểu biết về cơ chế phân tử và đột biến gen kết hợp với các thử nghiệm lâm sàng đang dẫn tới các phương pháp trị liệu hứa hẹn và phù hợp hơn [18],[33],[34],[35]. Nhiều thách thức vẫn tồn tại, bao gồm sự không đồng nhất của khối u, vị trí khối u ở một vùng mà nó vượt ngoài khả năng kiểm soát, và sự tái phát nhanh của khối u [36].

Nguyên tắc điều trị tuân thủ: điều trị triệu chứng, phẫu thuật và điều trị dự phòng tái phát [3],[4],[5],[37].

##### **1.1.4.1. Điều trị triệu chứng**

Tùy thuộc vào triệu chứng của bệnh nhân để điều trị, có thể chống phù não, giảm đau, điều trị liệt, chống co giật, động kinh ...

##### **1.1.4.2. Điều trị phẫu thuật**

Phẫu thuật lấy u là phương pháp điều trị quan trọng nhất, với mục đích loại bỏ tối đa toàn bộ u. Điều trị phẫu thuật triệt để u sẽ kéo dài cuộc sống cho bệnh nhân. Ngày nay nhờ chụp cắt lớp vi tính, hình ảnh cộng hưởng từ đã cho biết chắc chắn vị trí khối u và liên quan tổ chức xung quanh, và nhờ kính vi phẫu, hệ thống phẫu thuật thần kinh có hình ảnh đường dẫn, người ta có thể lấy bỏ khối u một cách triệt để hơn, ít gây ra tổn thương tổ chức não lành nhất. Song mặc dù trang thiết bị hiện đại, kỹ thuật tiên tiến trong mổ u kể cả ở

những nước phát triển, việc lấy bỏ triệt để khối u không phải lúc nào cũng làm được. Nó còn tùy thuộc vào vị trí khối u ở nông hay ở sâu, u có giới hạn hay không có giới hạn, u phát triển chậm hay ác tính xâm lấn quá nhanh [38].

#### ***1.1.4.3. Điều trị dự phòng tái phát***

Do khối u nguyên bào thần kinh đệm có thể xâm lấn và di căn sang các vùng lân cận tại não, nên việc phẫu thuật lấy khối u không được hoàn toàn; do vậy sau phẫu thuật u thường hay tái phát. Để giảm khả năng tái phát khối u, lâm sàng thường sử dụng phương pháp xạ trị hoặc phối hợp xạ trị và hóa chất, cách điều trị này đã có hiệu quả khá tốt.

##### ***\* Xạ trị***

Xạ trị là phương pháp điều trị nhằm tiêu diệt những tế bào u, hạn chế sự phát triển của u [2].

Chỉ định: sau phẫu thuật cắt bỏ u, để hạn chế sự tái phát của u, hoặc sử dụng cho những trường hợp không có chỉ định phẫu thuật;

Có thể sử dụng tia X để chiếu xạ, hiện nay thường sử dụng xạ trị bằng máy gia tốc, liều thấp 1,8-2,0 Gy/ngày x 5 ngày/tuần, tổng liều 6000 cGy.

Có thể sử dụng dao gama phẫu thuật lấy u, hoặc sử dụng phương pháp quang động học chiếu tia ánh sáng cao vào vùng u có thuốc nhạy quang sau mổ lấy u.

Sự đáp ứng của UNBTKĐ đối với xạ trị khác nhau. Trong nhiều trường hợp, xạ trị có thể gây ra một giai đoạn thuyên giảm, thường được đánh dấu bằng sự ổn định cũng như sự giảm sút về kích thước của khối u, nhưng bất kỳ thời kỳ phản ứng nào cũng có thời gian ngắn vì khối u thường tái phát trong vòng 1 năm, dẫn đến tình trạng lâm sàng xấu đi.

##### ***\* Hoá trị liệu - Các chất chống ung thư***

Mặc dù hiện nay chưa có phương pháp trị liệu hóa học tối ưu cho bệnh UNBTKĐ, nhưng một số nghiên cứu đã cho thấy hơn 25% bệnh nhân có

được lợi ích sống còn đáng kể từ hóa trị liệu hỗ trợ. Các phân tích cho thấy kết quả điều trị hóa trị liệu hỗ trợ cho tỷ lệ sống sót tăng lên 6-10% [39]. Tuy vậy các độc tính phải được tính đến. Các hóa chất thường sử dụng với mục đích là giảm sự nhân lên của các tế bào khối u, giảm cung cấp máu đến nuôi khối u [40]. Hiện nay thường sử dụng một số hóa chất điều trị như sau:

**Temozolomide** là một chất kháng alkyl hoạt động, được sử dụng cho những người mới được chẩn đoán mắc bệnh UNBTKĐ, hoặc điều trị chống tái phát sau phẫu thuật cắt bỏ khối UNBTKĐ. Thuốc được phê duyệt vào tháng 3 năm 2005, thuốc được dung nạp tốt và mang lại lợi ích cho sự sống còn của người bệnh.

Liều dùng: 7,5mg/m<sup>2</sup>/ngày x 6 tuần, duy trì 150mg/m<sup>2</sup> x 5 ngày/1 tháng x 6 tháng.

#### **Carmustine (BCNU)**

Màng polyme phân hủy sinh học được tẩm hóa chất Carmustine, đã được khuyến cáo sử dụng như là một phụ trợ phẫu thuật khi được chỉ định phẫu thuật; Carmustine (BCNU) thuộc nhóm thuốc kháng alkyl hóa. Cách sử dụng: cấy dưới da (đặt trong khoang cắt bỏ u), màng cấy 7,7mg x 8 màng.

#### **Bevacizumab**

Thuốc kháng thể nhân tạo Ig1, truyền tĩnh mạch 10mg/2 tuần 1 lần, tác dụng giảm cung cấp máu đến khối u [35],[40].

Lưu ý là các loại hóa chất điều trị thường có độc tính, có tác dụng khác nhau trên mỗi bệnh nhân, do vậy tùy đặc điểm của bệnh nhân mà sử dụng cho thích hợp...

#### **1.1.4.4. Điều trị đích**

Sự phát triển của ngành sinh học phân tử bước đầu sử dụng phương pháp can thiệp sinh học, dựa vào cơ chế sinh học ung thư trong các u não, các nhà khoa học tiến hành các thử nghiệm can thiệp vào các hoạt động của gen

sinh ung thư, gen đè nén ung thư tham gia vào quá trình ức chế sự sinh sản của các tế bào u. Có thể sử dụng các chất ức chế thần kinh, kháng thể đơn dòng, vắc-xin... Điều trị được cho là thành công đòi hỏi thuốc phải thâm nhập và qua được rào cản máu não để đến được tế bào u và có độc tính thấp nhưng có tính chọn lọc cao đối với khối u.

Gần đây, một số các nghiên cứu đã dựa vào hoạt động của các thụ thể xuyên màng như EGFR, FGFR trong bệnh UNBTKĐ, và cơ chế sinh bệnh của đột biến các gen EGFR, FGFR, để thử nghiệm sử dụng các chất ức chế các hoạt động này, mục đích làm giảm quá trình hoạt động quá mức của các thụ thể khi gen mã hóa các thụ thể bị đột biến. Liệu pháp này tỏ ra nhiều hứa hẹn trong việc làm thay đổi bệnh cảnh và tiên lượng các u thần kinh đệm, tuy nhiên phương pháp này vẫn còn đang trong giai đoạn nghiên cứu [4], [37],[41],[42].

Tóm lại, điều trị các u não ác tính như UNBTKĐ tuân thủ nguyên tắc: khi phẫu thuật cố gắng lấy bỏ tối đa khối lượng của u, kèm theo điều trị phối hợp phóng xạ và hoá chất để đạt hiệu quả cao hơn [37],[43].

### ***1.1.5. Dự phòng***

Hiện chưa có biện pháp dự phòng hiệu quả để phát hiện sớm UNBTKĐ cũng như u não nói chung. Chủ yếu phát hiện sớm các triệu chứng gợi ý của bệnh ở vùng sọ não: nhức đầu kéo dài, cảm giác ngủ gà ngủ gật, các rối loạn về tâm thần...và nhiều trường hợp ở thể còn không có triệu chứng.

## **1.2. Nguyên nhân và cơ chế sinh bệnh u nguyên bào thần kinh đệm**

### ***1.2.1. Nguyên nhân gây bệnh***

Ngày nay người ta biết rõ, ung thư không phải do một nguyên nhân sinh ra. Tùy mỗi loại ung thư mà có nguyên nhân riêng biệt. Một tác nhân sinh ung thư có thể gây một số loại ung thư và ngược lại một loại ung thư có

thể do một số tác nhân khác nhau. Có ba nhóm tác nhân chính gây ung thư là vật lý, hóa học và sinh học [5].

Trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm, nhiều nguyên nhân chưa rõ ràng, người ta thấy UNBTKĐ hay gặp ở nam giới, phần lớn bệnh xảy ra ngẫu nhiên không có tính chất gia đình. Không có mối liên quan giữa UNBTKĐ với hút thuốc, chế độ ăn hay phơi nhiễm điện từ, có liên quan đến tình trạng nghiện rượu, nhiễm virus SV40 và cytomegalovirus, nhiễm phóng xạ, nhiễm polyvinyl chlorid - một chất hay sử dụng trong xây dựng...

***Một số yếu tố nguy cơ:***

Tuổi: trên 50 tuổi

Chủng tộc: người da trắng và châu Á

Gia đình: một số gen đột biến có nguy cơ gây UNBTKĐ hoặc một số bệnh lý rối loạn hệ thống gen.

Yếu tố kinh tế xã hội có thể là yếu tố nguy cơ của UNTKĐ và liên quan đến sự sống sót đã được đề cập đến qua nghiên cứu của Maya A [44].

***1.2.2. Cơ chế sinh bệnh trong u nguyên bào thần kinh đệm***

Cơ chế sinh bệnh ung thư được nhắc đến đầu tiên là cơ chế gen: ung thư thường do một loạt các đột biến gây ra, mỗi đột biến sẽ thay đổi đặc tính của khối u theo cách nào đó. Sinh ung thư là quá trình rối loạn tốc độ phân chia tế bào do tổn thương DNA.

Các tác nhân vật lý, hóa học, sinh học... từ môi trường bên ngoài hoặc các rối loạn chuyển hóa trong cơ thể, tác động trực tiếp vào nhân tế bào trong đó có gen chứa thông tin di truyền, gây đột biến các mã thông tin trên gen, làm thay đổi loại acid amin trên phân tử protein do gen quy định, làm rối loạn quá trình sinh sản tế bào, tế bào tăng sinh, không ngừng phân chia dẫn đến hình thành khối u [5],[41].

Thông thường, một tế bào bình thường để chuyển dạng sang tế bào ung thư phải trải qua một vài đột biến ở một số gen nhất định. Quá trình này liên quan đến hệ thống gen sinh ung thư và gen kháng ung thư. Hai gen này bình thường trong tế bào đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát quá trình sinh sản tế bào, sự biệt hóa tế bào và quá trình chết theo chương trình của tế bào, giúp cho ổn định sinh học của cơ thể. Gen sinh ung thư kiểm soát theo hướng tích cực, mã hóa protein truyền những tín hiệu phân bào. Khi các gen này bị đột biến sẽ truyền tín hiệu phân bào sai lạc mà cơ thể không kiểm soát được dẫn đến sinh ung thư, (EGFR, FGFR, IDH...). Các gen kháng ung thư trái lại mã hóa cho những protein kiểm soát phân bào theo hướng ức chế, làm chu kỳ phân bào dừng ở một pha, thường ở pha G<sub>1</sub>; các gen kháng ung thư còn có chức năng làm biệt hóa tế bào, hoặc mã hóa tế bào chết theo chương trình, (ví dụ gen TP53, PTEN...). Khi các gen kháng ung thư bị bất hoạt do đột biến sẽ làm biến đổi tế bào lành thành ác tính [5].

Các nghiên cứu đã chỉ ra bệnh UNBTKĐ có liên quan đến nhiều gen: gen áp chế khối u như gen TP53, PTEN, gen tiền sinh ung thư như: EGFR, FGFR, IDH, MGMT, ATRX, TERT, hoặc xóa 1p/19q, mất nhiễm sắc thể 10 [4],[45], nhưng thường đi sâu nghiên cứu đột biến một số gen như gen TP53, EGFR, FGFR ... liên quan đến bệnh sinh, phân loại và đáp ứng điều trị của bệnh UNBTKĐ, trong đó đột biến gen EGFR, FGFR đã được chứng minh đóng vai trò quan trọng trong định hướng nghiên cứu điều trị đích của bệnh u nguyên bào thần kinh đệm [6],[7],[46].

### ***1.2.2.1. Cơ chế phân tử của gen TP53 trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm.***

#### ***\* Vị trí và cấu trúc của gen TP53***

Gen TP53 nằm trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể 17 (17p13.1), dài 20kb với exon 1 không mã hóa và intron 1 dài tới 10kb [47],[48]. Gen TP53 mã hóa cho protein p53 trọng lượng phân tử 53kDa, gồm 393 acid amin với 3 vùng chức năng [49]:

*Vùng hoạt hóa N tận bao gồm*

*Vùng C tận bao gồm*

*Vùng điều hòa*

### **\* Chức năng của gen TP53**

TP53 là gen áp chế khối u, có vai trò quan trọng trong kiểm soát chu kỳ tế bào và chết theo chương trình thông qua hoạt động của protein p53.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, p53 có vai trò quan trọng trong phòng chống ung thư thông qua một số cơ chế:

- Hoạt hóa các protein có vai trò sửa chữa DNA khi DNA bị sai hỏng.
- Ngăn cản sự phân chia tế bào chứa DNA bị sai hỏng ở pha G1/S, tạo điều kiện cho các protein sửa chữa DNA có thời gian hoạt động, sau đó tế bào có thể tiếp tục thực hiện tiếp chu kỳ phân chia.
- Khởi động chu trình chết tế bào, nếu tổn thương DNA không sửa chữa được.

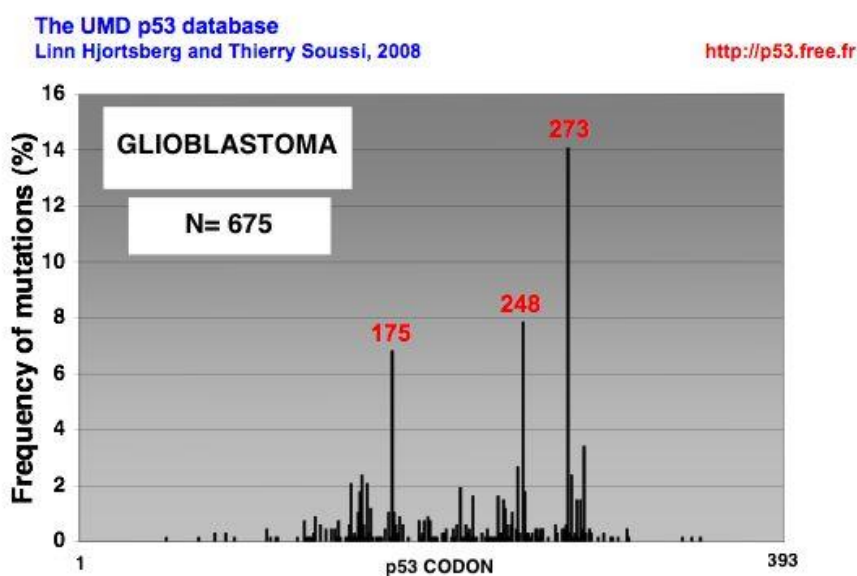
TP53 có vai trò quan trọng trong việc duy trì ổn định bộ gen của tế bào [50].

### **\* Đột biến gen TP53 sinh bệnh u nguyên bào thần kinh đệm**

Khi gen TP53 bị đột biến, tế bào tổn thương DNA không được sửa chữa và nhân lên không giới hạn, là cơ sở hình thành khối u.

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 hoặc mất gen TP53 được tìm thấy ở hơn 50% bệnh nhân ung thư trên toàn thế giới. Các nghiên cứu đã chứng minh: ở bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm, đột biến gen TP53 có tỷ lệ khá cao [4],[51], khoảng 81% gặp ở thể thứ phát và 27% ở thể nguyên phát [3]. 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

[52],[53],[54],[55]. 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 [54]. 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) [12]. 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. Chính vì vậy việc xác định đột biến gen TP53 được xem như là một dấu ấn quan trọng đánh giá tiên lượng trong điều trị đối với bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm. Đột biến gen TP53 trong u nguyên bào thần kinh đệm hầu hết là các đột biến điểm nằm rải rác trên toàn bộ chiều dài gen TP53 nhưng tập trung chủ yếu ở các exon từ exon 5 đến exon 9. Trong đó đột biến gặp nhiều trên exon 7 và exon 8 [52],[53], do đó trong khuôn khổ của đề tài nghiên cứu, chúng tôi tập trung xác định đột biến trên hai exon 7, 8 này.



**Hình 1.3. Hình ảnh minh họa sự phân bố và tần suất đột biến gen TP53 trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm.**

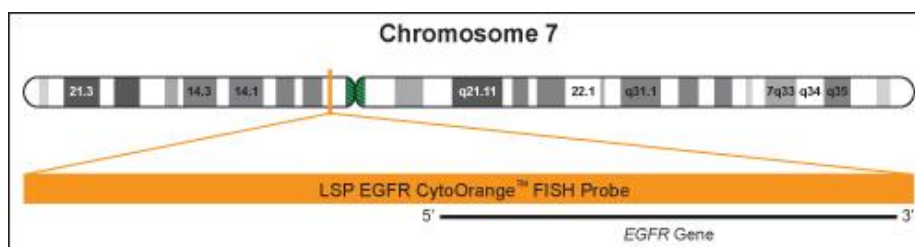
Nguồn: Linn Hjortsberg and Thierry Soussi, 2008; <http://p53.free.fr> [56]



### 1.2.2.2. Cơ chế sinh ung thư của gen *EGFR* và liên quan đến tiên lượng, đáp ứng điều trị trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm.

#### \* Cấu trúc, chức năng của gen *EGFR*

Gen *EGFR* nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 7 mã hóa cho thụ thể *EGFR*, là một loại thụ thể liên kết trên bề mặt tế bào trong nhóm các yếu tố phát triển thần kinh - bì. Gen *EGFR* nằm tại vị trí 7p12, có kích thước khoảng 237 kb, có 28 exon, mã hóa cho 1210 acid amin với trọng lượng phân tử 134 kDa.



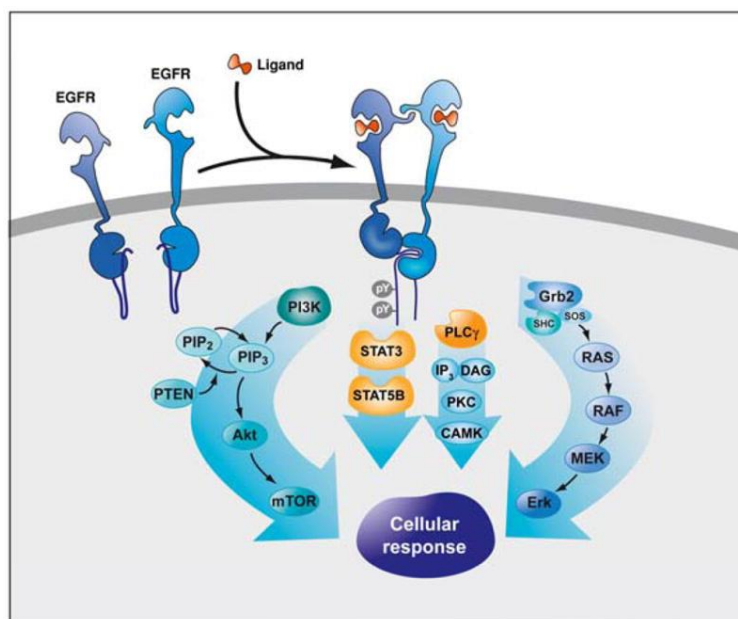
**Hình 1.4. Vị trí gen *EGFR* trên NST số 7**

Nguồn: <http://genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EGFR>

Thụ thể *EGFR* gồm 4 loại HER-1/*ErbB1*, HER-2/*neu/ErbB2*, HER-3/*ErbB3*, và HER-4/*ErbB4*. Các protein này có vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh các quá trình sinh trưởng phát triển trao đổi chất và quá trình sinh lý của tế bào [57],[58].

Protein *EGFR* mang hoạt tính tyrosine kinase là khởi nguồn của con đường tín hiệu tyrosin kinase trong tế bào. Phân tử *EGFR* gồm một vùng gắn kết các phối tử nằm ngoài màng tế bào của *EGFR* có trọng lượng khoảng 100kDa, có hai vùng gắn cystein là nơi để gắn kết các phối tử của *EGFR*. Vùng xuyên màng trọng lượng nhỏ chỉ khoảng 3 kDa, tập trung tại vùng phân cực phospholipid màng. Phần trong tế bào trọng lượng khoảng 60kDa là protein kinase với đuôi tận cùng carboxyl nơi xảy ra phản ứng tự phosphoryl hóa của *EGFR*.

Hoạt động của EGFR kích thích nhiều con đường tín hiệu nội bào phức tạp, vốn được điều hòa chặt chẽ bởi sự hiện diện của các phối tử đặc hiệu. Hai con đường tín hiệu chính được kích hoạt bởi EGFR là RAS/RAF/MEK/ERK và PI3K/AKT, ngoài ra còn có Src kinase, PLC, PKC và STAT [59],[60],[61].



**Hình 1.5. Các cơ chế kích hoạt và các đường dẫn tín hiệu do EGFR thực hiện**

Nguồn <https://www.google.com.vn/search?q=EGFR&source=lnms&tbm>

Ngay khi được hoạt hóa, vùng nội bào của EGFR sẽ tự phosphoryl hóa, khởi động dòng tín hiệu lan tỏa khắp các tế bào gây kích hoạt sự tăng trưởng mạch máu, di căn và ức chế quá trình chết theo chương trình, kích thích phân bào và các con đường dẫn truyền tín hiệu phiên mã [10],[58].

**\* Cơ chế sinh bệnh phân tử của gen EGFR trong u nguyên bào thần kinh đệm**

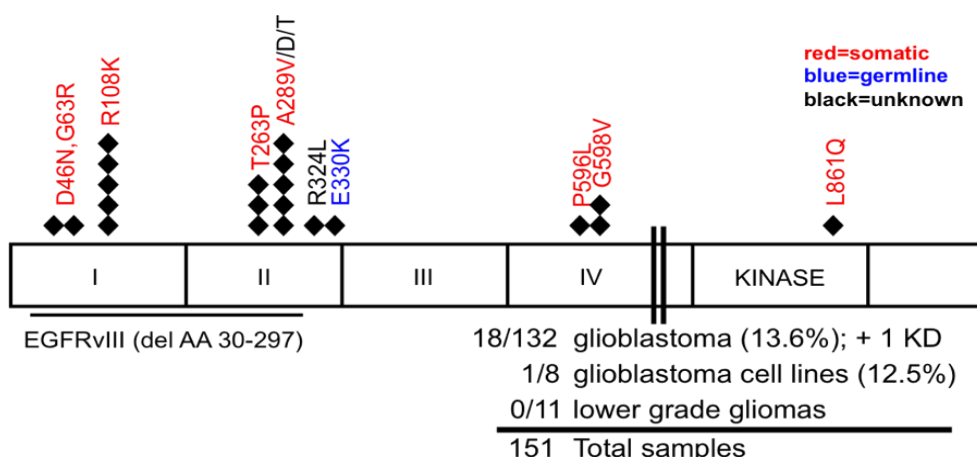
Trong tế bào bình thường, sự hoạt hóa của EGFR cần thiết cho nhiều chức năng quan trọng của tế bào như quá trình tăng sinh và biệt hóa tế bào. Tuy nhiên, sự hoạt hóa EGFR quá mức không phụ thuộc vào sự hiện diện của phối tử có thể dẫn đến sự tăng sinh bất thường cũng như di chuyển dạng ác tính của tế bào. Có nhiều cơ chế dẫn đến sự hoạt động bất thường của EGFR như sự

biểu hiện quá mức của thụ thể, sự khuếch đại của gen EGFR hoặc đột biến gen EGFR. Do giữ vị trí khởi nguồn của con đường tín hiệu tyrosinase kinase trong các tế bào có nguồn gốc biểu mô nên EGFR đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của một số bệnh ung thư như ung thư biểu mô tế bào vảy đầu cổ, ung thư phổi không tế bào nhỏ, ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư tụy, u nguyên bào thần kinh đệm. Với vai trò quan trọng, EGFR trở thành đích cho các thể thuốc điều trị mới [10],[15],[62].

Trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm tỉ lệ đột biến gen EGFR khá cao, chiếm khoảng 40-50% số trường hợp. Đột biến gây mất kiểm soát gen EGFR thường xảy ra với bệnh nhân mang khối u nguyên phát. Các dạng đột biến này ảnh hưởng chủ yếu đến hoạt động vùng ngoại bào của phân tử EGFR, nơi xảy ra tương tác với các phối tử. Có nhiều dạng đột biến EGFR nhưng đột biến phổ biến nhất là EGFRvIII, liên quan đến bệnh sinh UNBTKĐ, là đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 tương ứng với nucleotide từ vị trí 275 đến 1075 (801 bp) trên cDNA và acid amin 6 đến 273 trên protein và đột biến điểm ở các exon này [62],[63],[64]. Theo nghiên cứu của Shinojima Naoki và các cộng sự ở đại học Y Kumamoto tỉ lệ đột biến EGFR ở bệnh nhân UNBTKĐ là 46% trong số đó tỉ lệ đột biến EGFRvIII là 45% [65]. Hay theo nghiên cứu của Youngmin Choi công bố có 43,8% bệnh nhân UNBTKĐ có đột biến dạng EGFRvIII [66]. Đột biến dạng EGFRvIII gắn với sự khuếch đại EGFR, các biểu hiện quá mức của EGFRvIII đóng một vai trò quan trọng trong hình thành khối u ung thư, và đáp ứng với liệu pháp kháng thể cũng như tiên lượng xấu...[65].

Bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ gen EGFR của bệnh nhân UNBTKĐ, các nghiên cứu đã xác định được các đột biến của EGFR nằm trong các lĩnh vực liên kết ngoại bào (I, III) hoặc vùng giàu cysteine (II, IV) của thụ thể EGFR [62],[63]. Các kiểu đột biến điểm đã phát hiện là: kiểu đột

biến R108K, T263P, E330K, A289D, A289T, và R324L được tìm thấy trong khối u mà không có trong mô bình thường, trong vùng ngoại bào của EGFR. Vùng nội bào của EGFR rất hiếm gặp đột biến, ví dụ đột biến L861Q là thường gặp trong ung thư phổi, nhưng chỉ có một mẫu khối u chứa một biến thể sai nghĩa trong lĩnh vực kinase EGFR trong nghiên cứu đã công bố trên 132 bệnh nhân UNBTKĐ. Tỷ lệ đột biến điểm trên gen EGFR gặp khoảng 14,4%; trong đó đột biến trên 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% [62]. Như vậy trong số các đột biến điểm thì đột biến trên exon 7 của gen EGFR gặp nhiều nhất (5,3%); exon 3 gen EGFR có tỉ lệ gặp cao thứ hai sau exon 7, cao hơn so với các exon khác.

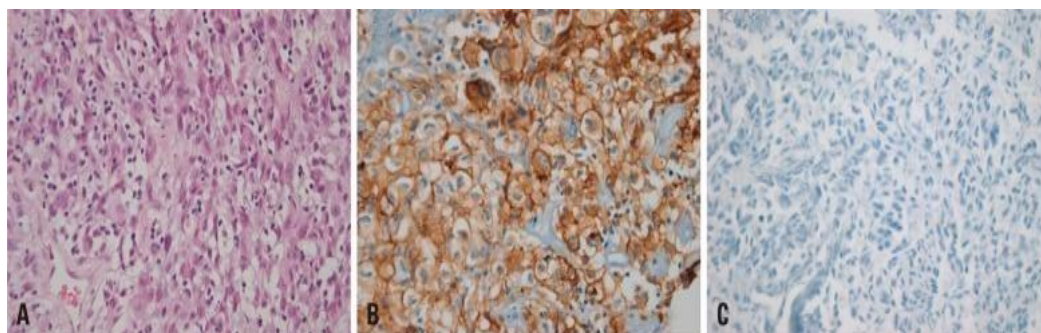


**Hình 1.6. Vị trí đột biến gen EGFR trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm**

Nguồn: Jeffrey C Lee và cộng sự (2006) [62].

**- Đột biến gen EGFR sinh khối u nguyên bào thần kinh đệm**

Các nghiên cứu ghi nhận khi có đột biến gen EGFR sẽ thấy hiện tượng khuếch đại protein tương ứng ở mô; có sự tương quan chặt chẽ giữa sự nhân lên của gen EGFR và EGFR quá mức ( $p < 0,0001$ ); 58,8% trường hợp có sự đột biến về đặc điểm của gen EGFR, đều thấy có bằng chứng của khuếch đại protein EGFR, được phát hiện bằng nhuộm hóa mô miễn dịch trên mô các khối u [62], đặc biệt dạng đột biến EGFRvIII gắn với sự khuếch đại EGFR [10], [60],[67].



**Hình 1.7. Ảnh nhuộm miễn dịch học của EGFR trong mô UNBTKĐ [62]**

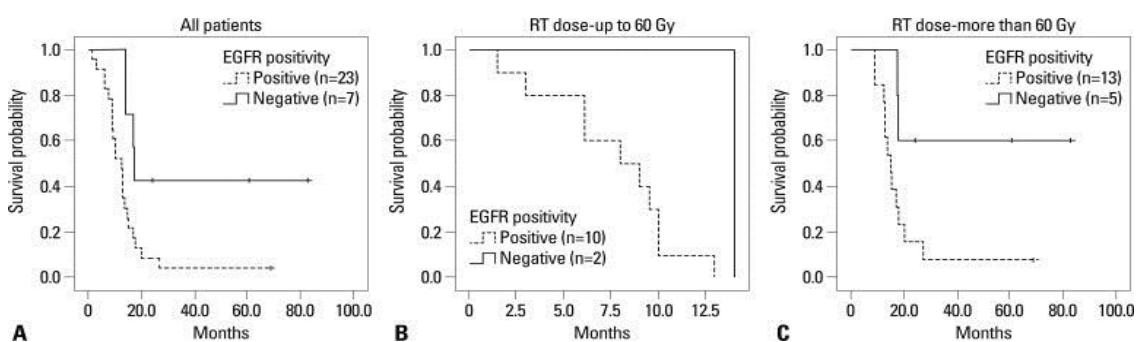
Các tế bào khối u của UNBTKĐ có các hạt nhân không đều và các tế bào chất dồi dào trong quá trình nhuộm HE (A), và có kết quả dương tính với EGFR (B). Các tế bào khối u âm tính đối với EGFR (C).

Các đột biến R108K, T263P, A289V của protein EGFR do các đột biến điểm tương ứng trên gen EGFR tạo ra, được chứng minh là nguyên nhân sinh khối UNBTKĐ qua thử nghiệm trên chuột, những con chuột được tiêm các tế bào chứa kiểu đột biến R108K, T263P, A289V; sau tiêm, các khối u lớn đã xuất hiện tại vị trí tiêm trên tất cả các con chuột trong vòng ba đến bốn tuần [62].

*Đột biến gen EGFR liên quan đến tiên lượng và đáp ứng điều trị*

Ở người bệnh UNBTKĐ, gen EGFR có giá trị tiên lượng quan trọng để dự đoán sự sống còn, sự nhân lên quá mức của các gen EGFR đột biến hoặc các biến thể EGFRvIII sẽ bất lợi cho sự sống còn tổng thể, nhất là ở bệnh nhân trẻ tuổi.

Đột biến gen gây biểu hiện khuếch đại EGFR và ảnh hưởng đến sự sống còn của người bệnh UNBTKĐ sau phẫu thuật và tiếp nhận xạ trị được chứng minh qua nghiên cứu: sự sống sót trong số người bệnh UNBTKĐ có biểu hiện khuếch đại EGFR thấp hơn đáng kể so với những người bệnh không biểu hiện (tỷ lệ sống trung vị là 12,5 so với 17,5 tháng,  $p = 0,013$ ). Người bệnh nhận được liều xạ trị (RT) trên 60 Gy cho thấy sự sống còn được cải thiện so với những người nhận được liều dưới 60 Gy (trung vị sống sót: 17,0 so với 9,0 tháng,  $p = 0,000$ ) [66].



**Hình 1.8. Thời gian sống còn của người bệnh UNBTKĐ**

(A) có biểu hiện khuếch đại EGFR, (B) nhận được liều xạ trị dưới 60 Gy, (C) nhận được liều xạ trị trên 60 Gy [66]

Giá trị tiên lượng của yếu tố tăng trưởng biểu bì Factor Receptor ở bệnh UNBTKĐ được ghi nhận qua phân tích mối quan hệ giữa kết quả điều trị và gen EGFR ở người bệnh mới được chẩn đoán. Tình trạng gen EGFR được đánh giá bởi điện hóa phát quang và biểu hiện EGFR bởi mô miễn dịch bằng cách sử dụng ba kháng thể đơn dòng (EGFR.25 cho EGFR, EGFR.113 cho EGFRwt, và DH8.3 cho EGFRvIII); kết quả đã phát hiện có 40 người (46%) bị đột biến xóa đoạn EGFR trong 87 người bệnh UNBTKĐ; có sự tương quan chặt chẽ giữa sự nhân lên của gen EGFR và EGFR quá mức ( $p < 0,0001$ ). Phân tích đa biến cho thấy nhân lên của EGFR là độc lập, dự báo bất lợi cho sự sống còn tổng thể (OS) trong tất cả các bệnh nhân. Về mối quan hệ với tuổi, tình trạng gen EGFR là một dự đoán đáng kể ở những bệnh nhân trẻ tuổi, đặc biệt là ở những người  $< 60$  tuổi. Phát hiện này cho thấy rằng quá mức EGFRvIII trong sự hiện diện của nhân lên EGFR là chỉ số mạnh nhất của một tiên lượng sống còn [65].

Đột biến gen EGFR ảnh hưởng đến kết quả điều trị UNBTKĐ đã được ghi nhận: người bệnh UNBTKĐ được điều trị phẫu thuật cắt bỏ khối u, sau đó xạ trị, kết hợp TMZ hỗ trợ sau phẫu thuật. Kết quả: người bệnh UNBTKĐ có đột biến dạng EGFRvIII, tỷ lệ sống sót dài hơn 2,59 lần so với người không có đột biến dạng này với  $p = 0,0023$  (OR = 2,59// 95% CI = 1,40 - 4,79) [64].

Huang PH et al. (Mỹ 2007): phân tích định lượng EGFRvIII một chiến lược điều trị tổ hợp cho bệnh UNBTKĐ qua sự hoạt hóa của c-Met thụ thể tyrosine kinase bởi EGFRvIII: để xác định ý nghĩa của phát hiện này, nghiên cứu đã phát minh ra một phương pháp điều trị kết hợp được sử dụng một chất ức chế kinase c-Met và hoặc là một chất ức chế EGFR kinase hoặc thuốc cisplatin. Phác đồ này dẫn đến độc tế bào có sự thay đổi của gen EGFRvIII so với điều trị bằng hợp chất riêng lẻ. Những kết quả này gợi ý rằng việc sử dụng lâm sàng của các thuốc ức chế kinase c-Met khi phối hợp với thuốc ức chế EGFR hoặc liệu pháp hóa chất tiêu chuẩn có thể đại diện cho một phương pháp điều trị trước đây chưa được mô tả, để khắc phục sự kháng hóa chất quan sát thấy ở những bệnh nhân UNBTKĐ [68].

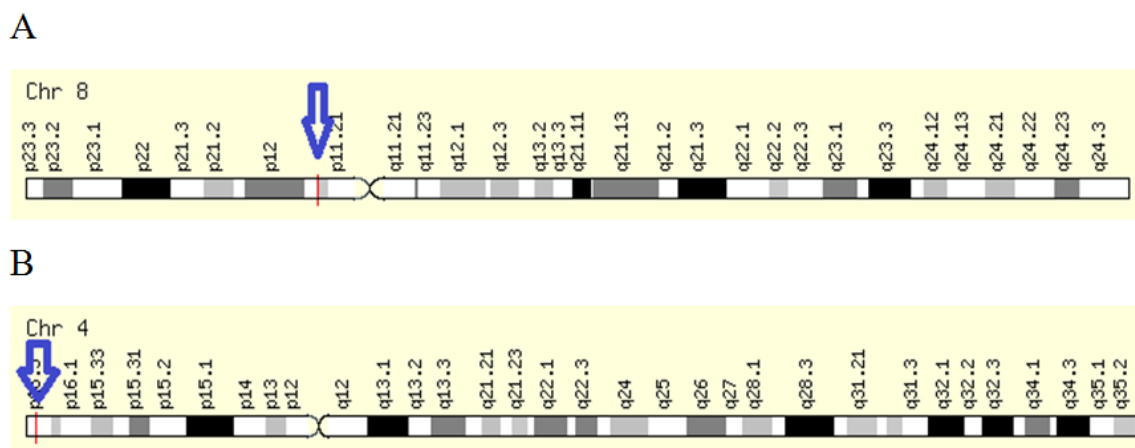
Vì tất cả các phân tích trên, nhóm nghiên cứu tiên hành xác định đột biến từ exon 2 đến exon 7 của gen EGFR.

### ***1.2.2.3. Cơ chế sinh ung thư của gen FGFR và liên quan đến tiên lượng, đáp ứng điều trị trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm.***

#### ***\* Vị trí cấu trúc, chức năng của gen FGFR***

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. Họ gen FGFR gồm bốn loại là FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4. Trong đó, gen FGFR1 nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 8, ở giữa vị trí p11.22 và p11.23, dài 57 kb bao gồm 24 exon và mã hóa cho protein chứa 822 acid amin. Gen FGFR3 nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 4, ở vị trí 4p16.3 dài 15kb bao gồm 19 exon, mã hóa cho protein chứa 806 acid amin. Gen FGFR1 và FGFR3 đều được xếp vào nhóm gen sinh ung thư [69].





**Hình 1.9. Vị trí của gen *FGFR1* trên NST (A)**

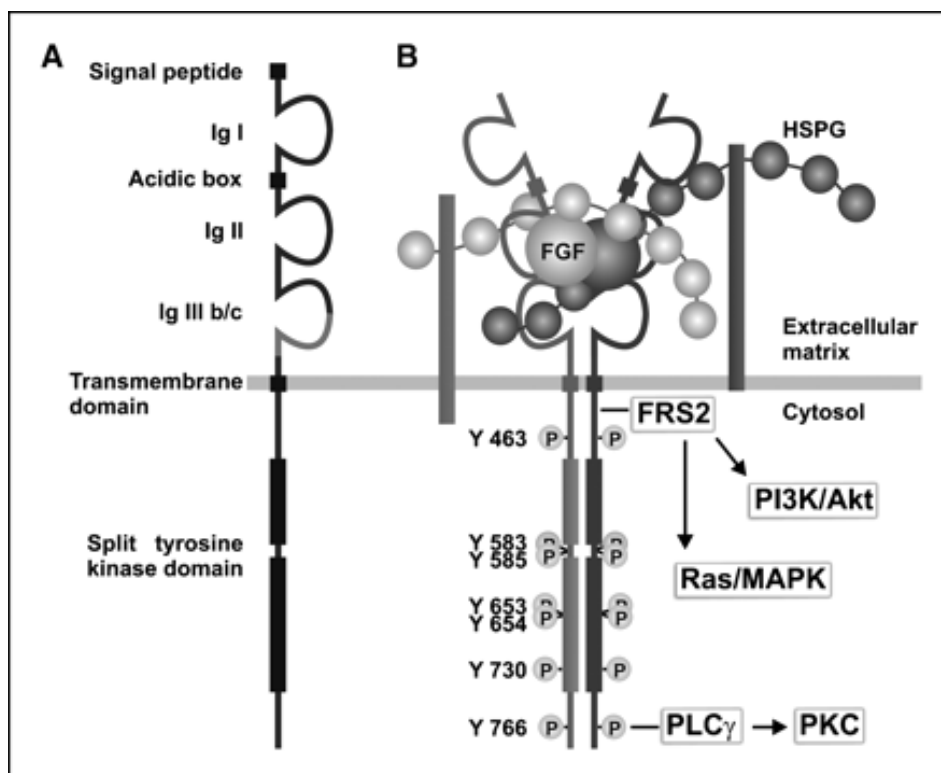
**Vị trí của gen *FGFR3* trên NST (B)**

(Nguồn: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGFR>)

Các protein FGFR đóng vai trò quan trọng trong suốt quá trình phát triển và trưởng thành của tế bào [70],[71]. Mỗi protein FGFR gồm một vùng ngoại bào, một vùng xuyên màng và một vùng nội bào. Vùng ngoại bào chứa 3 immunoglobulin - Ig cụ thể IgI, IgII và IgIII, có chức năng ức chế thụ động và sự bắt cặp của các phối tử. Vùng ngoại bào chứa yếu tố phát triển nguyên bào sợi FGF, FGF tiết ra glycoprotein làm ổn định sự tương tác lẫn nhau của phối tử với thụ thể FGF nhờ protease [69]. Phần trong tế bào là protein kinase với đuôi tận cùng carboxyl nơi xảy ra phản ứng tự phosphoryl hóa của FGFRs [72].

Ngay sau khi được hoạt hóa bằng cách gắn với phối tử của chúng, vùng nội bào của FGFRs sẽ tự phosphoryl hóa, khởi đầu một dòng tín hiệu lan tỏa khắp tế bào gây kích hoạt con đường PI3K/Akt, sự tăng sinh mạch máu, di căn và ức chế quá trình chết theo chương trình (apoptosis), tín hiệu Ras/mitogen-activated protein kinase, và các con đường dẫn truyền tín hiệu phiên mã [11],[61]. Do đó các đột biến làm rối loạn hoạt động của gen FGFRs đều làm thay đổi hoạt động sống của tế bào và là nguyên nhân cho sự hình thành và phát triển ung thư.



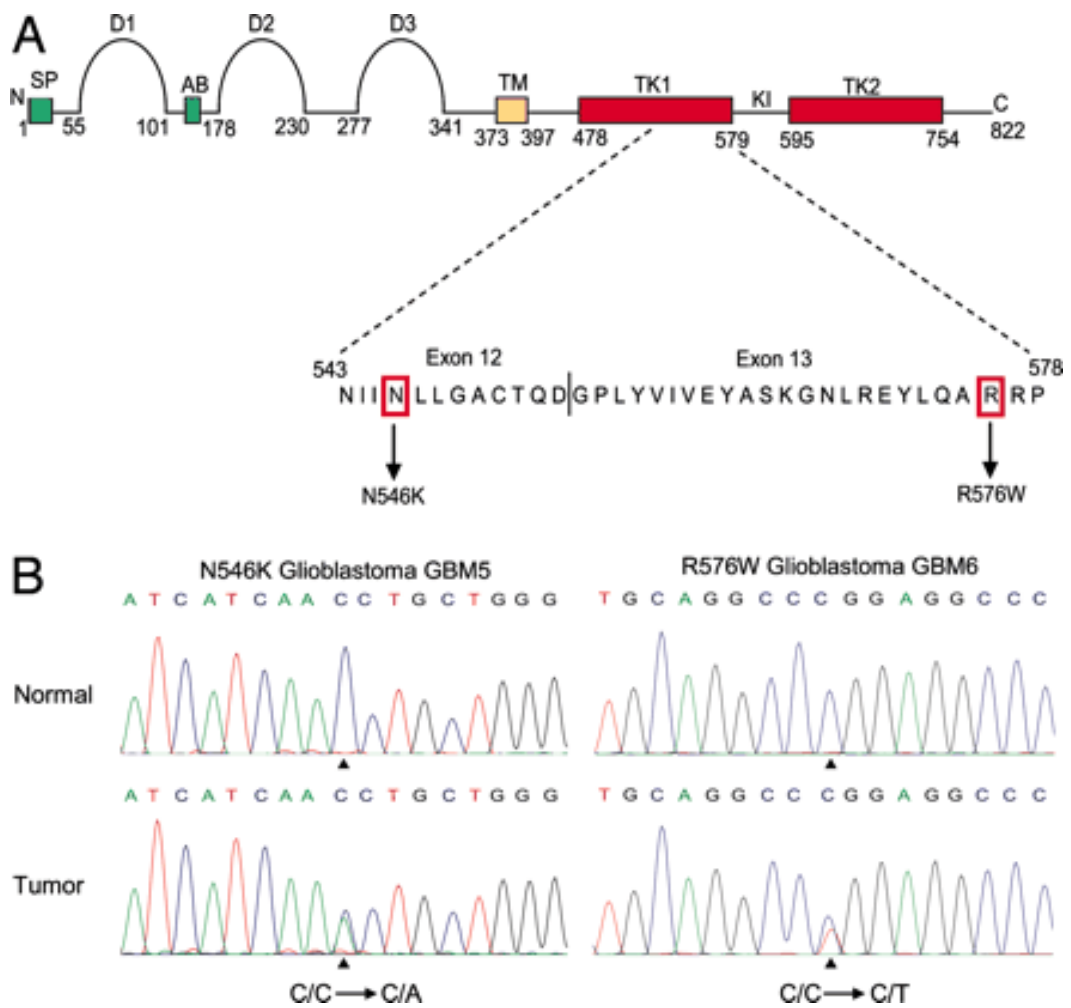


**Hình 1.10. Cấu trúc, vị trí hoạt động và con đường tín hiệu thông qua thụ thể yếu tố phát triển nguyên bào sợi FGFRs.**

*Nguồn: Haugsten et. al. Mol Cancer Res. 2010;11,1439-1452.*

**\* Đột biến gen FGFR sinh bệnh u nguyên bào thần kinh đệm**

Có nhiều cơ chế dẫn đến sự bất thường trong hoạt động của protein FGFR: như sự khuếch đại quá mức của gen FGFR, đột biến điểm, chuyển đoạn nhiễm sắc thể dẫn đến sự dung hợp gen... Khi có sự bất thường về gen FGFR thì các quá trình hoạt động của thụ thể FGFR bị mất kiểm soát, dẫn đến sự hình thành các khối u như ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư dạ dày... trong đó có u nguyên bào thần kinh đệm. Do gen FGFR đóng vai trò quan trọng trong cơ chế sinh ung thư nên gen FGFR trở thành đích nhắm tiềm năng cho các thể hệ thuốc điều trị mới ung thư [72],[73],[74]. Các dạng đột biến hay gặp trên gen FGFR trong bệnh UNBTKĐ là dạng đột biến điểm trên gen FGFR<sub>1</sub> tương ứng với sự thay đổi tại vị trí N546K và R576W trên phân tử protein và đột biến dung hợp gen FGFR<sub>3</sub>-TACC<sub>3</sub> [16],[75],[76].



**Hình 1.11. Hình ảnh đột biến gen FGFRs trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm.**

(A) Hình ảnh minh họa cấu trúc gen FGFRs và vùng phát hiện đột biến tại exon 12 và 13 trên vùng có hoạt tính tyrosine kinase. (B) Kết quả giải trình tự gen trực tiếp xác định đột biến N546K và R576W của gen FGFRs.

Nguồn: Rand et. al. PNAS. 2005;102,14344-14349.

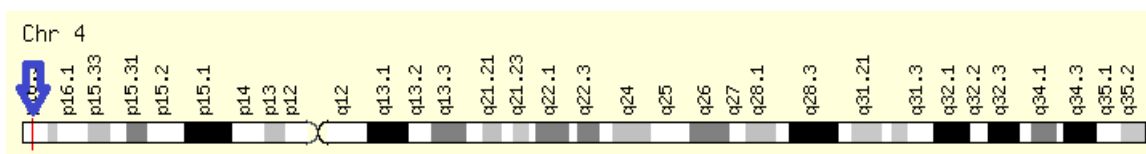
Hai đột biến N546K và R576W của thụ thể FGFR<sub>1</sub> đã tác động lên thành phần bên trong cấu trúc phân tử protein, làm thay đổi bề mặt tại vị trí đột biến trên phân tử protein FGFR<sub>1</sub> do gen FGFR<sub>1</sub> mã hóa, gây sự tự phosphoryl hóa và sinh rối loạn chuyển hóa tế bào, từ đó sinh khối u, điều này đã được phát hiện trong nghiên cứu của Rand [16].

Để tìm các mục tiêu phân tử, nghiên cứu đã giải trình tự mã hóa các exon cho các miền kinase của gen tyrosine kinase receptor (RTK) trong các tế bào nguyên bào thần kinh đệm của con người, xác định các thay đổi có nguồn gốc tự nhiên, không được bảo quản trong hai loại RTK, thụ thể tăng trưởng nguyên bào sợi 1 (FGFR<sub>1</sub>) và thụ thể yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu (PDGFRA). Hai đột biến N546K và R576W đã được xác định trong gen FGFR<sub>1</sub> của người UNBTKĐ trong nghiên cứu. Để hiểu được tác động của hai đột biến trong miền kinase của FGFR<sub>1</sub>, nghiên cứu đã phân tích thành phần chuỗi bên trong các đoạn bị biến đổi trong cấu trúc protein, xác định dư lượng acid - base trong vùng đột biến FGFR1. So sánh các cấu trúc của FGFR<sub>1</sub> hoang dại và cấu trúc hai đột biến đã cho thấy sự thay đổi trên bề mặt vùng đột biến, có sự giảm đáng kể điện tích dương, tính chất cơ bản trên bề mặt của đột biến R576W ở vùng bị ảnh hưởng bởi đột biến này. Cấu trúc tinh thể của FGFR1 cho thấy rằng chuỗi bên của N546 được liên kết hydro với chuỗi chính của H541. Do đó, khi N546K thay thế đạt được chức năng, thì các tương tác N546 quan sát thấy trong cấu trúc tinh thể FGFR<sub>1</sub> là ức chế, và sự gián đoạn của liên kết này đã được dự đoán ổn định cấu hình hoạt động của thụ thể. Như vậy sự đột biến tại các vị trí N546K và R576W đã làm thay đổi bề mặt của phân tử protein do gen FGFR mã hóa, và có thể là nguyên nhân gây sự tự phosphoryl hóa và sinh rối loạn chuyển hóa tế bào [16].

Nghiên cứu của Rand gồm 19 bệnh nhân, trong đó có tám nữ và 11 nam giới, với độ tuổi từ 7 đến 77 tuổi, mặc dù tần suất các đột biến FGFR<sub>1</sub> trong ung thư không thể xác định được từ phân tích này, điều thú vị là trong một lượng khối UNBTKĐ tương đối nhỏ, tác giả đã xác định được hai đột biến FGFR<sub>1</sub> và sự thay đổi cấu trúc phân tử protein tương ứng. Điều quan trọng là phải mở rộng nghiên cứu này tới bảng biểu khối u và các loại ung thư khác. Hơn nữa, một phân tích rộng hơn về họ gen RTK (receptor tyrosine kinase (RTK)) sẽ cho thấy các đặc tính của các giao diện sinh học trong họ gen này và trong các con đường truyền tín hiệu. Thách thức lớn hơn đối với công nghệ

di truyền, là xây dựng cơ sở dữ liệu toàn diện về thay đổi gây ra ung thư và kết hợp kiến thức này giúp dự đoán tốt hơn cho những mục tiêu phân tử nào sẽ mang lại liệu pháp can thiệp ung thư hữu hiệu. U nguyên bào thần kinh đệm là một trong những bệnh ung thư thường xảy ra mà các liệu pháp hiện tại có ít tác động đến sự sống còn. Các thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) được khuếch đại trong 30-50% UNBTKĐ và là một mục tiêu phân tử tiềm năng, để thử nghiệm nhanh chóng các liệu pháp mới cho UNBTKĐ với sự có sẵn của các tế bào khối u và do nhu cầu cần thiết để điều trị được cải thiện, hệ gen UNBTKĐ đã được chọn để tái tạo một phần [77]. Để cải thiện các tiện ích của FGFR<sub>1</sub> hoặc con đường nhân tố tăng trưởng nguyên bào sợi như là một mục tiêu cho điều trị UNBTKĐ, các nghiên cứu thêm là cần thiết. Không biết những đột biến FGFR<sub>1</sub> có hoạt động bổ sung cho sự khuếch đại EGFR, mặc dù cả hai gen đều sử dụng các sự kiện kích hoạt ở hạ lưu tương tự và không quan sát thấy sự chùng chéo trong các mẫu có sự thay đổi gen trong các gen này. Các đột biến được tìm thấy ở đây liên quan nhiều hơn đến con đường trong thụ thể và cho thấy thụ thể có thể là một mục tiêu trực tiếp, tuy tần số đột biến là thấp. Tuy nhiên, ngoài nhắm mục tiêu vào thụ thể, có thể xác định thêm sự kích hoạt tyrosin kinase bằng các phương tiện khác như thông qua việc ràng buộc phối tử với thụ thể. Xác định mức độ và tần suất mà sự ức chế thụ thể FGFR<sub>1</sub> có thể làm thay đổi sự tăng trưởng của UNBTKĐ nên là bước tiếp theo hữu ích [16].

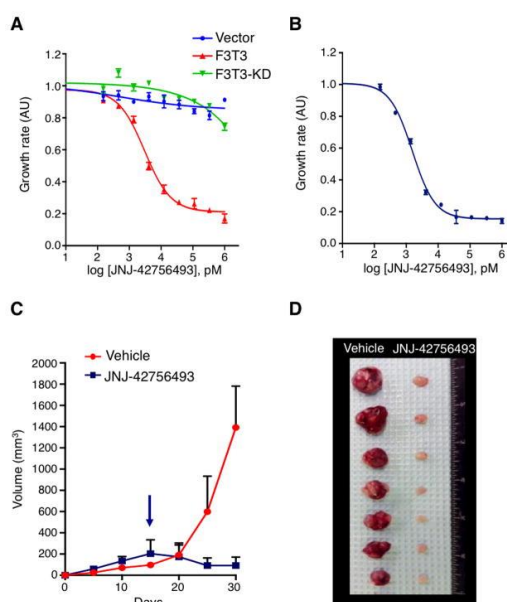
Đột biến dung hợp gen FGFRs-TACC đóng vai trò rất quan trọng đối với bệnh sinh u nguyên bào thần kinh đệm. Dung hợp gen FGFR3-TACC3 hình thành là do sự sao chép song song 2 gen FGFR3 và TACC3 trong cùng một vùng 70-kb trên 4p16.3, gây sự chuyển đoạn nhiễm sắc thể giữa các exon của gen FGFR3 và gen TACC3 tạo dung hợp gen. Gen TACC3 (Transforming, Acidic Coiled-Coil Containing Protein 3) mã hóa cho một protein thuộc họ TACC. TACC3 nằm trên nhánh ngắn của NST số 4, dài 23 kb bao gồm 18 exon, mã hóa cho protein chứa 838 acid amin [74],[75].



**Hình 1.12. Vị trí của  $TACC_3$  trên NST số 4**

Nguồn: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TACC3>

Ngoài ra, đột biến dung hợp gen  $FGFR_3$ - $TACC_3$  được cho là liên quan đến bệnh sinh UNBTKĐ và có đáp ứng tốt với thuốc điều trị JNJ-42756493, một chất ức chế thụ thể  $FGFR$ . Chất JNJ-42756493 có tác dụng ức chế thụ thể  $FGFR$  được sử dụng để đánh giá hiệu quả trên chuột có khối UNBTKĐ và bệnh nhân mắc UNBTKĐ có đột biến  $FGFR_3$ - $TACC_3$ . Chuột được cấy tế bào GIC-1123 (loại tế bào nguồn sinh UNBTKĐ), sau đó đã được xác định là đã mắc u nguyên bào thần kinh đệm. Chuột được phân ngẫu nhiên để nhận JNJ-42756493 (12 mg/kg). Kết quả phản ánh qua thực nghiệm cho thấy, JNJ-42756493 đã ức chế sự tăng trưởng khối u GIC-1123 rất mạnh (Hình 13C-D) sau hai tuần điều trị (giá trị p của độ dốc tính từ điểm khởi đầu điều trị = 0,04). Qua đó, cung cấp nền tảng vững chắc để thử nghiệm chất JNJ-42756493 cho các bệnh nhân UNBTKĐ có đột biến dạng  $FGFR_3$ - $TACC_3$  [76].

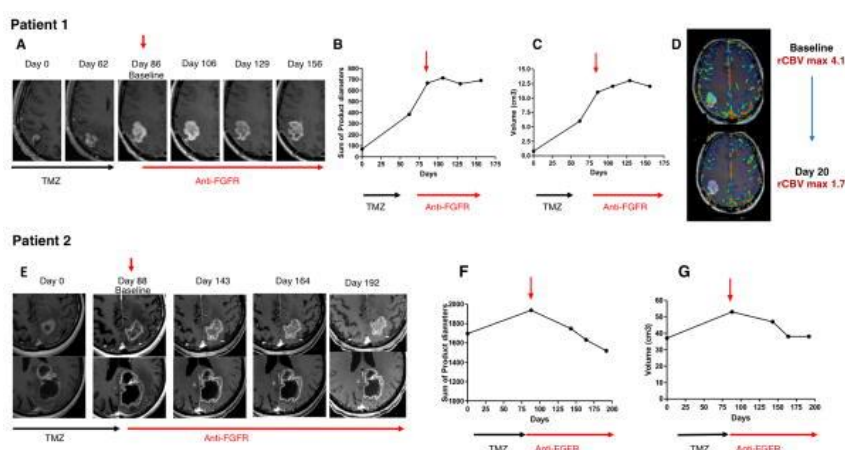


**Hình 1.13. Kết quả thử nghiệm chất JNJ-42756493 trên chuột có UNBTKĐ.**

Kích thước khối u nhỏ dần sau tiêm chất ức chế JNJ-42756493

Nguồn: Anna Luisa Di Stefano, *Clin Cancer Res.* 2015 Jul 15; 21(14): 3307-3317.

Chất ức chế JNJ-42756493 tiếp tục được thử nghiệm trên bệnh nhân bị UNBTKĐ tái phát chứa dung hợp gen  $FGFR_3$ - $TACC_3$ . Kết quả bệnh nhân có sự ổn định bệnh, bệnh tiến triển sau 21 tháng kể từ khi chẩn đoán và 287 ngày kể từ khi bắt đầu điều trị chống FGFR [76].



**Hình 1.14. Sự thay đổi kích thước khối u và thời gian sống kéo dài của bệnh nhân có đột biến gen  $FGFR$  sau điều trị bằng chất ức chế JNJ-42756493.**

*Nguồn: Anna Luisa Di Stefano, Clin Cancer Res. 2015 Jul 15; 21(14): 3307-3317.*

Đột biến dung hợp gen  $FGFR_3$ - $TACC_3$  làm tăng ái lực của thuốc điều trị với thụ thể này 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 ngoài vai trò trong bệnh sinh u nguyên bào thần kinh đệm thì các đột biến gen FGFRs còn 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 hướng đích ức chế hoạt tính tyrosine kinase trên bệnh nhân UNBTKĐ [12],[74],[76]. Trong điều kiện của nghiên cứu nhóm nghiên cứu tập trung xác định đột biến trên exon 12 và exon 13 gen FGFR, chưa xác định được loại đột biến dung hợp gen  $FGFR_3$ - $TACC_3$ , cần có một nghiên cứu khác về loại đột biến này.

Tóm lại, để phân loại bệnh UNBTKĐ theo WHO, yếu tố phân tử trong bệnh UNBTKĐ phải được xác định để làm rõ xem bệnh thuộc thể loại nào và tùy vào đó để tiên lượng, điều trị bệnh cho phù hợp, điều này đòi hỏi phải có các kỹ thuật để xác định sự thay đổi của các gen liên quan. Đồng thời hướng nghiên cứu cho điều trị gen đích của bệnh UNBTKĐ là tiềm năng, và xét nghiệm gen là không thể thiếu đối với các bác sỹ lâm sàng khi triển khai các liệu pháp điều trị đối với bệnh nhân.

### **1.3. Đặc điểm người bệnh U nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen và thời gian sống sau điều trị**

#### ***1.3.1. Đặc điểm nguyên phát và thứ phát***

Thể bệnh của UNBTKĐ đã được các tác giả đề cập từ lâu, sau nhiều lần nhóm họp WHO đã thống nhất chia UNBTKĐ thành hai thể bệnh nguyên phát và thứ phát. Thể nguyên phát là những trường hợp phát bệnh lần đầu và được chẩn đoán ngay là UNBTKĐ độ IV, còn thể thứ phát là thể được chuyển từ những trường hợp đã phát bệnh lần trước là các u thần kinh đệm độ I, II, hoặc III; nay chuyển sang UNBTKĐ độ IV. Tái phát bệnh tức người bệnh đã phẫu thuật lấy khối UNBTKĐ độ IV, sau đó u phát triển lại và được chẩn đoán lại lần hai cùng chẩn đoán là UNBTKĐ độ IV, nên vẫn xếp vào thể u nguyên phát [31],[32].

Ngoài khác nhau về dạng mô bệnh học, UNBTKĐ nguyên phát và thứ phát còn khác nhau về một số các đặc điểm di truyền, về độ tuổi: UNBTKĐ nguyên phát chiếm phần lớn, xuất hiện ở bệnh nhân lớn tuổi (trung bình tuổi 55) sau một thời gian ngắn lâm sàng thường ít hơn 3 tháng, được đặc trưng bởi sự khuếch đại EGFR (khoảng 40% trường hợp) và/hoặc biểu hiện quá mức EGFR (60%), đột biến PTEN (30%), xóa p16INK4a (30% -40%), khuếch đại MDM2 (<10%). Ngược lại, UNBTKĐ thứ phát phát triển chậm hơn do tiến triển ác tính từ các u thần kinh đệm cấp thấp chuyển thể sang UNBTKĐ và gặp ở bệnh nhân trẻ tuổi (trung bình 40 tuổi). UNBTKĐ thứ phát có chứa đột biến ở TP53 trong khoảng 60% trường hợp; UNBTKĐ thứ

phát được đặc trưng bởi sự mất đi alen của các nhiễm sắc thể 19q và 10q. Về mặt mô học, một sự phân biệt rõ ràng về những phân nhóm này vẫn còn khó nắm bắt, nhưng chúng rõ ràng tiến triển thông qua các con đường di truyền khác nhau [31],[32]. Việc phân thể bệnh giúp các bác sỹ lâm sàng tiên lượng và định hướng điều trị cho bệnh nhân, tuy nhiên các nhà khoa học cho rằng, vẫn cần các nghiên cứu chỉ ra liệu những phân nhóm này có khác biệt đáng kể về tiên lượng, hay có khả năng là chúng sẽ đáp ứng khác biệt với các liệu pháp điều trị mới hay không.

Năm 2016, WHO đã cập nhật rõ hơn về đặc điểm hai thể bệnh nguyên phát và thứ phát của UNBTKĐ, như về thời gian tiến triển lâm sàng, thời gian sống sau điều trị.

**Bảng 1.1. Đặc điểm 2 thể bệnh UNBTKĐ nguyên phát và thứ phát [3]**

<b>Thể bệnh</b>	<b>Nguyên phát</b>	<b>Thứ phát</b>
Loại	UNBTKĐ IDH hoang dã	UNBTKĐ IDH đột biến
Tỉ lệ	90%	10%
Tuổi trung bình mắc	62 tuổi	44 tuổi
Tỉ lệ nam/nữ mắc	1,42	1,05
Thời gian tiến triển lâm sàng	4 tháng	15 tháng
Thời gian sống sau:		
Phẫu thuật + xạ trị	9,9 tháng	14 tháng
Phẫu thuật + xạ trị + hóa chất	15 tháng	31 tháng
Tp53 đột biến	27%	81%
EGFR khuếch đại	35%	Hiếm gặp
ATRX đột biến	Hiếm gặp	71%
TERT đột biến vùng khởi động	72%	26%
PTEN đột biến	24%	Hiếm gặp



Nghiên cứu của Wantanabe K đã chứng minh, sự biểu hiện quá mức của thụ thể EGF và đột biến p53 là loại trừ lẫn nhau trong quá trình tiến hóa của u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát và thứ phát. Nghiên cứu trình bày bằng chứng rằng u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát và thứ phát tạo thành các thực thể bệnh khác nhau phát triển thông qua việc thu nhận các thay đổi di truyền khác nhau. Phân tích đột biến TP53, tích lũy protein TP53 và biểu hiện thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) trong 49 sinh thiết được phân loại là u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát hoặc thứ phát theo tiêu chí lâm sàng và mô bệnh học. Bệnh nhân mắc u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát được lựa chọn trên cơ sở tiền sử lâm sàng dưới 3 tháng và các đặc điểm mô bệnh học của u nguyên bào thần kinh đệm ở sinh thiết đầu tiên (19 trường hợp, tuổi trung bình, 55 tuổi). Việc chẩn đoán u nguyên bào thần kinh thứ phát cần ít nhất hai sinh thiết và lâm sàng cũng như bằng chứng mô học về tiến triển từ u tế bào hình sao cấp thấp (30 trường hợp, tuổi trung bình, 39 tuổi). Phân tích trình tự DNA cho thấy đột biến TP53 rất hiếm gặp ở u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát (11%) trong khi u nguyên bào thứ phát có tỷ lệ đột biến TP53 cao (67%), trong đó 90% đã có trong sinh thiết đầu tiên. Ngược lại, khả năng miễn dịch đối với thụ thể EGF chiếm ưu thế trong u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát (63%) nhưng hiếm gặp ở u nguyên bào thần kinh thứ phát (10%). Chỉ có một trong 49 trường hợp cho thấy biểu hiện quá mức EGFR và đột biến TP53. Các dữ liệu này chỉ ra rằng sự biểu hiện quá mức của thụ thể EGF và đột biến gen ức chế khối u TP53 là các sự kiện loại trừ lẫn nhau xác định hai con đường di truyền khác nhau trong quá trình tiến hóa của UNBTKĐ là điểm cuối kiểu hình chung [78].

Như vậy thể bệnh nguyên phát và thứ phát trong UNBTKĐ rõ ràng có sự khác biệt về thời gian tiến triển lâm sàng cùng đáp ứng điều trị, điều này giúp ích cho các thầy thuốc tư vấn điều trị cho bệnh nhân. Và có thể áp dụng các cách điều trị phù hợp từng người bệnh.

### ***1.3.2. Thời gian sống sau điều trị của người UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến gen***

Với thời gian tiến triển lâm sàng rất nhanh, nếu không được điều trị người mắc UNBTKĐ chỉ sống được vài tháng, nếu được điều trị bằng phẫu thuật thời gian sống kéo dài hơn có thể đến một năm hoặc hai năm, tuy nhiên với tỷ lệ rất thấp [79].

Kiều Đình Hùng (2006), nghiên cứu 43 bệnh nhân mắc u thần kinh đệm ác tính bao gồm: u nguyên bào thần kinh đệm (chiếm tỷ lệ cao nhất 62,7%); u tế bào hình sao giảm biệt hóa (25,6%); u thần kinh đệm ít nhánh ác tính (4,7%); u tế bào thần kinh đệm lợp ống nội tủy ác tính (7,0%), được điều trị bằng phẫu thuật quang động học, sau điều trị tỷ lệ chết của bệnh nhân đến khi kết thúc nghiên cứu là 81,4%: chết sớm nhất là sau 1 tháng, muộn nhất là sau 58 tháng, trung bình 12,3 tháng; tỷ lệ sống sót của bệnh nhân 18,6%: thấp nhất là 15 tháng, cao nhất là 78 tháng, trung bình 37,3 tháng. Thời gian sống trung bình của 43 bệnh nhân 16,9 tháng [25].

Trần Chiến (2011), nghiên cứu 150 bệnh nhân u tế bào thần kinh đệm hình sao, trong đó có 59 bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm (độ IV) chiếm tỉ lệ cao nhất 39,3%. Thời gian sống trung bình sau phẫu thuật của u độ IV là  $9,7 \pm 0,3$  tháng [26].

Nghiên cứu của Dương Đại Hà và Hà Kim Trung (2014), 96 bệnh nhân u thần kinh đệm hình sao, được điều trị phẫu thuật cắt u từ năm 2011 đến 2012, đánh giá thời gian sống sau phẫu thuật đến 28 tháng có kết quả: thời gian sống sau mổ trung bình  $15,93 \pm 2,91$  tháng. Tỷ lệ tử vong sau mổ 6 tháng của u độ III là 12,5% và u độ IV là 43,8% [27].

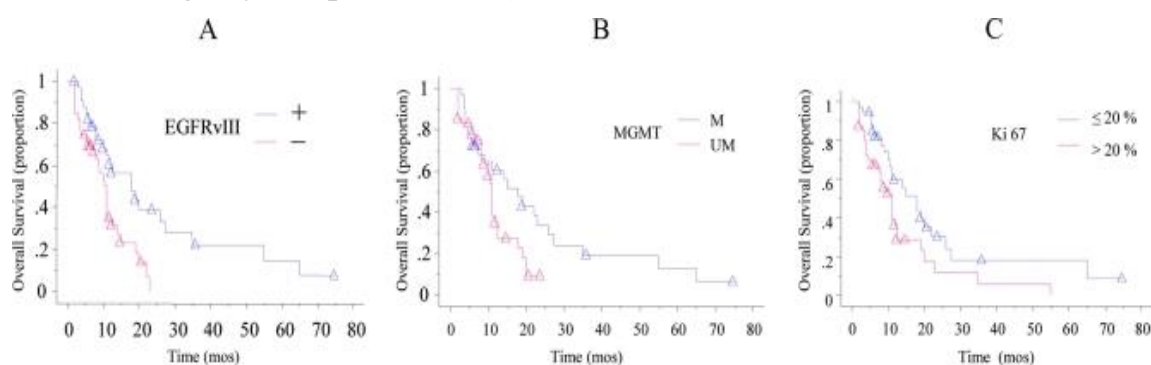
Có nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng đến kết quả điều trị bệnh UNBTKĐ: tuổi càng cao tỷ lệ sống sót thấp hơn tuổi trẻ do sức chịu đựng hoặc đề kháng thấp hơn so với người trẻ, bệnh ở giai đoạn nặng khi người bệnh đã không

còn khả năng tự chăm sóc bản thân khi vào viện thì tiên lượng kém hơn người vẫn còn khả năng tự chăm sóc bản thân, tổn thương mô bệnh học thấy hình ảnh tỷ lệ tế bào ung thư phát triển mạnh (chỉ số phát triển tế bào Ki), số lượng tế bào càng nhiều tiên lượng sẽ càng kém hơn, sau phẫu thuật nếu người bệnh được điều trị hỗ trợ xạ trị hay hoá chất sẽ có thời gian sống dài hơn người không được điều trị hỗ trợ... Do đó, điều trị UNBTKĐ vẫn phải tuân thủ nguyên tắc phối hợp mới đạt được hiệu quả: sự sống sót của bệnh nhân UNBTKĐ mới mắc được điều trị bằng xạ trị (RT) và temozolomide (TMZ) được ghi nhận ở 2 nhóm bệnh nhân mắc u nguyên bào thần kinh đệm mới, được chẩn đoán với các tiêu chí về điều kiện tương tự. Một nhóm bệnh nhân (n=244) được điều trị bằng các phương pháp tiếp cận mới (NABTT) RT + TMZ với talampanel hoặc poly-ICLC, hoặc cilengitide; một nhóm chỉ điều trị bằng RT + TMZ (n = 287) (EORTC). Đánh giá kết quả điều trị bằng theo dõi tỷ lệ sống sót; được so sánh với dữ liệu EORTC đã công bố. Kết quả tỷ lệ sống trung bình đối với bệnh nhân EORTC (n = 287) và bệnh nhân NABTT (n = 244) tương đương là 14,6 so với 19,6 tháng, tỷ lệ sống trung bình 12 tháng là 61% so với 81% và 24 tháng là 27% so với 37%. Thông qua 2 năm theo dõi, nếu bệnh nhân được sử dụng phương pháp điều trị mới NABTT giảm 37% tỷ lệ tử vong ( $p < 0,0001$ ) so với bệnh nhân EORTC chỉ nhận được RT + TMZ [43].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh người UNBTKĐ có đột biến gen tỷ sống thấp hơn người không có đột biến gen, đột biến gen EGFR gây biểu hiện khuếch đại protein EGFR và ảnh hưởng đến sự sống còn của người bệnh UNBTKĐ sau phẫu thuật và tiếp nhận xạ trị, sự sống sót trong số người bệnh UNBTKĐ có biểu hiện khuếch đại EGFR thấp hơn đáng kể so với những người bệnh không có biểu hiện này (tỷ lệ sống trung vị là 12,5 so với 17,5 tháng,  $p = 0,013$ ) [65]. Giá trị tiên lượng của yếu tố tăng trưởng biểu bì ở bệnh UNBTKĐ được ghi nhận qua phân tích mối quan hệ giữa kết quả điều trị và gen EGFR ở người bệnh mới được chẩn đoán, kết quả đã phát hiện có 40

(46%) bị đột biến xóa đoạn gen EGFR trong 87 người bệnh UNBTKĐ; có sự tương quan chặt chẽ giữa sự nhân lên của gen EGFR và EGFR quá mức ( $p < 0,0001$ ). Phân tích đa biến cho thấy nhân lên của EGFR là độc lập, dự báo bất lợi cho sự sống còn tổng thể (OS) trong tất cả các bệnh nhân. Về mối quan hệ với tuổi, tình trạng gen EGFR là một dự đoán đáng kể ở những bệnh nhân trẻ tuổi, đặc biệt là ở những người  $< 60$  tuổi. Phát hiện này cho thấy rằng quá mức EGFRvIII trong sự hiện diện của nhân lên EGFR là chỉ số mạnh nhất của một tiên lượng sống còn [65].

Đột biến gen EGFR ảnh hưởng đến kết quả điều trị UNBTKĐ đã được chứng minh: người bệnh UNBTKĐ được điều trị phẫu thuật cắt bỏ khối u, sau đó xạ trị: liều 2 Gy/ 1 lần/ 1 ngày x 5 ngày/1 tuần, tổng liều 60 Gy, kết hợp TMZ bổ trợ sau phẫu thuật. Kết quả: những người bệnh  $\leq 60$  tuổi hoặc điểm số KPS trước phẫu thuật  $\geq 70$  có tương quan đáng kể với tỷ lệ sống còn dài hơn ( $p = 0,0069$ // OR = 0,43// 95%CI = 0,23 - 0,79 đối với tuổi;  $p = 0,0035$ // OR = 2,34// 95%CI = 1,32 - 4,14 đối với KPS); người bệnh UNBTKĐ có đột biến dạng EGFRvIII, tỷ lệ sống sót dài hơn 2,59 lần so với người không có đột biến dạng này với  $p = 0,0023$  (OR = 2,59// 95% CI = 1,40 - 4,79) [64].



**Hình 1.15. (A) So sánh tỷ lệ sống còn của người bệnh UNBTKĐ có đột biến gen dạng EGFRvIII và người không có đột biến [64]**

Ngoài ra nghiên cứu một số gen như IDH, MGMT, TERT được sử dụng như là một dấu hiệu dự đoán trong lâm sàng, ý nghĩa tiên lượng về sự thay đổi di truyền và biểu hiện lâm sàng ở bệnh nhân UNBTKĐ

[80],[81],[82]. Một nghiên cứu đã sàng lọc 98 mẫu u nguyên bào thần kinh đệm ở người để tìm sự thay đổi di truyền và biểu hiện ở 10 gen và vị trí nhiễm sắc thể bằng phương pháp PCR và khuếch đại đầu dò phụ thuộc vào hệ thống ghép môi (MLPA). Thử nghiệm sự liên quan giữa những thay đổi di truyền, biểu hiện và sự sống sót của bệnh nhân UNBTKĐ. Sau đó, nghiên cứu đã phát triển một công cụ dự đoán sống sót từ 2 gen. Các phân tích đa biến cho thấy các đột biến trong isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1), methyl hóa thúc đẩy MGMT, liều chiếu xạ và tình trạng bệnh thông qua chỉ số phát triển tế bào u Karnofsky (KFS) là các yếu tố tiên lượng độc lập. Một yếu tố dự đoán 2 gen cho sự sống sót của UNBTKĐ đã được tạo ra. Dựa trên tình trạng di truyền và biểu hiện của IDH1 và MGMT, bệnh nhân UNBTKĐ được phân tầng thành 3 kiểu gen khác nhau trên lâm sàng: bệnh nhân với IDH1 đột biến kèm MGMT methyl hoá có thời gian sống lâu nhất, tiếp theo là bệnh nhân mắc IDH1 đột biến kèm MGMT không methyl hoá có thời gian tồn tại ngắn nhất. Công cụ dự đoán 2 gen này là một yếu tố tiên lượng độc lập và thực hiện tốt hơn đáng kể trong việc dự đoán tỷ lệ sống so với đột biến IDH1 hoặc methyl hóa MGMT đơn thuần. Như vậy, sự kết hợp giữa đột biến IDH1 và methyl hóa MGMT vượt trội hơn cả đột biến IDH1 hoặc methyl hóa MGMT đơn thuần trong việc dự đoán sự sống sót của bệnh nhân UNBTKĐ, thông tin này sẽ giúp tăng hiểu biết về sinh học UNBTKĐ, và nó có thể hữu ích cho các so sánh cơ bản trong các thử nghiệm lâm sàng trong tương lai [80]. Một số các nghiên cứu về các gen khác cũng công bố về ảnh hưởng của đột biến gen đến hiệu quả điều trị và thời gian sống sót của bệnh nhân UNBTKĐ [46],[83]. Liên quan đến việc thất bại trong điều trị bệnh UNBTKĐ, các nghiên cứu về tế bào gốc thần kinh đệm (GSCs) đã đưa ra quan điểm: tế bào gốc tạo thành một quần thể nhỏ phân chia chậm trong một khối u nguyên bào thần kinh không đồng nhất. Chúng có thể tự làm mới, tái cấu trúc toàn bộ một khối u và

phân biệt thành các quần thể UNBTKĐ cụ thể khác. Do đó, chúng đã phải chịu trách nhiệm cho việc tái phát ác tính sau khi điều trị theo phương pháp tiêu chuẩn đã áp dụng và đây là một tiên lượng xấu của UNBTKĐ tái phát. Sự thất bại của các liệu pháp hiện tại để loại bỏ các quần thể GSC cụ thể đã được coi là một yếu tố chính góp phần vào sự tái phát không thể tránh khỏi ở bệnh nhân UNBTKĐ sau khi điều trị. Nghiên cứu đã thảo luận về các cơ chế phân tử của phản ứng hóa học của GSC và lý do tại sao việc loại bỏ hoàn toàn GSCs rất khó đạt được. Đồng thời nghiên cứu đã mô tả các liệu pháp nhắm mục tiêu hiện có sẵn cho GSC và các cơ chế có thể để khắc phục tính kháng hóa chất và tránh tái phát điều trị [41],[84]. Dự đoán về biểu hiện lâm sàng, đáp ứng với điều trị và kết quả của bệnh u thần kinh đệm là một thách thức. Trên cơ sở các nghiên cứu trước đây về sinh học khối u, một nghiên cứu đã xác định năm nhóm phân tử thần kinh đệm với việc sử dụng ba thay đổi: đột biến TERT, đột biến ở IDH và mã hóa của nhánh nhiễm sắc thể 1p và 19q. Kiểm tra giả thuyết rằng trong các nhóm dựa trên các đặc điểm này, các khối u sẽ có các biến lâm sàng tương tự, thay đổi tế bào và các biến thể mầm. Cho điểm các khối u là âm tính hoặc dương tính đối với từng dấu hiệu này trong 1087 u thần kinh đệm và so sánh các thay đổi có được và đặc điểm bệnh nhân trong số năm nhóm phân tử chính. Sử dụng 11,590 điều khiển, nghiên cứu đã đánh giá mối liên hệ giữa các nhóm này và các biến thể mầm thần kinh đệm đã biết. Trong số 615 u thần kinh đệm độ II hoặc III, 29% có cả ba thay đổi (nghĩa là dương tính ba lần), 5% có đột biến TERT và IDH, 45% chỉ có đột biến IDH, 7% chỉ có ba âm tính và 10% chỉ có đột biến Tert; 5% có sự kết hợp khác. Trong số 472 u thần kinh đệm độ IV, ít hơn 1% là dương tính ba lần, 2% có đột biến TERT và IDH, 7% chỉ có đột biến IDH, 17% là đột biến ba âm tính và 74% chỉ có đột biến TERT. Các nhóm phân tử có liên quan độc lập với sự sống sót chung giữa những bệnh nhân bị u thần kinh đệm độ II

hoặc III nhưng không phải ở những bệnh nhân bị u thần kinh đệm độ IV. Các nhóm phân tử được liên kết với các biến thể mầm cụ thể, ngụ ý rằng chúng được đặc trưng bởi các cơ chế sinh bệnh học khác nhau [85].

Tại Việt Nam chưa có nghiên cứu về đặc điểm của người UNBTKĐ nguyên phát, thứ phát cũng như đặc điểm về thời gian sống của người UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến gen được điều trị với các phương pháp điều trị khác nhau thì khác nhau như thế nào, do đó nhóm nghiên cứu của chúng tôi sẽ dựa vào các kết quả của tình trạng đột biến gen xác định được trên người bệnh để phân tích một số đặc điểm ở người UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến gen.

#### **1.4. Kỹ thuật sinh học phân tử xác định đột biến gen trong u nguyên bào thần kinh đệm.**

Có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng để xác định đột biến gen, trong nghiên cứu chúng tôi sử dụng một số kỹ thuật cơ bản như: PCR, MLPA và giải trình tự gen trực tiếp để xác định các đột biến các gen TP53, EGFR, FGFR.

##### ***1.4.1. Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction)***

Trong số các tiến bộ khoa học kỹ thuật, PCR (polymerase chain reaction) được coi là kỹ thuật cơ bản quan trọng nhất, là nền tảng cơ sở cho hầu hết các kỹ thuật khác trong lĩnh vực sinh học phân tử.

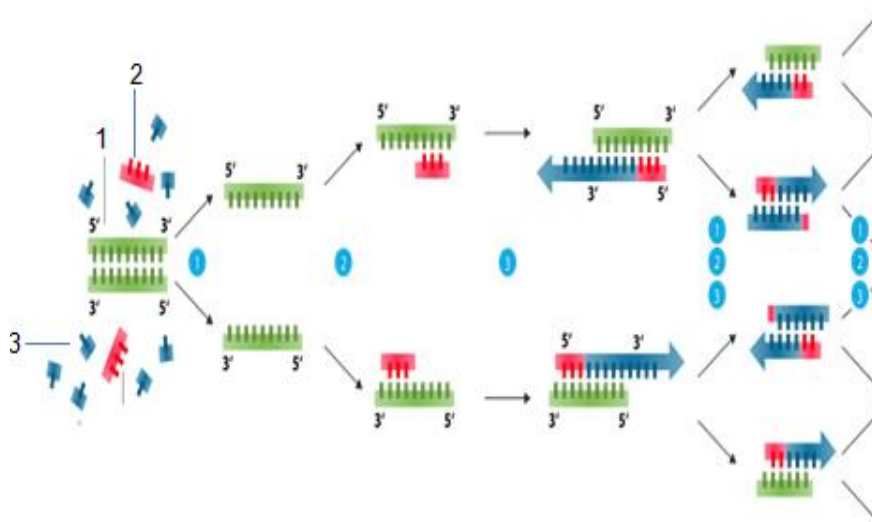
Kỹ thuật PCR là phương pháp trong ống nghiệm, sử dụng DNA polymerase (thường là Taq polymerase) để nhân bản nhanh một trình tự DNA nào đó mà chỉ cần một lượng mẫu hạn chế ban đầu [86], được phát minh đầu tiên bởi Kary Mullis vào năm 1985, dựa trên ý tưởng ban đầu là xây dựng một quy trình làm cho DNA có thể nhân lên nhiều lần một cách nhân tạo qua nhiều chu kỳ sao chép bởi enzym DNA polymerase [87].

##### ***1.4.1.1. Nguyên tắc chung của kỹ thuật PCR***

Dựa trên cơ sở tính biến tính, hồi tính của DNA, và hoạt tính của các DNA polymerase có khả năng tổng hợp 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 [86],[87]. Phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba bước:

- Bước 1: là giai đoạn biến tính (denaturation)
- Bước 2: là giai đoạn bắt cặp (annealing).
- Bước 3: là giai đoạn tổng hợp hay kéo dài (extension).

Sau mỗi chu kỳ các chuỗi đôi DNA mới tạo thành sẽ tiếp tục được dùng làm các DNA nền để tổng hợp các DNA mới trong chu kỳ tiếp theo. Số lượng chu kỳ của mỗi phản ứng PCR phụ thuộc số lượng khuôn DNA ban đầu, thường 30 chu kỳ và không quá 40 chu kỳ. Sau mỗi chu kỳ sẽ được tăng gấp đôi lượng DNA của lần trước. Sau n chu kỳ sẽ có  $2^n$  bản sao DNA giống DNA ban đầu. Nhờ vậy, có đủ lượng DNA để thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo như: điện di, nhuộm, tạo dòng hoặc giải trình tự [86],[87].



**Hình 1.16. Phản ứng PCR (thành phần và sản phẩm)**  
 (1) Đoạn gen khuôn, (2) Đoạn gen môi, (3) Nucleotid tự do  
 Nguồn [https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

#### 1.4.1.2. Phân tích sản phẩm PCR



Phân tích sản phẩm PCR thu được giúp cho việc tối ưu hóa các thành phần tham gia và điều kiện của phản ứng để thu được sản phẩm DNA đúng yêu cầu. Thường sau khi thực hiện phản ứng PCR người ta tiến hành điện di sản phẩm trên gel agarose để kiểm tra chất lượng sản phẩm PCR thu được.

#### ***1.4.1.3. Ứng dụng của kỹ thuật PCR***

Sau khi thu được sản phẩm PCR theo đúng yêu cầu. Các sản phẩm PCR được sử dụng làm nguyên liệu cho các kỹ thuật chuyên sâu như: Southern và Dot blot, kỹ thuật enzym cắt giới hạn, giải trình tự gen trực tiếp, MLPA...

Trong bệnh UNBTKĐ, kỹ thuật PCR được sử dụng để khuếch đại các exon trên gen, từ đó xác định các đột biến điểm trên các exon của gen TP53, EGFR, FGFR... và đột biến xóa đoạn trên gen EGFR.

Các cặp mồi được thiết kế riêng biệt cho mỗi exon của gen cần khuếch đại, đảm bảo các cặp mồi là đặc hiệu.

Sau đó sử dụng các DNA được tách chiết từ các mẫu mô đủ tiêu chuẩn để làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR, tiến hành phản ứng PCR với chu trình nhiệt đã được chuẩn hóa trước. Sản phẩm DNA được khuếch đại sau chạy PCR được kiểm tra bằng điện di, sau đó được giải trình gen bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp để xác định trình tự các nucleotid trên từng exon của gen, và đọc kết quả đối chiếu với gen mẫu Genbank, từ đó xác định các điểm đột biến.

Jeffrey C Lee (2006), khi nghiên cứu đột biến gen EGFR trên bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm đã sử dụng phương pháp PCR để khuếch đại 21 exon trong tổng số 28 exon của gen EGFR, sau đó sử dụng phương pháp giải trình tự để tìm các đột biến điểm trên các exon này, kết quả đã xác định được các đột biến chủ yếu trên các exon 2,3,5,7,8,15,21 gen EGFR, trong đó tỉ lệ đột biến cao nhất gặp ở exon 7 [62].

<u>Mã số</u>	<u>kí hiệu bệnh</u>	<u>exon</u>	<u>nucleotid thay đổi</u>	<u>acid amin thay đổi</u>
S001050	GBM	2	G136A, G187C	D46N, G63R
S001073	GBM	3	G323A	R108K
S001076	GBM	3	G323A	R108K
S001092	GBM	3	G323A	R108K
S001094	GBM	3	G323A	R108K
S003763	GBM	3	G323A	R108K
S001067	GBM	7	A787C	T263P
S001102	GBM	7	A787C	T263P
S001103	GBM	7	A787C	T263P
S001097	GBM	7	C866A	A289D
S001095	GBM	7	G865A	A289T
S001090	GBM	7	C866T	A289V
S001108	GBM cell line	7	C866T	A289V
S004384	GBM	7	C866T	A289V
S002024	GBM	8	G971T	R324L
S001026	GBM	8	G988A	E330K
S003577	GBM	15	C1787T	P596L
S001018	GBM	15	G1793T	G598V
S001005	GBM	15	G1793T	G598V
S001071	GBM	21	T2582A	L861Q

**Hình 1.17. Ảnh kết quả đột biến điểm gen EGFR bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm [62].**

Nguồn: Jeffrey C Lee. 2006 Dec; 3(12): e485. Published online 2006 Dec 19. doi: 10.1371/journal.pmed.0030485

#### **1.4.2. Kỹ thuật khuếch đại DNA đầu dò - 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. Trong phản ứng MLPA, vấn đề thiết kế các đầu dò (probe) gắn đặc hiệu với các đoạn DNA đích đóng vai trò cực kỳ quan trọng.

Kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation - dependent Probe Amplification) hay kỹ thuật khuếch đại đầu dò đa môi dựa vào phản ứng nối - là một biến thể của phản ứng PCR đa môi (Multiplex Polymerase Chain Reaction) cho phép khuếch đại nhiều đích chỉ với một cặp môi duy nhất. Mỗi đầu dò bao gồm hai

oligonucleotide, mỗi đoạn đều chứa một trình tự môi cho phản ứng PCR và một trình tự bổ sung với trình tự đích (được gọi là trình tự lai). Khi các đầu dò được lai chính xác vào trình tự đích, chúng sẽ được nối lại bởi enzym ligase bền nhiệt. Phản ứng PCR sẽ chỉ khuếch đại các đầu dò đã được nối lại hoàn chỉnh. Vì mỗi đầu dò đều được đánh dấu huỳnh quang và có kích thước riêng biệt, nên có thể thu được tín hiệu của mỗi đầu dò đã được phân tách và xác định trên hệ thống điện di mao quản. Kỹ thuật MLPA có thể định lượng số bản sao của nhiều trình tự trong một gen với năng suất lên tới 40 trình tự đích trong một phản ứng.

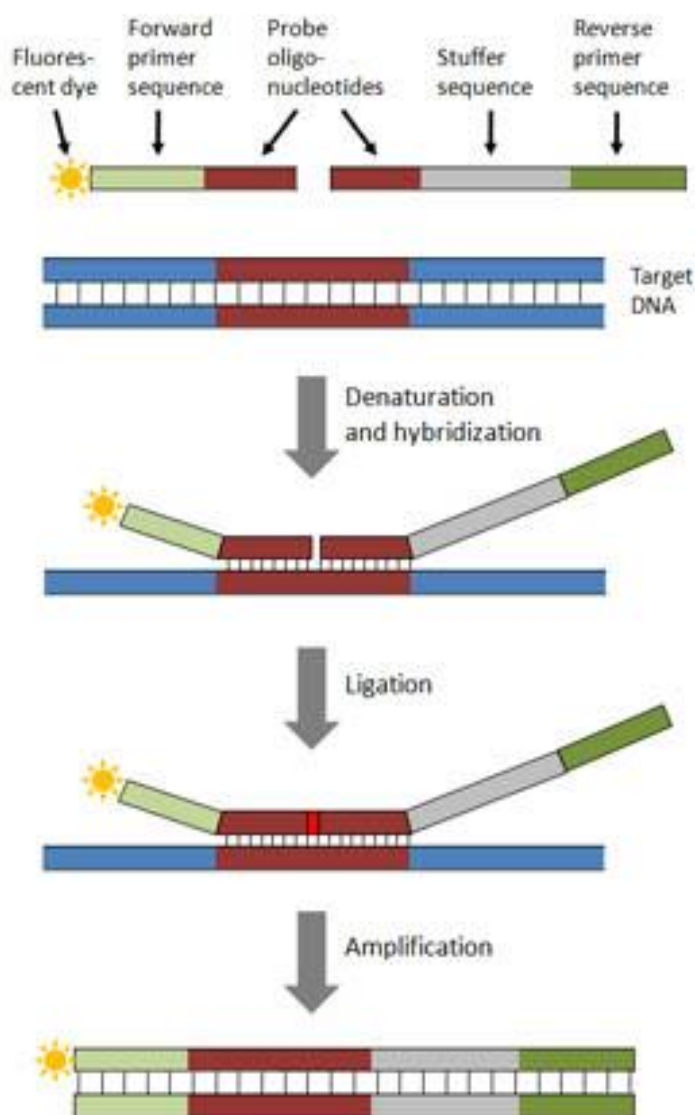
#### ***1.4.2.1. Nguyên tắc kỹ thuật***

Sử dụng các đoạn đầu dò DNA (probe) có khả năng lai với phân tử DNA đích đặc hiệu. Mỗi probe gồm hai chuỗi oligonucleotid dài và ngắn, chuỗi dài gắn ở đầu 5', chuỗi ngắn gắn ở đầu 3' của DNA đích. Mỗi chuỗi có đoạn đặc hiệu với DNA đích (đoạn 1), đoạn gắn môi (đoạn 2).

- Đoạn 1: chứa khoảng 21-30 nucleotid ở chuỗi ngắn, 25-43 nucleotid ở chuỗi dài, đoạn này có trình tự nucleotide bổ sung và liên tiếp nhau trên đoạn DNA đích. Khi tiến hành phản ứng lai với DNA đích, đoạn 1 của hai chuỗi sẽ gắn ở vị trí liền kề nhau tạo điều kiện cho enzym ligase gắn chúng lại thành probe hoàn chỉnh (sản phẩm lai) đặc hiệu với đoạn DNA đích.

- Đoạn 2: Chứa khoảng 19 nucleotid ở chuỗi ngắn, 36 nucleotid ở chuỗi dài. Trình tự nucleotide giống nhau ở tất cả các probe. Đây là vị trí gắn môi để khuếch đại sản phẩm lai.

Ngoài hai đoạn trên, ở chuỗi dài có thêm đoạn đệm (đoạn 3) nằm ở giữa đoạn 1 và 2. Cấu tạo gồm 19-370 nucleotid, không đặc hiệu với DNA đích, vai trò của đoạn 3 là làm cho các sản phẩm lai có kích thước khác nhau, khi khuếch đại sẽ dễ dàng phân tích bằng sản phẩm điện di.



**Hình 1.18. Hình ảnh probe và quy trình phản ứng MLPA  
(theo Jan P. Schouten, 2002)**

#### **1.4.2.2. Các bước tiến hành phản ứng MLPA**

DNA sau khi tách chiết từ mẫu mô u nguyên bào thần kinh đệm được đo nồng độ và độ tinh sạch. Trong đó, 50ng DNA tổng số được sử dụng cho phản ứng MLPA để xác định đột biến.

- **Bước 1: Biến tính DNA**
- **Bước 2: Gắn (lai) probe vào gen đích**
- **Bước 3: Nối hai đầu probe**
- **Bước 4: Khuếch đại sản phẩm lai (PCR)**

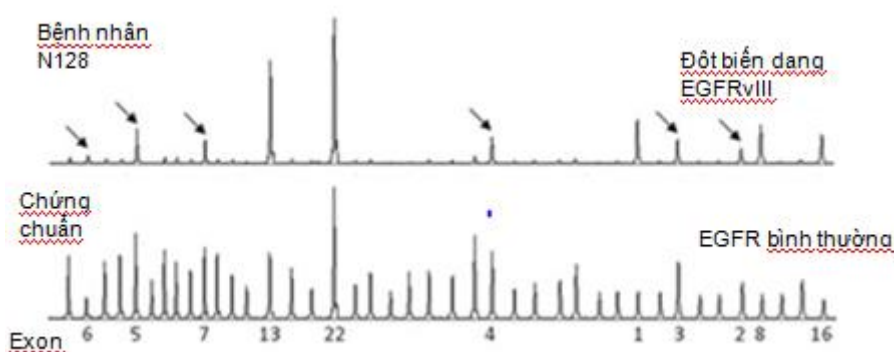
Sau phản ứng PCR, mỗi probe sẽ được khuếch đại thành nhiều bản sao. Các probe khác nhau sẽ có kích thước khác nhau do độ dài đoạn đệm (stuffer) của chúng khác nhau. Do vậy, chúng sẽ được phân tách bằng phương pháp điện di (thường sử dụng phương pháp điện di mao quản). Số lượng sản phẩm khuếch đại của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

#### **1.4.2.3. Ứng dụng MLPA trong xác định đột biến gen *UNBTKĐ***

Trong những năm gần đây, MLPA là phương pháp được ưu tiên chọn lựa trong chẩn đoán đột biến xóa đoạn, lặp đoạn gen, với độ chính xác cao, cho kết quả nhanh chóng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng bộ sinh phẩm SALSA MLPA P105-D2 của hãng MRC Holland (Hà Lan) để xác định đột biến xóa đoạn EGFRvIII (xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7) của gen EGFR. Bên cạnh đó, bộ kit còn được thiết kế để có thể phát hiện một số biến đổi liên quan đến các gen như PDGFRA (4q12), CDKN2A (9p21.3), PTEN (10q23.31), TP53 (17p13.1), CDK4-MIR26A2-MDM2 (12q14 - q15) and NFKBIA (14q13.2).

Nghiên cứu của Judith Jeuken năm 2009, đã sử dụng phương pháp MLPA để xác định gen EGFRvIII (đột biến xóa đoạn exon 2 đến exon 7 gen EGFR) [88], kết quả phát hiện có đột biến dạng EGFRvIII.



**Hình 1.19. Hình ảnh điện di xác định đột biến gen dạng *EGFRvIII* bằng kỹ thuật MLPA**

Nguồn: Judith Jeuken, *Brain Pathol.* 2009 Oct; 19(4): 661-671.

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

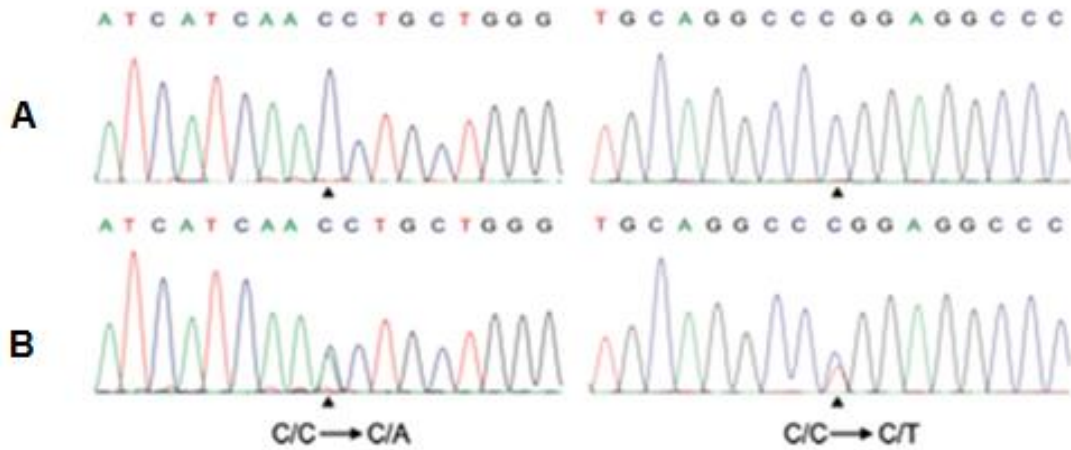
Giải trình tự gen (DNA sequencing) là phương pháp xác định vị trí sắp xếp của các nucleotid trong phân tử DNA. Hiện nay, người ta thường sử dụng hai phương pháp giải trình tự đó là phương pháp dideoxynucleotid và giải trình tự bằng máy tự động. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng phương pháp giải trình tự bằng máy tự động.

Máy giải trình tự gen tự động hoàn toàn được thiết kế trên nguyên tắc sử dụng ddNTP do F.Sanger và cộng sự phát minh [89]. Với các máy thế hệ mới sau này, người ta dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP. Nhờ vậy phản ứng giải trình tự có thể thực hiện trong một ống nghiệm và chỉ cần điện di trên một hàng mà không phải trên 4 hàng khác nhau như trước đây, 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 diện được là nucleotid nào, từ đó biết được trình tự của DNA đích.

Mặc dù có nhiều phương pháp khác nhau để xác định đột biến nhanh hơn phương pháp giải trình tự gen, nhưng ưu điểm mạnh nhất của phương pháp giải trình tự là cho phép xác định đột biến cụ thể của từng loại nucleotid trên từng vị trí một. Ví dụ cùng trên một vị trí đột biến X nào đó với nucleotid ban đầu là A có thể thay đổi thành T hoặc C hoặc G, thì chỉ có giải trình tự gen mới có thể xác định được chính xác như vậy. Do đó giải trình tự gen vẫn là phương pháp sử dụng phổ biến hiện nay để xác định các đột biến gen.

Trong bệnh UNBTKĐ, phương pháp giải trình tự gen để xác định đột biến gen được nhiều nghiên cứu sử dụng [90],[91],[92],[93], ví dụ các tác giả

như Jeffrey C Lee [62], Frederick Lori [63] sử dụng phương pháp giải trình tự để xác định các đột biến điểm trên gen EGFR, hay Vikki Rand [16] dùng phương pháp giải trình tự để xác định đột biến trên gen FGFR.



**Hình 1.20. Ảnh kết quả giải trình tự xác định đột biến gen FGFR**

*Nguồn: Rand et. al. PNAS. 2005;102,14344-14349.*

## **CHƯƠNG 2**

### **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **2.1. Đối tượng nghiên cứu**

Bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm được chẩn đoán xác định bằng lâm sàng và cận lâm sàng [2]; kèm kết quả giải phẫu bệnh (theo phân loại mô bệnh học UNBTKĐ của WHO năm 2007 [32]), sau phẫu thuật lấy u tại bệnh viện Việt Đức Hà Nội.

##### **2.1.1. Tiêu chuẩn chọn mẫu**

- Bệnh nhân UNBTKĐ có mẫu mô đúc paraffin có hình ảnh tổn thương của bệnh u nguyên bào thần kinh đệm theo phân loại mô bệnh học UNBTKĐ của WHO năm 2007 [32].

- Các mẫu mô có tiêu bản tương ứng kèm theo.

- Không có hình ảnh tổn thương trên tiêu bản là của bất kỳ một khối u, ung thư cơ quan nào khác UNBTKĐ.

- Có đầy đủ các thông tin nghiên cứu.

##### **2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ**

- Bệnh nhân không có mẫu mô và tiêu bản tương ứng

- Các mẫu mô có hình ảnh tổn thương trên tiêu bản là của bất kỳ một khối u, ung thư cơ quan nào khác UNBTKĐ.

- Không đầy đủ các thông tin nghiên cứu.

##### **2.1.3. 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 tương ứng với danh sách đã lập được.

- Lựa chọn mẫu mô đúc paraffin của người bệnh theo danh sách.

- Loại những người bệnh không có tiêu bản và mẫu mô ra khỏi danh sách.



- Soi tiêu bản mô bệnh học xác định vùng lấy mô: khoanh vùng lấy mô 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), loại các mẫu có hình ảnh của các u không phải UNBTKĐ.

- Đục lấy phân mô đã khoanh vùng (khoảng 50-100mg, vì cần khoảng 20mg mô cho một lần tách chiết DNA [86]) 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.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu mô tả cắt ngang

### **2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu**

Chọn mẫu có chủ đích, trong khoảng thời gian nghiên cứu lấy toàn bộ các mẫu đủ các tiêu chuẩn chọn mẫu, tiêu chuẩn loại trừ (mục 2.1.1 và 2.1.2).

Trong giới hạn thời gian nghiên cứu, chúng tôi lấy các mẫu có từ năm 2012 đến năm 2017 đủ các tiêu chuẩn chọn mẫu, tiêu chuẩn loại trừ, tổng số mẫu thu thập được là 70 mẫu, như vậy  $n = 70$  là số mẫu chúng tôi đưa vào nghiên cứu.

### **2.2.3. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất nghiên cứu:**

**Dụng cụ:** phải được vô trùng tuyệt đối (hấp 120°C trong 20 phút).

- Đầu côn các loại thể tích.

- Ống Eppendorf các loại thể tích.

**Thiết bị**

- Máy PCR (Eppendorf)
- Máy điện di: Mupid (Nhật Bản).
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động (Dolphin Chemi Wealtec, USA).
- Máy quang phổ kế Nano- Drop (Nhật Bản).
- Máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm các loại (Đức).
- Tủ lạnh âm sâu: -30°C và - 80°C (Sanyo-Nhật Bản).
- Máy điện di mao quản Beckman Coulter.
- Máy đọc trình tự gen ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (USA).

**Hóa chất nghiên cứu**

- *Hóa chất tách chiết DNA và tinh sạch DNA:*

- + Kít tách chiết DNA từ mô: Therascreen RGQ PCR Kit (QIAGEN-Đức).
- + Kít tinh sạch DNA từ gel (Hãng QIAGEN-Đức).
- + Tên hóa chất trình bày ở phụ lục 1

- *Hóa chất dùng cho phản ứng PCR:* (Hãng QIAGEN-Đức)

- + Enzym Taq DNA polymerase 1000U.
- + Hỗn hợp Taq PCR Microsatellite
- + Nucleotid tự do dNTP, PCR grade (250 $\mu$ l).
- + Sử dụng các cặp môi được gắn với chất huỳnh quang đặc hiệu.

- *Hóa chất dùng cho điện di gel agarose*

- + Dung dịch đệm TBE 1X gồm: trise base, boric acid, EDTA
- + Bột agarose
- + Thang chuẩn DNA 100bp (Marker 100bp): có khoảng cách giữa các

thang DNA điện di là 100bp

- + Dung dịch ethidium bromide 10mg/mL

- *Hoá chất để giải trình tự gen:* ABI/ Mỹ

- + Đệm Big dye 5X (ABI/ Mỹ)                                   + EDTA
- + Big dye Terminator v3.1 (ABI/ Mỹ)                   + Hi-Di formamide (ABI/ Mỹ)

- *Hóa chất nhân bản DNA dò: (kit hãng MRC- Hà Lan)*

kit SALSA MLPA P105-D2 bao gồm các thành phần:

- + Dung dịch đệm MLPA
- + Enzym nối Ligase - 65
- + Đệm A - 65
- + Đệm B - 65
- + Hỗn hợp mồi P105
- + Enzym Taq polymerase
- + Dung dịch đệm Enzyme

- *Hóa chất điện di mao quản: ABI/ Mỹ*

- + Dung dịch nạp mẫu: Sample Loading Solution (SLS),
- + Thang chuẩn: Size Standard 600 (SS600)
- + Gel phân tách: Separation Gel
- + Đệm phân tách: Separation Buffer

#### **2.2.4. Các bước nghiên cứu**

##### **1/ Bước 1. Thu thập mẫu nghiên cứu**

+ Thu thập các mẫu mô bệnh đúc paraffin theo tiêu chuẩn chọn mẫu, cách chọn mẫu (trong mục 2.1.1; 2.1.3).

+ Thu thập bệnh án nghiên cứu theo danh sách

+ Thu thập các thông tin nghiên cứu khác qua gọi điện cho người thân.

##### **2/ Bước 2. Tách DNA và bảo quản - 20°C:**

- Nguyên tắc kỹ thuật tách DNA: sự tách chiết DNA dựa trên nguyên tắc hòa tan khác nhau của các phân tử khác nhau (nucleic acid/protein) trong hai pha không hòa tan (phenol, chloroform/nước).

- Thực hiện theo đúng quy trình kỹ thuật tách chiết DNA từ mẫu mô paraffin (phụ lục 1).

- Đo nồng độ DNA tổng số sau tách chiết DNA, đảm bảo có DNA với nồng độ khoảng  $\geq 25$  ng/ $\mu$ l, độ tinh sạch khoảng 1,8 - 2,0. Nếu nồng độ và độ tinh sạch không đảm bảo cần tách chiết lại đến khi đảm bảo để chạy được PCR.

- Nếu chưa sử dụng cần lưu trữ và bảo quản DNA trong tủ âm ( $< 0^{\circ}\text{C}$ ).

### 3/ Bước 3. Nhân bản các exon của các gen nghiên cứu cần xác định các đột biến (gen TP53, gen FGFR, gen EGFR).

- Nguyên tắc kỹ thuật: dựa trên cơ sở tính biến tính, hồi tính của DNA, và hoạt tính của các DNA polymerase có khả năng tổng hợp 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 [86].

- Sử dụng các cặp môi đặc hiệu tương ứng các exon trên các gen để nhân bản từng exon nghiên cứu, nguồn gốc môi: các cặp môi 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, môi nhân bản exon 7+8 gen TP53 dựa theo công thức môi trong nghiên cứu Roger H. Frankel (1992) [94]... , môi nhân bản gen dạng EGFRvIII của hãng MRC Hà Lan thiết kế.

**Bảng 2.1. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu**

Gen	Exon	Trình tự môi	Kích thước sản phẩm base pair (bp)	Hãng sản xuất
<b>TP53</b>	7+8	Môi xuôi 5'- GGTTGGGAGTAGATGGAGCC-3'	495	IDT Mỹ
		Môi ngược 5'-ATGCCCAATTGCAGGTA -3'		
<b>EGFR</b>	2	Môi xuôi 5'- GG ACC TTG AGG GAT TGT TT-3'	312	IDT Mỹ
		Môi ngược 5'- CTT CAA GTG GAA TTC TGC CC-3'		
	3	Môi xuôi 5'- TTAGGGTTCAACTGGGCGTC-3'	321	IDT Mỹ
		Môi ngược: 5'- AGCCTTCTCCGAGGTGGAAT-3'		
	7	Môi xuôi 5'-GCT TTC TGA CGG GAG TCA AC-3'	296	IDT Mỹ
	Môi ngược 5'-AGA CAG AGC GGG AAC AGG AT-3'			
<b>EGFR</b>	8	Môi xuôi 5'-CT TCC ATC ACC CCT CAA GA-3'	261	IDT Mỹ
		Môi ngược 5'-CTC AGC AGC CGA GAA CAA-3'		
	Bộ 10 exon	Các môi exon 2,3,4,5,6,7,8,13,16,23 trong 1 kit		MRC Hà Lan
<b>FGFR</b>	12	Môi xuôi 5'-GCAGATGCATCCAGATGGTA-3'	617	IDT Mỹ
		Môi ngược 5'-TCTCCATTCATGGCCACATA-3'		
<b>FGFR</b>	13	Môi xuôi 5'-TGTGAAGAAGAACAAGCCTGC-3'	527	IDT Mỹ
		Môi ngược 5'-AGAACTCCGTGAGATCGTGC-3'		

- Các cặp mồi sử dụng để nhân bản các exon trong xác định xóa đoạn gen ở dạng các đầu dò, được thiết kế để xác định số lượng bản sao các exon của gen EGFR và gen EGFRvIII trong bệnh UNBTKĐ: bao gồm các đầu dò xác định exon 1 (tên thăm dò MRC-Holland: 2062-L3282) exon 2 (5435-L4851), exon 3 (5436-L4852), exon 4 (5437-L4853), exon 5 (5438-L6027), exon 6 (6121-L6286), exon 7 (5440-L4856), exon 8 (2063-L3283), exon 13 (5441-L5612), exon 16 (2064-L1577) và exon 23 (5968-L5385). Kèm theo là 12 đầu dò tham khảo và bắt buộc phải có hình ảnh trên sản phẩm điện di trong các mẫu.

- Sử dụng quy trình kỹ thuật nhân bản DNA dò (MLPL), để xác định đột biến dạng EGFRvIII (phụ lục 4).

- Thực hiện theo đúng quy trình kỹ thuật PCR (phụ lục 2), để nhân bản các exon trên gen xác định đột biến điểm.

#### 4/ Bước 4. Điện di sản phẩm PCR

\* *Điện di trên gel arogase:*

- Mục đích: kiểm tra sản phẩm PCR sử dụng cho việc giải trình tự

- Yêu cầu: chạy điện di trên gel arogase, đảm bảo băng điện di rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước bằng với mẫu chuẩn [86].

- **Nguyên tắc kỹ thuật:** điện di là hiện tượng các phân tử mang điện dịch chuyển trong điện trường dưới tác dụng của dòng điện, phân tử tích điện âm di chuyển về cực (+) và phân tử tích điện dương dịch chuyển về cực (-). Acid nucleic là phân tử mang điện tích âm nhờ khung phosphat của mình, dưới tác dụng của dòng điện một chiều acid nucleic sẽ di chuyển về cực dương. Các đoạn DNA có kích thước khác nhau sẽ di chuyển khác nhau. Tùy mục đích, có thể sử dụng các chất giá khác nhau để điện di DNA, phổ biến nhất là sử dụng gel agarose.

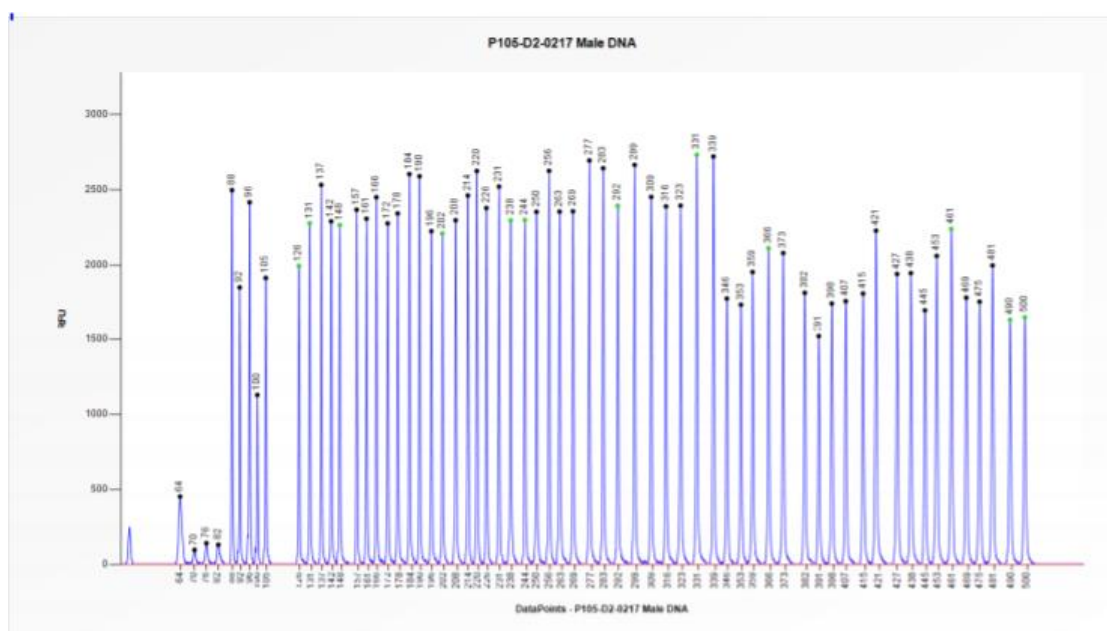
- Quy trình kỹ thuật: thực hiện theo đúng quy trình kỹ thuật (phụ lục 2)

- Nếu chưa sử dụng cần lưu trữ, bảo quản sản phẩm PCR trong tủ âm (< 0°C).

### + Điện di mao quản:

- Nguyên tắc kỹ thuật: điện di mao quản (CE - capillary electrophoresis) là một kỹ thuật tách các chất trong dung dịch lỏng dựa trên sự di chuyển khác nhau của các phân tử chất (mang điện tích) trong cột mao quản dưới ảnh hưởng của điện trường tạo bởi điện áp cao thế (15 - 30 kV) đặt vào hai đầu mao quản.

- Quy trình kỹ thuật: thực hiện đúng quy trình chạy điện di mao quản (phụ lục 4).



**Hình 2.1. Hình ảnh kết quả chạy điện di mao quản mẫu DNA chuẩn của người nam (sử dụng bộ kit SALSA MLPA P105 của hãng hóa chất MRC-Hà Lan sản xuất; hình ảnh do hãng hóa chất cung cấp)**

+ Yêu cầu: hình ảnh điện di rõ, mẫu chuẩn chứa đủ 55 đỉnh tương ứng 55 đầu dò MLPA (đối với chuẩn nam), chứa 54 đỉnh (đối với chuẩn nữ): gồm các sản phẩm nhân bản từ 126 đến 500 nucleotid, 9 đoạn điều khiển tạo ra một sản phẩm nhân bản nhỏ hơn 120 nucleotid: bốn mảnh DNA (Q-fragments) tại vị trí 64-70-76-82 nucleotid, ba đoạn điều khiển biến tính DNA (Dfragments) tại vị trí 88-92-96 nucleotid, một mảnh X ở vị trí 100 nucleotid và một mảnh Y ở vị trí

105 nucleotid. Trong đó có 12 đỉnh tương ứng 12 đầu dò để kiểm soát về độ nhạy và độ đặc hiệu (vị trí và kích thước/ nghĩa là các đỉnh này bắt buộc phải hiển thị trên hình ảnh điện di mao quản trong các mẫu).

- Kết quả điện di được đọc trên máy tính, đảm bảo đúng các tiêu chuẩn của phương pháp đo, các đỉnh điện di rõ nét, tất cả các đỉnh chuẩn phải rõ ràng, đạt kích thước cho phép.

#### **5/ Bước 5. Giải trình tự với các cặp mỗi tương ứng.**

- **Nguyên tắc kỹ thuật:** giải trình tự gen (DNA sequencing) là phương pháp xác định vị trí sắp xếp của các nucleotid trong phân tử DNA, dựa trên nguyên tắc sử dụng các nucleotid tự do ddNTP do F.Sanger và cộng sự phát minh [88]. Dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP, qua hệ thống 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 diện được là nucleotid nào, từ đó biết được trình tự của DNA đích.

- Thực hiện theo đúng quy trình kỹ thuật giải trình tự (phụ lục 3).

- Kết quả giải trình tự đảm bảo rõ nét, các đỉnh nucleotid rõ, không đứt đoạn, không nhiễu.

#### **6/ Bước 6. Phân tích kết quả**

##### **\* Kết quả giải trình tự**

- Đọc kết quả giải trình tự các exon và so sánh tương ứng với mẫu chuẩn trên Gen - Bank bằng phần mềm CLC Main Workbench 6.0.1.

- Trình tự nucleotid trên các exon được đọc bằng các tín hiệu huỳnh quang dựa trên nguyên tắc cảm quang, biểu hiện bằng trình tự các đỉnh sóng với mỗi loại nucleotid A, T, G, C lần lượt tương ứng với một màu khác nhau xanh lá, đỏ, đen, xanh dương. Bình thường mỗi vị trí nucleotid chỉ tương ứng 1

đỉnh sóng 1 màu, khi có sự biến đổi về nucleotid, sẽ xuất hiện 2 sóng trên cùng một vị trí hoặc mất hẳn sóng chính và thay bằng đỉnh sóng của một loại nucleotid khác. Kết quả của giải trình tự gen được thể hiện bằng hình ảnh là các đỉnh sóng liên tiếp nhau tương ứng với trình tự của các nucleotid trên exon.

- Nếu mẫu nào không đạt (nhiều, không đọc được kết quả), cần tinh sạch lại sản phẩm PCR và giải trình tự lại đến khi đọc được kết quả. Nếu vẫn không được cần làm lại PCR (bước 3), không được thì cần tách lại DNA (bước 2). Có thể chạy giải trình tự bằng môi ngược nếu môi xuôi kết quả vẫn không đọc được.

### **\* Phân tích kết quả xóa đoạn dạng EGFRvIII**

Phân tích kết quả bằng công cụ Coffalyser chuyên biệt (được cung cấp bởi hãng MRC - Hà lan).

*Nguyên tắc:* 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. Thời gian, địa điểm nghiên cứu**

### **2.3.1. Thời gian nghiên cứu**

Thời gian nghiên cứu từ tháng 11/2015 đến tháng 12/2018.

### **2.3.2. Địa điểm nghiên cứu**

- Bộ môn Hóa sinh trường Đại học Y Hà Nội.
- Khoa Giải phẫu bệnh, Phòng Kế hoạch tổng hợp Bệnh viện Việt Đức.
- Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

## **2.4. Xử lý số liệu**

\* Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê y học dựa vào phần mềm thống kê SPSS 19.0.



- Tất cả các số liệu được nhập vào máy tính, làm sạch số liệu.
- Sử dụng test đánh giá một số đặc điểm của đột biến gen trong bệnh UNBTKĐ.
  - + Test T-student: các bảng có  $n > 5$
  - + Test Fisher Exact: các bảng có  $n \leq 5$
  - \* Đọc kết quả giải trình tự bằng phần mềm CLC Main Workbench 6.0.1.
  - \* Phân tích kết quả xóa đoạn gen bằng công cụ Coffalyser chuyên biệt (được cung cấp bởi hãng MRC - Hà Lan).

## **2.5. 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.

- Mẫu vật nghiên cứu được lấy từ các mẫu mô sau mổ, hoàn toàn không ảnh hưởng đến quá trình điều trị hay kết quả điều trị và đời sống sau này của người bệnh.

- Các mẫu được lấy có sự đồng ý của Ban Giám đốc bệnh viện, Phòng kế hoạch tổng hợp và Khoa Giải phẫu bệnh của bệnh viện Việt Đức.

- Tất cả các thông tin về người bệnh chỉ phục vụ công tác nghiên cứu và được giữ kín tuyệt đối.

- Người bệnh và người nhà không phải trả bất cứ kinh phí nào khi tham gia đề tài.

## **2.6. Biện pháp tránh sai số**

- Sai số mẫu mô

Cách khắc phục: tập huấn kỹ cho nhóm lấy mẫu, chọn mẫu đúng tiêu chuẩn chọn mẫu đã đề ra. Để tránh sai số do lấy không đúng phần mô có các tế bào u, cần chọn phần mô để tách DNA tại vùng có các tế bào u đang phát triển mạnh nhất trong tổ chức u, ít tổ chức hoại tử nhất có thể (nhận biết qua soi tiêu bản cắt ngang vùng u đang phát triển mạnh), theo tiêu chuẩn lấy mẫu mô đúc paraffin của Bệnh viện Việt Đức.

- Nồng độ DNA thấp, độ tinh sạch không đạt chuẩn

Cách khắc phục: tách chiết lại đến khi đạt tiêu chuẩn.

- Sai quy trình kỹ thuật

Cách khắc phục: các qui trình kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu cần chuẩn hóa trước. Khi thực hiện kỹ thuật PCR: đảm bảo mỗi lần chạy mẫu cần chạy kèm 1 chứng âm (lấy nước cất làm mẫu), và kèm 1 chứng dương (là mẫu đã được chuẩn hóa, giải trình tự và đã được đọc kết quả sau so sánh với trình tự chuẩn trên gen bank, đảm bảo chính xác là trình tự của các exon tương ứng trên gen).

- Sai kết quả giải trình tự: do tinh sạch mẫu chưa tốt gây nhiều kết quả.

Cách khắc phục: thực hiện kỹ thuật giải trình tự cần lưu ý bước tinh sạch mẫu, nếu sau giải trình tự bị nhiễu không đọc được cần tinh sạch lại và giải trình tự lại cho đến khi đọc được kết quả, trình tự mẫu giải được phải tương ứng trình tự mẫu trên Gen Banks.

- Sai thông tin nghiên cứu

Cách khắc phục: ghi chép đầy đủ thông tin lấy từ bệnh án theo mẫu phiếu đã thống nhất cho tất cả người bệnh. Các thông tin qua gọi điện phải hỏi người thân cận nhất của người bệnh như: vợ, chồng, con, bố mẹ ... về các đặc điểm thời gian sống chết, tiền sử phẫu thuật lần trước, thời gian điều trị xạ trị, hóa chất sau phẫu thuật và ghi chép đầy đủ.

## **2.7. Kinh phí thực hiện đề tài**

Đề tài được thực hiện với sự hỗ trợ một phần kinh phí của đề tài: ***“Nghiên cứu xác định đột biến một số gen trong bệnh U nguyên bào thần kinh đệm”*** thuộc đề tài cấp Bộ Y tế năm 2014, quyết định số 4214/QĐ-BYT ngày 16/10/2014 của Bộ trưởng bộ Y tế.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Qua nghiên cứu xác định tình trạng đột biến gen TP53, EGFR, FGFR ở 70 mẫu mô của 70 người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm sau phẫu thuật tại bệnh viện Việt Đức, chúng tôi thu được kết quả như sau:

#### 3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

##### 3.1.1. Đặc điểm về tuổi

Chúng tôi chia tuổi theo cách chia các giai đoạn tuổi của tổ chức CBTRUS Hoa kỳ [4].

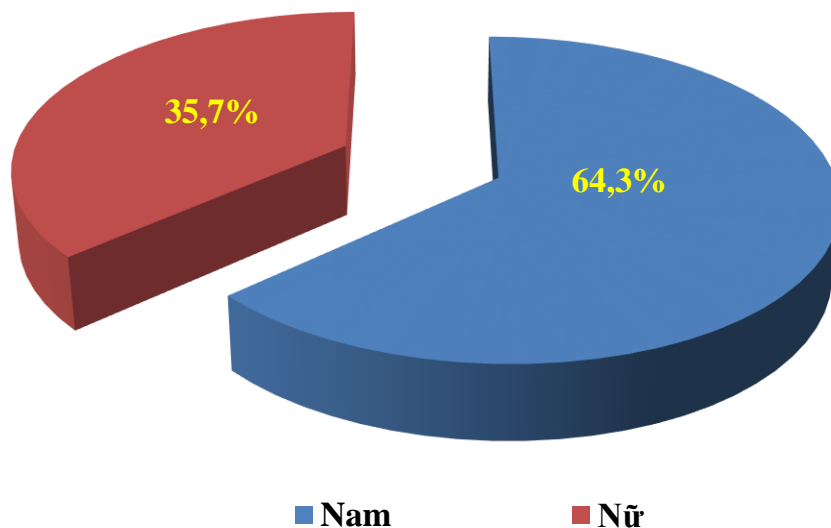
**Bảng 3.1. Đặc điểm về tuổi của người bệnh trong nghiên cứu**

Giai đoạn tuổi	n	%
0-19	3	4,3
20-34	11	15,7
35-44	10	14,3
45-54	13	18,6
55-64	22	31,4
65-74	9	12,9
≥ 75	2	2,9
Tổng	70	100
$\bar{X} \pm SD$ (min - max)	49,6 ± 15,8 (5 - 78)	

- Tuổi trung bình là  $49,6 \pm 15,8$ ; trong đó tuổi thấp nhất là 5 tuổi, cao nhất là 78 tuổi.

- Có 22/70 bệnh nhân có độ tuổi từ 55 đến 64 tuổi, chiếm tỷ lệ cao nhất (31,4%); có 13/70 bệnh nhân tuổi từ 45 đến 54 cao thứ 2 (18,6%), tỷ lệ cao thứ ba là lứa tuổi từ 20 đến 34 tuổi, dưới 20 tuổi có 3 trường hợp chiếm 4,3% trong đó có một trẻ 5 tuổi; thấp nhất là 2/70 (2,9%) bệnh nhân tuổi trên 75.

### 3.1.2. Đặc điểm về giới



**Hình 3.1. Đặc điểm về giới của người bệnh trong nghiên cứu**

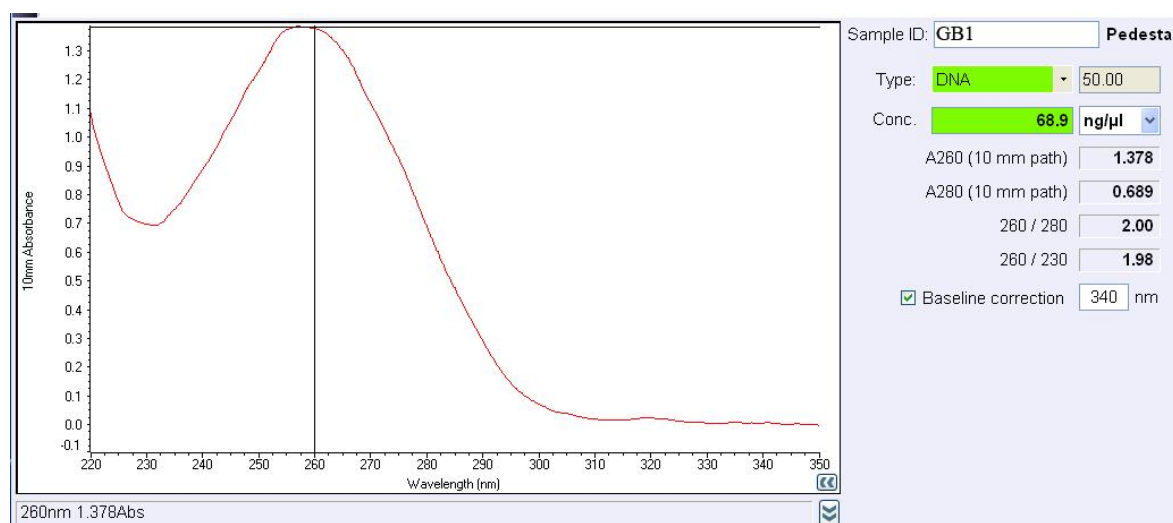
- Có 64,3% là nam giới và 35,7% nữ giới.

- Tỷ lệ nam/nữ  $\approx 1,8$ .

## 3.2. Kết quả xác định một số đột biến trên gen TP53, EGFR, FGFR ở người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm

### 3.2.1. Kết quả tách chiết DNA từ mẫu mô paraffin.

70 mẫu mô nghiên cứu được thực hiện tách DNA theo đúng quy trình, sau đó kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch DNA bằng máy Nanodrop.



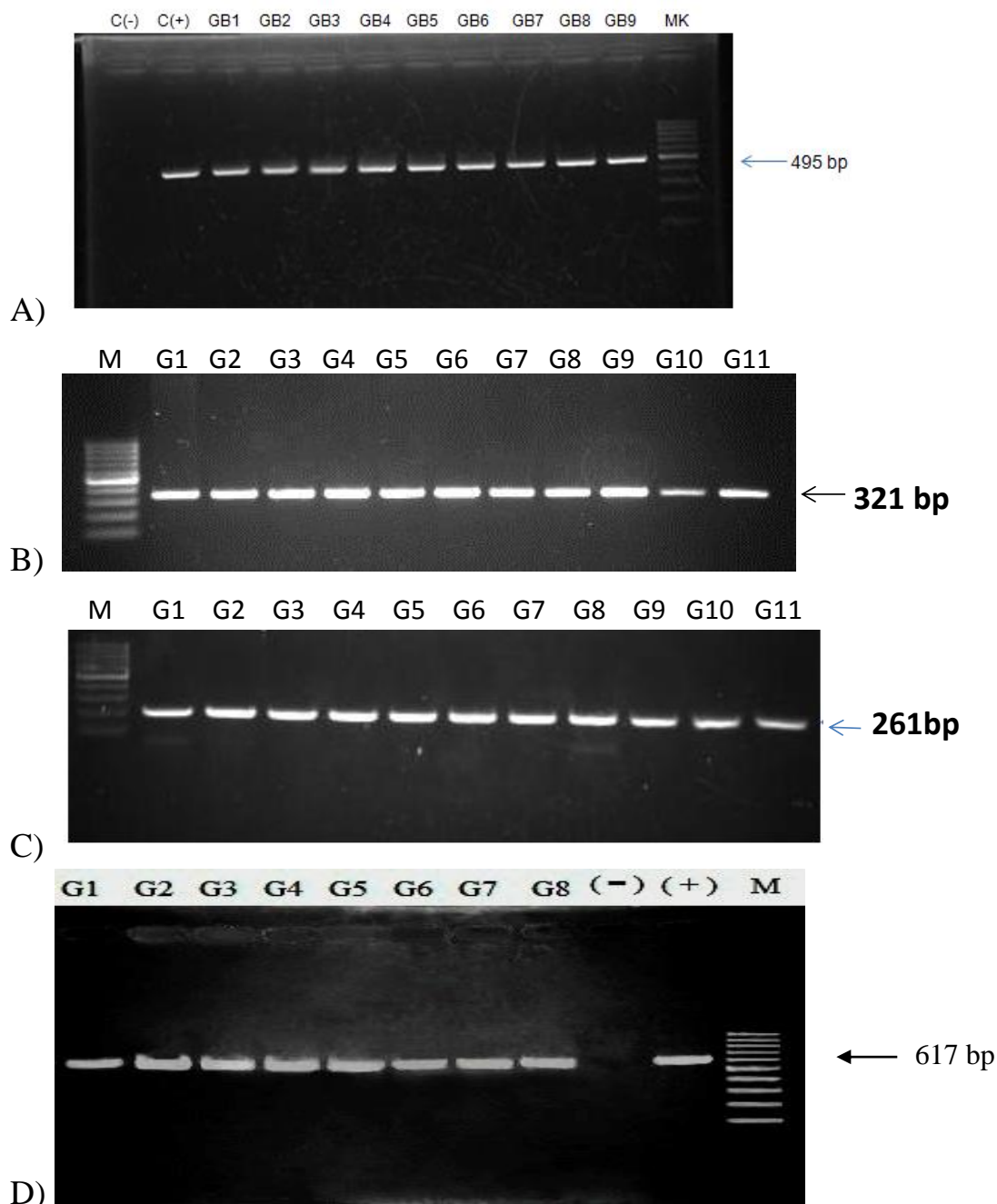
**Hình 3.2. Hình ảnh minh họa kết quả đo OD của mẫu DNA tách chiết bằng máy Nanodrop 1000**

Kết quả đo quang nồng độ DNA của 70 mẫu mô, đều có nồng độ đạt > 25ng/μl và độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm luôn nằm trong khoảng 1,8-2,0.

Trước khi tiến hành giải trình tự gen, thông thường cần có bước tinh sạch mẫu, để giảm tối đa các tạp chất trong mẫu, giảm ảnh hưởng kết quả, tránh phải giải lại gây tốn kém. Nếu bất kỳ mẫu nào có hình ảnh giải trình tự bị nhiễu, không đọc được kết quả, bắt buộc phải làm lại PCR của mẫu đó và giải trình tự lại đến khi thu được hình ảnh để đọc được [86].

Các mẫu có sản phẩm DNA sau nhân bản bằng PCR được tinh sạch và giải trình tự theo phương pháp giải trình tự trực tiếp bằng máy.

**3.2.2. Một số hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản các exon nghiên cứu của gen TP53, EGFR, FGFR**



**Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản các exon nghiên cứu: A) exon 7+8 gen TP53; B) exon 3 và C) exon 8 gen EGFR; D) exon 12 gen FGFR.**

*M: marker (kích thước các khoảng cách trên marker hơn kém nhau 100bp), (+): mẫu chứng dương chứa DNA chuẩn, (-): mẫu chứng âm không chứa khuôn DNA. Các chữ số trên mỗi giếng ký hiệu các mẫu nghiên cứu.*

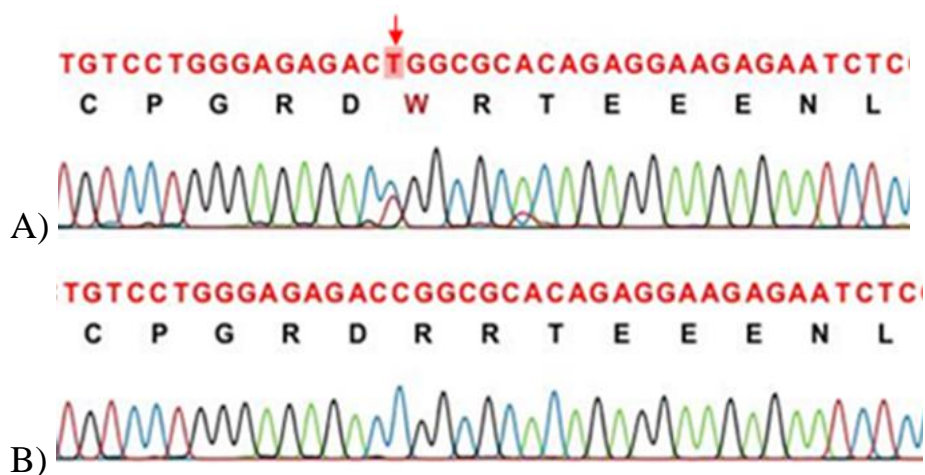
Kết quả trên cho thấy, mỗi mẫu điện di chỉ cho 1 băng sáng duy nhất, rõ nét, không có các băng phụ, kích thước đồng đều và có chiều dài tương ứng với kích thước tính toán trên lý thuyết, marker được phân tách rõ ràng cho phép nhận định kết quả chính xác. Phản ứng PCR đạt hiệu quả, sản phẩm PCR thu được đặc hiệu, đạt yêu cầu cho kỹ thuật giải trình tự gen.

Các exon của các gen nghiên cứu của 70 mẫu bệnh, sau nhân bản đều đạt yêu cầu cho việc giải trình gen.

### 3.2.3. Kết quả giải trình tự gen xác định đột biến trên gen TP53

Sau khi kiểm tra chất lượng và tinh sạch, sản phẩm PCR được giải trình tự bằng máy giải trình tự gen tự động. Kết quả được phân tích trên phần mềm CLC Genomics Workbench.

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



**Hình 3.4. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 8 gen TP53 có chứa đột biến điểm p.R282W**

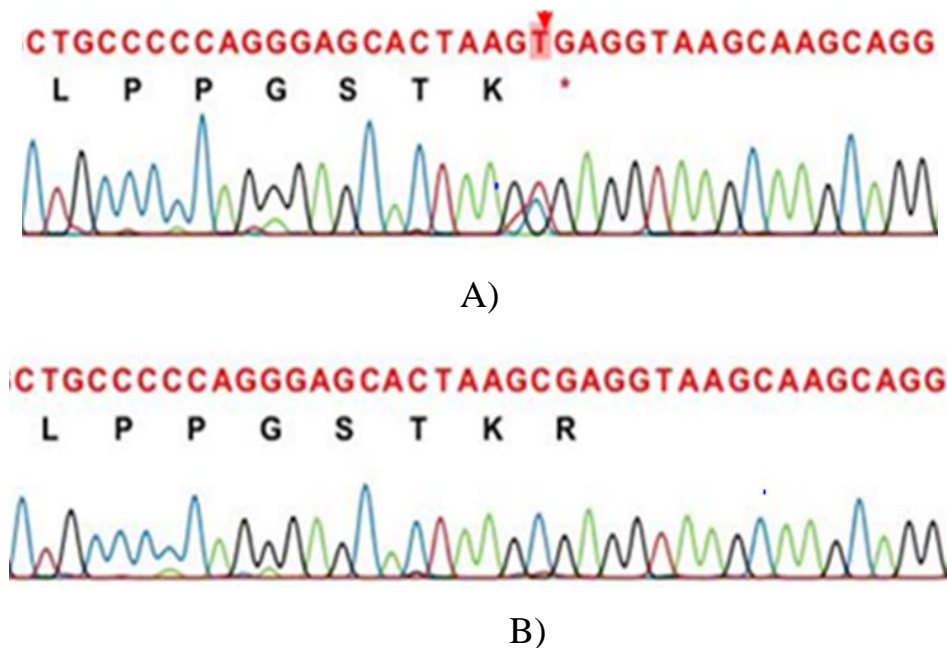
A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB31.

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. Kết quả thu được tương ứng với kết quả giải trình tự khi so sánh với Gen-Bank.

Mẫu bệnh phẩm mã số GB31 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. R306X trên exon 8 gen TP53**



**Hình 3.5. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 8 gen TP53 chứa đột biến điểm p.R306X**

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB11.

B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB8

Mẫu bệnh phẩm mã số GB11 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 916C>T dẫn đến ở vị trí codon thứ 306 bộ ba CGA mã hóa cho Arginine chuyển thành bộ ba TGA mã hóa cho Termination, ký hiệu p.R306X.

Các mẫu bệnh còn lại chưa phát hiện được đột biến nào trên exon 7 và exon 8 gen TP53.

### 3.2.4. Kết quả xác định đột biến trên gen EGFR

#### 3.2.4.1. Kết quả giải trình tự xác định đột biến điểm trên gen EGFR

Sản phẩm PCR của các exon 2, exon 3, exon 7 và exon 8 sẽ được tiến hành giải trình tự để phát hiện đột biến điểm trên gen EGFR. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench và so sánh với trình tự chuẩn của gen EGFR (NM\_005228) trên ngân hàng dữ liệu Gene Bank.

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 được trình bày trong bảng 3.2.



**Bảng 3.2. Kết quả phát hiện 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%).

Có 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%).

Có 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%).

Chưa phát hiện thấy đột biến trên exon 8 gen EGFR.

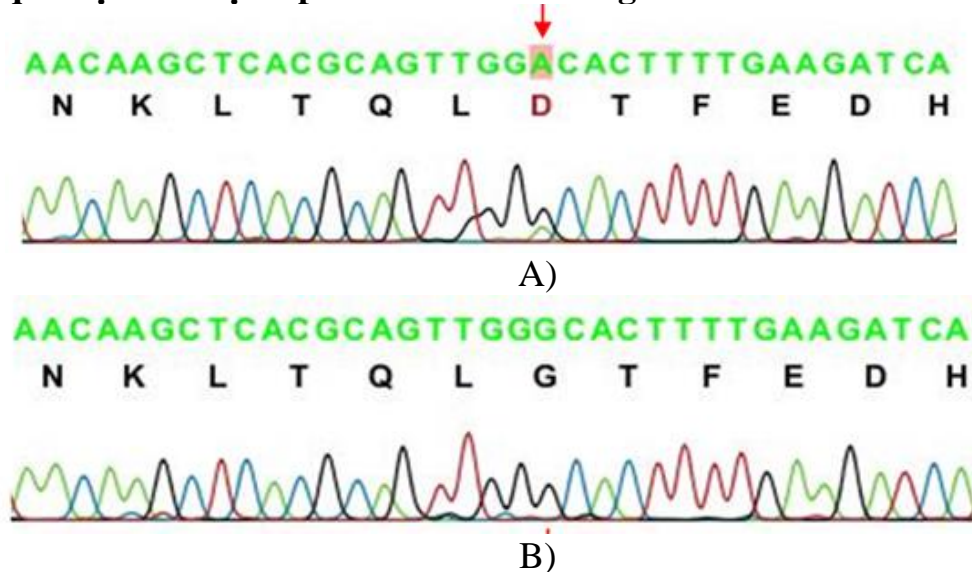
**Bảng 3.3. Tỷ lệ các dạng đột biến trên gen EGFR**

STT	Dạng đột biến	Exon	n	%
1	G42D	2	3	11,5
2	L62I	2	1	3,85
3	G87D	3	1	3,85
4	K129N	3	6	23,1
5	D262D	7	1	3,85
6	P272S	7	3	11,5
7	T274M	7	1	3,85
8	K284N	7	7	26,9
9	A289T	7	2	7,7
10	K293X	7	1	3,85
	Tổng		26	100%

Phát hiện 10 dạng đột biến điểm khác nhau, các dạng đột biến bao gồm 8 đột biến sai nghĩa P272S, G42D, T274M, L62I, A289T và 1 đột biến vô nghĩa K293X, 1 đột biến không thay đổi nghĩa. Tỷ lệ đột biến cao nhất là đột biến sai nghĩa. Trong số các đột biến dạng K284N chiếm tỷ lệ cao nhất 26,9%, thứ hai là đột biến K129N chiếm tỷ lệ 23,1%; tiếp theo là 2 đột biến G42D và P272S cùng có tỷ lệ 11,5%; đột biến A289T chiếm tỷ lệ 7,7%; các dạng đột biến còn lại chiếm tỷ lệ 3,85%.

\* Một số hình ảnh đại diện đột biến sau giải trình tự exon 2,3,7 gen EGFR

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



**Hình 3.6. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 2 gen EGFR chứa đột biến điểm p.G42D**

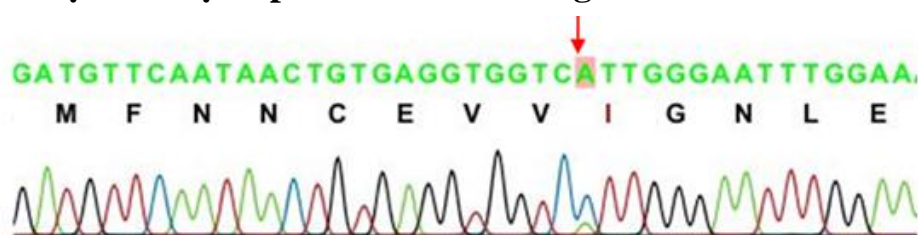
A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB26.

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

Mẫu bệnh phẩm mã số GB26 có 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.

Có 3 bệnh nhân mang đột biến gen dạng p.G42D.

+ Kết quả đột biến vị trí p.L62I trên exon 2 gen EGFR

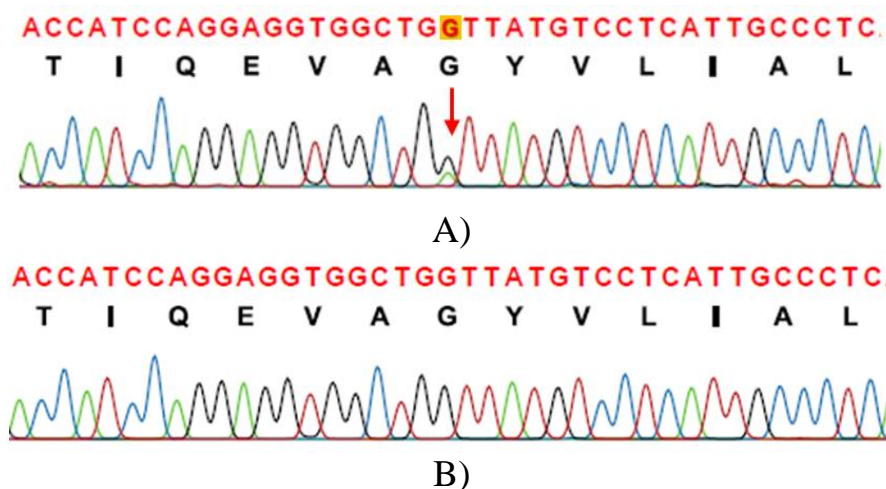


**Hình 3.7. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 2 gen EGFR chứa đột biến điểm p.L62I**

Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB25.

Mẫu GB25 ở vị trí 183 trên exon 2, có đỉnh A dưới đỉnh C, chứng tỏ có đột biến thay thế nucleotid 183C>A dẫn đến bộ ba thứ 62 CTT mã hóa cho Leucine chuyển thành ATT mã hóa cho Isoleucine, ký hiệu p.L62I.

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



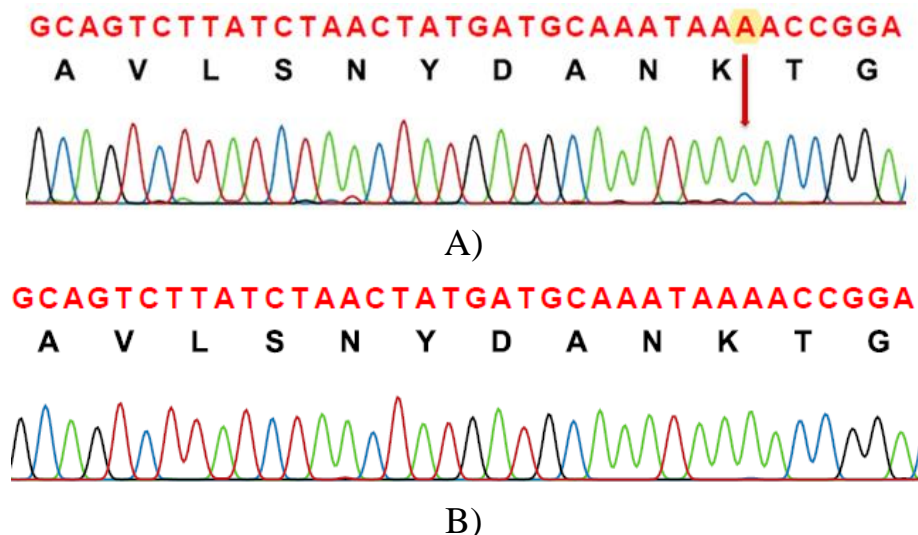
**Hình 3.8. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 3 gen EGFR chứa đột biến điểm p.G87D**

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

Kiểu đột biến nucleoid G>A tại vị trí 259 trên c.DNA, 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.K129N trên exon 3 gen EGFR**



**Hình 3.9. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 3 gen EGFR chứa đột biến điểm p.K129N**

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 GB50

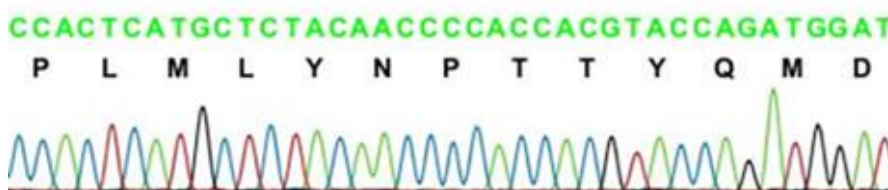
Kiểu đột biến nucleoid A>C tại vị trí 386 trên c.DNA, làm thay đổi acid amin lysine có bộ ba mã hóa là AAA thành arginine có bộ ba mã hóa là AAC tại vị trí 129 trên phân tử protein của EGFR, ký hiệu p.K129N.

Có 6 bệnh nhân mang đột biến gen kiểu p.K129N.

**+ Kết quả đột biến vị trí p.T274M trên exon 7 gen EGFR**



A)



B)

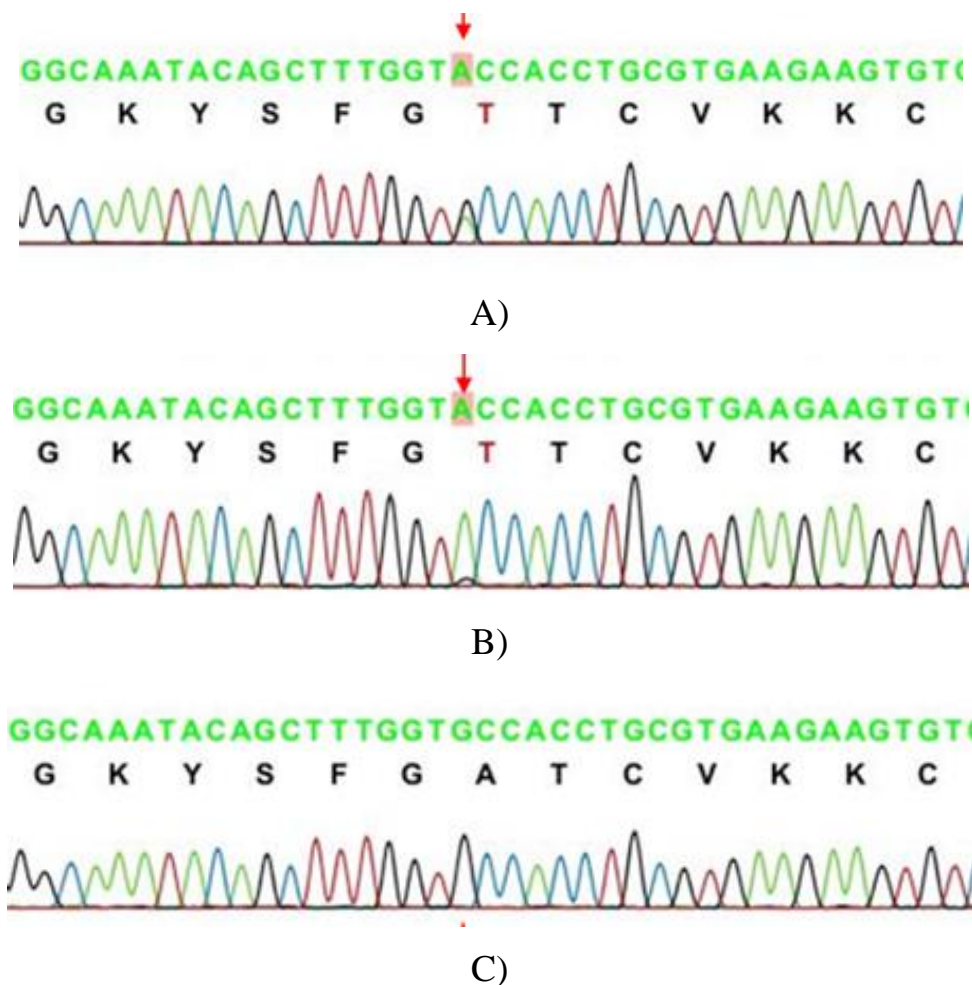
**Hình 3.10. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p.T274M**

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB24.

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

Mẫu bệnh phẩm mã số GB24 có đột biến thay thế nucleotid 820C>T dẫn đến bộ ba thứ 274 ACG mã hóa cho Threonine chuyển thành ATG mã hóa Methionine, ký hiệu p.T274M.

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



**Hình 3.11. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p.A289T**

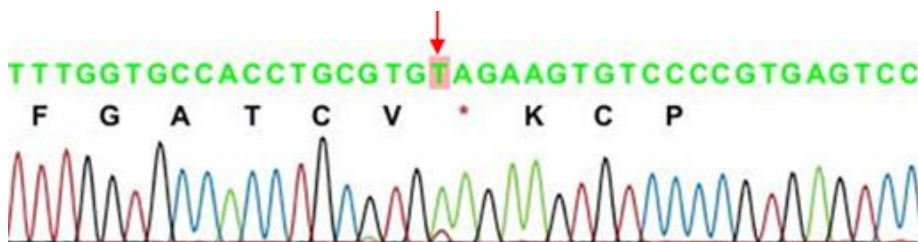
- A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB26  
 B) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB27  
 C) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB25

Mẫu bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB26 và GB27 có 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.

Bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB25 không có đột biến tại vị trí p.A289T.



+ Kết quả đột biến vị trí p.K293X trên exon 7 gen EGFR

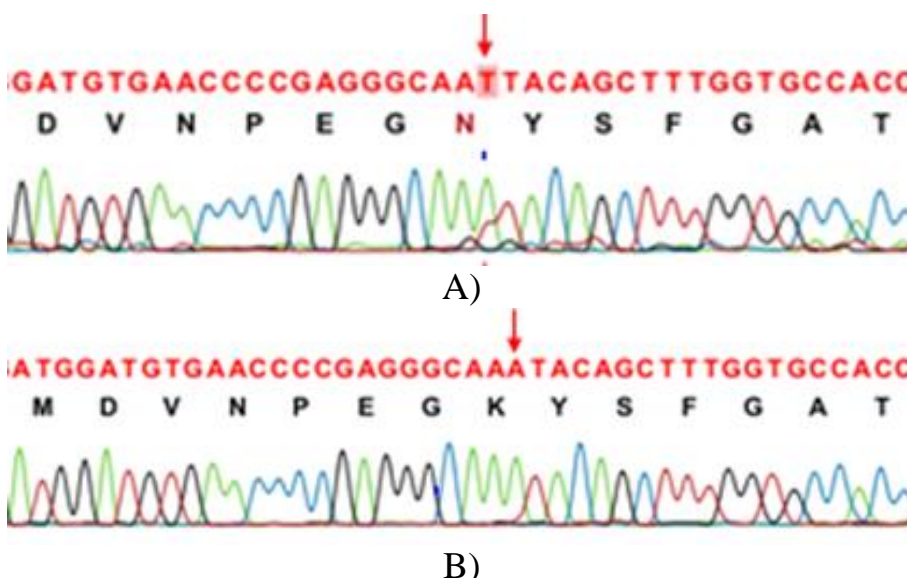


**Hình 3.12. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p. K293X**

Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB24

Mẫu bệnh phẩm mã số GB24 có đột biến thay thế nucleotid 877A>T dẫn đến bộ ba thứ 293 AAG mã hóa cho Lysine chuyển thành mã bộ ba kết thúc sớm TAG, ký hiệu p.K293X.

+ Kết quả đột biến vị trí p.K284N trên exon 7 gen EGFR



**Hình 3.13. Hình ảnh giải trình tự đoạn exon 7 gen EGFR chứa đột biến điểm p.K284N**

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB55

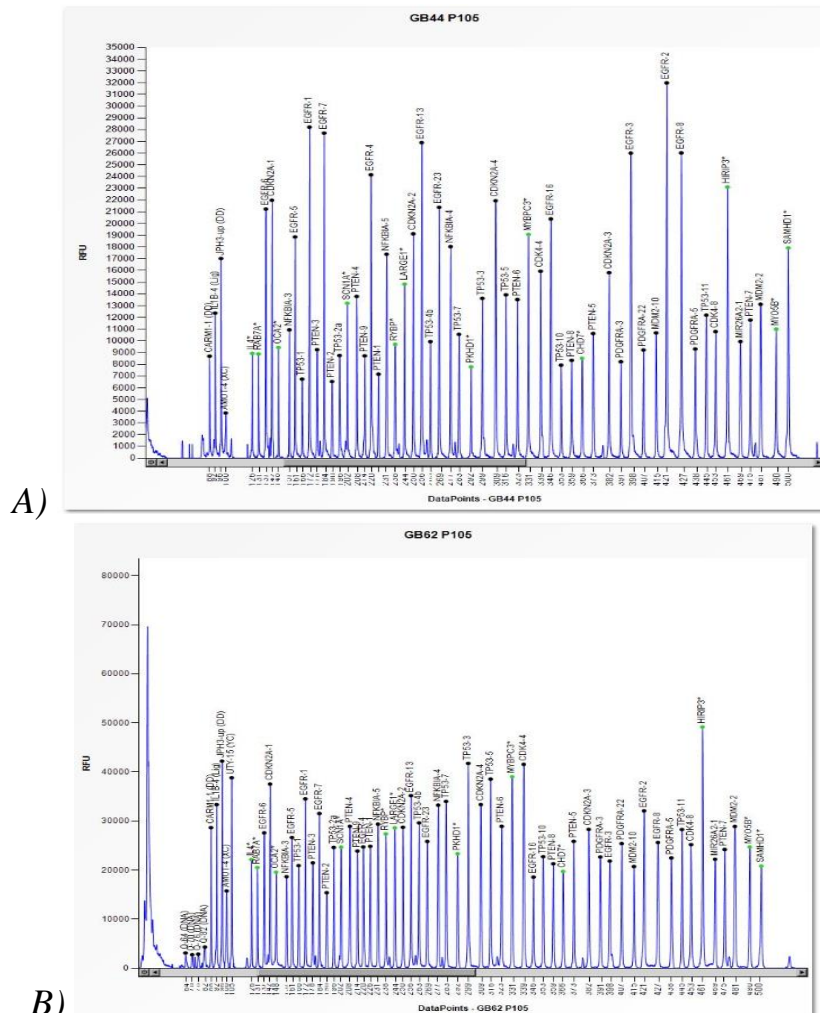
B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB54

Mẫu GB55 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid 851A>T dẫn đến ở vị trí codon thứ 284 bộ ba AAA mã hóa cho Lysine chuyển thành bộ ba AAT mã hóa cho Asparagine, ký hiệu: p.K284N, có 7 mẫu đột biến kiểu p.K284N.

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

Sau khi tách được DNA từ các mẫu mô, chúng tôi thực hiện khuếch đại các exon nghiên cứu bằng bộ kit SALSA MLPA P105 của hãng MRC-Hà Lan sản xuất, theo đúng quy trình (phụ lục 2). Sản phẩm cuối cùng được điện di mao quản trên hệ thống phân tích đoạn Beckman Coulter GeXP và phân tích kết quả bằng công cụ Coffalyser chuyên biệt.

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



**Hình 3.14. Hình ảnh điện di mao quản sản phẩm PCR xác định xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR**

A) Hình ảnh đại diện kết quả chạy điện di mao quản mẫu DNA của người bệnh UNBTKĐ mã số GB44 (mẫu nữ); B) Hình ảnh đại diện kết quả chạy điện di mao quản mẫu DNA của người bệnh UNBTKĐ mã số GB62 (mẫu nam)



- Hình ảnh điện di rõ, chứa đủ 55 đỉnh tương ứng 55 đầu dò MLPA đối với bệnh nhân nam, chứa 54 đỉnh với bệnh nhân nữ: gồm các sản phẩm nhân bản từ 126 đến 500 nucleotid, 9 đoạn điều khiển tạo ra một sản phẩm nhân bản nhỏ hơn 120 nucleotid: bốn mảnh DNA (Q-fragments) tại vị trí 64-70-76-82 nucleotid, ba đoạn điều khiển biến tính DNA (Dfragments) tại vị trí 88-92-96 nucleotid, một mảnh X ở vị trí 100 nucleotid và một mảnh Y ở vị trí 105 nucleotid. Trong đó có 12 đỉnh tương ứng 12 đầu dò để kiểm soát về độ nhạy và độ đặc hiệu (vị trí và kích thước/ nghĩa là các đỉnh này bắt buộc phải hiển thị trên hình ảnh điện di mao quản trong các mẫu).

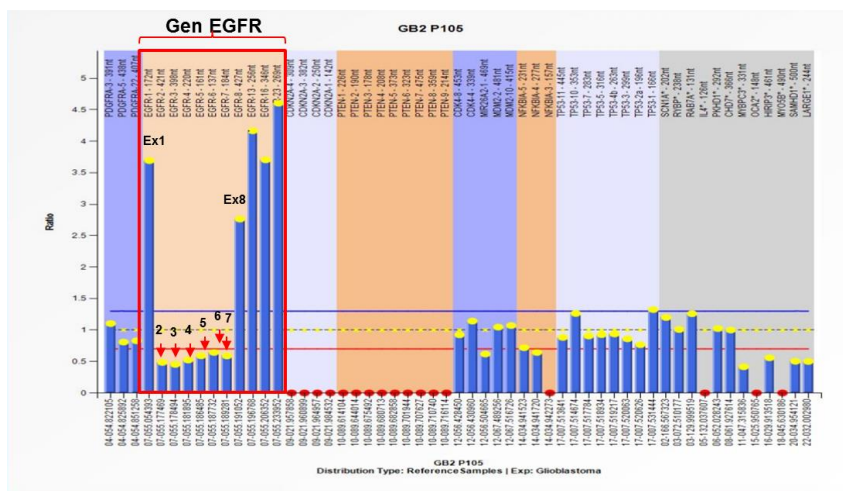
- Hình ảnh điện di mao quản của mã người bệnh GB44 và GB62 có các đỉnh rõ, đạt tiêu chuẩn phân tích kết quả.

- Sau chạy điện di 70 mẫu cho thấy, hình ảnh điện di của 70 mẫu nghiên cứu đều đạt yêu cầu để phân tích kết quả.

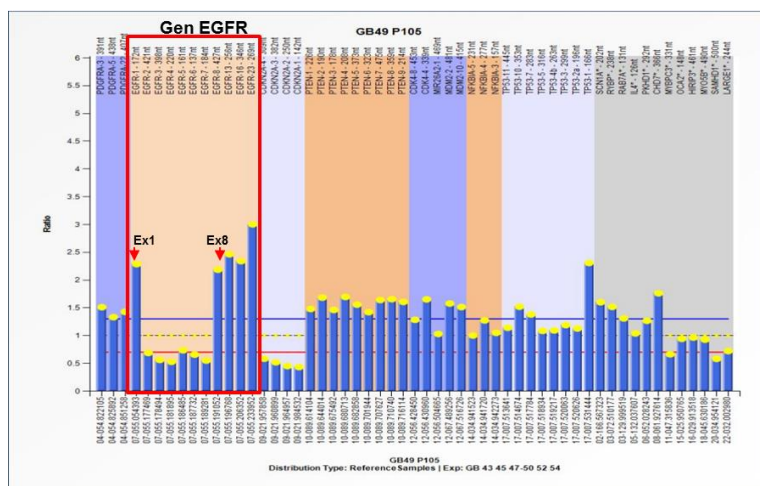
**\* *Kết quả phân tích số bản sao của các exon từ 2 đến 7 gen EGFR***

Sau chạy điện di mao quản trên hệ thống phân tích đoạn Beckman Coulter GeXP, 70 mẫu được phân tích bằng công cụ Coffalyser chuyên biệt theo khuyến cáo của hãng MRC-Hà Lan cho kit SALSA MLPA P105, được thể hiện trên hình ảnh phân tích:

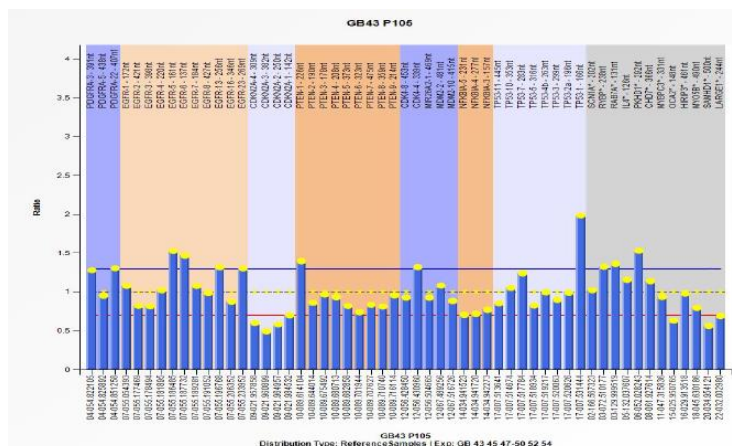
A)



B)



C)



**Hình 3.15. Hình ảnh kết quả phân tích xác định độ biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR**

- A) Mẫu đại diện có độ biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB2
- B) Mẫu đại diện có độ biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB49
- C) Mẫu đại diện không có độ 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 tỏ có xóa đoạn gen ở các mẫu bệnh GB2, GB49.

- Sau phân tích 70 mẫu bệnh UNBTKĐ, kết quả phát hiện 6 mẫu có đột biến xóa đoạn gen, được trình bày ở bảng (3.4).

### 3.2.4.3. Các dạng xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR

**Bảng 3.4. Kiểu xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR**

STT	Mã số người bệnh	Kiểu xóa đoạn	n	%
1	GB2	Exon 2 đến exon 7	5/70	7,2
2	GB30			
3	GB37			
4	GB49			
5	GB66			
6	GB24	Exon 4 đến exon 7	1/70	1,4
<b>Chung</b>			<b>6/70</b>	<b>8,6</b>

- Phát hiện 6 mẫu có xóa đoạn gen, chiếm tỉ lệ 8,6%: trong đó 5/6 mẫu có xóa đoạn dạng EGFRvIII (chiếm 7,2%), có 1/6 mẫu có kiểu xóa đoạn từ exon 4 đến exon 7 (chiếm 1,4%).

- Còn lại 64 mẫu DNA của 64 người bệnh UNBTKĐ chưa phát hiện ra có đột biến xóa đoạn qua xác định bằng kit SALSA P105 theo phương pháp MLPA.

### 3.2.4.4. Tổng hợp số lượng đột biến từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR

**Bảng 3.5. Tổng hợp số lượng đột biến từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR**

Exon	Loại đột biến	Tỷ lệ	
		n	%
2	Đột biến điểm	4	12,9
3	Đột biến điểm	7	22,6
7	Đột biến điểm	14	45,2
8	Đột biến điểm	0	0
Từ 2 đến 7	Đột biến xóa	5	16,1
Từ 4 đến 7	Đột biến xóa	1	3,2
<b>Chung</b>		<b>31/70</b>	<b>100</b>

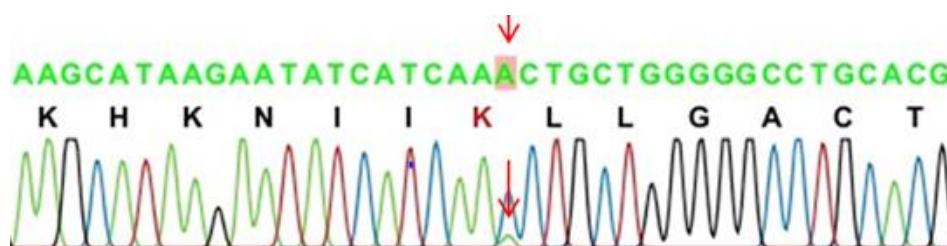
Phát hiện 31 đột biến trên gen EGFR: trong đó đột biến điểm trên exon 7 chiếm cao nhất (45,2%), đứng thứ 2 là đột biến điểm trên exon 3 (22,6%), tiếp theo là đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7 (16,1%) và đột biến điểm trên exon 2 (12,9%), thấp nhất là xóa từ exon 4 đến exon 7 (3,2%).

Chưa phát hiện thấy đột biến nào trên exon 8 của gen EGFR.

### 3.2.5. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến trên exon 12 và exon 13 gen *FGFR*

Sản phẩm nhân bản exon 12 và exon 13 gen *FGFR* được giải trình tự và so sánh kết quả với trình tự chuẩn trên GeneBank bằng phần mềm CLC Main Workbench.

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



A)



B)

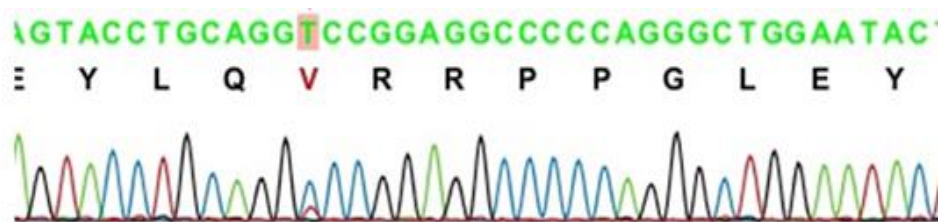
**Hình 3.16. Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 12 gen *FGFR* chứa đột biến điểm p.N546K**

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

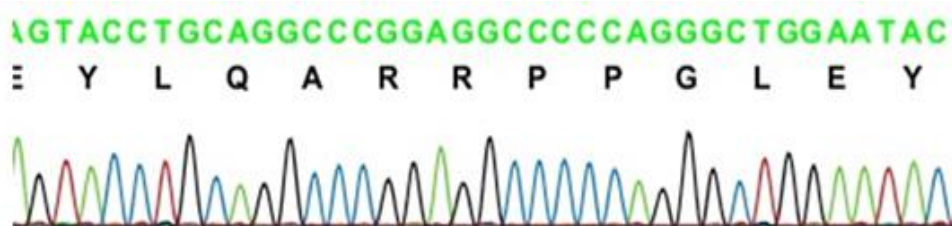
B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB49

Kết quả giải trình tự ở mẫu GB48, tại vị trí codon 546 bên dưới tín hiệu của đỉnh C, có xuất hiện tín hiệu của đỉnh A, đột biến điểm tại vị trí acid amin 546 làm thay đổi mã bộ ba AAA mã hóa cho acid amin Asparagine, thành AAC mã hóa cho acid amin Lysine, ký hiệu p.N546K. Mẫu GB49 không phát hiện thấy đột biến dạng này.

**\* Kết quả đột biến vị trí p.A575V trên exon 13 gen FGFR**



A)



B)

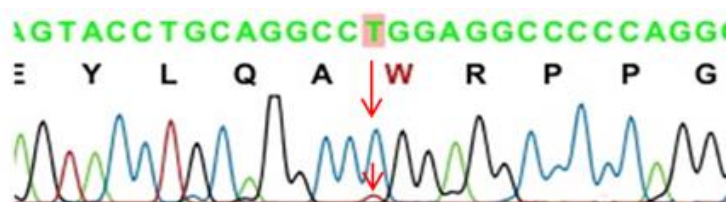
**Hình 3.17. Hình ảnh kết quả giải trình tự đoạn exon 13 gen FGFR chứa đột biến điểm p.A575V**

A) Mẫu đại diện có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB46

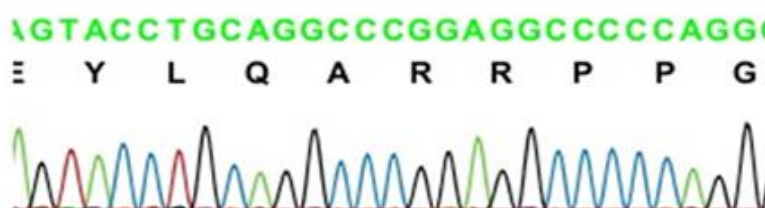
B) Mẫu đại diện không có đột biến của bệnh nhân UNBTKĐ mã số GB55

Kết quả trên hình cho thấy sản phẩm giải trình tự rõ nét, các đỉnh màu tương ứng với các nucleotide rõ ràng và không có tín hiệu nhiễu, tương đồng với trình tự exon 13 của gen FGFR, chứng tỏ sản phẩm PCR đặc hiệu. Kết quả giải trình tự ở mẫu GB46, tại vị trí codon 575 bên dưới tín hiệu của đỉnh C, có xuất hiện tín hiệu của đỉnh T, đột biến điểm tại vị trí acid amin 575 làm thay đổi mã bộ ba CCC mã hóa cho acid amin Alanine thành TCC mã hóa cho acid amin Valine, ký hiệu p.A575V; Mẫu GB55 không phát hiện thấy dạng đột biến này.

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



A)



B)

**Hình 3.18. Hình ảnh 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 codon 576 trên exon 13 gen FGFR, bên dưới tín hiệu của đỉnh C, có xuất hiện tín hiệu của đỉnh T chứng tỏ có đột biến biến đổi nucleotid C thành T. Kết quả 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.

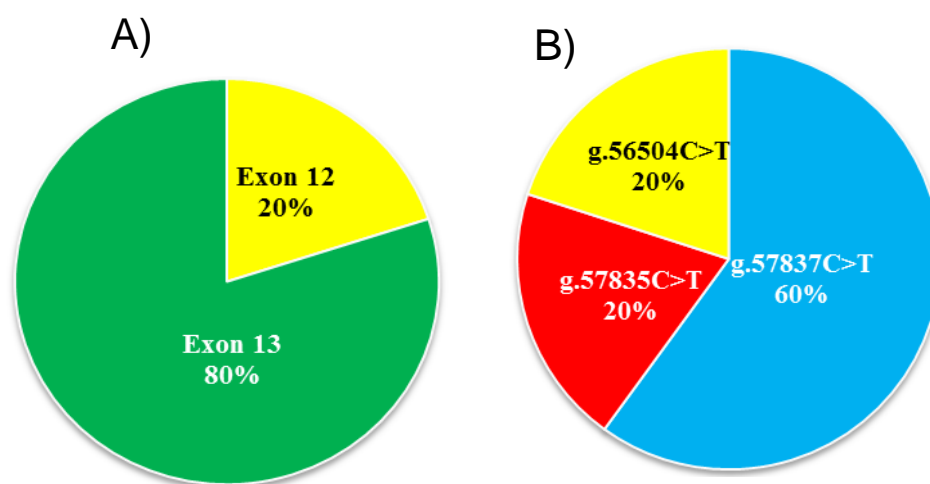
Giải trình tự 70 mẫu xác định đột biến điểm trên exon 12 và exon 13 của gen FGFR, kết quả được trình bày ở bảng 3.6.

**Bảng 3.6. Kết quả phát hiện đột biến điểm trên gen FGFR**

STT	Mã số người bệnh	Exon	Thay đổi nucleotid	Thay đổi acid amin	Tên acid amin thay đổi
1	GB46	13	g.57835C>T	p. A575V	Alanine > Valine
2	GB48	12	g.56504C>T	p. N546K	Asparagine > Lysine
3	GB52	13	g.57837C>T	p. R576W	Arginine > Tryptophan
4	GB53	13	g.57837C>T	p. R576W	Arginine > Tryptophan
5	GB57	13	g.57837C>T	p. R576W	Arginine > Tryptophan

Phát hiện 5/70 mẫu có đột biến gen FGFR, tỷ lệ là 7,1%: trong đó 1/70 mẫu có đột biến trên exon 12, và 4/70 mẫu có đột biến trên exon 13.

Dạng đột biến chiếm cao nhất là R576W trên exon 13 (60%), có 01 đột biến dạng A575V trên exon 13 (20%), có 01 đột biến dạng N546K trên exon 12 (20%).

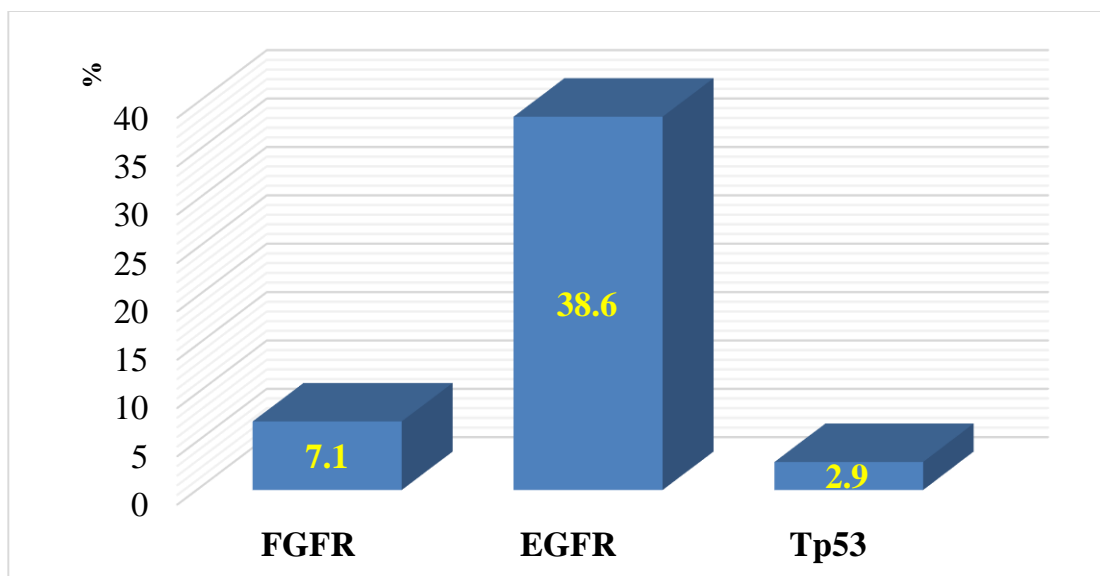


**Hình 3.19. Tỷ lệ đột biến (A) và tỷ lệ các dạng đột biến (B) trên exon 12, exon 13 của gen FGFR.**

Hầu hết các đột biến xuất hiện ở exon 13 chiếm 80%, trong đó dạng đột biến R576W chiếm tỷ lệ cao nhất với 60%.



### 3.2.6. Tổng hợp các đột biến trên 3 gen nghiên cứu: gen TP53, EGFR, FGFR



**Hình 3.20. Tỷ lệ đột biến trên các gen nghiên cứu**

Phát hiện:

7,1% bệnh nhân có đột biến trên exon 12 và exon 13 gen FGFR.

38,6% bệnh nhân có đột biến trên exon từ 2 đến 7 gen EGFR

2,9% bệnh nhân có đột biến trên exon 8 gen TP53

### 3.2.7. Tổng hợp các đột biến kép trên 3 gen nghiên cứu: gen TP53, EGFR, FGFR

**Bảng 3.7. Các đột biến kép trên 3 gen TP53, EGFR, FGFR**

Exon - Gen đột biến	Kiểu đột biến kép	n	Mã số người bệnh
Exon 2 và 7 gen EGFR	2 đột biến điểm	1	GB26
Exon 3 gen EGFR và xóa exon 2 đến 7 gen EGFR	1 đột biến điểm + 1 đột biến xóa đoạn	1	GB49
Exon 13 gen FGFR và exon 3 gen EGFR	2 đột biến điểm	2	GB52, GB53
Exon 2 gen EGFR Exon 7 gen EGFR từ exon 4 đến exon 7 gen EGFR	1 đột biến điểm 1 đột biến điểm 1 đột biến xóa	1	GB24

Phát hiện thấy 1/70 mẫu đột biến kép trên cả hai exon 2 và exon 7, cả 2 đều là đột biến điểm; 2 mẫu đột biến kép trên cả hai gen FGFR và EGFR, là đột biến điểm; 1 mẫu đột biến kép đôi trong đó mang một đột biến điểm và một đột biến xóa đoạn; 1 mẫu đột biến kép ba, trong đó một đột biến điểm trên exon 2, một đột biến điểm trên exon 7 và một đột biến xóa từ exon 4 đến exon 7; Còn lại các mẫu có đột biến riêng lẻ trên từng exon.

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

#### 3.3.1. Đặc điểm về tuổi và giới của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen

*Bảng 3.8. Tuổi trung bình của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen*

Gen	Đặc điểm	n	Tuổi trung bình	Min - Max	p
<b>FGFR</b>	Đột biến	5	45,4 ± 21,9	19 - 75	0,54
	Không đột biến	65	49,9 ± 15,4	5 - 78	
<b>EGFR</b>	Đột biến	27	49,4 ± 18,3	5 - 78	0,95
	Không đột biến	43	49,7 ± 14,3	19 - 75	
<b>TP53</b>	Đột biến	2	52,5 ± 6,4	48 - 57	0,79
	Không đột biến	68	49,5 ± 16	5 - 78	
<b>FGFR hoặc EGFR hoặc TP53</b>	Đột biến	32	48,9 ± 18,6	5 - 78	0,74
	Không đột biến	38	50,2 ± 13,3	20 - 72	

Tuổi trung bình của người bệnh phát hiện thấy đột biến trên gen EGFR, FGFR thấp hơn người không đột biến, ở gen TP53 lại ngược lại, tuy nhiên nếu tính chung cho cả 3 gen thấy đột biến thì tuổi trung bình thấp hơn người không đột biến, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.9. Tuổi trung bình của hai giới nam và nữ**

<b>Giới</b>	<b>n</b>	<b>Tuổi trung bình (<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>	<b>Min – Max</b>	<b>p</b>
<b>Nam</b>	45	50,5 ± 15,9	5 – 78	<b>&gt; 0,05</b>
<b>Nữ</b>	25	48 ± 15,9	19 – 75	
<b>Chung</b>	70	49,6 ± 15,8	5 – 78	

Tuổi trung bình của hai giới nam và nữ không khác biệt, ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.10. Đặc điểm về phân bố tuổi ở người bệnh đột biến gen EGFR**

<b>Giai đoạn tuổi</b>	<b>Gen EGFR</b>				<b>p</b>
	<b>Đột biến</b>		<b>Không đột biến</b>		
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
0-19	2	7,4	1	2,3	<b>0,84</b>
20-34	3	11,1	8	18,6	
35-44	5	18,5	5	11,6	
45-54	4	14,8	9	20,9	
55-64	8	29,6	14	32,6	
65-74	4	14,8	5	11,6	
≥ 75	1	3,7	1	2,3	
<b>Tổng</b>	<b>27</b>	<b>100,0</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>	

Không có sự khác biệt về đột biến gen EGFR giữa các nhóm tuổi, ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.11. Đặc điểm về tuổi của người bệnh UNBTKĐ đột biến 1 trong 3 gen nghiên cứu**

Giai đoạn tuổi	Gen TP53 - EGFR – FGFR				p
	Đột biến		Không đột biến		
	n	Tỷ lệ	n	Tỷ lệ	
0-19	3	9,4	0	0,0	0,41
20-34	4	12,5	7	18,4	
35-44	5	15,6	5	13,2	
45-54	5	15,6	8	21,0	
55-64	9	28,1	13	34,2	
65-74	4	12,5	5	13,2	
≥ 75	2	6,3	0	0,0	
Tổng	32	100,0	38	100,0	

Sự khác biệt về đột biến gen giữa các nhóm tuổi chưa có ý nghĩa thống kê, ( $p > 0,05$ ).

Do số trường hợp thấy đột biến của gen TP53 (2/70), và gen FGFR (5/70) thấp nên chúng tôi không so sánh riêng đột biến gen này với phân bố tuổi.

**Bảng 3.12. Đặc điểm về giới của người 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	
Chung cả 3 gen	Nam	22	68,8	23	60,5	0,47
	Nữ	10	31,2	15	39,5	

Giới nữ thấy đột biến gen FGFR cao hơn nam giới, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, ( $p = 0,05$ ).

Giới nam thấy đột biến gen EGFR cao hơn nữ giới, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, ( $p < 0,05$ ).

Cả 2 trường hợp đột biến exon 8 gen TP53 đều là nữ giới, chưa thấy ở nam giới.

### 3.3.2. Đặc điểm về kích thước khối u của người bệnh đột biến gen

**Bảng 3.13. Phân bố kích thước khối u của người bệnh đột biến gen FGFR**

Kích thước u	Gen FGFR				p
	Đột biến		Không đột biến		
	n	%	n	%	
≤ 3 cm	0	0,0	7	10,7	1,00
> 3 - 5 cm	2	40,0	25	38,5	
> 5 cm	3	60,0	33	50,8	
Tổng	5	100,0	65	100,0	

Kích thước khối u của người thấy đột biến gen FGFR phần lớn là > 5cm (60%), không có trường hợp nào kích thước u dưới 3cm.

**Bảng 3.14. Phân bố kích thước khối u của người đột biến gen EGFR**

Kích thước u	Gen EGFR				p
	Đột biến		Không đột biến		
	n	%	n	%	
≤ 3 cm	3	11,1	4	9,3	0,93
> 3 - 5 cm	11	40,7	16	37,2	
> 5 cm	13	48,2	23	53,5	
Tổng	27	100,0	43	100,0	

Kích thước khối u của người phát hiện thấy đột biến gen EGFR phần lớn là > 5cm, (chiếm 48,2%), rất ít trường hợp kích thước u dưới 3cm (11,1%), chưa thấy sự khác biệt so với người bệnh không thấy đột biến gen ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.15. Phân bố kích thước khối u của người đột biến một trong 3 gen FGFR - EGFR - TP53**

Kích thước u	Một trong 3 gen FGFR - EGFR - TP53			
	Đột biến		Không đột biến	
	n	%	n	%
≤ 3 cm	3	9,4	4	10,5
> 3 - 5 cm	12	37,5	15	39,5
> 5 cm	17	53,1	19	50,0
Tổng	32	100,0	38	100,0
<b>p</b>	> 0,05			

Kích thước khối u của người bệnh đột biến một trong 3 gen FGFR, EGFR, TP53 tập trung chủ yếu là trên 5cm (53,1%), chỉ có 9,4% người đột biến gen có kích thước u dưới 3cm.

### 3.3.3. Đặc điểm về thể bệnh nguyên phát và thứ phát

**Bảng 3.16. Tỷ lệ thể bệnh nguyên phát và thứ phát**

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

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

**Bảng 3.17. Tuổi trung bình của hai thể nguyên phát và thứ phát**

<b>Thể bệnh</b>	<b>n</b>	<b>Tuổi trung bình (<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>	<b>Min – Max</b>	<b>p</b>
Nguyên phát	64	49,5 ± 15,9	19 – 75	0,77
Thứ phát	6	47,5 ± 9,6	33 – 59	
Chung	70	49,2 ± 15,1	19 – 75	

Tuổi trung bình của 2 thể bệnh nguyên phát và thứ phát không khác biệt.

Tổng số mẫu nghiên cứu là 70 người bệnh, có 45 người là đầy đủ thông tin để xác định thời gian sống chết và điều trị hay không, vì vậy từ các bảng 3.18 trở đi chúng tôi phân tích với  $n = 45$ . Các phân tích thống kê gồm:

T-student cho  $n \geq 5$ , Fisher exact cho  $n < 5$  cho các bảng số liệu.

**Bảng 3.18. 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**

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

Thời gian trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật (A) của thể nguyên phát ngắn hơn thể thứ phát có nghĩa thống kê,  $p < 0,001$ .

Thời gian sống trung bình sau phẫu thuật (B) của thể nguyên phát ngắn hơn thể thứ phát, 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) của thể thứ phát dài hơn thể nguyên phát có nghĩa thống kê,  $p < 0,001$ .

**Bảng 3.19. Phân bố thời gian từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật của thể nguyên phát và thể thứ phát**

Thời gian (tháng)	Nguyên phát		Thứ phát		Chung	
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	34	87,2	3	50,0	37	82,2
> 6 - 12	4	10,3	2	33,3	6	13,3
> 12 - 24	1	2,6	0	0,0	1	2,2
> 24 - 36	0	0,0	0	0,0	0	0,0
> 36 - 60	0	0,0	1	16,7	1	2,2
Tổng	39	100,0	6	100,0	45	100,0
p	0,048					

Thời gian trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật của 2 thể nguyên phát và thứ phát đều phần lớn từ 6 tháng trở xuống (82,2%), tuy nhiên thể nguyên phát hầu hết (87,2%) có thời gian tiến triển bệnh ngắn (≤ 6 tháng) cao hơn so với thể thứ phát (50%), có ý nghĩa thống kê (p = 0,048).

**Bảng 3.20. 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% trường hợp chết trước 6 tháng sau phẫu thuật ít hơn rõ rệt so với thể nguyên phát có tới 41% chết trước 6 tháng 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 ( $p = 0,016$ ).

**Bảng 3.21. Phân bố thời gian từ khi phát hiện bệnh đến khi chết của thể nguyên phát và thể thứ phát**

Thời gian (tháng)	Nguyên phát		Thứ phát		Chung		
	n	%	n	%	n	%	
≤ 6	13	33,3	0	0,0	13	28,9	
> 6 - 12	10	25,6	0	0,0	10	22,2	
> 12 - 24	11	28,2	4	66,6	15	33,3	
> 24 - 36	5	12,8	1	16,7	6	13,3	
> 36 - 60	0	0,0	1	16,7	1	2,2	
Tổng	39	100,0	6	100,0	45	100,0	
p	0,013						

Có 33,3% người mắc UNBTKĐ thể nguyên phát chết trước 6 tháng tính từ khi phát hiện bệnh, nhóm thứ phát không có trường hợp nào chết trước 6 tháng, sự khác biệt rất rõ ( $p = 0,013$ ).

Tất cả các trường hợp thể thứ phát đều sống được trên 12 tháng kể từ khi phát bệnh.

Có 1 trường hợp thể thứ phát sống được trên 36 tháng, thể nguyên phát không có trường hợp nào.

### 3.3.4. Phân bố thời gian sống của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen có điều trị xạ trị, hóa chất

Tổng số 45 người bệnh trong nghiên cứu có đầy đủ thông tin về điều trị xạ trị, hóa chất, do đó trong nghiên cứu về đặc điểm người bệnh mang đột biến gen với điều trị chúng tôi phân tích số mẫu với  $n = 45$ . Do số mẫu không nhiều nên chúng tôi qui định, nếu người bệnh được điều trị thêm sau mổ là xạ trị, hoặc chỉ dùng hóa chất hoặc dùng cả xạ trị và hóa chất đều được coi là có điều trị, còn người bệnh không điều trị xạ trị hoặc không dùng hóa chất hoặc không dùng cả xạ trị và hóa chất đều được coi là không điều trị.

**Bảng 3.22. Tuổi trung bình của người bệnh đột biến gen.**

Gen	Đặc điểm	n	Tuổi trung bình	Min - Max	p
<b>FGFR</b>	Đột biến	5	45,4 ± 21,9	19 - 75	0,56
	Không đột biến	40	49,7 ± 14,4	20 - 72	
<b>EGFR</b>	Đột biến	16	48,9 ± 13,9	24 - 70	0,92
	Không đột biến	29	49,4 ± 16	19 - 75	
<b>TP53</b>	Đột biến	2	52,5 ± 6,4	48 - 57	0,76
	Không đột biến	43	49 ± 15,4	19 - 75	
<b>1 trong 3 gen FGFR- EGFR - TP53</b>	Đột biến	21	48,2 ± 15,6	19 - 75	0,68
	Không đột biến	24	50,1 ± 15	20 - 72	

Tuổi trung bình của nhóm phát hiện thấy đột biến gen FGFR hoặc gen EGFR hoặc gen TP53 hoặc đột biến 1 trong 3 gen và không đột biến gen không có sự khác biệt, ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.23. Phân bố thời gian sống sau phẫu thuật của thể nguyên phát và thể thứ phát có điều trị xạ trị, hóa chất**

Thời gian (tháng)	Có điều trị xạ trị, hóa chất				Chung	
	Nguyên phát		Thứ phát			
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
> 6 - 12	6	37,5	1	20,0	7	33,3
> 12 - 24	7	43,8	4	80,0	11	52,4
> 24 - 36	3	18,8	0	0,0	3	14,3
> 36 - 60	0		0		0	
Tổng	16		5		21	
p	0,49					

Khi có điều trị xạ trị hoặc hóa chất không có trường hợp người bệnh nào chết trước 6 tháng sau phẫu thuật.

Có 80% người mắc UNBTKĐ thể thứ phát sống được từ 12 đến 24 tháng sau phẫu thuật, cao hơn thể nguyên phát (43,8%) khi có điều trị xạ trị hoặc hóa chất, tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Có 18,8% thể nguyên phát có điều trị sống được 24 đến 36 tháng, thể thứ phát không trường hợp nào sống trên 24 tháng.

**Bảng 3.24. Thời gian sống của người bệnh sau phẫu thuật có điều trị**

Thời gian (tháng)	Có điều trị xạ trị, hóa chất				Chung	
	Đột biến 1 trong 3 gen FGFR - EGFR - TP53		Không đột biến FGFR - EGFR - TP53			
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
> 6 - 12	4	50,0	3	23,1	7	33,3
> 12 - 24	3	37,5	8	61,5	11	52,4
> 24 - 36	1	12,5	2	15,4	3	14,3
> 36 - 60	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Tổng	8	100,0	13	100,0	21	100,0
p	0,59					

Không có người bệnh nào được điều trị xạ trị hoặc hóa chất chết trước 6 tháng sau phẫu thuật.

Người bệnh phát hiện thấy đột biến 1 trong 3 gen FGFR, EGFR, TP53 được điều trị chết trước 12 tháng sau phẫu thuật nhiều hơn người không thấy đột biến (50% so với 23,1%), tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Người bệnh không phát hiện thấy đột biến 1 trong 3 gen FGFR, EGFR, TP53 được điều trị thời gian sống 12 đến 24 tháng sau phẫu thuật cao hơn đáng kể so với người không thấy đột biến 1 trong 3 gen nghiên cứu (61,5% so với 37,5%), tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.25. Thời gian sống của người bệnh đột biến gen FGFR sau phẫu thuật có điều trị xạ trị, hóa chất**

Thời gian (tháng)	Đột biến FGFR				Chung	
	Có điều trị		Không điều trị			
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0,0	1	50,0	1	20,0
> 6 - 12	1	38,3	1	50,0	2	40,0
> 12 - 24	2	66,7	0	0,0	2	40,0
> 24	0	0,0	0	0,0	0	0,0
p	0,60					

Người phát hiện thấy đột biến gen FGFR sau phẫu thuật có điều trị xạ trị, hoặc hóa chất có thời gian sống dài hơn người thấy đột biến không được điều trị, không có trường hợp nào chết trước 6 tháng, và nếu không được điều trị thì không có trường hợp nào sống được từ 12 tháng trở lên, có được điều trị thì 66,7% sống được từ 12 đến 24 tháng, tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.26. Thời gian sống của người bệnh đột biến gen EGFR sau phẫu thuật có điều trị xạ trị, hóa chất**

Thời gian (tháng)	Đột biến EGFR				Chung	
	Có điều trị		Không điều trị			
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0,0	6	66,7	6	37,5
> 6 - 12	3	42,9	2	22,2	5	31,2
> 12 - 24	3	42,9	0	0,0	3	18,8
> 24 - 36	1	14,2	1	11,1	2	12,5
> 36 - 60	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Tổng	7		9		16	
p	0,015					

Thời gian sống sau phẫu thuật của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen EGFR có điều trị xạ trị, hóa chất dài hơn so với không được điều trị, không có người bệnh nào thấy đột biến được điều trị chết trước 6 tháng, nếu thấy đột biến không được điều trị có tới 66,7% chết trước 6 tháng sau phẫu thuật.

Người thấy đột biến được điều trị có 42,9% sống thêm được trên 12 đến 24 tháng, so với 11,1% người không được điều trị sống được đến thời gian này (p = 0,015).

**Bảng 3.27. Thời gian sống của người bệnh sau phẫu thuật đột biến 1 trong 3 gen, có điều trị xạ trị, hóa chất**

Thời gian (tháng)	Đột biến gen				Chung	
	Có điều trị		Không điều trị			
	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 thì thời gian sống sau phẫu thuật dài hơn người bệnh không được điều trị, có ý nghĩa thống kê, ( $p = 0,001$ ).

Không có người bệnh nào thấy đột biến được điều trị mà chết trước 6 tháng, so với 69,2% người đột biến không được điều trị chết trước 6 tháng, có ý nghĩa thống kê, ( $p = 0,001$ ).

50% người thấy đột biến được điều trị sống kéo dài từ 6 đến 12 tháng khác biệt so với 23,1% trường hợp người không được điều trị sống 6 đến 12 tháng ( $p = 0,001$ ).

37,5% người thấy đột biến được điều trị sống kéo dài từ 12 đến 24 tháng khác biệt so với 0% người không được điều trị, ( $p = 0,001$ ).

**Bảng 3.28. Thời gian sống của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen FGFR tính từ khi phát hiện mắc bệnh đến lúc chết có điều trị xạ trị, hóa chất**

Thời gian (tháng)	Đột biến FGFR				Chung	
	Có điều trị		Không điều trị			
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
> 6 - 12	0	0,0	1	50,0	1	20,0
> 12 - 24	2	66,7	1	50,0	3	60,0
> 24 - 36	1	33,3	0	0,0	1	20,0
> 36 - 60	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Tổng	3	100,0	2	100,0	5	100,0
p	1,00					

Không có người bệnh nào thấy đột biến được điều trị mà chết trước 12 tháng, so với 50,0% người có đột biến không được điều trị chết trước 12 tháng, tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê, ( $p > 0,05$ ).

Có 33,3% người thấy đột biến được điều trị sống kéo dài từ 24 đến 36 tháng không có trường hợp người không được điều trị sống trên 24 tháng, tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê, ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.29. Thời gian sống của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen EGFR tính từ khi phát hiện mắc bệnh đến lúc chết có điều trị xạ trị, hóa chất**

Thời gian (tháng)	Đột biến EGFR				Chung	
	Có điều trị		Không điều trị			
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0,0	5	45,45	5	27,8
> 6 - 12	2	28,6	5	45,45	7	38,9
> 12 - 24	3	42,9	0	0,0	3	16,7
> 24 - 36	1	14,3	1	9,1	2	11,1
> 36 - 60	1	14,3	0	0,0	1	5,6
Tổng	7	100,0	11	100,0	18	100,0
p	0,02					

Không có người bệnh nào thấy đột biến được điều trị mà chết trước 6 tháng, so với 45,45% người thấy đột biến không được điều trị chết trước 6 tháng, có ý nghĩa thống kê, ( $p = 0,02$ ).

Có 90% trường hợp thấy đột biến không được điều trị sống dưới 12 tháng; 42,9% người thấy đột biến được điều trị sống kéo dài từ 12 đến 24 tháng ( $p = 0,02$ ).

Người thấy đột biến được điều trị có 14,3% sống kéo dài đến trên 36 tháng, người không được điều trị không có trường hợp nào.



**Bảng 3.30. Thời gian sống của người bệnh đột biến 1 trong 3 gen nghiên cứu tính từ khi phát hiện mắc bệnh đến lúc chết có điều trị**

Thời gian (tháng)	Đột biến FGFR - EGFR - TP53				Chung	
	Có điều trị		Không điều trị			
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	0	0,0	6	40,0	6	26,1
> 6 - 12	2	25,0	7	46,6	9	39,1
> 12 - 24	3	37,5	1	6,7	4	17,4
> 24 - 36	2	25,0	1	6,7	3	13,0
> 36 - 60	1	12,5	0	0,0	1	4,3
Tổng	8	100,0	15	100,0	23	100,0
p	0,02					

Không có người bệnh nào phát hiện thấy đột biến được điều trị mà chết trước 6 tháng, so với 40,0% người thấy đột biến không được điều trị chết trước 6 tháng, có ý nghĩa thống kê, ( $p = 0,02$ ).

Có 35,7% người thấy đột biến được điều trị sống kéo dài từ 12 đến 24 tháng lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với 6,7% trường hợp người không được điều trị ( $p = 0,02$ ).

Người thấy đột biến được điều trị có 12,5% sống kéo dài đến trên 36 tháng, người không được điều trị không có trường hợp nào ( $p = 0,02$ ).

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

Ngày nay, rõ ràng ung thư vẫn là căn bệnh nan y, việc tìm thuốc đặc hiệu chữa bệnh vẫn là mục tiêu cấp thiết của ngành Y nói chung và chuyên ngành ung thư nói riêng. Những tiến bộ gần đây trong công nghệ sắp xếp trình tự DNA cung cấp cơ hội để khảo sát những thay đổi đột biến trong ung thư ở mức độ cao và toàn diện, và nghiên cứu quá trình đáp ứng tế bào thông qua tyrosine kinases là một trong những đại diện cho các mục tiêu hấp dẫn để can thiệp điều trị ung thư. Báo cáo về quá trình phân tích trình tự các thành viên của họ thụ thể tyrosine kinase (RTK) trong bộ gen của các khối u nguyên bào thần kinh đệm, đã xác định được sự thay đổi trong phân tử của các thành viên họ tyrosine kinases này: bao gồm sự khuếch đại thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì, kèm đột biến trong gen EGFR, đột biến thụ thể tăng trưởng nguyên bào sợi (FGFR bao gồm đột biến đầu tiên trong miền kinase của gen này, và được quan sát thấy trong nhiều ung thư khác nhau), và đột biến trong thụ thể yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu (PDGFRA). Các thụ thể tăng trưởng nguyên bào sợi, thụ thể yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu và thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì, là các điểm đầu vào tiềm năng cho các phosphatidylinositol 3-kinase và mitogen kích hoạt protein kinase trong các tín hiệu nội bào đã được biết là đầu mối cho sự rối loạn hoạt động sinh sản của tế bào trong ung thư [61]. Kết quả của các nghiên cứu cho thấy tiện ích của việc áp dụng công nghệ sắp xếp chuỗi DNA để đánh giá một cách có hệ thống trình tự mã hóa các gen trong bộ gen ung thư nguyên bào thần kinh đệm. Điều quan trọng là phải mở rộng nghiên cứu bộ gen này để hệ thống với bảng biểu diễn gen trong các loại ung thư khác [95]. Hơn nữa, một phân tích rộng hơn về họ gen RTK sẽ cho thấy các đặc tính của các giao diện sinh học

trong họ gen này và trong các con đường truyền tín hiệu. Ngoài ra hệ thống gen kiểm soát ung thư cũng có vai trò quan trọng không kém trong cơ chế sinh ung thư, trong đó gen TP53 được coi như trạm kiểm soát ung thư của cơ thể, có vai trò sửa chữa DNA..., và tế bào nguyên bào thần kinh đệm chịu sự kiểm soát của gen này. Thách thức lớn hơn đối với công nghệ di truyền ung thư là xây dựng cơ sở dữ liệu toàn diện về thay đổi gây ra ung thư và kết hợp kiến thức này với các bức tranh tổng thể đột biến gen, để dự đoán tốt hơn những mục tiêu phân tử nào sẽ mang lại liệu pháp can thiệp ung thư hữu hiệu [96]. Nghiên cứu đột biến gen TP53, EGFR, FGFR trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm của chúng tôi nhằm mục đích bước đầu xác định một số dạng thay đổi trong các gen này, và một số đặc điểm của người phát hiện thấy đột biến gen TP53, EGFR, FGFR ở người Việt Nam.

Nghiên cứu 70 mẫu mô và bệnh án của 70 bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm được thu thập tại khoa Giải phẫu bệnh và Phòng hồ sơ bệnh án tại Bệnh viện Việt Đức, sau tách chiết DNA từ các mẫu mô, chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR nhân bản các exon cần nghiên cứu của các gen TP53, EGFR, FGFR, giải trình tự các exon xác định đột biến điểm, sử dụng phương pháp MLPA xác định đột biến xóa đoạn exon gen EGFR dạng EGFRvIII. Từ kết quả thu được, chúng tôi có một số bàn luận:

#### **4.1. Đặc điểm chung của các đối tượng nghiên cứu**

Đặc điểm về tuổi: bệnh u nguyên bào là thường gặp, có thể gặp ở bất kỳ lứa tuổi nào, từ trẻ nhỏ cho đến người già, kết quả nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.1) có tuổi trung bình mắc là:  $49,6 \pm 15,8$  (5-78), tuổi mắc bệnh thấp nhất là 5 tuổi, cao nhất là 78 tuổi, bệnh UNBTKĐ được phân bố ở đủ các lứa tuổi, khoảng tuổi mắc nhiều nhất là từ trung niên trở lên, trong đó độ tuổi từ 55 tuổi đến 64 tuổi chiếm tỉ lệ cao nhất trong các mẫu nghiên cứu (31,4%); đứng thứ hai là 18,6% người bệnh có độ tuổi từ 45-54, thấp nhất 2/70 (2,9%)

là nhóm có độ tuổi trên 75. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với các báo cáo trên thế giới: tỷ lệ mắc u nguyên bào thần kinh đệm tăng theo tuổi, theo báo cáo của CBTRUS năm 2016: độ tuổi mắc bệnh nhiều nhất là từ 65 đến 74 tuổi, trong một nghiên cứu khảo sát toàn nước Anh từ năm 2007 đến năm 2011 có 10.743 người mắc UNBTKĐ, lứa tuổi mắc bệnh cao nhất cũng từ 65 đến 75 tuổi, hay kết quả nghiên cứu ở bốn quốc gia Bắc Âu cũng ghi nhận nhóm tuổi 60-79 tuổi mắc UNBTKĐ là cao nhất, có sự gia tăng mắc bệnh ở nhóm tuổi già nhất, với cả nam giới và nữ giới, sự gia tăng trung bình hàng năm 12,4% đối với nam giới và tăng 10,5% với nhóm phụ nữ. Kết quả độ tuổi mắc bệnh mà chúng tôi gặp nhiều nhất là từ 55 tuổi đến 64 tuổi, có tuổi ít hơn so với độ tuổi trong các nghiên cứu đã được công bố về độ tuổi mắc, độ tuổi mắc nhiều nhất; cho thấy đặc điểm tuổi ở bệnh u nguyên bào thần kinh đệm ác tính trong nghiên cứu của chúng tôi gặp nhiều ở lứa tuổi trẻ, có thể do vị trí địa lý, các điều kiện xã hội, lối sống ở Việt Nam khác so với các nước, hoặc có thể do số đối tượng nghiên cứu của chúng tôi còn ít (70 mẫu), Tỷ lệ mắc bệnh trong nghiên cứu của chúng tôi tăng dần đến nhóm tuổi 64, sau đó lại giảm dần đến nhóm tuổi trên 64, có thể do các đối tượng chúng tôi thu thập nghiên cứu là sau phẫu thuật, những người trẻ tuổi luôn được điều trị tích cực hơn, có xu hướng điều trị phẫu thuật nhiều hơn; ở nhóm người cao tuổi trên 65, nhất là các đối tượng tuổi cao trên 70 tuổi ở Việt Nam có thể sẽ ít điều trị phẫu thuật hơn vì cho rằng tuổi già có điều trị cũng không cải thiện được nhiều. Do đó khoảng tuổi trẻ hơn chiếm tỷ lệ nhiều hơn ở Việt Nam chưa đại diện được cho tỷ lệ mắc gặp nhiều ở tuổi trẻ hơn, cần có những nghiên cứu mở rộng phạm vi hơn tại các vùng miền và các cơ sở điều trị, quản lý bệnh UNBTKĐ khác. Tuy nhiên kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Trần Chiến [26]: nhóm u ác tính độ IV tuổi hay gặp từ 51 đến 60, chiếm tỷ lệ cao nhất so với các lứa tuổi khác (28,8%). Ngoài ra, tỷ lệ mắc u nguyên bào

thần kinh đệm ở trẻ em trong nghiên cứu của chúng tôi là 4,3%, phù hợp với tổng kết của WHO: u não nguyên phát ở trẻ em gặp dưới 10%, hay gặp nhất là trước 5 tuổi [3],[32].

Đặc điểm về giới tính: trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm nam giới thường mắc nhiều hơn phụ nữ, trung bình 3,3-5,1/100.000 đối với nam giới và 2,1-3,5/100.000 phụ nữ; tỉ lệ nam/nữ khoảng 1,4-1,7; [4],[19]. Kết quả của chúng tôi có 45/70 mẫu là nam chiếm 64,3% so với nữ là 25/70 mẫu, chiếm 35,7%, tỉ lệ mẫu nam/nữ khoảng 1,8; kết quả này tương đồng như các nghiên cứu về tỉ lệ nam mắc bệnh nhiều hơn nữ trên thế giới: nghiên cứu 10.743 người mắc UNBTKĐ ở Anh trong 5 năm, kết quả có 6451 là nam giới và 4292 là nữ giới, nam giới có tỷ lệ mắc bệnh gấp 1,66 lần so với nữ giới. Nghiên cứu về xu hướng tỷ lệ mắc các khối u nội sọ chính ở người trưởng thành ở bốn quốc gia Bắc Âu: Đan Mạch, Na Uy, Thụy Điển và Phần Lan, kết quả ghi nhận tỷ lệ mắc bệnh UNBTKĐ ở nam cao hơn nữ, tỷ lệ này gia tăng hàng năm, trung bình hàng năm ở nam giới tăng 9,2% và nữ giới tăng 8,8%. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với hầu hết các công bố trong nước về tỷ lệ mắc UNBTKĐ ở nam cao hơn ở nữ như kết quả nghiên cứu của Trần Chiến và Kiều Đình Hùng [25],[26], tuy nhiên tỷ lệ nam/nữ mắc bệnh trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn, có thể do số mẫu nghiên cứu của chúng tôi còn chưa đủ lớn.

## **4.2. Đặc điểm đột biến trên các gen nghiên cứu**

### **4.2.1. Đặc điểm DNA tách chiết từ mẫu mô paraffin**

Mục đích nghiên cứu của chúng tôi là xác định đột biến trên gen của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm; u phát sinh do sự phát triển bất thường tại các tế bào trong não, sự nhân lên quá mức của gen, của tế bào mà thành, UNBTKĐ thường là nguyên phát, phát triển tại chỗ trong não, chỉ lan tỏa sang vùng não lân cận, ít di căn sang các bộ phận khác trong cơ thể, vì vậy chúng tôi sử dụng tế bào tại khối u để nghiên cứu; do đó chúng tôi tách chiết

DNA từ mô khối u. Thông thường, khi phát hiện bệnh u nguyên bào thần kinh đệm qua chẩn đoán lâm sàng và cận lâm sàng, đa số khối u đã có kích thước khá lớn (trên 4cm), vì vậy sẽ có chỉ định mổ cắt u, đó là phương pháp hiện nay mang lại kết quả tối ưu cho điều trị bệnh này. Khối u sau khi được lấy ra khỏi cơ thể người bệnh, sẽ được lưu trữ, bảo quản bằng cách cắt một phần u cố định bằng formaldehyd và đúc trong một khối paraffin.

Các mẫu nghiên cứu của chúng tôi được lấy tế bào mô từ các khối paraffin, việc tách chiết DNA từ tế bào mô này gặp nhiều khó khăn, để DNA thu được đảm bảo có độ tinh sạch nhất, loại bỏ tối đa các tạp chất như paraffin, các protein khác... đòi hỏi các kỹ thuật viên phải hết sức cẩn thận, chính xác và tập trung trong quá trình thao tác.

Chúng tôi sử dụng phương pháp tách mẫu paraffin phenol/chloroform [86] để lấy DNA, đây là phương pháp đơn giản và dễ thực hiện. Quan trọng nhất trong các bước tách là loại paraffin ra khỏi mẫu mô, nếu không loại hết, paraffin sẽ bao bọc khối mô chứa protein và DNA, làm cho quá trình ly giải protein gặp khó khăn, ảnh hưởng đến độ tinh sạch của DNA, và nếu paraffin còn dư sẽ gây ức chế phản ứng PCR. Để hạn chế điều này thì bước cạo mô từ khối đúc cần lưu ý loại thô hết mức có thể phần paraffin bám vào khối mô trước khi nghiên cứu đưa vào tách chiết.

Sau tách chiết DNA là bước kiểm tra về số lượng và chất lượng sản phẩm, để đảm bảo lượng DNA đủ cho việc làm kỹ thuật PCR tiếp theo thì quan trọng nhất là phải có DNA sau tách chiết, nồng độ DNA không nhất thiết phải là quá cao, vì phương pháp PCR ưu điểm ở chỗ chỉ cần một lượng DNA rất nhỏ đã có thể khuếch đại được một sản phẩm rất lớn sau các chu trình, theo khuyến cáo của hãng hóa chất thì nồng độ DNA khôn chỉ cần khoảng 25 đến 100ng/ $\mu$ l. Vì nếu nồng độ DNA cao quá có thể gây ức chế phản ứng PCR, do việc bắt cặp sẽ gặp khó khăn hơn trong quá trình PCR. Do

vậy các mẫu có nồng độ DNA sau tách chiết quá cao ( $>100\text{ng}/\mu\text{l}$ ) cần phải pha loãng các nồng độ này về trong khoảng  $50\text{ng}/\mu\text{l}$ , để chạy phản ứng PCR. Trong 70 mẫu DNA của chúng tôi có 3 mẫu nồng độ thấp là mẫu GB23 nồng độ  $28,3\text{ng}/\mu\text{l}$  và 2 mẫu GB2 + GB3 nồng độ  $28,6\text{ng}/\mu\text{l}$ . Theo kinh nghiệm thì những mẫu có nồng độ thấp khi tiến hành chạy PCR ta có thể tăng thể tích mẫu, tùy theo nồng độ thực tế của các mẫu. Các mẫu nồng độ khoảng từ  $25\text{ng}/\mu\text{l}$  đến dưới  $50\text{ng}/\mu\text{l}$  chạy PCR vẫn cho kết quả tốt [86].

Quan trọng hơn cả về chất lượng của DNA là độ tinh sạch, nghĩa là DNA thu được sau tách chiết hạn chế tối đa nhiễm các tạp chất, mặc dù trong quá trình tách chiết chúng ta đã cố gắng để loại bỏ hết tạp chất, xong nhiều khi vẫn không sạch hết. Các tạp chất còn lẫn trong sản phẩm DNA có thể hạn chế việc khuếch đại của phản ứng PCR, gây ức chế việc bắt cặp giữa môi và đoạn gen cần nhân bản. Độ tinh sạch cần đạt được tính theo tỉ lệ  $A_{260}/A_{280}$  là 1,8 -2,0.  $A_{260}$  là mật độ quang đo được của DNA ở bước sóng 260nm, gọi là đỉnh hấp thụ của DNA;  $A_{280}$  là mật độ quang đo được của protein ở bước sóng 280nm, gọi là đỉnh hấp thụ của protein. Nếu protein còn lại nhiều sau tách chiết thì đỉnh hấp thụ đo được sẽ lệch sang phải và tỉ lệ  $A_{260}/A_{280}$  sẽ lớn hơn 2,0 [86]; Các mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi đều đạt độ tinh sạch cao, nếu mẫu nào chưa đạt độ tinh sạch cần tách chiết lại cho đến khi đạt yêu cầu cho phản ứng PCR.

#### ***4.2.2. Đặc điểm về kết quả PCR nhân bản các exon xác định đột biến điểm của các gen nghiên cứu***

Nguyên tắc trước khi chạy PCR cho một loại mẫu cần phải chuẩn hóa các điều kiện. Nếu kết quả chạy xong được kiểm tra đạt các điều kiện tiêu chuẩn, mới bắt đầu tiến hành chạy đồng loạt các mẫu [86].

Chúng tôi áp dụng quy trình PCR cơ bản, gồm 3 bước: biến tính, bắt cặp (gắn môi) và kéo dài [87]. Sau khi tiến hành chuẩn điều kiện trên mẫu mô, chúng tôi thu được các mẫu exon sau PCR có kết quả rất tốt; kiểm tra kết

quả chạy PCR trên hình ảnh điện di băng điện di rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết.

Một điều quan trọng trong phản ứng PCR là thể tích trong thành phần pha mẫu chạy PCR, nước pha là nước cất 2 lần, enzym phải hoạt động tốt trong môi trường nhiệt độ cao (95°C), môi hoạt động tốt, mẫu DNA tinh sạch và đủ nồng độ, và các thành phần đệm khác, đều phải có tỉ lệ nhất định để phản ứng PCR ra được kết quả.

Chạy điện di để kiểm tra kết quả sản phẩm DNA là bước quan trọng trong quy trình, khi đổ gel lưu ý các giếng không được thủng, vỡ, khi tra mẫu đảm bảo đúng thứ tự, đúng vào giếng không tra ra ngoài miệng giếng; Lưu ý dòng hiệu điện thế, cường độ dòng điện và thời gian chạy phải đúng và đủ; để các băng điện di lên hình rõ ràng, bước nhuộm cần đủ thời gian, thường nhuộm 3-5 phút trong dung dịch ethidium bromide 10%, chất này sẽ phát huỳnh quang dưới tia tử ngoại (UV) khi gắn với DNA cho phép phát hiện vị trí các đoạn DNA trên gel khi chụp. Nếu sản phẩm có DNA được khuếch đại thì các băng điện di lên rất rõ nét, kích thước trùng với kích thước khi so sánh trên marker. Chỉ có những mẫu có hình ảnh điện di đúng mới được giải trình tự gen [86]. Các mẫu có hình ảnh điện di đều lên rất rõ, so với mẫu chuẩn và marker kích cỡ là tương đương. Như vậy về chất lượng sản phẩm chúng tôi đánh giá là tốt, các sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự gen.

#### **4.2.3. Đặc điểm đột biến điểm trên exon 7, exon 8 gen TP53**

Đột biến điểm của gen TP53 trên bệnh nhân UNBTKĐ thường xảy ra ở exon 5, 6, 7 và exon 8; do các exon 7 và exon 8 gặp khá nhiều đột biến (10,8% có đột biến trên exon 7; 7,3% có đột biến trên exon 8) [54],[94], các exon 7 và exon 8 gen TP53 có kích thước không lớn, nên chỉ cần sử dụng một cặp mồi để khuếch đại 2 exon này, sau giải trình tự hai exon 7 và exon 8 trên



gen TP53, chúng tôi đã xác định được 2 dạng đột biến trên exon 8 gen TP53, trên exon 7 gen TP53 chúng tôi chưa phát hiện được có đột biến. Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện đột biến điểm R282W 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 mà chúng tôi xác định được là 2/70 (chiếm 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 có 1/37 (2,7%) có đột biến trên exon 4; 6/37 (16,2%) có đột biến trên exon 5; 1/37 (2,7%) có đột biến trên exon 6; 4/37 (10,8%) có đột biến trên exon 7; 2/37 (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 [3],[51] 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, tiến hành nghiên cứu dựa vào dân số ở Canton của Zurich, Thụy Sĩ (với dân số khoảng 1,16 triệu người) để xác định tần số biến đổi gen, hiệu quả của điều trị với thời gian sống của bệnh nhân UNBTKĐ từ năm 1980 đến năm 1994: 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 [97].

#### **4.2.4. Đặc điểm đột biến từ exon 2 đến exon 7 gen EGFR.**

##### **4.2.4.1. Đặc điểm đột biến điểm trên các exon 2, 3, 7, 8 gen EGFR.**

###### **\* Đột biến điểm trên exon 2 gen EGFR**

Nghiên cứu của chúng tôi xác định được 3 mẫu mô GB23, GB24, GB26 có đột biến điểm tại vị trí p.G42D, một mẫu GB25 có đột biến tại vị trí p.L62I tương ứng trên phân tử protein; các đột biến này đều là loại đột biến sai nghĩa.

So sánh kiểu đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi với nghiên cứu của Jeffrey C Lee và cộng sự (2006): nghiên cứu 132 mẫu UNBTKĐ tại Mỹ, thì điểm đột biến của chúng tôi không giống với điểm đột biến của tác giả, trên exon 2 Jeffrey C Lee tìm thấy các đột biến là p.D46N và p.G63R [62]; chúng tôi cho rằng có thể dân tộc, màu da hay vị trí địa lý có thể gây sự sai khác trong vị trí của đột biến trên exon 2 gen EGFR trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm, (hầu hết những người mắc UNBTKĐ trong nghiên cứu của Jeffrey C Lee là người gốc Bắc Âu); nhưng sự sai khác vị trí không cách nhau quá xa (p.G42D so với p.D46N và p.L62I so với p.G63R).

Tỉ lệ đột biến điểm ở exon 2 gen EGFR trên người mắc UNBTKĐ mà nghiên cứu của chúng tôi xác định được là 4/70 trường hợp (5,7%), cao hơn

so với nghiên cứu của Jeffrey C Lee đã công bố: đột biến điểm ở exon 2 là 0,8% trong số 132 mẫu người mắc UNBTKĐ đã nghiên cứu, có thể do tác nhân gây bệnh tác động hoặc do đáp ứng của người sống ở vùng miền khác nhau thì khác nhau về tỉ lệ mắc, cũng như tỷ lệ đột biến gen.

**\* Đột biến điểm trên exon 3 gen EGFR**

Chúng tôi đã tìm thấy đột biến trên exon 3 gen EGFR như các nghiên cứu đã báo cáo, nhưng khác nhau về vị trí đột biến; một mẫu mang đột biến kiểu p.G87D và 5 mẫu mang đột biến kiểu p.K129N và đều là đột biến sai nghĩa, gây ảnh hưởng đến chức năng bình thường của phân tử protein, có thể dẫn đến rối loạn hoạt động của tế bào.

Nghiên cứu của Jeffrey C Lee, chỉ xác định được 1 kiểu đột biến trên exon 3 gen EGFR, tương ứng sự thay đổi trên protein EGFR là R108K của người bệnh UNBTK đặng và có 5 mẫu có kiểu đột biến này, như vậy số kiểu đột biến của chúng tôi tìm được nhiều hơn so với nghiên cứu của Jeffrey C Lee nhưng lại không giống ở vị trí đột biến.

Có thể giải thích sự khác nhau về vị trí đột biến: 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. Với 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

cũng có thể gặp các kiểu đột biến khác nữa như G719S, G719A, G719C, S768I, L861Q...[14],[73],[98]. 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 [62].

Trong tổng số 70 mẫu nghiên cứu, chúng tôi xác định được 7 mẫu có đột biến trên exon 3 gen EGFR, tỉ lệ đột biến chiếm khoảng 10,0%; tỉ lệ đột biến trên exon 3 gen EGFR tuy không cao nhưng so với nghiên cứu đã công bố thì tỉ lệ đột biến của chúng tôi lớn hơn, kết quả nghiên cứu của Jeffrey C Lee, tỉ lệ đột biến exon 3 gen EGFR chỉ 3,8%: sự chênh lệch này có thể do vị trí địa lý hoặc điều kiện sống khác nhau, do phản ứng của mỗi cơ thể với tác nhân gây bệnh khác nhau trong các điều kiện khác nhau.

Hơn nữa ngoài đột biến trên exon 3 gen EGFR, bệnh nhân UNBTKĐ còn gặp đột biến trên các exon khác như exon 2,7,8... gen EGFR hoặc đột biến trên các exon 12,13 gen FGFR, exon 5,7,8 gen TP53... và mỗi cá thể có thể sẽ mang đột biến của 1 trong các exon trên các gen này, vì vậy tỉ lệ đột biến trên từng exon có thể không cao: như trong nghiên cứu của Jeffrey C Lee đã công bố, tỉ lệ đột biến điểm gen EGFR trên người bị UNBTKĐ 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% [62].

#### **\* Đột biến điểm trên exon 7 gen EGFR**

Kết quả giải trình tự gen của 70 mẫu mô UNBTKĐ, 14/70 trường hợp (20,0%) phát hiện thấy đột biến điểm ở exon 7 gen EGFR. Chúng tôi xác định được 5 dạng đột biến là: D262D (mẫu GB17); T274M, và K293X (mẫu GB24); A289T (mẫu GB26 và GB27); K284N (mẫu GB41, GB47, GB55, GB59, GB61, GB62, GB67); kết quả của chúng tôi có 2 mẫu GB26 và GB27

có vị trí đột biến tại codon 289 trùng với vị trí đột biến trong nghiên cứu của tác giả Jeffrey C Lee. Theo nghiên cứu của Jeffrey C Lee tại vị trí codon 289 có 3 kiểu đột biến là p.A289T (1 mẫu); p.A289V (3 mẫu); p. A289D (1 mẫu); như vậy tại vị trí codon 289 rất hay xảy ra đột biến và có nhiều kiểu đột biến, nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ có 1 kiểu đột biến p.A289T và có 2 mẫu có đột biến kiểu này, nhiều hơn 1 mẫu so với nghiên cứu của Jeffrey C Lee [62]. Riêng mẫu GB17 vị trí đột biến có sai lệch 1 codon (vị trí p.D262D), so với nghiên cứu của Jeffrey C Lee có vị trí đột biến là p.T263P; còn lại các đột biến khác là phát hiện mới. Sự sai khác về vị trí đột biến giữa nghiên cứu của chúng tôi so với nghiên cứu của Jeffrey C Lee (5 vị trí so với 4 vị trí) và số lượng đột biến (20,0% so với 5,3%) có thể do điều kiện sống khác nhau, tác nhân gây bệnh khác nhau, hoặc có thể do cách chọn bệnh nhân nghiên cứu, người bệnh được lựa chọn của chúng tôi tập trung tại một bệnh viện, tuy các bệnh nhân này ở nhiều tỉnh khác nhau nhưng chỉ ở vùng Miền Bắc Việt Nam, và thường bệnh nhân nặng, với kích thước khối u khá lớn, đều có chỉ định mổ, nên có thể chưa được đại diện cho bệnh UNBTKĐ nói chung.

**\* Đột biến exon 8 gen EGFR**

Kết quả giải trình tự exon 8 gen EGFR của các mẫu nghiên cứu không phát hiện thấy đột biến, khác với kết quả của tác giả Jeffrey C Lee, có 2/132 (chiếm 1,5%) mẫu có đột biến trên exon 8 gen EGFR, 1 mẫu có kiểu đột biến tại vị trí p.R324L và 1 mẫu đột biến ở vị trí p.E330K [62]. Có thể số mẫu nghiên cứu của chúng tôi còn ít, 70 mẫu so với 132 mẫu của tác giả; nhưng cũng thấy rõ rằng số mẫu có đột biến ở exon 8 là rất ít. Theo chúng tôi cần phải có nghiên cứu tăng về số lượng mẫu nhiều hơn nữa để kết luận.

Kết quả của chúng tôi cũng khá phong phú về các kiểu đột biến điểm, và trên cùng gen có thể có 2 vị trí đột biến (đột biến trên exon 7 của mẫu GB24). Hầu hết là các đột biến sai nghĩa, song cũng có đột biến không làm thay đổi acid amin trong phân tử protein (đột biến trên exon 7 của mẫu GB17).

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 [62]. 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.

#### **4.2.4.2. Đặc điểm đột biến xóa đoạn exon 2 đến exon 7 gen EGFR**

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 [63],[64],[68].

Trong nghiên cứu, chúng tôi đã xác định được 6/70 trường hợp có đột biến xóa đoạn gen, chiếm 8,6%; trong đó có hai dạng đột biến xóa đoạn, một dạng là đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 7, đa số là các đột biến dạng này, có 5/6 trường hợp (chiếm 7,2%); dạng đột biến thứ hai là đột biến xóa đoạn từ exon 4 đến exon 7, có 1/6 trường hợp (chiếm 1,4%).

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

ngiên cứu của Judith Jeuken: 16,3% (17/104) trường hợp mắc UNBTKĐ có xóa đoạn gen dạng EGFRvIII [88], có thể do số mẫu nghiên cứu của chúng tôi ít hơn, nên có kết quả đột biến xóa đoạn thấp hơn.

Các nghiên cứu dạng xóa đoạn gen EGFRvIII đã công bố đều có tỷ lệ xóa cao hơn, Frederick L và cộng sự năm 2000 báo cáo, kết quả đột biến xóa đoạn gen EGFR với tỉ lệ 67% xóa đoạn dạng D6-273; ngoài ra còn nhiều kiểu xóa khác như: D6-185; D521-603; D958-1030. So với nghiên cứu của Frederick L thì số kiểu xóa đoạn mà chúng tôi xác định được là ít, vì chúng tôi chỉ tập trung nghiên cứu vào một số các exon cụ thể thường gặp đột biến xóa, như exon 2, 3, 4, 5, 6, 7, và một số exon chứng khác như 8, 13, 16, 23; nên không xác định được các kiểu xóa đoạn khác. Và nghiên cứu của chúng tôi xác định xóa đoạn theo phương pháp MLPA nên chỉ xác định được kiểu xóa theo exon, chứ không xác định được kiểu xóa cụ thể tương ứng với acid amin trên phân tử protein như nghiên cứu của Frederick L, giải mã toàn bộ gen EGFR nên đã xác định được kiểu xóa là: xóa từ acid amin 6 đến acid amin 273, hay xóa từ acid amin 6 đến 185; từ acid amin 521 đến acid amin 603; từ acid amin 958 đến acid amin 1030 trên phân tử protein tương ứng [63].

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%); đứng 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 và các cộng sự ở đại học Y Kumamoto tỉ lệ đột biến EGFR ở bệnh nhân UNBTKĐ là 46% trong đó tỉ lệ đột biến EGFRvIII là 45% [65], và tỉ lệ mang đột biến xóa dạng EGFRvIII của chúng

tôi thấp hơn nhiều (8,6% so với 45%). Hay theo Youngmin Choi có 43,8% bệnh nhân có đột biến dạng EGFRvIII [66], điều này 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.

#### **4.2.5. Đặc điểm đột biến điểm trên exon 12, exon 13 gen FGFR**

Miền kinase của FGFR là vị trí của một số đột biến có tác động đáng kể trong ung thư. Đặc biệt quan trọng là các đột biến trong vùng kích hoạt và điểm tự phosphoryl hóa, hiện diện trong tất cả các loại FGFR, các đột biến này tăng cường hoạt tính kinase, sự tự phosphoryl hóa của thụ thể và tín hiệu hạ lưu. Lập bản đồ các đột biến với cấu trúc ba chiều của FGFR rất có giá trị trong nghiên cứu và chẩn đoán bệnh sinh UNBTKĐ. Một số cấu trúc FGFR đã được thử nghiệm cho đến nay, và Ngân hàng Dữ liệu Protein FGI [11], là cơ sở quan trọng để xác định vị trí của các đoạn FGFR bị biến đổi với sự hoàn chỉnh của cấu trúc đặc biệt này.

Để tìm hiểu cơ sở dẫn đến hoạt động bất thường của Tyrosin kinase FGFR, Rand và cộng sự đã xác định sự thay đổi protein cấu trúc bằng cách sử dụng số dư lượng acid - base trên bề mặt các acid amin. Để xác định tác động của sự đột biến vùng kinase lên cấu trúc protein, mô hình so sánh sự tương đồng trong cấu trúc được thực hiện, bằng cách sử dụng cấu trúc protein đã được xác định để kiểm tra từng thay đổi acid amin một cách riêng rẽ với cấu trúc đối chứng. Dựa vào cơ sở này Rand và cộng sự đã quan sát thấy tại vị trí codon 546 trên phân tử protein nếu có sự thay thế Asparagine (AAC) bằng acid amin Lysin (AAA) và tại vị trí codon 576 nếu Arginine (CGG) bị thay thế bằng Tryptophan (TGG) thì dư lượng acid - base trên bề mặt của các acid amin bị thay thế sẽ thay đổi, và cấu trúc FGFR1 bị thay đổi [16]. Đây là cơ sở cho sự hoạt động bất thường của thụ thể FGFR1, làm rối loạn hoạt động tế bào và là cơ sở phát sinh u nguyên bào thần kinh đệm. Một số đột biến



trong FGFR đã được xác định trong u nguyên bào thần kinh đệm như N546K, N544K, R576W, R574W [16],[69].

Các kết quả giải trình tự gen trên exon 12 và exon 13 của gen FGFR trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, hình ảnh các đỉnh của tín hiệu rõ ràng và hầu như không có các tín hiệu nhiễu, là minh chứng cho sự tối ưu các giai đoạn của quy trình kỹ thuật đã sử dụng của chúng tôi.

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 của gen FGFR, chứng tỏ bệnh nhân mắc UNBTKĐ ở Việt Nam phát hiện được đột biến gen FGFR tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới. Đây là hai đột biến làm thay đổi cấu trúc phân tử protein ở miền kinase và được chứng minh đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tiến triển và quyết định tính đáp ứng với thuốc ức chế FGFR của khối u [16],[70].

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 [16],[69]; kết quả nghiên cứu của chúng tôi tìm thấy có hai điểm N546K và R576W giống với nghiên cứu đã công bố, nhưng chúng tôi chưa thấy các đột biến kiểu N544K và R574K, có thể số mẫu nghiên cứu của chúng tôi còn nhỏ hoặc đặc điểm đột biến khác nhau theo chủng tộc, vùng miền, điều này cần phải được nghiên cứu thêm.

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.

Nghiên cứu của chúng tôi xác định được 5 đột biến của năm bệnh nhân trên tổng số 70 bệnh nhân (tỉ lệ 5/70 tương ứng khoảng 7,1%), chứng tỏ 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. Tuy rằng tỉ lệ đột biến phát hiện chưa cao, song đây 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%), đứng thứ hai là đột biến trên gen FGFR với tỷ lệ là 7,1%; thấp nhất là đột biến gen TP53 với 2,9% (hình 3.22).

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

Ngày nay, các nghiên cứu ngày càng khẳng định cơ chế sinh bệnh ung thư là do đột biến gen, mối quan tâm hàng đầu của các nhà Khoa học Y sinh. Quá trình sinh ung thư liên quan chặt chẽ đến tổn thương hai nhóm gen sinh ung thư và gen kháng ung thư. Khởi phát của sinh ung thư thường là từ tế bào gốc, do tiếp xúc với chất sinh ung thư gây ra những đột biến làm thay đổi không hồi phục của nhân tế bào. Các tế bào đột biến biểu hiện sự đáp ứng kém với môi trường và ưu thế tăng trưởng chọn lọc ngược với tế bào bình thường ở xung quanh. Quá trình này diễn ra rất nhanh và hoàn tất trong một

vài phần giây và có đặc điểm là không thể đảo ngược được. Đa số tế bào được khởi phát hoặc là sẽ không tiến triển thêm, hoặc là chết đi, hoặc bị cơ chế miễn dịch vô hiệu hóa. Nhưng nếu những tế bào được khởi phát này tiếp tục được tăng trưởng, được thúc đẩy do các yếu tố tác nhân sẽ dẫn tới sự thay đổi biểu hiện gen, sự bành trướng đơn dòng có chọn lọc và sự tăng sinh tế bào khởi phát, nhưng có khả năng hồi phục. Sinh ung thư gồm 2 giai đoạn khởi phát và thúc đẩy, tiếp đó là giai đoạn chuyển biến, kế tiếp của quá trình phát triển ung thư, cho phép sự xâm nhập hay những ổ tế bào ung thư nhỏ, bắt đầu đi vào tiến trình không hồi phục về hướng ác tính lâm sàng. Sau đó các tế bào ung thư bắt đầu lan tràn, biểu hiện là sự tăng trưởng nhóm tế bào tại mô nào đó, có thể ngắn hoặc dài vài tháng đến nhiều năm, trong giai đoạn này tế bào ung thư gia tăng, nhưng vẫn còn quá nhỏ để phát hiện bằng những phương pháp phân tích được. Giai đoạn cuối cùng của ung thư là tiến triển gồm xâm lấn và di căn: biểu hiện ở tính di động của tế bào ác tính, di chuyển đến các vị trí mới và tăng trưởng tại đó [5],[6]. Khi hiểu rõ về quá trình phát sinh, phát triển bệnh liên quan đến đột biến gen, sẽ là cơ sở cho các tác động vào các giai đoạn gen, ức chế tế bào ung thư, nhằm ngăn chặn sự phát triển bệnh. Đây chính là hướng đích đến của các nhà nghiên cứu. U nguyên bào thần kinh đệm là một loại ung thư ác tính độ IV, sự phát sinh và phát triển bệnh không nằm ngoài cơ chế gen này. Do đó việc nghiên cứu tìm ra các đột biến gen để từ đó đưa ra hướng điều trị cho người bệnh đạt hiệu quả nhất có thể, đang là mối quan tâm hàng đầu của chuyên ngành Thần kinh học và Ung thư học trên thế giới. Nghiên cứu của chúng tôi đã xác định được một số đột biến gen thường gặp ở người mắc UNBTKĐ, và chúng tôi cũng phân tích thêm một số đặc điểm của người có đột biến gen trong bệnh UNBTKĐ, góp phần hiểu rõ hơn về bệnh, giúp thầy thuốc lâm sàng có thể định hướng điều trị bệnh tốt hơn.

### ***4.3.1. Đặc điểm tuổi và giới của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen***

Bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen trong nghiên cứu của chúng tôi gặp nhiều ở lứa tuổi trung niên trở lên, cao nhất ở lứa tuổi 55-64 tuổi (28,1%), sau đó là lứa tuổi 35 đến 44 và 45-54 tuổi (cùng 15,6%) (bảng 3.11), tuổi thấy đột biến gen thấp nhất là 5 tuổi, và cao nhất là 78 tuổi, còn ở nhóm không thấy đột biến gen tuổi thấp nhất là 20 tuổi và cao nhất là 72 tuổi (bảng 3.8), chứng tỏ đột biến gen trong UNBTKĐ hay gặp ở lứa tuổi trẻ hơn. Trong nhóm tuổi nhỏ và vị thành niên (< 20 tuổi) thì cả 3 trường hợp (100%) đều mang đột biến gen (bảng 3.11), để kết luận đột biến gen trong u nguyên bào thần kinh đệm gặp hầu hết ở lứa tuổi trẻ em < 20 tuổi hay không, cần nghiên cứu thêm với số lượng mẫu lớn hơn. Số thấy đột biến gen tại các nhóm lứa tuổi chưa tìm thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm không thấy đột biến gen, có thể số lượng mẫu ở các nhóm lứa tuổi chưa đủ lớn.

Trong khi đó đột biến gen giữa nam và nữ trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm lại thấy sự khác nhau rất rõ ràng, đột biến gen EGFR ở nam (81,5%) cao hơn so với đột biến gen ở nữ (18,5%) có ý nghĩa thống kê, (với  $p = 0,02$ ); kết quả này phần nào lý giải mối liên quan đột biến gen trong sinh bệnh UNBTKĐ, nam giới mắc UNBTKĐ cao hơn nữ giới, (tỉ lệ nam/nữ thường từ 1,4-1,7 [4],[19]); có thể do đột biến gen EGFR ở nam đã làm gia tăng mắc bệnh, nên nam mắc bệnh nhiều hơn nữ. Đối với gen FGFR thì ngược lại giới nữ có đột biến gen cao hơn nam giới, có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,05$ ), có thể do số mẫu có đột biến gen FGFR còn ít; và cả 2 đột biến ở gen TP53 đều là nữ; nhưng số lượng có đột biến ở gen EGFR nhiều hơn nhiều so với số đột biến ở gen FGFR cộng gen TP53, do đó kết quả chung nam giới ở bệnh nhân UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến gen cao hơn nữ giới.

### ***4.3.2. Đặc điểm về kích thước khối u ở người thấy đột biến gen trong bệnh UNBTKĐ***

Đặc điểm bệnh UNBTKĐ là thời gian tiến triển lâm sàng rất nhanh, chỉ vài tháng sau khi phát hiện đã có các biểu hiện nặng nề như đau đầu nhiều, buồn nôn, nôn và các triệu chứng về thần kinh khác, kết quả chụp cộng hưởng từ hoặc CT não cho thấy kích thước khối u thường đã rất lớn, kết quả nghiên cứu của Trần Chiến ghi nhận, người UNBTKĐ có kích thước u từ 40mm đến 60mm gặp 61,8%, trên 60mm gặp 33,9% và rất ít có kích thước < 40mm (1,7%) [26]. Nghiên cứu kích thước khối u của người UNBTKĐ chúng tôi phát hiện thấy đột biến gen về đặc điểm khác biệt so với người không thấy đột biến, kết quả (bảng 3.15) cho thấy kích thước khối u của người mắc UNBTKĐ thường lớn, trên 50% người mắc bệnh có kích thước khối u > 5cm, nhưng người thấy đột biến gen có kích thước u chưa thấy có sự khác biệt với người không thấy đột biến gen ( $p > 0,05$ ), có thể cần nghiên cứu với số lượng mẫu lớn hơn.

### ***4.3.3. Đặc điểm hai thể bệnh nguyên phát và thứ phát của UNBTKĐ***

Tổ chức Y tế thế giới đã khuyến cáo về hai thể bệnh nguyên phát và thứ phát của UNBTKĐ: chúng có đặc điểm khác nhau về gốc tế bào phát sinh bệnh, UNBTKĐ nguyên phát phát sinh từ những nguyên bào thần kinh đệm chưa biệt hóa hoặc rất ít biệt hóa, còn thể UNBTKĐ thứ phát bắt nguồn từ những tế bào thần kinh đệm hình sao đã biệt hóa sau đó chuyển thể sang nguyên bào thần kinh đệm, theo phân loại thì các u nguyên phát có độ ác tính cao (độ IV), thường xuất hiện ở những người cao tuổi, thời gian tiến triển bệnh nhanh, tử vong nhanh mặc dù điều trị tích cực, u thứ phát thường gặp ở lứa tuổi trẻ hơn, có độ ác tính thấp hơn (từ u thần kinh đệm độ I, II, III chuyển sang u nguyên bào thần kinh đệm độ IV) thời gian tiến triển bệnh và thời gian sống kéo dài hơn, do đó tiên lượng bệnh của u thứ phát tốt hơn u nguyên phát, tuy vậy trên lâm sàng u nguyên phát gặp nhiều hơn u thứ phát [31],[32].

Về mặt mô học, UNBTKĐ nguyên phát và thứ phát phần lớn khó phân biệt được, nhưng chúng khác nhau về cấu trúc di truyền và biểu sinh của chúng. Một số nghiên cứu gần đây đã chứng minh đột biến gen IDH1 là các dấu hiệu di truyền quyết định của u nguyên bào thần kinh thứ phát, không có trong u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát. Đột biến IDH1 là sự thay đổi di truyền sớm nhất có thể phát hiện được trong các u tế bào hình sao khuếch tán cấp thấp và trong tế bào thần kinh đệm ít nhánh, chỉ ra rằng các khối u này có nguồn gốc từ các tế bào tiền thân thần kinh khác với các tế bào thần kinh đệm nguyên phát. Trong nghiên cứu đã tóm tắt các đặc điểm dịch tễ, lâm sàng, mô bệnh học, di truyền và biểu hiện của u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát và thứ phát và hậu quả sinh học của đột biến IDH1, và kết luận rằng sự thay đổi di truyền này là một dấu hiệu phân tử chẩn đoán xác định của u nguyên bào thần kinh thứ phát và đáng tin cậy và khách quan hơn so với tiêu chí lâm sàng. Mặc dù có hình dạng mô học tương tự nhau, u nguyên bào thần kinh nguyên phát và thứ phát là những thực thể khối u riêng biệt có nguồn gốc từ các tế bào tiền thân khác nhau và có thể yêu cầu các phương pháp điều trị khác nhau [99].

Theo WHO năm 2016, dấu hiệu di truyền quyết định của UNBTKĐ thứ phát là đột biến IDH1. Đột biến IDH1 là biến đổi di truyền sớm nhất có thể phát hiện được trong tiền thân của các u sao bào, chỉ ra rằng các khối u này có nguồn gốc từ các tế bào tiền thân thần kinh khác với các tế bào nguyên bào thần kinh nguyên phát. Mặc dù xuất hiện mô học tương tự, UNBTKĐ nguyên phát và thứ phát là các thực thể khối u riêng biệt có nguồn gốc từ các tế bào tiền thân khác nhau và có thể yêu cầu phương pháp điều trị khác nhau. Tuy nhiên năm 2017, WHO mới công bố đột biến về IDH để phân biệt thể nguyên phát và thứ phát, và đề tài của chúng tôi bắt đầu nghiên cứu từ năm 2015, do

đó đề tài của chúng tôi không nghiên cứu về gen IDH, và chúng tôi dựa vào tiêu chuẩn của WHO 2007 để phân loại nguyên phát và thứ phát: để xác định được là UNBTKĐ thứ phát phải có kết quả giải phẫu bệnh xác định u thần kinh đệm độ I, II, III của các lần phẫu thuật trước, và kết quả giải phẫu bệnh lần này là u độ IV. Kết quả nghiên cứu 70 mẫu của 70 bệnh nhân UNBTKĐ, chúng tôi gặp chủ yếu là UNBTKĐ nguyên phát (91,4%), chỉ gặp rất ít trường hợp u thứ phát (8,6%), 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%.

Khi so sánh về một số đặc điểm của hai thể bệnh, kết quả của chúng tôi cho thấy: trung bình tuổi mắc của thể thứ phát thấp hơn thể nguyên phát (bảng 3.17), 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, nhưng kết quả có sự khác biệt rất rõ về thời gian tiến triển bệnh, thời gian sống từ khi mắc bệnh đến khi chết (bảng 3.18). 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  $p = 0,000$ ). Kết quả của chúng tôi 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 (WHO 2016), thể thứ phát cũng thấp hơn ( $13,2 \pm 14,1$  tháng) so với 15 tháng (WHO 2016). Về phân bố thời gian trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật của 2 thể nguyên phát và thứ phát (bảng 3.19) đều phần lớn từ 6 tháng trở xuống (82,2%), tuy nhiên thể nguyên phát hầu hết (87,2%) có thời gian

tiến triển bệnh ngắn ( $\leq 6$  tháng) cao hơn so với thể thứ phát (50%), có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,048$ ).

Mặc dù thời gian sống trung bình sau phẫu thuật lấy u của thể bệnh thứ phát ( $13,2 \pm 5,8$  tháng) dài hơn thể bệnh nguyên phát ( $9,7 \pm 8,4$  tháng), nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), tuy nhiên sự phân bố thời gian sống sau phẫu thuật (bảng 3.20) 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 ( $p = 0,016$ ). Kết quả của chúng tôi cũng cho thấy thời gian sống trung bình từ khi phát hiện bệnh đến khi chết của thể bệnh thứ phát là  $26,5 \pm 11,5$  tháng dài hơn đáng kể so với thể bệnh nguyên phát là  $12,6 \pm 8,6$  tháng (bảng 3.18), có ý nghĩa thống kê (với  $p = 0,001$ ); so với công bố của WHO là UNBTKĐ nguyên phát sống trung bình là 9,9 tháng, u nguyên bào thần kinh đệm thứ phát sống trung bình là 14 tháng, thì thời gian sống trung bình của bệnh u nguyên bào thần kinh đệm nguyên phát và thứ phát trong nghiên cứu của chúng tôi đều dài hơn. Xét về phân bố thời gian sống hoặc chết của người mắc UNBTKĐ, chúng tôi có kết quả: 33,3% người mắc UNBTKĐ thể nguyên phát chết trước 6 tháng tính từ khi phát hiện bệnh, nhóm thứ phát không có trường hợp nào chết trước 6 tháng, sự khác biệt rất rõ ( $p = 0,013$ ). Tất cả các trường hợp thể thứ phát đều sống được trên 12 tháng kể từ khi phát bệnh. Có 1 trường hợp thể thứ phát sống được trên 36 tháng, thể nguyên phát không có trường hợp nào (bảng 3.21). Nếu được điều trị hỗ trợ sau phẫu thuật bằng xạ trị hoặc hoá chất thì thời gian sống của cả hai thể trong nghiên cứu của chúng tôi đã kéo dài hơn đáng kể, thời gian sống từ 12 đến 24 tháng thể nguyên phát



tăng lên 80% (nếu được điều trị) so với 66,7% (nếu tính chung cả không được điều trị) và thể thứ phát tăng lên 43,8% so với 23,1% có ý nghĩa thống kê (bảng 3.20 và 3.22). 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.

#### ***4.3.4. Đặc điểm về thời gian sống của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm phát hiện thấy đột biến gen***

Chúng tôi xác định thời gian sống sau mắc bệnh tính từ khi phát hiện có các triệu chứng bệnh đến khi chết của người bệnh. Các triệu chứng để phát hiện bệnh ở người mắc UNBTKĐ thường là đau đầu, chóng mặt, buồn nôn, nôn, yếu nửa người, tê bì giảm vận động nửa người, giảm thị lực... bắt buộc người bệnh phải đi khám bệnh. Tất cả người bệnh trong nghiên cứu đều được phẫu thuật, do đó chúng tôi chia thành các mốc thời gian: thời gian sống tính từ khi phát hiện bệnh đến khi phẫu thuật, thời gian sống sau phẫu thuật đến khi chết, và thời gian sống từ khi phát hiện bệnh đến thời điểm kết thúc nghiên cứu.

##### ***4.3.4.1. Thời gian sống trung bình của người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm***

Kết quả điều trị đối với người bệnh được đánh giá bằng thời gian khỏi bệnh sau điều trị, hoặc thời gian sống sau điều trị, với bệnh UNBTKĐ kết quả điều trị phụ thuộc nhiều yếu tố như vị trí, kích thước khối u, và phương pháp điều trị, ngoài ra còn phụ thuộc tuổi, tuổi càng trẻ thì thời gian sống thêm càng dài hơn [64].

Nghiên cứu của chúng tôi có kết quả thời gian sống thêm sau phẫu thuật của người mắc UNBTKĐ trung bình là  $10,1 \pm 8,2$  tháng (bảng 3.18), kết quả này tương đương với một số báo cáo, nghiên cứu của Trần Chiến đã công bố về thời gian sống trung bình sau phẫu thuật của UNBTKĐ độ

IV là  $9,7 \pm 0,3$  tháng [26], theo Hou bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm sống trung bình 8-9 tháng sau phẫu thuật [100]. Nhưng so với Dương Đại Hà với kết quả thời gian sống sau phẫu thuật trung bình  $15,93 \pm 2,91$  tháng thì kết quả của chúng tôi thấp hơn [27]. Nhưng nếu tính trung bình thời gian sống tổng thể thì kết quả của chúng tôi là  $14,5 \pm 10,1$  tháng (bảng 3.18), cao hơn so với kết quả của Bergern: UNBTKĐ độ IV sống trung bình 1 năm [101], hay Osborn: UNBTKĐ độ I sống 10 năm chiếm 70%, u độ II sống 6 đến 10 năm, u độ III sống 2 đến 3 năm, UNBTKĐ độ IV sống trung bình từ 9 đến 12 tháng [102].

Trong bệnh UNBTKĐ mặc dù đã được điều trị tích cực bằng phẫu thuật, kết hợp xạ trị và hoá chất, nhưng u vẫn tái phát rất nhanh, khoảng chỉ vài tháng sau phẫu thuật, và cũng chưa thể xác định được người bệnh nào thì tái phát nhanh người bệnh nào thì chậm hơn, nhưng sau khi tái phát bệnh tiến triển nhanh, tử vong nhanh. Người bệnh UNBTKĐ từ kết quả của chúng tôi có tỷ lệ sống sau phẫu thuật dưới 6 tháng là cao nhất chiếm 37,8%; 24,4% sống từ 6 tháng đến dưới 1 năm; 28,9% sống từ 12 tháng đến dưới 2 năm; chỉ có 8,9% sống từ 2 năm đến 3 năm, không có bệnh nhân nào sống được trên 3 năm sau phẫu thuật. Như vậy tỷ lệ tử vong trong năm đầu của UNBTKĐ sau phẫu thuật vẫn là cao nhất (khoảng 62,2%) (bảng 3.20), đánh giá thời gian sống sau phẫu thuật đến 28 tháng của bệnh nhân UNBTKĐ của Dương Đại Hà và Hà Kim Trung từ năm 2011 đến 2012: tỷ lệ tử vong sau phẫu thuật 6 tháng là 43,8% [27], cao hơn so với kết quả của chúng tôi 37,8%.

So với kết quả nghiên cứu của Hou với tỷ lệ 22% sống trên 2 năm, 10% sống được 5 năm sau phẫu thuật [100], thì người bệnh u nguyên bào thần kinh đệm độ IV trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn, chỉ có khoảng 8,9% sống từ 2 năm đến 3 năm sau phẫu thuật (bảng 3.20). Lý giải về tỷ lệ sống sau 2 năm của người bệnh UNBTKĐ ở Việt Nam thấp hơn trên thế giới có thể do điều trị sau phẫu thuật ở Việt Nam chưa đồng đều, việc kết hợp xạ trị hay hóa

chất sau phẫu thuật chưa thực hiện được cho tất cả các bệnh nhân, vì giá thành điều trị còn cao, chưa áp dụng được cho người bệnh thuộc đối tượng người nghèo.

#### ***4.3.4.2. Đặc điểm thời gian sống của người bệnh phát hiện thấy đột biến gen có điều trị xạ trị, hóa chất***

Việc quản lý và điều trị người mắc UNBTKĐ ở một số nước như Mỹ, hay Anh hoặc các nước Bắc Âu khá chặt chẽ, hoặc các nghiên cứu về bệnh và kết quả điều trị cũng được quan tâm, nhất là vấn đề lưu trữ mẫu rất thuận tiện cho nghiên cứu. Nhưng ở một số nước Châu Á, cụ thể ở Việt Nam vì chưa có kho lưu trữ tốt nên việc thu thập mẫu mô nghiên cứu gặp nhiều khó khăn, việc quản lý và điều trị bệnh chưa được đồng đều, và cũng chưa có nghiên cứu thống kê trên toàn quốc về căn bệnh này. Khó khăn gặp phải trong khi nghiên cứu của chúng tôi chính là việc lấy mẫu bệnh và mẫu chứng, mẫu bệnh được lấy từ khối u sau phẫu thuật, phẫu thuật viên chỉ có thể cắt bỏ tối đa phần u mà không thể lấy sang các phần mô lành, vì ảnh hưởng đến vùng thần kinh chức năng của người bệnh, do đó chúng tôi không thể lấy được mẫu chứng mô lành của bệnh u nguyên bào thần kinh đệm, (nếu có tình lấy mô não lành là vi phạm đạo đức nghiên cứu Y sinh). Ngoài ra chúng tôi cũng không được cung cấp mẫu chứng bệnh, khi so sánh chúng tôi so trên mẫu Gen - Banks, là mẫu gen chuẩn của người bình thường.

Quản lý và theo dõi điều trị của người bệnh sau phẫu thuật trong nghiên cứu chưa được đồng nhất, tuy nhiên chúng tôi khai thác thông tin (qua bệnh án lưu trữ tại bệnh viện và phỏng vấn người nhà, người thân của người bệnh theo mẫu phiếu nghiên cứu), kết quả có 45 người bệnh có đủ thông tin về thời gian sống sau điều trị, và các thông tin về điều trị xạ trị, hóa chất, do đó trong nghiên cứu về đặc điểm của người bệnh mang đột biến gen được điều trị xạ trị hoặc hóa chất, chúng tôi phân tích số mẫu với  $n = 45$ . Chúng tôi qui định, nếu

người bệnh được điều trị thêm sau mổ là xạ trị, hoặc chỉ dùng hóa chất hoặc dùng cả xạ trị và hóa chất đều được coi là có điều trị, còn người bệnh không điều trị xạ trị hoặc không dùng hóa chất hoặc không dùng cả xạ trị và hóa chất đều được coi là không điều trị.

Khi tính riêng rẽ từng gen FGFR, EGFR hay chung cả 3 gen trong nghiên cứu của chúng tôi kết quả đều cho thấy: người phát hiện thấy đột biến gen có điều trị xạ trị, hoặc hóa chất có thời gian sống sau phẫu thuật dài hơn người thấy đột biến không được điều trị, không có trường hợp nào chết trước 6 tháng; nếu đột biến gen FGFR không được điều trị thì không có trường hợp nào sống được trên 12 tháng, có được điều trị thì 66,7% sống được từ 12 đến 24 tháng (bảng 3.25). Với gen EGFR (bảng 3.26), nếu đột biến không được điều trị có tới 66,7% chết trước 6 tháng sau phẫu thuật, người thấy đột biến được điều trị có 42,9% sống được trên 12 đến 24 tháng, so với 11,1% người không được điều trị sống được đến thời gian này ( $p = 0,015$ ).

Người bệnh phát hiện thấy đột biến của 1 trong 3 gen FGFR, hoặc gen EGFR, hoặc gen TP53 (bảng 3.27). 50% người thấy đột biến được điều trị sống kéo dài từ 6 đến 12 tháng khác biệt so với 23,1% trường hợp người không được điều trị sống 6 đến 12 tháng ( $p = 0,001$ ). So với kết quả nghiên cứu của tác giả Nguyễn Quang Hiền ghi nhận, thời gian sống 2 năm của u nguyên bào thần kinh đệm độ IV khoảng 10% sau khi đã phẫu thuật, kết hợp xạ trị và hóa chất [103], thì nghiên cứu của chúng tôi có kết quả là tương đương (9,5%), tuy nhiên kết quả của chúng tôi có 12,5% người phát hiện thấy đột biến gen sống được từ 24 đến 36 tháng, chứng tỏ người thấy đột biến gen có đáp ứng tốt với điều trị hơn so với người không thấy đột biến được điều trị (7,7%). Tuy nhiên kết quả nghiên cứu của chúng tôi chưa thấy có người bệnh nào sống được trên 3 năm sau phẫu thuật và điều trị bổ trợ, khác so nghiên

cứu của Nguyễn Quang Hiền có 5,5% người UNBTKĐ độ IV sống 5 năm sau phẫu thuật và điều trị xạ trị, hoá chất.

Tính chung thời gian sống từ khi phát hiện mắc bệnh đến khi ngừng theo dõi, của người UNBTKĐ thấy đột biến gen EGFR hay tổng thấy đột biến một trong 3 gen nghiên cứu được điều trị, dài hơn đáng kể so với người bệnh phát hiện đột biến mà không được điều trị (bảng 3.29, 3.30). Không có người bệnh nào có đột biến được điều trị mà chết trước 6 tháng, so với 45,45% người có đột biến không được điều trị chết trước 6 tháng, có ý nghĩa thống kê, ( $p = 0,02$ ). 90% trường hợp người thấy đột biến không được điều trị sống dưới 12 tháng, trong khi đó 42,9% người thấy đột biến được điều trị sống kéo dài từ 12 đến 24 tháng, ( $p = 0,02$ ). Người thấy đột biến được điều trị có 1 trường hợp sống kéo dài đến trên 36 tháng, người không được điều trị không có trường hợp nào. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nicola Montano: người bệnh UNBTKĐ được điều trị phẫu thuật cắt bỏ khối u, sau đó xạ trị: liều 2 Gy/ 1 lần/ 1 ngày x 5 ngày/1 tuần, tổng liều 60 Gy, kết hợp TMZ hỗ trợ sau phẫu thuật. Kết quả cho thấy những người bệnh UNBTKĐ có đột biến dạng EGFRvIII, tỷ lệ sống sót dài hơn 2,59 lần so với người không có đột biến dạng này với  $p = 0,0023$  (OR = 2,59// 95% CI = 1,40 - 4,79) [64].

Ngoài ra nghiên cứu của Montano cũng đã ghi nhận, người UNBTKĐ có đột biến Methyl Guanine Methyl Transferase (MGMT) sau phẫu thuật, đáp ứng tốt với điều trị xạ trị và TMZ hỗ trợ, và có thời gian sống kéo dài hơn so với người không có đột biến MGMT. Methyl Guanine Methyl Transferase là gen mã hóa cho enzym O6-methylguanine-DNA methyltransferase, đột biến vùng gen khởi động MGMT liên quan đến đáp ứng điều trị của hoá chất TMZ trong UNBTKĐ. Thời gian sống dường như bị hạn chế ở nhóm bệnh nhân bị methyl hóa và bất hoạt khởi động gen MGMT, nhưng lại có đáp ứng tốt với hoá chất điều trị TMZ [64]. Trong khuôn khổ nghiên cứu của đề tài, chúng tôi

chưa thực hiện xác định đột biến của gen MGMT, cần có một nghiên cứu khác cho vấn đề này.

Qua sự phân bố thời gian sống của người có đột biến gen được điều trị cho thấy tác động của điều trị bổ 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 này 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 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... tuy nhiên bước đầu chúng tôi cũng sơ bộ đánh giá thời gian sống của người có đột biến gen được điều trị kéo dài hơn so với người có đột biến gen không được điều trị.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với một số nghiên cứu trên thế giới, chứng minh việc điều trị phẫu thuật kết hợp với xạ trị, hoặc hoá chất đã cải thiện thời gian sống thêm cho bệnh UNBTKĐ, khi chẩn đoán ban đầu là UNBTKĐ: điều trị tiêu chuẩn bao gồm phẫu thuật cắt bỏ tối đa, xạ trị, và hóa trị liệu kèm theo và bổ trợ với temozolomide đã có hiệu quả đáng kể với bệnh nhân UNBTKĐ [64],[66],[68]; Stupp và cộng sự đã báo cáo kết quả cuối cùng của thử nghiệm phase III ngẫu nhiên cho những bệnh nhân bị u nguyên bào thần kinh đệm đã được điều trị bằng temozolomide bổ sung và bức xạ với thời gian theo dõi trung bình hơn 5 năm, sự sống sót trong nhóm điều trị kết hợp (tức là temozolomide và xạ trị) tiếp tục vượt quá mức xạ trị một mình trong suốt 5 năm theo dõi ( $p < 0,0001$ ). Tiên lượng sự sống sót của những bệnh nhân được dùng Temozolomide bổ trợ với xạ trị cho u nguyên bào thần kinh đệm tốt hơn xạ trị đơn thuần trên tất cả các phân nhóm lâm sàng [104]. Kết quả của chúng tôi đã cho thấy bệnh nhân UNBTKĐ sau phẫu

thuật có điều trị xạ trị và hoá chất có tỷ lệ sống sau 6 tháng cao hơn đáng kể so với không được điều trị: không có trường hợp nào (0%) so với 37,8% chết trước 6 tháng sau phẫu thuật (bảng 3.20).

Các đột biến gen EGFR trong bệnh UNBTKĐ ảnh hưởng lớn đến thời gian sống của người bệnh, tỉ lệ sống thấp hơn ở người UNBTKĐ có đột biến gen EGFR, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê [65], tuy nhiên những người mắc UNBTKĐ mang đột biến gen, nếu được điều trị tích cực lại có kết quả rất đáng kể; nghiên cứu của Nicola Montano đã ghi nhận: 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 [64], nghiên cứu của chúng tôi phần nào 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 có đột biến gen được điều trị đã có thời gian sống kéo dài hơn so với người có đột biến gen mà không được điều trị, có ý nghĩa thống kê (bảng 3.30).

Tuy vậy, việc điều trị hiệu quả UNBTKĐ gặp khó khăn hơn điều trị các loại u ở các cơ quan khác do việc cung cấp thuốc vào các tế bào não bị hạn chế bởi các mối nối chặt chẽ nội mô tạo thành hàng rào máu não không thấm nước. Sự phát triển của các mô hình điều trị mới đã bị cản trở bởi sự hạn chế của hàng rào máu não đối với các phương pháp trị liệu. Với những tiến bộ gần đây trong việc định vị lập thể và hình ảnh không xâm lấn, một số nghiên cứu đã tìm cách điều chỉnh lại cấu trúc não để tăng cường khả năng thấm chính xác vào hàng rào bất khả xâm phạm này. Phạm vi rộng của các bức xạ tập trung mang đến khả năng vô tận để phá vỡ tính thấm nội mô với các kiểu và cường độ khác nhau theo tọa độ ba chiều mang đến một điều mới về khả năng tiếp cận với tế bào trong não, cũng như các liệu pháp nhắm vào mục tiêu. Nghiên cứu đã đề xuất đánh giá về tình trạng hiện tại trong phân phối thuốc được nhắm mục tiêu bằng cách sử dụng các phương pháp hướng dẫn bằng hình ảnh không xâm lấn. Cuối cùng, tập trung vào các chiến lược hiện đang

được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng như siêu âm tập trung nhằm mục tiêu và siêu âm tập trung hướng dẫn cộng hưởng từ, các phương pháp thử nghiệm như hạt nano được đốt nóng từ trường, điện trường và laser, các kỹ thuật này đã chứng minh kết quả đáng chú ý cả trong ống nghiệm và trên tế bào sống. Bên cạnh các ứng dụng điều trị, các nền tảng lập thể có thể rất có giá trị trong các ứng dụng lâm sàng cho các chiến lược can thiệp để cải thiện mục tiêu và hiệu quả của thuốc. Đây là nền tảng để hướng dẫn nghiên cứu trong tương lai trong lĩnh vực này [105].

Kết quả nghiên cứu đột biến trên gen TP53, EGFR, FGFR trên người 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.

#### ***4.3.4.3. Đột biến gen kép giữa các gen nghiên cứu TP53 - EGFR - FGFR***

Ngoài việc xác định các đột biến sai nghĩa trong gen, nghiên cứu cũng xác định được một số người bệnh UNBTKĐ có bằng chứng của nhiều thay đổi gen. Trong một số trường hợp (GB24 và GB26 hay GB52 và GB53), nhiều đột biến đã xảy ra trong cùng một khối u không chỉ có đột biến 2 gen mà trong cùng một gen cũng có thể chứa nhiều đột biến.

Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện được một số người bệnh mang đột biến kép, có 1/70 mẫu phát hiện thấy đột biến kép trên exon 2 và exon 7 (GB26), đều là đột biến điểm. Có 2 mẫu phát hiện thấy đột biến điểm kép (đều là đột biến điểm) trên cả hai gen FGFR và EGFR (GB52, GB53). Có 1 mẫu phát hiện thấy đột biến kép đôi trong đó mang 1 đột biến điểm và 1 đột biến xóa đoạn (GB49). Có 1 mẫu phát hiện thấy đột biến kép ba, trong đó một đột biến điểm trên exon 2, một đột biến điểm trên exon 7 và một đột biến xóa từ exon 4 đến exon 7 (GB24). Gen TP53 được cho là gen kiểm soát khối u,



còn gen EGFR và gen FGFR là các gen sinh khối u, nhưng kết quả của chúng tôi chưa thấy có mối liên quan đột biến nào giữa các gen này với nhau, không có trường hợp nào có sự trùng lặp đột biến gen TP53 mà kèm đột biến ở gen EGFR hoặc gen FGFR. Mặc dù có 2 trường hợp có đột biến ở cả gen EGFR và gen FGFR (GB52, GB53). Đột biến kép có ảnh hưởng thế nào sự phát sinh, phát triển của khối u, hay có ảnh hưởng kết quả điều trị như thế nào, trên thế giới chưa có nghiên cứu đề cập đến, và số mẫu đột biến kép trong nghiên cứu của chúng tôi ít, nên chúng tôi chưa so sánh đặc điểm khác biệt của đột biến kép với đột biến đơn hay đột biến có cả trên 2 gen nghiên cứu của người mắc u nguyên bào thần kinh đệm. Tuy nhiên, trên thế giới có nghiên cứu kết luận các gen TP53 - EGFR gây UNBTKĐ là độc lập nhau [52].

Tại Việt Nam, Temozolomid đang được áp dụng điều trị cho người bệnh UNBTKĐ, nhưng chưa có thống kê nào trên số lượng lớn đánh giá được kết quả điều trị, chưa có nghiên cứu đánh giá về người có đột biến và không có đột biến thì có thời gian sống hay chất lượng sống tốt hơn. Và đây cũng là một hướng cho các nghiên cứu tiếp theo. Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên các mẫu mô sau phẫu thuật tại bệnh viện Việt Đức, người bệnh tập trung tại các tỉnh phía Bắc của Việt Nam, cũng không phải tất cả người mắc UNBTKĐ được khám và chữa bệnh hoặc được quản lý tại bệnh viện Việt Đức, do đó loại hình tổn thương đột biến có thể chưa mang tính đại diện cho người Việt Nam, nếu có thể nên mở rộng địa dư nghiên cứu tại Miền Trung, Miền Nam Việt Nam.

Tóm lại, bệnh u nguyên bào thần kinh đệm vẫn đang là mối quan tâm hàng đầu trong chuyên ngành phẫu thuật thần kinh, và chuyên ngành ung thư, về bệnh nguyên, bệnh sinh và điều trị... vì tính chất ác tính, sự phức tạp của bệnh và các phương pháp điều trị hiện nay mặc dù có cải thiện song vẫn chưa mang lại hiệu quả nhiều cho người bệnh. Do đó các nhà khoa học đã và vẫn đang tập

trung nghiên cứu về căn bệnh này, tìm mọi cách để kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân, trong đó tập trung nhiều nhất về lĩnh vực sinh học phân tử [36],[106].

Các kỹ thuật sinh học phân tử ngày càng mang lại những lợi ích to lớn trong việc phát hiện những bất thường trong gen tế bào, nó đã giúp ích không nhỏ cho việc chẩn đoán bệnh, tiên lượng, theo dõi và điều trị bệnh hiệu quả hơn, nhất là trong bệnh ung thư, việc điều trị tận gốc gặp rất nhiều khó khăn, mục đích trong điều trị ung thư là tiêu diệt hết được các tế bào ung thư, nhưng các phương pháp điều trị hiện nay như xạ trị hay hóa trị đều gây tổn thương cho các tế bào lành, và không diệt được hết tế bào ung thư. Mong muốn của ngành Y và các bác sỹ lâm sàng là làm sao để nhắm được trúng đích điều trị, bước đầu điều trị đích ít nhiều đã thành công trong điều trị một số loại ung thư, như điều trị đích trong ung thư phổi, ung thư đại tràng, ung thư vú... do vậy các kỹ thuật phân tử là cơ sở để tìm ra các phương pháp điều trị đích đang hướng tới trong điều trị ung thư ngày nay, trong đó có bệnh u nguyên bào thần kinh đệm.

## 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 ; Giới nam đột biến gen EGFR nhiều hơn giới nữ ( $p = 0,02$ ), giới nữ đột biến gen FGFR nhiều hơn nam ( $p = 0,05$ ), đột biến exon 8 gen TP53 cả 2 trường hợp đều là nữ.

+ 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, ( $p = 0,001$ ). Phân bố thời gian sống của người UNBTKĐ phát hiện thấy đột biến được điều trị so với thấy đột biến không được điều trị:

- + Chết trước 6 tháng : 0% so với 69,2%; ( $p = 0,001$ ).
  - + Sống kéo dài từ 6 đến 12 tháng : 50% so với 23,1%; ( $p = 0,001$ ).
  - + Sống được từ 12 đến 24 tháng : 37,5% so với 0%; ( $p = 0,001$ ).
- Chưa tìm thấy mối liên quan giữa các gen đột biến ở người UNBTKĐ.

## **HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO**

Nghiên cứu tiến 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 với số lượng mẫu lớn hơn.

Lập kế hoạch quản lý bệnh nhân UNBTKĐ trên các bệnh viện có điều trị nội khoa, ngoại khoa thần kinh trên toàn quốc, để hệ thống bệnh và báo cáo khoa học.

Quản lý các mẫu mô bệnh UNBTKĐ riêng biệt để thuận tiện cho việc nghiên cứu.

## **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.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phùng Trung Hùng, Đào Nguyễn Phương Linh, Nguyễn Phước Long (2013). *Sinh lý học tế bào thần kinh*, < <http://www.docsachsinh.com/sinh-hoc-phan-tu-te-bao/>>
2. Lê Xuân Trung và cộng sự (2003). *Bệnh học phẫu thuật thần kinh*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. David N. Louis, Arie Perry, Guido Reifenberger, et al (2017). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 401(016), 1545-1.
4. Quinn T. Ostrom, Jill S. Barnholtz-Sloan, Ph.D et al (2016). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro-Oncology*, 18(5), v1-v75.
5. Nguyễn Văn Hiếu (2015). *Ung thư học*, Nhà xuất bản Y học, Hà nội.
6. Tạ Thành Văn (2010). *Con đường tín hiệu tế bào và dấu ấn sinh học trong chẩn đoán*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
7. Nishikawa R, Ji XD, et al (1994). A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 91(16), 7727-7731.
8. Anita Huttner (2017). Molecular neuropathology and ontogeny of malignant. *Malignant Brain Tumors*, Springer International Publishing, 15-29.
9. Toshinori Ozaki and Akira Nakagawara (2011). Role of p53 in cell Death and human Cancers. *Cancer*, 3, 994-1013.
10. Lurje G and Lenz H.J (2009). EGFR signaling and drug discovery. *oncology*, 77, 400-410.

11. Haugsten E.M, Wiedlocha A, Olsnes S. Ellen et al (2010). Roles of Fibroblast Growth Factor Receptors in Carcinogenesis. *Mol Cancer Res*, 10, 1158-1541.
12. Xiang Wang et al (2014). Gain of Function of Mutant TP53 in Glioblastoma: Prognosis and Response to Temozolomide. *Annals of Surgical Oncology*, 21,(4), 1337-1344.
13. Van Meir EG, Kikuchi T et al (1994). Analysis of the p53 Gene and Its Expression in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research*, 54,649-652.
14. O'Brien C, Wallin J.J, Sampath D et al (2010). Predictive biomarkers of sensitivity to the phosphatidylinositol 3' kinase inhibitor GDC-0941 in breast cancer preclinical models. *Clin Cancer Res*, 16(14), 3670-3683.
15. Tạ Thành Văn (2014). Nghiên cứu xác định đột biến gen quyết định tính đáp ứng thuốc trong điều trị ung thư đại trực tràng và ung thư phổi, Đề tài cấp nhà nước, mã số KC04.06/11-15, Trường Đại học Y Hà Nội.
16. Vikki Rand, Huang J, Stockwell T.E et al (2005). Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 14344-9.
17. Semenza GL (2016). Dynamic regulation of stem cell specification and maintenance by hypoxia-inducible factors. *Mol Aspect Med*, 47-48, 15-23.
18. Thorne AH, Zanca C, Furnari F (2016). Epidermal growth factor receptor targeting and challenges in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 18, 914-8.
19. Andrew Brodbelt, David Greenberg, Tim Winters, et al (2015). Glioblastoma in England: 2007-2011. *European journal of cancer*, 51(4), 533-542.
20. Lönn S, Klaeboe L, Hall P et al (2004). Incidence trends of adult primary intracerebral tumors in four Nordic countries. *Int J Cancer*, 108(3):450-5.



21. Suvi Larjavaara, Riitta Mäntylä, Tiina Salminen et al (2007). Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol*, 9(3), 319-325.
22. Archya Dasgupta, Tejpal Gupta, and Rakesh Jalali (2016). Indian data on central nervous tumors: A summary of published work. *South Asian J Cancer*, 5(3), 147-153.
23. Lee CH1, Jung KW, Yoo H, Park S, Lee SH (2010). Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *Journal korean neurosurg*, 48(2), 145-52.
24. Lê Xuân Trung, Nguyễn Như Bằng (1975). Confrontations anatomo - clinique des tumeurs intra crâniennes opérées à l'hôpital universitaire VietDuc. *Travaux de la Clinique chirurgicale universitaire de l'Hôpital VietDuc*, I, 91-105.
25. Kiều Đình Hùng (2006). *Nghiên cứu ứng dụng quang động học trong điều trị Gliome não ác tính*, Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
26. Trần Chiến (2011). *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, chẩn đoán hình ảnh và kết quả phẫu thuật u não tế bào hình sao (astrocytoma) bán cầu đại não*, Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
27. Dương Đại Hà, Hà Kim Trung (2014). *Đặc điểm lâm sàng, chẩn đoán hình ảnh và kết quả phẫu thuật u não tế bào hình sao*. *Y học Việt Nam*, 7(2), 64-67.
28. Baley P and Cushing H.A (1926). Classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of program. *JB. Lippincott, Philadelphia*, 521-22.
29. Kernohan J.W et al (1949). A simplified classification of gliomas. *Proc Staff meet Mayo clin*, 24(3), 71-75.
30. Paul Kleihues, Peter C. Burger and Bernd W (1993). The New WHO Classification of Brain Tumours. *Brain Pathol*, 3(3), 255-68

31. Paul Kleihues MD, David N, Louis MD et al (2002). The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 3(1), 215-225.
32. David N, Hiroko Ohgaki, Otmar D Wiestler et al (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 114(2), 97-109.
33. Wesseling P, Vanden Bent M, Perry A (2015). Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*, 129(6). 809-27.
34. Zhenqiang He, MD<sup>a,b</sup>, Richard Alan Mitteer Jr, Msa, Yonggao Mou, MD<sup>b</sup>, Yi Fan, MD, PhD<sup>a,c\*</sup> (2017). Multimodality targeting of glioma cell. *Glioblastoma*, 55-72.
35. Chinot OL, Wick W, Mason W, et al (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*, 370, 709-22.
36. Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS (2014). Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annual review of pathology*, 9,1-25.
37. Wdward W. Jung, Mda, John Choi, Medb, Samuel T. Chao, Eron S. Murphy, John H.Suh, MD<sup>c\*</sup> (2017). Principles and tenets of radiation treatment in glioblastoma. *Glioblastoma*, 105-131.
38. Elena Fomchenko and veronica L.S Chiang (2017). The role of lazer-Induced thermal therapy in the management of malignant. *Malignant Brain Toumors*, Springer International Publishing, 103-119.
39. Stewart LA (2002). Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trial. *Lancet*, 359(9311), 1011-8

40. Weis Ms, Cheresch DA (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, 17,1359-70.
41. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, et al (2015). Cancer stem cell in glioblastoma. *Genes Dev*, 29, 1203-17.
42. Zheng Q, Han L, Dong Y, et al (2014). JAK2/STAT3 targeted therapy suppresses tumor invasion via disruption of the EGFRvIII/STAT3 axis and associated focal adhesion in EGFRvIII-expressing glioblastoma. *Neuro Oncol*, 16, 1229-43.
43. Grossman SA1, Ye X, Piantadosi S et al (2010). Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomid in research studies in the United States. *Clin Cancer Res*, 16(8), 2443-9
44. MayA. Babu, MD, MBA (2017). Socioeconomics and Survival. *Glioblastoma*, 265-269.
45. McNamara MG, Sahebram S, Mason WP (2013). Emerging biomarkers in glioblastoma. *Cancers (Basel)*, 51103-9.
46. Ceccarelli M, barthel FP, Malta TM, et al (2016). Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell*, 164(3), 550-63.
47. McBride OW, Merry D and Givol D (1986). The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 sht arm (17p13). *Proc Natl acad Sci USA*, 83(1) 130-134.
48. Ken SE et al (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Sience*, 252(5013), 1708-1711.
49. Vogelstein B and Kinzler KW (1992). p53 function and dysfunction. *Cell*, 70, 523-526.
50. Toshinori Ozaki and Akira Nakagawara (2011). Role of p53 in cell Death and human Cancers. *Cancer*, 3, 994-1013.

51. Kalil G. Abdullah, MD<sup>a</sup>, Corey Adamson, MD, PhD, MPH<sup>b</sup>, Steven Brem, MD<sup>a\*</sup> (2017). The molecular pathogenesis of glioblastoma. *Glioblastoma*, 21-31.
52. Sung T, Miller DC, Hayes RL, Alonso M, Yee H, Newcomb EW (2000). Preferential inactivation of the TP53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol*, 10, 249-259.
53. Van Meir EG, Kikuchi T et al (1994). Analysis of the p53 Gene and Its Expression in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research*, 54, 649-652.
54. Shoji Shiraishi M.D, Kenji Tada M.D, Yukitaka Ushio M.D et al (2002). Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer J*, 95(2), 249-257.
55. Bernard Leroy, Jean Louis Fournier, Thierry Soussi et al (2013). The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D962-D969.
56. Linn Hjortsberg and Thierry Soussi (2008). MUT-TP53 2.0: A novel versatile matrix for statistical analysis of TP53 mutations in human cancer. *Journal: Human Mutation* , Manuscript ID 2010-0129.
57. Carpenter G, King Jr, and Cohen S (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*, 276, 409-410.
58. Petri E.T, Halmos B, Boggon T.J kuma A (2008). Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J clin Oncol*, 26(10), 1742-1751.
59. Sliwkowski MX, Yarden Y (2001). Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol cell biol*, 2, 137-2001.

60. Marmor M.D, Skaria K.B and Yarden Y (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *J. Radiat, Oncol, Biol, Phy*, 58, 903-913.
61. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature reviews Cancer*, 15, 7-24.
62. Jeffrey C Lee et al (2006). Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Glioblastoma through Novel Missense Mutations in the Extracellular Domain. *Journal pmed*, 3(12), e485.
63. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, 60, 1383-1387.
64. Nicola Montano, Tonia Cenci, Roberto Pallini et al (2011). Expression of EGFRvIII in Glioblastoma: Prognostic Significance Revisited. *Neoplasia*, 13(12), 1113-1121.
65. Shinojima Naoki, Tada K, et al (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, 63(20), 6962-6970.
66. Youngmin Choi, Young-Jin Song, Hyung-Sik Lee et al (2013). Epidermal Growth Factor Receptor Is Related to Poor Survival in Glioblastomas: Single-Institution Experience. *Journal List Yonsei Med*, 54(1), 101-107.
67. Eskilsson E, Rosland GV, Talasila KM, Knappskog S, Keunen O, Sottoriva A, et al (2016). EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogeneous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro-oncology*, 18, 1644-1655.
68. Huang PH, Mukasa A et al (2007). Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 104(31), 12867-12872.

69. Tuner N. and Grose R. (2010). Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. *Nature Rev Cancer*, 10, 116-129.
70. Dienstmann R, Rodon J, Prat A et al (2014). Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann oncol*, 25(3), 552-563.
71. Haugsten E.M, Wiedlocha A, Olsnes S. Ellen et al (2010). Roles of Fibroblast Growth Factor Receptors in Carcinogenesis. *Mol Cancer Res*, 10, 1158-1541.
72. Agarwala S.S, Kirkwood J.M (2000). Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist*, 5(2), 144-151.
73. Carrie Marquette, Lisle Nabell (2012). Chemotherapy-Resistant Metastatic. *Breast Cancer*, 13(2), 263-275.
74. Brittany C. Parker et al (2013). The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma. *J Clin Invest*, 123(2), 855-865.
75. Devendra Singh, Joseph Minhow Chan, Pietro Zoppoli (2012). Transforming Fusions of FGFR and TACC Genes in Human Glioblastoma. *National Institutes of Health*, US, 1231-1235.
76. Anna Luisa Di Stefano, Alessandra Fucci, Veronique Frattini et al (2015). Detection, characterization and inhibition of FGFR-TACC fusions in IDH wild type glioma. *Clin Cancer Res*, 21(14), 3307-3317.
77. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci*, 16(6), 748-754.
78. Wantanabe K, Tachibana O, Sata K, et al (1996). Overexpression of the EGF and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain pathol*, 6(3), 217-23.

79. Quin T. Ostrom, MPH, MA, Peter Liao, BS, MD, Lindsay C. Stetson, Jill S. Barnholtz-Sloan, PhD (2017). Epidemiology of Glioblastoma and trend in Glioblastoma survivorship. *Glioblastoma*, Elsevier, 11-19.
80. Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, et al (2014). The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol*, 16(9), 1263-73.
81. Brannan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155(2), 462-77.
82. Suvi V, Jha P, Sharma MC, et al (2011). O6-methylguanine DNA methyltransferase gene promoter methylation in high grade gliomas: a review of current status. *Neurol India*, 59(2), 229-35.
83. Beiko J, Suki D, Hess KR, et al (2014). IDH1 mutant malignant astrocytomas are more amenable to surgical resection and have a survival benefit associated with maximal surgical resection. *Neuro Oncol*, 16, 81-91.
84. Auffinger B, Spencer D, Pytel P, et al (2015). The role of glioma stem cell in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert rev neurother*, 15, 741-52.
85. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al (2015). Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors. *N Engl J Med*, 372(26), 2499-508.
86. Tạ Thành Văn (2010). *PCR và một số kỹ thuật sinh học phân tử*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
87. Mullis K.B and Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
88. Judith Jeuken (2009). Robust Detection of EGFR Copy Number Changes and EGFR Variant III: Technical Aspects and Relevance for Glioma Diagnostics. *Brain Pathol*, 19(4), 661-671.

89. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-7.
90. Zascavage RR, Shewale SJ, Planz JV (2013). Deep-sequencing technologies and potential applications in forensic DNA testing. *Forensic Sci Rev*, 25, 79-105.
91. Switzeny OJ, Christmann M, Renovanz M, Giese A, Sommer C, Kaina B (2016). *MGMT* promoter methylation determined by HRM in comparison to MSP and pyrosequencing for predicting high-grade glioma response. *Clin Epigenetics*, 8, 49.
92. Cykowski MD, Allen RA, Fung KM, Harmon MA, Dunn ST (2016). Pyrosequencing of *IDH1* and *IDH2* mutations in brain tumors and non-neoplastic conditions. *Diagn Mol Pathol*, 21, 214-20.
93. Quillien V, Lavenu A, Ducray F et al (2016). Validation of the high-performance of pyrosequencing for clinical *MGMT* testing on a cohort of glioblastoma patients from a prospective dedicated multicentric trial. *Oncotarget*, 7, 61916-29.
94. Roger H. Frankel, William Bayona, Maxim Koslow, and Elizabeth W (1992). p53 Mutations in Human Malignant Gliomas: Comparison of Loss of Heterozygosity with Mutation Frequency. *Cancer research*, 52, 1427-1433.
95. Turner KM, Deshpande V, Beyter D, Koga T, Rusert J, Lee C, et al (2017). Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature*, 543, 122-125.
96. Congdon KL, Gedeon PC, Suryadevara CM, Caruso HG, Cooper LJ, Heimberger AB, et al (2014). Epidermal growth factor receptor and variant III targeted immunotherapy. *Neuro-oncology*, 16(8), 20-25.



97. Ohgaki H, Dessen P, Kleihues P et al (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, 64(19), 6892-9.
98. R.S Heymach, J.V Lipman, S.M Herbst (2008). Lung cancer. *N Engl J Med*, 354, 1367-1380.
99. Ohgaki H, Kleihues P (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19(4), 764-72.
100. Hou L.C, Veeravagu Anand, Hsu Andrew R (2006). Recurrent Glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg focus*, 20(4): E3.
101. Bergern M.S, Prados M.D (2007). Text book of Neuro-Oncology. *Elsevier saunders*, 111-165.
102. Osborn Anne. G, Blaser Susan. I, Salzman Karen.L, Katzman Gregory L, et al (2007). Diagnostic imaging brain. *Amyrsys*, 16 (16), 16-41.
103. Nguyễn Quang Hiến, Trương Văn Việt (2002). *Chuyên đề ngoại thần kinh*, U sao bào. Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 279-290.
104. Stupp Rmason, WPvan den, Bent MJ et al (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352987- 996.
105. Appelboom G, Detappe A, LoPresti M, Kunjachan S, Mitrasinovic S, Goldman S, et al (2016). Stereotactic modulation of blood-brain barrier permeability to enhance drug delivery. *Neuro-oncology*, 18, 1601-1609.
106. Singh B, Coffey RJ (2014). Trafficking of epidermal growth factor receptor ligands in polarized epithelial cells. *Annual review of physiology*. 76, 275-300.

# PHỤ LỤC 1

## QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT DNA

### 1.1. Quy trình tách DNA từ mẫu mô paraffin:

- Cạo phần ung thư đã được khoanh vùng từ mô đúc paraffin, (khoảng 20mg mô)
- Thêm 1ml Toluene, Vortex, Li tâm 15000 vòng/3-5 phút, loại bỏ dịch nổi
- Thêm 1ml Ethanol 100%, Vortex, Li tâm 15000 vòng/ 3-5 phút
- Loại bỏ dịch nổi. Để khô cạn 56 độ C
- Thêm 650  $\mu$ l Lysis buffer HD + 5 $\mu$ l Protein K
- Ủ 56 độ C qua đêm
- Thêm 500  $\mu$ l PCI (25:24:1).
- Vortex, ly tâm 15000 vòng/20 phút/4°C, sau đó thu lớp trên trong suốt.
- Thêm 500  $\mu$ l CI (24:1).
- Vortex, ly tâm 15000 vòng/10 phút/4°C, sau đó thu lớp trên trong suốt.
- Thêm: 1000  $\mu$ l ethanol 100% và 40  $\mu$ l CH<sub>3</sub>COONa 3M, sau đó lắc đều và để ở -20°C trong 2 giờ.
- Ly tâm 15000 vòng/20 phút/4°C và thu tủa.
- Thêm 1ml cồn 70%, ly tâm 15000 vòng/20 phút/4°C.
- Thu tủa DNA và để khô, hòa tan trong 60  $\mu$ l TE.

### 1.2. Đo mật độ quang học DNA sau tách chiết trên máy Nanodrop.

- Trừ trắng bằng dung dịch pha DNA (TE hoặc nước cất): hút 1,5  $\mu$ l TE nhỏ vào điểm đo mật độ quang, nhấn nút đo.
- Hút 1,5  $\mu$ l DNA tổng số tách được nhỏ vào điểm đo trên máy, nhấn nút đo.

## PHỤ LỤC 2

### QUY TRÌNH KỸ THUẬT PCR

#### 2.1. Các bước của quy trình

- Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ, hóa chất, môi và mẫu DNA.
- Thành phần của mỗi ống chạy PCR bao gồm:
  - + Nước cất: 3 $\mu$ l
  - + Taq polymerase: 5  $\mu$ l
  - + Môi xuôi: 0,5  $\mu$ l
  - + Môi ngược: 0,5  $\mu$ l
  - + DNA: 1  $\mu$ lTổng mỗi ống là 10  $\mu$ l
- Trộn đều các thành phần, đưa vào máy chạy PCR
- Chu trình nhiệt PCR:
  - + Biến tính: 94<sup>0</sup>C trong 5 phút
  - + Biến tính: 95<sup>0</sup>C trong 30 giây
  - + Gắn môi: 57<sup>0</sup>C trong 30 giây
  - + Kéo dài: 72<sup>0</sup>C trong 5 phút.
  - + Kéo dài: 72<sup>0</sup>C trong 5 phút} x 35 chu kỳ
- Lấy kết quả sản phẩm DNA sau chạy PCR để kiểm tra kết quả.

#### 2.2. Kiểm tra kết quả PCR.

Điện di DNA kiểm tra kết quả PCR.

- + *Tra mẫu và marker vào giếng:*

- Tra 3  $\mu$ l marker loại 100 bp vào 1 giếng.

- Với các giếng còn lại, mỗi giếng tra 3  $\mu$ l sản phẩm DNA tương ứng.

+ *Chạy điện di:*

- Cài đặt máy và tiến hành điện di với hiệu điện thế 120 V trong 30 phút.

+ *Nhuộm bản gel:*

- Ngâm bản gel trong dung dịch ethidium bromide 1  $\mu$ g/ml trong 5'.

- Sau đó rửa bản gel 2 lần để loại bỏ phần ethidium bromide dư và tiến hành chụp ảnh.

+ *Quan sát và chụp ảnh:*

- Cho bản gel vào máy chụp ảnh tử ngoại tự động, quan sát các băng sáng của DNA xuất hiện trên bản gel và chụp hình lưu trữ kết quả.

### PHỤ LỤC 3 QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ GEN

#### - Tinh sạch mẫu:

- + Thêm 60 $\mu$ L cồn 100% + 5 $\mu$ L EDTA vào mẫu cần tinh sạch.
- + Lắc mạnh, để trong phòng tối 15 phút, nhiệt độ phòng.
- + Lấy ra ly tâm 15.000 vòng/phút trong 20 phút.
- + Loại bỏ dịch nổi.
- + Thêm 200 $\mu$ L cồn 70%, ly tâm 15.000 vòng/phút trong 10 phút.
- + Loại bỏ dịch nổi, để khô.
- + Thêm 20 $\mu$ L Hi-di, ủ ở 95°C trong 5 phút.
- + Cho vào tủ lạnh khoảng 5 phút.
- + Lấy mẫu DNA đã tinh sạch sử dụng làm khuôn cho giải trình tự gen.

#### - Pha mẫu giải trình tự:

##### *Thành phần mẫu giải trình tự*

Thành phần	Thể tích ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O	6,5
Buffer Big dye 5X	1,5
Big dye Terminator v3.1	1
Môi F hoặc R (10pmol/ $\mu$ L)	0,5
DNA (đã tinh sạch)	0,5
<b>Tổng thể tích</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

#### - Chu trình nhiệt:

96°C: 2 phút

96°C: 10 giây

57°C: 5 giây

60°C: 4 phút

Bảo quản ở 15°C

} x 25 chu kỳ

- Đọc kết quả giải trình tự và lưu trên máy.

## PHỤ LỤC 4

### QUY TRÌNH KỸ THUẬT NHÂN BẢN DNA DÒ (MLPA)

(Sử dụng hóa chất kit SALSA MLPA P105-D2, hãng MRC- Hà Lan)

- **Bước 1: Biến tính DNA**

Cho 5 $\mu$ l dung dịch DNA cần phân tích vào ống PCR 0,2ml.

Biến tính ở 98 $^{\circ}$ C/5 phút,

Giữ ở 25 $^{\circ}$ C.

- **Bước 2: Gắn đầu dò vào gen đích**

+ Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng:

Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
Đệm SALSA MLPA	1,5
Hỗn hợp môi P105	1,5
<b>Tổng</b>	<b>3</b>

+ Cho 3  $\mu$ l hỗn hợp đã chuẩn bị ở trên vào mẫu DNA đã biến tính, nâng nhiệt độ 95 $^{\circ}$ C/1 phút để biến tính đầu dò, ủ ở 60 $^{\circ}$ C qua đêm (16h) để các đầu dò gắn đặc hiệu với đoạn gen đích.

- **Bước 3: Nối hai đầu dò**

+ Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng:

Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
Dung dịch đệm A	3
Dung dịch đệm B	3
Nước cất	25
Dung dịch gắn 65	1
<b>Tổng</b>	<b>32</b>

+ Cho 32  $\mu\text{l}$  dung dịch đã chuẩn bị ở trên vào hỗn hợp lai đã ủ qua đêm, tiếp tục chạy chu trình nhiệt:  $54^{\circ}\text{C}/15$  phút -  $98^{\circ}\text{C}/5$  phút -  $4^{\circ}\text{C}$  (sản phẩm lai có thể giữ được 1 tuần/  $4^{\circ}\text{C}$  hoặc lâu hơn ở  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

**- Bước 4: Nhân bản sản phẩm lai (PCR)**

+ Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng:

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
Môi có gắn huỳnh quang	2
Dung dịch đệm Enzyme	2
Nước cất	5,5
DNA polymerase	0,5
<b>Tổng</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

Cho 10  $\mu\text{l}$  dung dịch đã chuẩn bị ở trên vào hỗn hợp đang ở trong máy và tiếp tục chạy chu trình nhiệt:

+ $95^{\circ}\text{C}$ : 30 giây	} x 30 chu kỳ
+ $60^{\circ}\text{C}$ : 30 giây	
+ $72^{\circ}\text{C}$ : 60 giây	
+ $72^{\circ}\text{C}$ : 20 phút	
+ $72^{\circ}\text{C}$ : 5 phút	
+ Giữ ở $4^{\circ}\text{C}$	

- Điện di mao quản trên hệ thống phân tích đoạn trên máy Beckman Coulter GeXP

+ *Tra mẫu và marker vào giếng:*

Tra 3  $\mu\text{l}$  marker (mẫu đã kiểm tra chuẩn hóa các điều kiện) vào 1 giếng. Với các giếng còn lại, mỗi giếng tra 3  $\mu\text{l}$  sản phẩm DNA tương ứng.

+ *Chạy điện di:*

Cài đặt máy và tiến hành điện di.

- Phân tích kết quả bằng công cụ Coffalyser chuyên biệt (được cung cấp bởi hãng MCR - Hà lan).

## PHỤ LỤC 5

### BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

1. Hành chính

Họ và tên .....

Tuổi .....Giới (nam/nữ).....

Khoa/phòng.....

Điện thoại liên hệ.....

2. Mã vào viện.....

3. Tiền sử bệnh tật.....

Mô u não: rời/chưa; đã mổ với chẩn đoán: .....; độ I /II /III /IV

Ngày năm mổ.....

Điều trị sau mổ: + xạ trị: không/có - mấy đợt .....

+ hóa chất: không/có (tên hoá chất):.....mấy đợt .....

Kết quả chụp lại phim sau mổ: không/ có .....

Phát hiện tái phát: ngày tháng năm.....

4. Thời gian xuất hiện bệnh đến lúc vào viện.....

5. Chẩn đoán bệnh .....

6. Ngày tháng năm mổ.....

7. Mã giải phẫu bệnh.....

8. Kết quả giải phẫu bệnh.....

9. Kích thước khối u.....

10. Thời gian sống sau mổ.....

11. Điều trị sau mổ: + xạ trị: không/có - mấy đợt .....

+ hóa chất: không/có (tên hoá chất)..... mấy đợt .....