

NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA KIỂU GEN CYP1B1 VỚI KIỂU HÌNH Ở BỆNH NHÂN GLÔCÔM BẨM SINH NGUYÊN PHÁT

Trần Thu Hà^{1,2}, Nguyễn Văn Huy¹

Trương Như Hân¹ và Trần Văn Khánh^{2,✉}

¹Bệnh viện Mắt Trung ương

²Trường Đại học Y Hà Nội

Glôcôm bẩm sinh nguyên phát là tình trạng tăng nhãn áp do sự phát triển bất thường của bán phần trước nhãn cầu, đây là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây mù lòa ở trẻ nhỏ. Bệnh di truyền lặn, nhiễm sắc thể thường, gây nên do đột biến trên gen CYP1B1 thường là đột biến điểm nằm rải rác toàn bộ chiều dài gen. Việc phát hiện đột biến gen CYP1B1 trên bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát giúp đánh giá mối liên quan kiểu gen kiểu hình là tiền đề quan trọng trong việc đưa ra hướng điều trị cũng như tiên lượng cho bệnh nhân, giúp cho chẩn đoán trước sinh nhằm giảm tỷ lệ mù lòa ở trẻ. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: Xác định mối liên quan giữa kiểu gen CYP1B1 với kiểu hình ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát. Nghiên cứu tiến hành phân tích 85 bệnh nhân cho thấy có mối liên quan chặt chẽ giữa giai đoạn bệnh của bệnh nhân với tình trạng đột biến gen CYP1B1, bệnh nhân biểu hiện bệnh nặng có khả năng cao mang đột biến gen hơn nhóm bệnh nhân nhẹ và trung bình. Đường kính và mức độ đục giác mạc là yếu tố quan trọng liên quan nhất đến tình trạng đột biến gen. Bên cạnh đó, khi xét đến mối liên quan của sự kết hợp các đặc điểm lâm sàng với tình trạng đột biến gen CYP1B1 cho thấy khả năng đột biến gen cao hơn ở nhóm càng mang nhiều yếu tố phối hợp như bệnh biểu hiện sớm ngay sau sinh, ở cả hai mắt và giai đoạn nặng.

Từ khóa: kiểu gen, kiểu hình, glôcôm bẩm sinh nguyên phát, gen CYP1B1, đột biến.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Glôcôm bẩm sinh nguyên phát là tình trạng tăng nhãn áp do sự phát triển bất thường của bán phần trước nhãn cầu.¹ Bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, gây nên do đột biến gen CYP1B1. Đột biến trên gen CYP1B1 thường là đột biến điểm nằm rải rác toàn bộ chiều dài gen.²⁻⁵ Bệnh nhân mang đột biến gen CYP1B1 90% sẽ biểu hiện bệnh ở cả hai mắt và là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây mù lòa ở trẻ nhỏ.⁶ Việc phát hiện đột biến gen CYP1B1 trên bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát giúp đánh giá mối liên quan kiểu

gen, kiểu hình là tiền đề quan trọng trong việc đưa ra hướng điều trị cũng như tiên lượng cho bệnh nhân, đồng thời giúp cho chẩn đoán trước sinh nhằm giảm tỷ lệ mù lòa ở trẻ. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu “Xác định mối liên quan giữa đột biến gen CYP1B1 với biểu hiện lâm sàng ở bệnh nhân glôcôm bẩm sinh nguyên phát”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân được chẩn đoán xác định bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát khi có từ 4 triệu chứng trở lên⁷:

Nhãn áp cao ≥ 25 mmHg (Nhãn áp kế Maclakov) hoặc ≥ 22 mmHg (Nhãn áp kế Icare).
Chói, chảy nước mắt, sợ ánh sáng.

Đường kính giác mạc to bất thường ≥ 12 mm.

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 15/11/2022

Ngày được chấp nhận: 20/11/2022

Giác mạc phù, mờ đục.

Tiền phòng sâu, góc tiền phòng có tổ chức bất thường.

Tổn hại lõm teo gai thị trong bệnh glôcôm.

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh glôcôm bẩm sinh thứ phát; tổn thương của giác mạc: hội chứng tách lớp bán phần trước (Axenfeld, Reiger, Peters); Tổn thương của mống mắt: tật không mống mắt, tồn lưu màng Wachendorf; Dị thường thể thủy tinh: hội chứng Lowe, Marfan, Machesani.

2. Phương pháp

Lấy mẫu bệnh phẩm: 2ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA.

Tách chiết DNA từ máu ngoại vi: DNA tổng số được tách chiết từ máu toàn phần bằng phenol-chloroform-isopropanol (25:24:1).

Kỹ thuật PCR: PCR được sử dụng để khuếch đại exon 2 và exon 3 của gen CYP1B1 với 3 cặp mồi được thiết kế.⁸ Thành phần phản ứng PCR (thể tích 20 μ l) gồm: 1X đệm PCR; 2,5mM dNTP, 0,2 μ M mồi xuôi và ngược, 0,5U Taq polymerase, 20 - 50ng DNA. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/5 phút, 35 chu kỳ [94°C/40 giây, 54°C/30 giây, 72°C/45 giây],

72°C/7 phút. Bảo quản mẫu ở 15°C.

Kỹ thuật giải trình tự gen: các sản phẩm PCR sẽ được tiến hành giải trình tự trực tiếp trên máy ABI 3100 Genetic Analyzer. Kết quả được thu thập và xử lý bằng phần mềm ABI PRISM™ 3100 - Avant Data Collection, DNA Sequencing Analysis 5.2 và BLAST NCBI. Trình tự được so sánh trên ngân hàng gen: DNA (NG- 008806) và mRNA (NM- 000053).

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học. Bệnh nhân và gia đình bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia. Bệnh nhân và gia đình được thông báo về kết quả xét nghiệm gen để giúp cho các bác sỹ tư vấn di truyền hoặc lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Các thông tin cá nhân được đảm bảo bí mật.

III. KẾT QUẢ

Tổng số 85 bệnh nhân được tiến hành đánh giá mối liên quan giữa đột biến gen CYP1B1 với biểu hiện lâm sàng với 144 mắt, kết quả thu được như sau:

Bảng 1. Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh với tình trạng đột biến

		Lâm sàng		Tổng	p
		Ngay sau sinh	Các trường hợp còn lại		
Đột biến	n	8 (44,4%)	10 (55,6%)	18 (100%)	0,503*
	%	25,0%	18,9%	21,2%	
Không đột biến	n	24 (35,8%)	43 (64,2%)	67 (100%)	
	%	75,0%	81,1%	78,8%	
Tổng	n	32 (37,6%)	53 (62,4%)	85 (100%)	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
OR (KTC 95%)		1,43 (0,50 - 4,12)			

*: Kiểm định χ^2

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

bệnh sớm ngay sau sinh cao gấp 1,43 lần so với khả năng đột biến ở nhóm bệnh nhân biểu hiện bệnh muộn tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95% có chứa 1.

Bảng 2. Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh và số mắt bị bệnh với tình trạng đột biến

		Lâm sàng		Tổng	p
		Ngay sau sinh + 2 mắt	Các trường hợp còn lại		
Đột biến	n	10 (55,6%)	8 (44,4%)	18 (100%)	0,031*
	%	34,5%	14,3%	21,2%	
Không đột biến	n	19 (28,4%)	48 (71,6%)	67 (100%)	
	%	65,5%	85,7%	78,8%	
Tổng	n	29 (34,1%)	56 (65,9%)	85 (100%)	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
OR (KTC 95%)		3,16 (1,08 - 9,21)			

*: Kiểm định χ^2

Khi xét hai yếu tố kết hợp là thời gian xuất hiện bệnh ngay sau sinh và tình trạng biểu hiện bệnh ở cả hai mắt thấy tỷ lệ đột biến gen trong nhóm này là 34,5%, nhóm bệnh nhân không có cùng lúc hai yếu tố này thì tỷ lệ đột biến gen là 14,3%. Khả năng đột biến gen *CYP1B1* ở nhóm

bệnh nhân mang đồng thời hai đặc điểm bệnh biểu hiện sớm ngay sau sinh và cả hai mắt cao gấp 3,16 lần so với khả năng đột biến ở nhóm bệnh nhân biểu hiện bệnh muộn và/hoặc bệnh ở một mắt, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95% không chứa 1.

Bảng 3. Mối liên quan giữa thời gian xuất hiện bệnh, số mắt bị bệnh và giai đoạn bệnh với tình trạng đột biến

		Lâm sàng		Tổng	p
		Ngay sau sinh + 2 mắt + giai đoạn nặng	Các trường hợp còn lại		
Đột biến	n	7 (38,9%)	11 (61,1%)	18 (100%)	0,002*
	%	53,8%	15,3%	21,2%	
Không đột biến	n	6 (9,0%)	61 (91,0%)	67 (100%)	
	%	46,2%	84,7%	78,8%	

	Lâm sàng			p
	Ngày sau sinh + 2 mắt + giai đoạn nặng	Các trường hợp còn lại	Tổng	
Tổng	n	13 (15,3%)	72 (84,7%)	85 (100%)
	%	100,0%	100,0%	100,0%
OR (KTC 95%)		6,47 (1,83 - 22,93)		

*: Kiểm định χ^2

Khi xét ba yếu tố kết hợp là thời gian xuất hiện bệnh ngay sau sinh, tình trạng biểu hiện bệnh ở cả hai mắt thấy tỷ lệ đột biến gen trong nhóm này là 53,8% cao hơn nhóm bệnh nhân không có đồng thời ba đặc điểm trên là 15,3%. Khả năng đột biến gen *CYP1B1* ở nhóm bệnh nhân mang đồng thời ba đặc điểm bệnh biểu hiện sớm ngay sau sinh, ở cả hai mắt và giai đoạn bệnh nặng cao gấp 6,47 lần so với khả năng đột biến ở nhóm bệnh nhân còn lại, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95% không chứa 1.

IV. BÀN LUẬN

Để đánh giá mối liên quan giữa giai đoạn bệnh glôcôm bẩm sinh nguyên phát với đột biến gen *CYP1B1*, các nghiên cứu trên thế giới đã chia bệnh thành 3 mức độ nhẹ, trung bình, nặng.⁷ Nhóm nghiên cứu cũng tiến hành phân loại giai đoạn bệnh như trên thu được kết quả tỷ lệ đột biến của những bệnh nhân có mắt ở giai đoạn nặng là cao nhất (chiếm 46,8%), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ đột biến của nhóm bệnh nhân ở giai đoạn trung bình (12,9%) và giai đoạn nhẹ (25%) với $p = 0,000$.

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

biến $12,10 \pm 0,82\text{mm}$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,018$). Nhãn áp trung bình của nhóm có đột biến gen là $28,03 \pm 8,89\text{mmHg}$ cao hơn so với nhãn áp trung bình của nhóm không có đột biến gen $26,74 \pm 8,27\text{mmHg}$, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Mức độ lõm đĩa trung bình của nhóm có đột biến gen là $0,73 \pm 0,14$ không khác biệt so với mức độ lõm đĩa trung bình của nhóm không đột biến $0,72 \pm 0,23$ ($p > 0,05$). So sánh với các tác giả khác trên thế giới như trong nghiên cứu của Xueli Chen (2013), mức độ đục giác mạc ở nhóm mang đột biến gen nặng hơn có ý nghĩa so với nhóm không có đột biến gen ($p = 0,034$), tuy nhiên không có sự khác biệt về nhãn áp trung bình và đường kính giác mạc của 2 nhóm ($p = 0,064$ và $p = 0,986$).⁸ Nghiên cứu của Orna Geyer (2011), mức độ đục giác mạc nặng và lồi mắt trâu chiếm 58% (10/17 bệnh nhân) ở nhóm mang đột biến cao hơn nhóm không đột biến 11% (2/17 bệnh nhân) ($p = 0,004$).⁹

Nghiên cứu của Wool Suh (2011) thấy ở nhóm có đột biến gen *CYP1B1* tỷ lệ mức độ bệnh nặng cao hơn (52,4%) so với nhóm không có đột biến gen (43,9%), tuy nhiên khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.⁸

Nghiên cứu tại Liban (2016) cũng chỉ ra rằng không có sự khác biệt về nhãn áp trung bình trước mổ (35,2mmHg và 35,6mmHg), nhãn áp trung bình sau mổ (15,6mmHg và 14,8mmHg), mức độ lõm đĩa ($0,57 \pm 0,19$ và

0,62 ± 0,3) giữa hai nhóm có và không có đột biến gen ($p > 0,05$). Bên cạnh đó mức độ nặng (đục giác mạc nặng và lồi mắt trâu) tại thời điểm phát hiện bệnh của nhóm mang đột biến là 67% cao hơn gấp 2 lần nhóm không mang đột biến, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,32$).¹⁰ Wool Suh (2012) tại Hàn Quốc so sánh giữa nhóm không có đột biến gen (63 bệnh nhân), nhóm mang 1 đột biến gen (11 bệnh nhân) và nhóm mang 2 đột biến gen (11 bệnh nhân) thấy kết quả nhãn áp không điều chỉnh sau phẫu thuật và dùng thuốc ở nhóm mang 2 đột biến gen lên tới 45,5% cao hơn hẳn 2 nhóm kia là 4,8% và 0% ($p = 0,000$). 58,7% bệnh nhân đạt kết quả nhãn áp điều chỉnh ($< 21\text{mmHg}$) sau phẫu thuật ở nhóm không đột biến tốt hơn kết quả này ở nhóm đột biến là 22,7% ($p = 0,008$).¹¹

V. KẾT LUẬN

Có mối liên quan chặt chẽ giữa thời gian biểu hiện bệnh, giai đoạn bệnh với tình trạng đột biến gen CYP1B1, bệnh nhân biểu hiện bệnh nặng có khả năng cao mang đột biến gen hơn nhóm bệnh nhân nhẹ và trung bình. Đường kính và mức độ đục giác mạc là yếu tố quan trọng liên quan nhất đến tình trạng đột biến gen.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử xác định đột biến gen CYP1B1 trong bệnh Glôcôm bẩm sinh nguyên phát tại Hà Nội” và sự giúp đỡ của các cán bộ Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Shields M B. *Primary congenital glaucoma*. Third edition, Williams and Wilkins, USA. 1982:220-233.

2. A. O. Khan, M A Aldahmesh, J Y Mohamed. CYP1B1 analysis of unilateral primary newborn glaucoma in Saudi children. *J AAPOS*. 2012;16(6):571-572.

3. Mei Yang, Xiangming Guo, Xing Liu. Investigation of CYP1B1 mutations in Chinese patients with primary congenital glaucoma. *Mol Vis*. 2009;15:432-437.

4. Ji Hyun Lee, Chang-Seok Ki, Hee-Jung Kim. Analysis of copy number variation using whole genome exon-focused array CGH in Korean patients with primary congenital glaucoma. *Mol Vis*. 2011;17:3583-3590.

5. Mukesh Tanwar, Tanuj Dada, Ramanjit Sihota. Mutation spectrum of CYP1B1 in North Indian congenital glaucoma patients. *Mol Vis*. 2009;15:1200-1209.

6. Robert N. Weiss, Shaffer, Daniel I. Congenital and pediatric glaucomas. *Mosby, St. Louis*. 1970;37.

7. S. G. Panicker, A. K. Mandal, A. B. Reddy, et al. Correlations of genotype with phenotype in Indian patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(4):1149-56.

8. X. Chen, Y. Chen, L. Wang, et al. CYP1B1 genotype influences the phenotype in primary congenital glaucoma and surgical treatment. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(2):246-51.

9. O. Geyer, A. Wolf, E. Levinger, et al. Genotype/phenotype correlation in primary congenital glaucoma patients from different ethnic groups of the Israeli population. *Am J Ophthalmol*. 2011;151(2):263-71e1.

10. C. Al-Haddad, M. Abdulaal, R. Badra, et al. Genotype/Phenotype Correlation in Primary Congenital Glaucoma Patients in the Lebanese Population: A Pilot Study. *Ophthalmic Genet*. 2016;37(1):31-6.

11. W. Suh, C. Kee. A clinical and molecular genetics study of primary congenital glaucoma in South Korea. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(11):1372-7.

Summary

CYP1B1 GENOTYPE AND PHENOTYPE CORRELATIONS IN PRIMARY CONGENITAL GLAUCOMA PATIENTS

Primary congenital glaucoma occurs from an increase in the intraocular pressure because of developmental anomalies in the anterior eye segment, cause childhood blindness. It is an autosomal recessive inherited disease, point mutation is the most common in the *CYP1B1* gene. The detection of mutations will be established the genotype - phenotype correlations is an important premise for treatment, prenatal diagnosis are effective solutions for prevent and reduce the incidence. The aim of this study is to establish the genotype - phenotype correlations of various *CYP1B1* mutations with primary congenital glaucoma. 85 primary congenital glaucoma patients were analyzed, the result showed that there is a strong relationship between the patient's disease stage and the *CYP1B1* mutation, patients with severe disease are more likely to carry the mutation than mild and moderate patients. Corneal diameter and degree of opacity are the most important factors associated with genetic mutation status. Besides, when considering the relationship of the combination of clinical features with the mutation status of the *CYP1B1* gene, the possibility of mutation is higher in the group carrying more co-factors such as the disease manifesting itself soon after birth, in both eyes and severe stage.

Keywords: genotype-phenotype, primary congenital glaucoma, CYP1B1, mutations.