

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**



**NGUYỄN THỊ PHƯƠNG MAI**

**NGHIÊN CỨU GENOTYPE CỦA  
*HUMAN PAPILLOMAVIRUS*  
TRÊN MỘT SỐ UNG THƯ SINH DỤC NỮ**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2019**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**



**NGUYỄN THỊ PHƯƠNG MAI**

**NGHIÊN CỨU GENOTYPE CỦA  
*HUMAN PAPILLOMAVIRUS*  
TRÊN MỘT SỐ UNG THƯ SINH DỤC NỮ**

Chuyên ngành: Hóa sinh y học

Mã số: 62710112

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

GS.TS. Tạ Thành Văn

**HÀ NỘI – 2019**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành được đề tài này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ và động viên tận tình của các Thầy Cô, Lãnh đạo cơ quan, đồng nghiệp, các bệnh nhân, bạn bè và đặc biệt gia đình thân yêu của tôi.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, sự kính trọng tới GS. TS. Tạ Thành Văn - người Thầy trực tiếp hướng dẫn khoa học, đã tận tình giúp đỡ và truyền đạt những kinh nghiệm và kiến thức quý báu cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án, người đã cho tôi niềm tin, ánh sáng mỗi khi bế tắc trong tư duy và sự vững vàng trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến PGS. TS. Trần Văn Khánh, Phó Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Gen và Protein người đã trực tiếp giúp đỡ và luôn đồng hành bên tôi trong suốt thời gian hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới các Thầy, Cô của Trường Đại học Y Hà Nội đã tận tình giúp tôi hoàn thành luận văn:

- Ban Giám Hiệu, Phòng đào tạo Sau Đại học.
- PGS. TS. Nguyễn Thị Hà - Nguyên Phó Hiệu trưởng.
- PGS. TS. Phạm Thiện Ngọc, Nguyên Trưởng Bộ môn Hóa sinh.
- PGS. TS. Trần Huy Thịnh, Phó Trưởng Bộ môn Hóa sinh.
- PGS. TS. Đặng Thị Ngọc Dung, Giáo vụ phụ trách Sau đại học, Bộ môn Hóa sinh.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới Lãnh đạo các Bệnh viện và Bác sĩ đã hỗ trợ tôi trong suốt quá trình thu thập số liệu:

- BSCK2 Chu Hoàng Hạnh - Phó Khoa Khám bệnh, PGS.TS. Tạ Văn Tờ  
- Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh, PGS.TS. Nguyễn Phi Hùng - Phó Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện K Trung ương
- PGS.TS. Lê Quang Vinh, Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Phụ sản Trung ương

- BSCK2. Nguyễn Văn Tiến, Trưởng khoa Ngoại 1; BSCK1. Nguyễn Văn Thành, Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Ung bướu Thành phố Hồ Chí Minh.

Tôi xin cảm ơn tới GS. TS. Hiroshi Ichimura, Trưởng Khoa Virus và Bệnh truyền nhiễm Quốc tế, Đại học Kanazawa, Nhật Bản đã tài trợ hóa chất và hỗ trợ kỹ thuật cho tôi hoàn thành quá trình phân tích số liệu.

Tôi xin cảm ơn Ban Giám Hiệu, Đảng bộ Trường Đại học Y Dược Hải Phòng đã luôn tạo điều kiện cho tôi hoàn thành nhiệm vụ.

Cảm ơn những đồng nghiệp đã luôn động viên giúp đỡ tôi.

Lời cảm ơn cuối cùng nhưng cũng là lòng biết ơn tới công sinh thành nuôi dưỡng của bà, của mẹ, sự ủng hộ của chị và em trong gia đình; sức mạnh tinh thần cũng như sự hy sinh của chồng và hai con tôi cho tôi hoàn thành luận án.

*Hà Nội, ngày 6 tháng 02 năm 2020*

**Người cam kết**

**Nguyễn Thị Phương Mai**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi là Nguyễn Thị Phương Mai, nghiên cứu sinh khóa 31 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh Y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy Tạ Thành Văn.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

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

*Hà Nội, ngày 6 tháng 02 năm 2020*

**Người cam kết**

**Nguyễn Thị Phương Mai**

## DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Akt:	Protein kinase B
CIN:	Cervical Intrepithelial Neoplasia U biểu mô cổ tử cung
DNA:	Deoxyribose Nucleic Acid Acid Nucleic
E:	Early Sớm
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô
FIGO:	International Federation of Gynecology and Obstetrics Hội Sản Phụ khoa Quốc tế
HPV:	<i>Human Papillomavirus</i>
HPSG:	Heparan Sulfat Proteoglycans
HSIL:	Highgrade Squamous Intrepithelial Lession Tổn thương biểu mô vảy cổ tử cung nặng
ICC:	Invassive Cervical Cancer Ung thư xâm nhập cổ tử cung
L:	Late Muộn
LSIL:	Lowgrade Squamous Intrepithelial Lession Tổn thương biểu mô vảy cổ tử cung nặng
ORF:	Open Reading Frame Khung dịch mã
PCR:	Polymerase Chain Reaction Phản ứng khuếch đại

PI3k:	Phosphiinositide 3 – kinase
RDBH	Reverse dot blot hybridization Lai thâm điễm ngược trên màng
TNF:	Tumor Necrosis Factor Yếu tố hoại tử u
OCC:	Ung thư biểu mô khác
UTSD:	Ung thư sinh dục
UTCTC:	Ung thư cổ tử cung
UTAH:	Ung thư âm hộ
UTAD:	Ung thư âm đạo
VIN:	Vulvar Intrepithelial Neoplasia U biểu mô âm hộ
VAIN:	Vaginal Intrepithelial Neoplasia U biểu mô âm đạo

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. <i>Human Papillomavirus</i> (HPV).....	3
1.1.1. Cấu tạo của HPV .....	3
1.1.2. Lịch sử phát hiện và phân loại HPV .....	4
1.1.3. Cơ chế gây bệnh của HPV.....	6
1.1.4. Sự lây nhiễm HPV và loại bỏ HPV .....	14
1.2. Ung thư sinh dục nữ .....	16
1.2.1. Ung thư cổ tử cung .....	16
1.2.2. Ung thư âm đạo .....	21
1.2.3. Ung thư âm hộ .....	23
1.2.4. Cơ chế ung thư sinh dục nữ.....	24
1.3. Nghiên cứu trong và ngoài nước về HPV và bệnh lý liên quan.....	26
1.3.1. HPV và bệnh lý sinh dục nữ.....	26
1.3.2. Liên quan giữa genotype của HPV và loại tế bào ung thư.....	32
1.4. Các kỹ thuật phát hiện HPV và xét nghiệm mô bệnh học .....	34
1.4.1. Kỹ thuật phát hiện HPV.....	34
1.4.2 Xét nghiệm mô bệnh học.....	38
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>39</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	39
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn.....	39
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	39
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	39
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu .....	39



2.2.2. Cỡ mẫu.....	39
2.2.3. Các chỉ số nghiên cứu.....	40
2.2.4. Trang thiết bị, hóa chất.....	40
2.2.5. Quy trình nghiên cứu.....	41
2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	51
2.3.1. Địa điểm nghiên cứu.....	51
2.3.2. Thời gian nghiên cứu.....	51
2.4. Xử lý số liệu.....	51
2.5. Đạo đức trong nghiên cứu.....	52
2.6. Kinh phí thực hiện đề tài.....	52
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>54</b>
3.1. Đặc điểm về tuổi của đối tượng nghiên cứu.....	54
3.2. Phân bố genotype của HPV.....	55
3.2.1. Độ tinh sạch của DNA sau tách chiết.....	55
3.2.2. Tỷ lệ nhiễm HPV.....	56
3.2.3. Phân bố genotype của HPV.....	61
3.2.4. Phân nhóm dưới nhóm và sublineage của HPV16.....	67
3.3. Liên quan giữa genotype của HPV và loại tế bào ung thư.....	79
3.3.1. Loại tế bào tại mô ung thư.....	79
3.3.2. Liên quan giữa genotype của HPV và loại tế bào ung thư.....	82
<b>Chương 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>87</b>
4.1. Đặc điểm về tuổi của đối tượng nghiên cứu.....	87
4.2. Phân bố genotype của HPV.....	88
4.2.1. Độ tinh sạch DNA của HPV sau tách chiết.....	88
4.2.2. Tỷ lệ nhiễm HPV.....	89
4.2.3. Phân bố genotype của HPV.....	94
4.2.4. Sublineage HPV16.....	98

4.3. Liên quan giữa genotype và loại tế bào ung thư .....	102
4.3.1. Loại tế bào ung thư .....	102
4.3.2. Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư .....	104
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>110</b>
<b>KHUYẾN NGHỊ .....</b>	<b>111</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1:	Trình tự nucleotid của các cặp môi GP5 <sup>+</sup> /GP6 <sup>+</sup> .....	43
Bảng 2.2:	Thành phần phản ứng khuếch đại gen L1 của HPV bằng cặp môi GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup> original và GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup> modified.....	44
Bảng 2.3:	Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen L1 của HPV với cặp môi GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup> original.....	45
Bảng 2.4:	Thành phần và thể tích phản ứng khuếch đại gen L1 Bigdye.....	46
Bảng 2.5:	Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen L1 với Bigdye .....	46
Bảng 2.6:	Thành phần và thể tích phản ứng PCR biotin hóa gen L1 .....	47
Bảng 2.7:	Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR biotin hóa gen L1 .....	47
Bảng 2.8:	Trình tự môi E6, E7 của HPV16.....	49
Bảng 2.9:	Thành phần và thể tích phản ứng khuếch đại gen E6, E7 của HPV1650	
Bảng 2.10:	Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen E6, E7 của HPV16.50	
Bảng 3.1:	Tuổi trung bình của nhóm đối tượng nghiên cứu .....	54
Bảng 3.2:	Phân độ tuổi theo từng nhóm ung thư 20-29 tuổi .....	55
Bảng 3.3:	Tỉ lệ nhiễm HPV tại mô ung thư sinh dục.....	60
Bảng 3.4:	Phân bố tỉ lệ nhiễm HPV theo độ tuổi sinh sản .....	61
Bảng 3.5:	Phân bố genotype của HPV tại mô UTSD.....	64
Bảng 3.6:	Phân bố đột biến nucleotide và acid amin thay thế trên gen E6, E7 của HPV16 .....	77
Bảng 3.7:	Liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV với loại tế bào ung thư.....	82
.Bảng 3.8:	Liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV với loại tế bào ung thư biểu mô83	
Bảng 3.9:	Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư biểu mô84	
Bảng 3.10:	Liên quan giữa lineage của HPV16 với loại tế bào ung thư biểu mô.85	
Bảng 3.11:	Liên quan giữa sublineage của HPV16 với loại tế bào ung thư biểu mô.....	86

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1:	Sơ đồ cấu tạo các gen của HPV và chức năng các protein.....	3
Hình 1.2:	Sơ đồ hạt vi rút.....	4
Hình 1.3:	Cây phả hệ căn cứ vào trình tự gen L1 của 198 HPV .....	5
Hình 1.4:	Chu kỳ sống của HPV.....	7
Hình 1.5:	Tác động của protein E5 lên con đường tín hiệu tế bào. ....	10
Hình 1.6:	Tác động của protein E6 .....	11
Hình 1.7:	Sơ đồ HPV16 E6 oncoprotein .....	12
Hình 1.8:	Sơ đồ protein E7 và các vị trí can thiệp vào pRb .....	13
Hình 1.9:	Hình ảnh tế bào ung thư cổ tử cung.....	18
Hình 1.10:	Chu kỳ phát triển và lây nhiễm của HPV .....	20
Hình 1.11:	Hình ảnh ung thư tế bào vảy sừng hóa âm đạo.....	22
Hình 1.12:	Hình ảnh ung thư âm hộ .....	23
Hình 1.13:	Sơ đồ về cơ chế gây ung thư sinh dục nữ .....	25
Hình 1.14:	Tình trạng nhiễm HPV trên thế giới .....	26
Hình 2.1:	Màng lai HPV với các DNA probe HPV loại tương ứng.....	49
Hình 3.1:	Kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTCTC. ....	56
Hình 3.2:	Kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTAH. ....	57
Hình 3.3:	Kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTAD. ....	58
Hình 3.4:	Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR của đoạn gen L1. ....	59
Hình 3.5:	Hình ảnh phát hiện các loại HPV bằng phương pháp màng lai. ....	63
Hình 3.6:	Phân bố genotype của HPV theo chủng .....	65

Hình 3.7:	Phân bố tỉ lệ nhiễm HPV16-, HPV18- và HPV16, 18- theo nhóm tuổi .....	66
Hình 3.8:	Điện di sản phẩm sau khuếch đại bằng cặp mồi HPV16 E6, E7	67
Hình 3.9:	Hình ảnh phân nhóm dưới nhóm của HPV16 .....	69
Hình 3.10:	Hình ảnh phân nhóm dưới nhóm của HPV16. ....	70
Hình 3.11:	Hình ảnh đột biến 178T>G; 183T>G; 293G>A trên gen E6 của HPV16 Asian .....	72
Hình 3.12:	Hình ảnh đột biến 276A>G trên gen E6 của HPV16 Asian .....	73
Hình 3.13:	Hình ảnh đột biến 335C>T; 350T>G trên gen E6 của HPV16 Asian American .....	74
Hình 3.14:	Hình ảnh đột biến 132G>T; 143C>G; 145G>T trên gen E6 của HPV16 African .....	75
Hình 3.15:	Hình ảnh đột biến 647A>G trên gen E7 của HPV16 .....	76
Hình 3.16:	Một số hình thái loại tế bào ung thư được nhuộm HE và quan sát ở vật kính 100 .....	80
Hình 3.17:	Phân bố từng loại tế bào ung thư tại mô UTSDN.....	81

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư cổ tử cung (UTCTC) là loại ung thư thường gặp, đứng thứ 3 về tỉ lệ mắc và tử vong trong số các bệnh ung thư ở phụ nữ. Ngược lại, ung thư âm hộ (UTAH) và ung thư âm đạo (UTAD) là hai loại ung thư ít gặp, có tỉ lệ mắc và tử vong ít hơn 10 lần so với UTCTC. Năm 2018, trên thế giới ước tính có khoảng 569,8 trường hợp UTCTC; 44,2 trường hợp UTAH và 17,6 trường hợp UTAD mới mắc tính trên 100.000 phụ nữ. Tại khu vực Đông Nam Á, UTCTC có tỉ lệ tử vong đứng đầu trong các bệnh tử vong do ung thư [1]. Cũng trong năm 2018, tại Việt Nam có tới 4,177 trường hợp UTCTC, 188 trường hợp UTAH và 48 trường hợp UTAD mới mắc [2].

Một số nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng khoảng 90% mô ung thư cổ tử cung (UTCTC), 66% mô ung thư âm đạo (UTAD) và 60% mô ung thư âm hộ (UTAH) nhiễm HPV [3],[4].

*Human Papillomavirus* (HPV) là vi rút lây truyền qua đường tiếp xúc trực tiếp, đặc biệt quan hệ tình dục, gây tổn thương da và niêm mạc ở mức độ lành tính (mụn cóc, u nhú, u nhầy) hoặc ác tính (ung thư) [5]. Căn cứ vào sự tương đồng các nucleotid trên gen L1 của HPV, 198 loại HPV đã được phát hiện [6]. Căn cứ vào khả năng gây bệnh, HPV được chia làm 3 nhóm: nhóm nguy cơ cao, nhóm có khả năng gây ung thư và nhóm nguy cơ thấp. 15 loại HPV nhóm nguy cơ cao gồm HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, và 82; 03 HPV có khả năng gây ung thư như HPV 26, 53 và 66; 16 HPV nguy cơ thấp gồm 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 và CP6108 [7].

Hai loại vắc xin đã được bào chế từ HPV bao gồm vắc xin phòng nhiễm HPV thông qua hoạt động ngăn cản protein L1 của HPV nhận diện tế bào chủ và vắc xin điều trị tổn thương CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia) do nhiễm HPV bằng cách tăng đáp ứng các tế bào miễn dịch [8],[9]. Vắc xin

phòng nhiễm HPV đã được sử dụng tại Việt Nam từ những năm 2006 gồm Gardasil phòng nhiễm HPV16, 18, 6, 11 và Cervarix phòng nhiễm HPV16, 18 [8].

Tuy nhiên, Hoàng Thị Thanh Huyền và cộng sự đã xác định được HPV52 với tỉ lệ cao nhất 28,1%, tiếp theo là HPV16 với 18,7% và HPV18 chỉ chiếm 16,5% tại 139 bệnh phẩm phết cổ tử cung của gái mại dâm Việt Nam [10]. Khi xác định HPV từ 75 khối nén UTCTC với cặp môi đặc hiệu E6, E7 của HPV6, 11, 16, 18, Nguyễn Phi Hùng lại chỉ ra rằng 50% số mẫu bệnh phẩm nhiễm HPV16, đứng thứ 2 là HPV18 [11]. Cho tới thời điểm hiện tại, chưa có nghiên cứu nào tại Việt Nam nghiên cứu về tình trạng phân bố genotype của HPV tại mô UTSDN ở cả 03 loại mô UTCTC, UTAH và UTAD.

Vậy, xác định HPV từ khối nén UTCTC và sử dụng cặp môi đặc hiệu E6, E7 của 4 type HPV 6, 11, 16 và 18 như tác giả Nguyễn Phi Hùng có bỏ sót HPV52, một type HPV rất phổ biến ở đối tượng nguy cơ lây nhiễm cao đã được công bố? Liệu vắc xin phòng nhiễm HPV trên thị trường Việt Nam có khả năng phòng nhiễm các type HPV tại mô UTCTC, UTAH và UTAD hay không; và sự phân bố xác thực genotype của HPV có phải chỉ ở mô UTCTC hay còn có tại mô UTAH và UTAD là một câu hỏi mà chúng tôi muốn trả lời trong nghiên cứu này. Hơn nữa, chúng tôi kỳ vọng ở nghiên cứu sẽ cung cấp những dữ liệu về phân nhóm dưới nhóm của HPV16 E6, E7 tại loại tế bào ung thư là cơ sở cho chiến lược vắc xin điều trị nhiễm HPV.

Với những lý do trên đề tài: “**Nghiên cứu genotype của *Human Papillomavirus* trên một số ung thư sinh dục nữ**” được tiến hành với hai mục tiêu:

1. *Xác định genotype của HPV tại các mô ung thư cổ tử cung, âm hộ, âm đạo.*
2. *Đánh giá liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào tại mô ung thư.*

## Chương 1

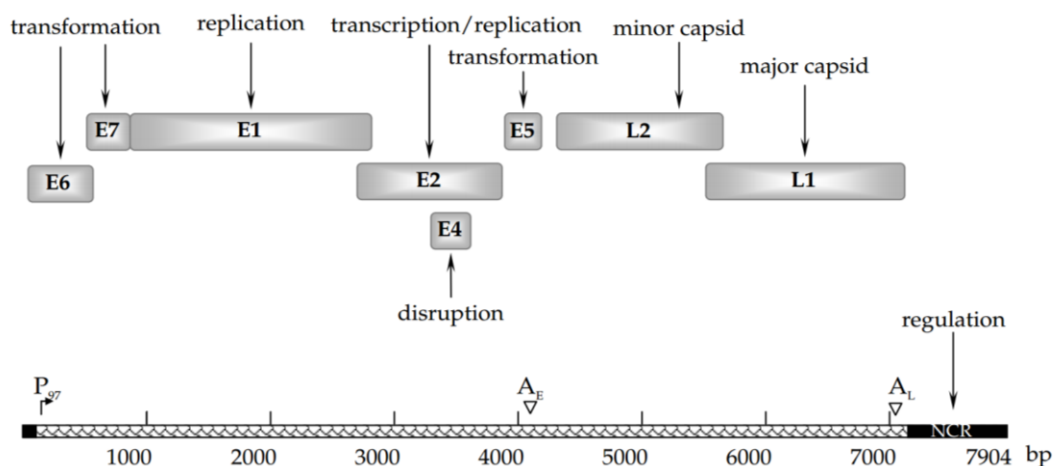
### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. *Human Papillomavirus* (HPV)

##### 1.1.1. Cấu tạo của HPV

*Papillomavirus* (PV) là loại virus lây lan qua con đường tiếp xúc trực tiếp, đặc biệt qua quan hệ tình dục. *Human Papillomavirus* (HPV) là loại *Papillomavirus* gây tổn thương biểu mô da và niêm mạc của người [5].

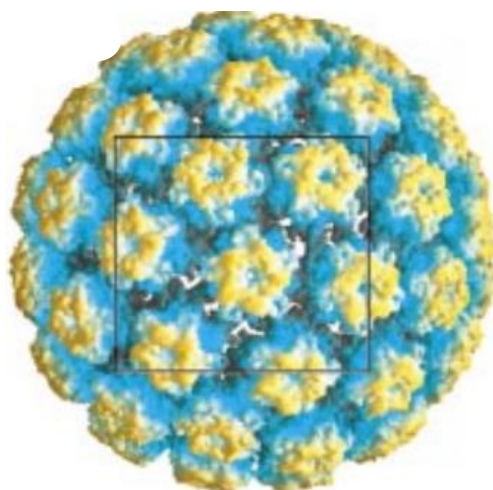
HPV là virus có đường kính 52-55 nm và được tạo bởi chuỗi xoắn kép DNA dài khoảng 8000 cặp base nitơ. Chuỗi DNA của HPV gồm 8 đoạn dịch mã; các gen dịch mã được chia thành 3 nhóm: gen muộn L (late), gen sớm E (early) và vùng điều khiển dài (long control region-LCR) hay còn gọi là vùng không mã hóa (unreading region - URR). *Capsid* virus gồm 72 *capsomeres*, mỗi *capsomere* được cấu tạo bởi 2 protein chính L1 và protein phụ L2. Vùng gen sớm gồm các gen E1, E2, E4, E5, E6 và E7 mã hóa cho các protein liên quan quá trình tái bản của vi rút. Sơ đồ về sự sắp xếp các gen và chức năng từng protein tương ứng của HPV được mô tả trong hình 1.1, mô hình *capsomeres* của hạt virus được minh họa tại hình 1.2 [12],[13].



**Hình 1.1: Sơ đồ cấu tạo các gen của HPV và chức năng các protein**

*E1-E7*: các gen của HPV; protein của *E1* can thiệp quá trình tái bản (replication), protein *E2* can thiệp quá trình sao mã và tái bản (transcription/replication), protein *E5*, *E6*, *E7* liên quan đến quá trình dịch mã (transformation).



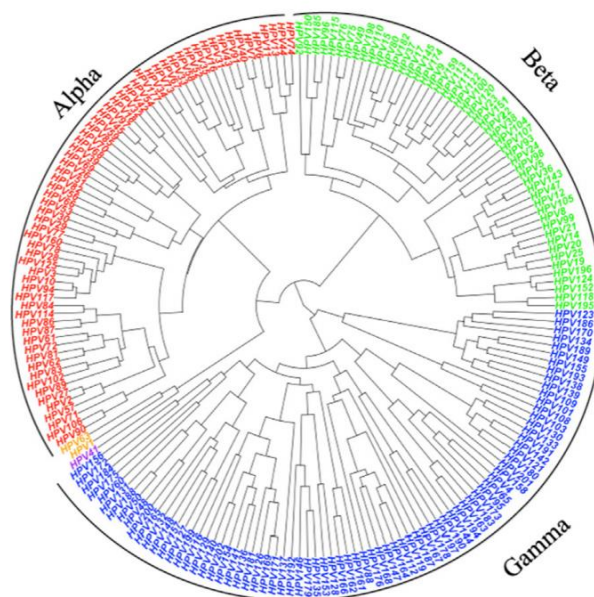


**Hình 1.2: Sơ đồ hạt vi rút [13]**

### **1.1.2. Lịch sử phát hiện và phân loại HPV**

HPV5 đại diện cho HPV đầu tiên phát hiện ở tế bào ung thư biểu mô da. Năm 1980, Gissmann và zur Hausen đã đặt tên là HPV6 cho HPV được tách thành công từ u nhú sinh dục. Năm 1982, Gissmann và cộng sự tách HPV 11 từ vùng hầu họng. Năm 1983, bằng kỹ thuật lai trên màng, Dürst và cộng sự đã tách sublineage HPV16. Năm 1984, Boshart và cộng sự tách sublineage HPV18 [14].

Sau gần 30 năm, từ phân loại dựa trên gen lai và đoạn gen mẫu, sự phân loại HPV đã chuyển sang so sánh toàn bộ bộ gen hoặc những đoạn subgenomic. Gen L1 có tính bảo tồn cao nên được sử dụng để phân loại HPV trong suốt hơn 15 năm qua. Một loại *Papillomavirus* được coi là mới nếu trình tự DNA của L1 khác biệt 10% so với loại gần nhất đã biết; nếu sự khác biệt từ 2-10% được gọi là dưới nhóm (subtype) và nếu ít hơn 2% được gọi là biến thể (variant) [14]. Năm 2011, Chen và cộng sự đã công bố tiêu chí phân loại mới cho HPV; nếu sự khác biệt toàn bộ bộ gen của HPV từ 1-10% được gọi là lineage, từ 0,5-1% được gọi là sublineage [16]. Năm 2013, Bzhalava và cộng sự đã xây dựng cây phả hệ HPV căn cứ vào gen L1 của 198 HPV, chi tiết được mô tả trong hình 1.3 [17].



**Hình 1.3: Cây phả hệ căn cứ vào trình tự gen L1 của 198 HPV**

Cũng căn cứ vào khả năng gây bệnh, Muñoz lại chia HPV thành 3 nhóm: nhóm nguy cơ cao gồm 15 loại: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 và 82; nhóm có khả năng gây ung thư gồm 3 loại HPV26, 53 và 66; nhóm nguy cơ thấp có 12 loại: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 và CP6108 [7].

Căn cứ vào bộ gen hoàn chỉnh của HPV16, Smith và cộng sự đã định danh phân nhóm dưới nhóm của HPV16 gồm nhóm châu Âu - European (gồm có sublineage châu Âu (E prototype - E(p) và Asian-E(As)) và không châu Âu - Non European (gồm sublineage châu Phi 1 (African -1 (Af-1)), châu Phi 2 (African-2 (Af-2)) và Á Mỹ (Asian American-AA)) [18].

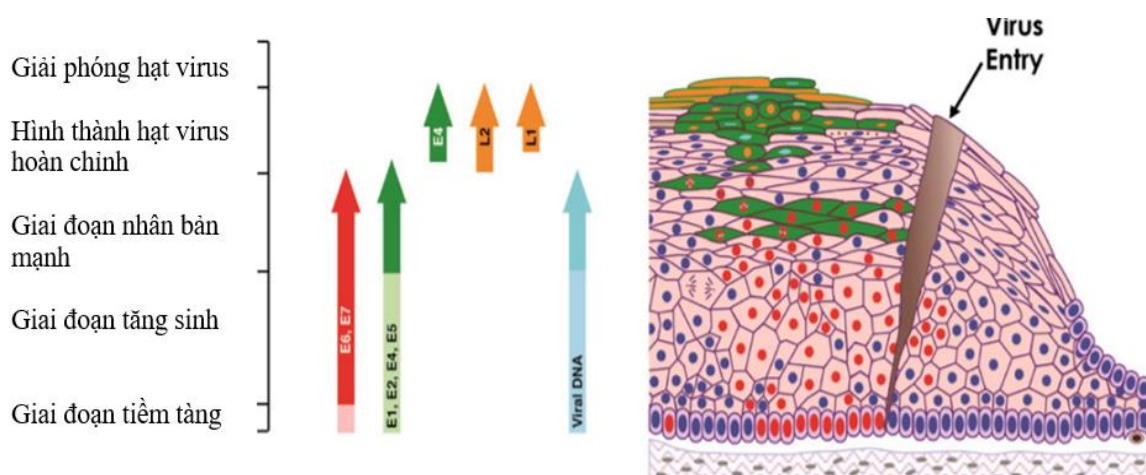
Không những sử dụng cả bộ gen của HPV, chỉ căn cứ vào trình tự nucleotide của đoạn gen E6, Antonio Huertas-Salgado đã định danh 5 loại sublineage của HPV16. Mỗi sublineage có những đặc điểm đột biến riêng đặc trưng của nó. Sublineage European (E) phải có đột biến C ở nucleotide thứ 109 nhưng tùy vào vị trí nucleotide 350 là T hay G mà lại chia làm 2 loại biến thể E-T350 và E-G350. Sublineage Asian (As) được đặc trưng bởi đột biến

acid nucleic tại vị trí 178. Đột biến T178G thuộc nhóm As-a; T178A thuộc As-b và T178C thuộc nhóm As-c. Sublineage Asian American (AA) được mô tả với các đột biến: G145T, T286g, A289g, T350G và A532g. Trong khi sublineage African1 (Af1) có đột biến C143G và G145T thì African 2 (Af 2) có 5 đột biến điểm: C143G, G145T, A289g và C335T (nucleotid viết thường là đột biến thay thế nucleotid không làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tương ứng) [19].

Như vậy, phân loại HPV được căn cứ vào trình tự gen L1 của HPV và phân nhóm (lineage) và phân nhóm dưới nhóm (sublineage) của HPV16 dựa trên trình tự gen E6, E7 của HPV16.

### ***1.1.3. Cơ chế gây bệnh của HPV***

Doorbar đã mô phỏng quá trình xâm nhập và nhân lên của HPV ở hình 1.5. Tại vùng biểu mô trụ tầng, ví dụ như cổ tử cung, qua những tổn thương nhỏ, HPV đã có thể xâm nhập vào màng đáy. Sau khi vi rút xâm nhập vào lớp tế bào biểu mô đáy, một hoặc 1 vài bản sao của vi rút được nhân lên và tồn tại như 1 thực thể ổn định trong nhân tế bào bằng cách gắn lên sợi nhiễm sắc tạo thể bổ sung hình nhẫn. Ngay ở lớp đáy, protein E6, E7 được biểu hiện, can thiệp vào chu kỳ tế bào. Gen khởi động của HPV được hoạt hóa và các protein sớm E1, E2 được giải mã, tổng hợp một lượng lớn thể bổ sung. Cùng với sự phân bào của tế bào đáy, bộ gen của HPV cũng được nhân lên và phân chia theo thoi vô sắc. Ở giai đoạn này, thể bổ sung được duy trì, gen của vi rút được biểu hiện với số lượng rất nhỏ nhưng vi rút được nhân lên với mức độ trung bình để đồng bộ với chu trình sống của tế bào chủ. Tới lớp thượng bì, các gen muộn L1, L2 được biểu hiện để tổng hợp protein L1, L2 tạo hạt vi rút hoàn chỉnh. Các hạt vi rút hoàn chỉnh được giải phóng cùng với sự bong ra các tế bào biểu mô khi các tế bào nhiễm vi rút phân chia tiến tới bề mặt lớp biểu mô [20].



**Hình 1.4: Chu kỳ sống của HPV**

Cơ chế gây bệnh của HPV được cụ thể hóa qua chức năng của các protein trong quá trình xâm nhập và nhân lên của HPV.

#### 1.1.3.1. Protein L1 và L2

Protein L1 và L2 vừa có vai trò nhận diện thụ thể màng tế bào, xâm nhập vào tế bào và nhân tế bào; sau khi bị phân hủy ở giai đoạn sớm tổng hợp trở lại giai đoạn muộn. Protein L1 với 531 acid amin của HPV có các đầu tận carbon và ni-tơ như những “cánh tay xâm lấn” vào đáy của các múi *capsomer* và các acid amin cystein tại vị trí 161, 229 và 379 có vai trò tăng sự bền vững đối với enzyme thủy phân-endonuclease trong quá trình biệt hóa tế bào biểu mô [21],[22]. Sự xâm nhập của HPV vào tế bào chủ bắt đầu bằng sự tương tác của protein L1 với tế bào biểu mô qua thụ thể trên bề mặt màng tế bào - heparan sulfat proteoglycans (HSPG) [23]. Nhưng cũng chính sự tương tác giữa *capsid* với thụ thể bề mặt tế bào biểu mô của vật chủ dẫn tới sự thay đổi ở các acid amin tận trên *capsid* protein L2-phân hủy một lượng acid amin nhất định bởi furin – protease tế bào, khiến cho protein L2 thoát khỏi sự thực bào của các hạt nội bào [24]. Bên cạnh đó, protein L2 bị furin phân cắt cho phép vi rút bám vào thụ thể thứ 2 trên bề mặt tế bào biểu mô [25].

Đột biến acid amin cystein tại vị trí 161, 229, 379 thành serin đã làm tăng khả năng bền vững với enzym thủy phân endonuclease, bảo tồn của

protein L1 [22]. Hơn nữa, chức năng nhận diện và bám vào tế bào biểu mô của protein L1 được các acid amin từ 54 -77, 274 -308 trên HPV16 L1 và 59-78, 259-278 trên HPV18 L1 đảm nhiệm [26]. Acid amin lysine 278 và 361 tại đỉnh của cánh pentamer cũng giữ vai trò chủ chốt trong việc tương tác với thụ thể bề mặt tế bào [27]. Sau khi xâm nhập vào tế bào, protein L1 của HPV16 còn xâm nhập vào nhân tế bào chủ qua Karyopherin  $\alpha 2\beta 1$ , receptor trên màng nhân và ức chế Karyopherin  $\alpha 2\beta 1$  trong suốt quá trình tăng sinh [28].

Protein L2 đóng vai trò quan trọng trong việc thoát khỏi sự kiểm soát của hệ thống miễn dịch tại chỗ. Tế bào Langerhan và tế bào thực bào của da và biểu mô - dendritic cell được hoạt hóa bởi sự xâm nhập của HPV mà điển hình là sự xuất hiện protein L1 của HPV [29]. Nhưng chính protein L2 giảm quá trình phosphoryl hóa Protein kinase B (Akt) dẫn tới giảm hoạt tính của Akt, do đó, gián tiếp con đường PI3K-Akt dẫn tới áp chế “sự chín” của tế bào Langerhan khiến cho HPV16 thoát khỏi sự kiểm soát của hệ miễn dịch [30].

Như vậy, protein L1 vừa nhận diện và bám vào thụ thể trên bề mặt màng tế bào. Sự kết hợp giữa protein L1 của HPV và thụ thể sẽ hoạt hóa các tế bào miễn dịch tại chỗ và cắt bỏ 1 vài acid amin của protein L2. Protein L2, đến lượt nó lại ức chế tế bào miễn dịch, giúp HPV sống sót và tiếp tục xâm nhập vào nội bào và tiến vào nhân tế bào chủ.

### 1.1.3.2. Protein E1 và E2

Protein E1 với 138 acid amin chia làm 3 phần, domain N từ acid amin số 1 đến 125 đảm nhiệm chức năng gắn với DNA, domain C từ acid amin 170 có hoạt tính như enzyme tháo xoắn DNA helicase/ATPase [31]. Protein E1 nhận diện vị trí sao chép của đoạn *ori* (origin) và biến tính DNA tại vị trí *ori*. Với số bản copy 50 bản/ tế bào, protein E1 HPV cần thiết cho cả giai đoạn bắt đầu nhân lên và duy trì bộ gen của vi rút [32]. Protein E1 không chỉ tác động

đến các gen liên quan đến chu trình tế bào mà còn giảm hoạt động của các gen đáp ứng miễn dịch như IFN $\beta$ 1, IFN $\lambda$ 1 và ISG [33].

Protein E1, cùng với sự hiện diện của protein E2, protein E2 qua DNA binding domain sẽ tăng cường E1 bám vào DNA. Phức hợp protein E1-E2-ori liên kết với DNA của tế bào chủ với ái lực cao [34].

#### 1.1.3.4. Protein E4

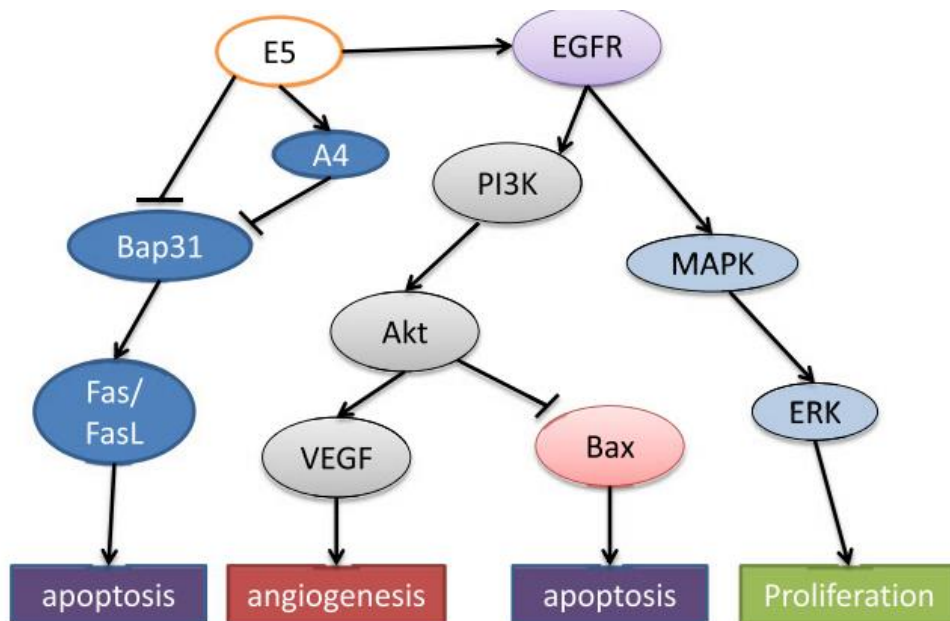
Protein E4 được tổng hợp sớm và với nồng độ cao, thậm chí cao hơn cả các protein L1, L2. Sự tổng hợp protein E4 chịu tác động của các *kinase*, mà điển hình là protein kinase A [35]. Motif LLXLL (từ acid amin ở vị trí số 10 đến số 14), đảm nhiệm chức năng tổng hợp sợi bào tương (cytoplasmic filamentous networks). Vùng bảo tồn LLXLL tại vị trí acid amin 12-16 trên protein E4 của HPV16, đóng vai trò then chốt trong việc sừng hóa tế bào [36].

#### 1.1.3.5. Protein E5

Protein E5 có khả năng khởi động một vài con đường tế bào bằng việc hoạt hóa thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR) và tăng điều hòa yếu tố phát triển nội mạc mạch máu (upregulated Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) [37]. Đoạn peptid từ acid amin 41 đến 54 và từ 54 đến 78 trên protein E5 bám vào tiểu phân 16K proteolipid của bơm proton trên màng tế bào mà dẫn tới hoạt động quá mức của EGFR [38].

Hơn nữa, Protein E5 cũng ức chế con đường chết tế bào (cell death pathway). Các thụ thể quá trình chết (death receptors-Drs) được hoạt hóa bởi yếu tố hoại tử u (tumor necrosis factor -TNF), thụ thể TNF R1, TNF R2 được hoạt hóa bởi TNF-alpha; thụ thể Fas bởi Fas ligand; DR1, DR2 bởi TNF liên quan đến chu trình chết tế bào có lập trình [39]. Khi FasL gắn vào thụ thể Fas, sẽ lập tức hoạt hóa DRs, caspase 8 và chu trình chết tế bào có lập trình. Trên thực nghiệm đã chứng minh, protein E5 giảm hoạt động của FasL, Fas cuối

cùng ức chế caspase 8 [40]. Protein E5 gắn lên Bap 31 (B cell protein associated protein 31) tạo phức hợp miễn dịch, ức chế thoái hóa protein Bap31 dẫn tới ức chế chết tế bào có lập trình [41]. Protein E5 cũng hoạt hóa lipoprotein xuyên màng A4-vốn đóng vai trò tương tác với Bap 31, dẫn tới tăng phân bào [42]. Con đường tác động của protein E5 được cụ thể hóa qua hình 1.5 của Chen J [43].



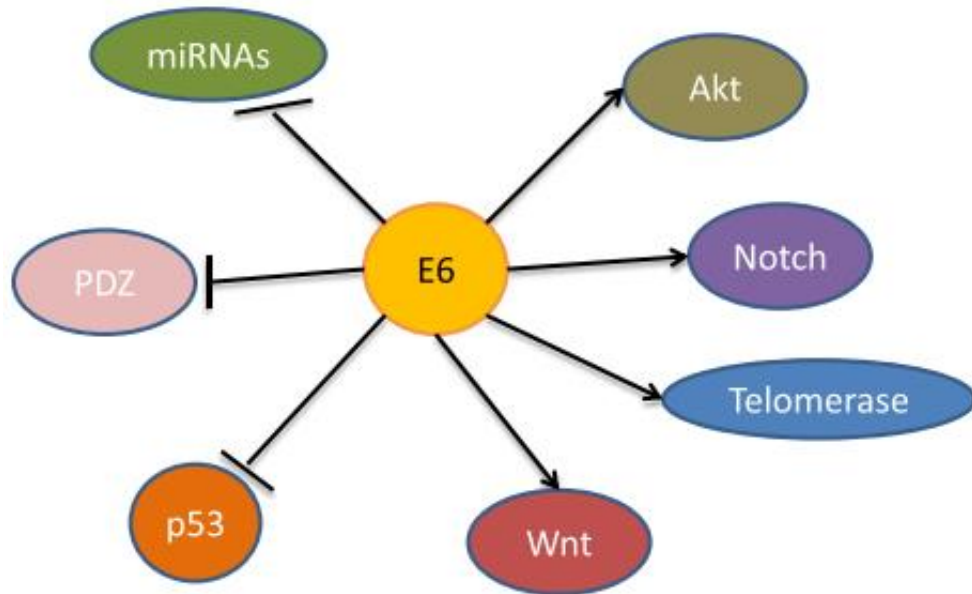
**Hình 1.5: Tác động của protein E5 lên con đường tín hiệu tế bào.**

Protein E5 tác động đến thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR, kích thích yếu tố tăng trưởng biểu mô, dẫn tới tăng hoạt hóa con đường phosphoinositide -3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) và hoạt hóa Protein kinase nguyên phân (MAPK)/kinase điều hòa tín hiệu gian bào (ERK). Akt tăng điều hòa yếu tố tăng trưởng nội mạch làm tăng sinh mạch máu (VEGF) và chặn Bax, giảm chết tế bào có lập trình. Protein E5 có thể chặn Bap31- tác động đến con đường chết tế bào có lập trình Fas/FasL

#### 1.1.3.6. Protein E6

Protein E6 được cấu tạo bởi 150 acid amin, có vai trò hoạt hóa con đường tín hiệu tế bào ung thư và ức chế protein áp chế khối u p53, phức hợp

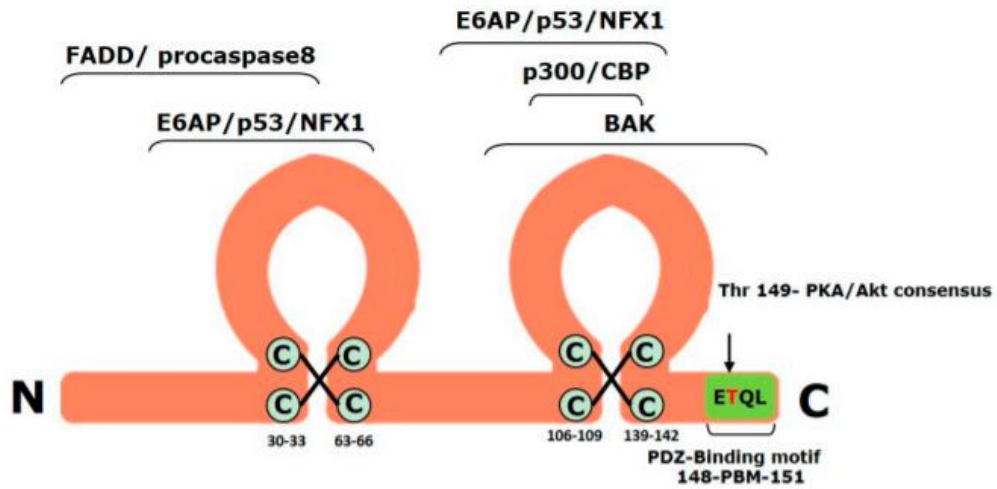
PZD (post synaptic density protein-drosophila disk large tumor suppressor-zonula occludens-1 protein). Bên cạnh đó, E6 còn có khả năng kích thích PI3K (phosphoinositide 3- kinase), Protein kinase B (Akt), Wnt và Notch, tăng biểu hiện telomerase, kéo dài sự bất tử của tế bào [43]. Vai trò của protein E6 được sơ đồ hóa trong hình 1.6.



**Hình 1.6: Tác động của protein E6**

Protein p53 được mã hóa bởi gen TP53 được biết đến như một tác nhân áp chế khối u thông qua hoạt động duy trì tính ổn định của bộ gen. Sự đứt gãy DNA và các yếu tố kích thích như stress oxy hóa, sốc thẩm thấu, nhiễm vi rút kích thích hoạt động của p53 [44]. Vai trò của p53 là làm chậm lại chu trình phân bào, cho phép các DNA tổn thương được sửa chữa. p53 hoạt động gắn lên DNA để tăng biểu hiện protein p21, chất ức chế cyclin - dependent kinase 2 (CDK2) làm giảm pha G1/S trong gián phân. p53 cũng đồng thời khởi động chết tế bào có lập trình nếu DNA bị tổn thương nặng. Do đó, bất hoạt p53 dẫn tới tích lũy tế bào chứa gen đột biến và là cơ sở hình thành khối u [43].





**Hình 1.7: Sơ đồ HPV16 E6 oncoprotein [45].**

Các acid amin 33-63, 109-139 cuộn lại thành các “zinc finger” tương tác với protein áp chế ung thư của tế bào chủ. Protein E6 của HPV nhóm nguy cơ cao gắn với mô tip LXXXL (L-leucin, X-acid amin) của E6AP (associated protein) tế bào, hình thành phức hợp E6-E6AP giáng hóa p53.

Chính sự giáng hóa p53 là cần thiết để duy trì DNA của HPV mà ở đây là gen E6 biến nạp vào tế bào sừng của người. HPV nhóm nguy cơ cao với các đột biến khác nhau đều làm tăng giáng hóa p53 lên nhiều lần [46].

Protein PDZ gồm 3 protein: protein PSD95 (Post synaptic density), protein áp chế khối u Dlg1 (Drosophila disk large) và protein Zo1 (zonula occludens-1), cấu tạo bởi hơn 250 acid amin. PDZ tham gia vào sự kết dính tế bào, liên kết chặt (tight junction), phân cực tế bào, vận chuyển ion và con đường tín hiệu tế bào [47]. Đầu tận carboxyl của protein E6 HPV nhóm nguy cơ cao có motif gắn PDZ làm giảm chức năng của PDZ [48].

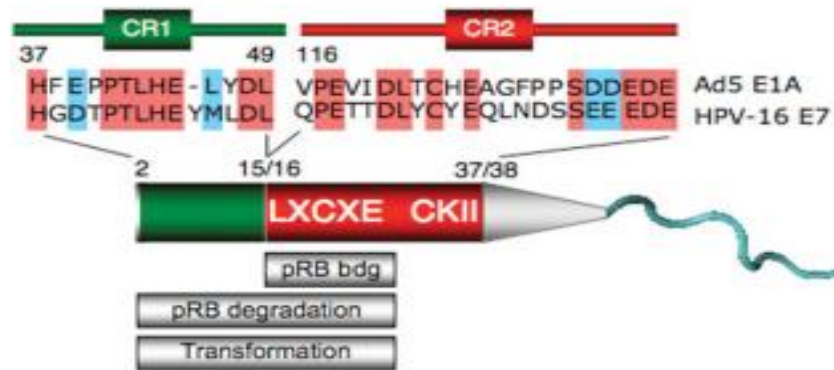
Đột biến gen hay yếu tố môi trường liên quan tới ung thư tử cung đều thông qua con đường hoạt hóa PI3K/Akt [49]. Notch đóng vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng, biệt hóa, đáp ứng miễn dịch của tế bào.

Telomerase là một ribonucleoprotein, có hoạt tính enzyme duy trì cấu trúc của telome ở đầu tận của sợi nhiễm sắc [50]. E6 tác động đến promoter hTERT (human telomerase reverse transcriptase) qua tương tác với E6AP và trực tiếp gắn lên protein hTERT, ngăn giáng hóa protein hTERT tăng hoạt tính của telomerase [51].

Như vậy, protein E6 ức chế quá trình tự sửa chữa DNA bằng cách giáng hóa protein p53, ức chế sự phân cực tế bào bằng việc ức chế protein PDZ. Protein E6 cũng thúc đẩy sự phân bào không kiểm soát qua hoạt động kích thích enzyme phosphoinositide 3- kinase và protein kinase, ngăn cản sự giáng hóa telomerase do đó duy trì hoạt động của telomerase, kéo dài thể mút telome. Protein E6 thúc đẩy các tế bào có bất thường về gen phân chia không kiểm soát dẫn tới hình thành mô ung thư.

#### 1.1.3.7. Protein E7

Protein E7 được cấu tạo bởi hơn 100 acid amin với 02 vùng gen bảo tồn (conserved region - CR). Vùng gen bảo tồn CR1 gồm acid amin từ 37-49 tham gia vào quá trình sao chép và giáng hóa p53. Vị trí liên kết với p53 LXCXE (Leu-X-Cys-X-Glu) nằm trong vùng gen bảo tồn CR2 từ acid amin 116-137, cần thiết cho sự gắn kết với p53 và phosphoryl hóa. Đầu carboxyl tận có các đầu chứa kẽm với 2 đoạn motif CXXC (Cys-X-X-Cys) có vai trò trùng hợp, cuộn kẽm lại, có ái lực cao với pRb, E2F [52].



**Hình 1.8: Sơ đồ protein E7 và các vị trí can thiệp vào pRb [52]**

Protein E7 được biết đến với khả năng tương tác với protein Retinoblastoma (pRb), con đường PI3K/Akt và miRNA. Hoạt động của pRb là gắn vào yếu tố sao chép E2F1-3 để ngăn cản chức năng của E3E1-3. Khi protein E7 gắn vào pRb sẽ không cho phép pRb gắn lên E2F1-3, E2F1-3 được giải phóng, có thể gắn với yếu tố điều hòa chu trình tế bào DP-1, DP-2, rút ngắn pha G1-S, tăng sự kém bền vững của bộ gen và giảm apoptosis. Protein E7 còn giảm độ bền của pRb qua việc can thiệp vào giáng hóa protein nội bào bằng phức hợp cullin 2 ubiquitin [53]. Protein còn gắn trực tiếp lên E2F, thúc đẩy hoạt động đưa tế bào vào pha S của E2F và ức chế hoạt động sao chép của E2F6, kéo dài pha S ở tế bào nhiễm HPV [54],[55].

Bằng các con đường khác nhau, protein E7 tương tác với protein áp chế khối u pRb, rút ngắn giai đoạn tự sửa chữa ở pha G1-S của tế bào, tạo điều kiện cho sự tích lũy các đột biến qua mỗi kỳ phân bào.

#### ***1.1.4. Sự lây nhiễm HPV và loại bỏ HPV***

##### ***1.1.4.1. Sự lây nhiễm HPV***

Quan hệ tình dục là con đường lây lan HPV chủ yếu. Tỷ lệ lây nhiễm HPV từ bạn tình nam sang nữ và nữ sang nam khác nhau giữa các khu vực và tỷ lệ lây nhiễm qua đường quan hệ tình dục cũng khác nhau [56],[57],[58]. HPV được phát hiện ở bạn tình sau 24 giờ quan hệ tình dục. Tính từ lần quan hệ tình dục trước khi phát hiện nhiễm HPV, tỷ lệ lây nhiễm HPV từ đường sinh dục nữ sang bạn tình nam khoảng 187,5 người/100 người/tháng trong 8 tuần đầu và từ đường sinh dục nam sang nữ 100 người/100 người/tháng sau 8 tuần 3 ngày [56]. Theo dõi trong 7,5 tháng, tỷ lệ lây HPV từ nam sang nữ 4,9/100 người/tháng trong khi từ nữ sang nam 17,4/100 người/tháng [57]. Tỷ lệ lây nhiễm HPV nguy cơ cao từ nam sang nữ cao hơn từ nữ sang nam; những cặp trẻ tuổi, HPV tồn tại dai dẳng hơn và lây nhiễm cao hơn [58].

Tình trạng nhiễm HPV còn liên quan tới thói quen hút thuốc lá, số lượng bạn tình, đặc biệt bạn tình mắc bệnh lây truyền qua đường tình dục, kết quả mô bệnh học bất thường [59]. Những phụ nữ có từ 6 bạn tình trở lên có nguy cơ nhiễm HPV gấp 3,89 lần so với người có 1 bạn tình [60]. Hơn nữa, nhiễm HPV nhóm nguy cơ cao và nhiễm dai dẳng có nguy cơ tiến triển thành CIN3+ ở những phụ nữ sau sinh [61].

HPV không chỉ lây nhiễm qua con đường quan hệ tình dục âm đạo - dương vật mà còn qua các con đường quan hệ tình dục bằng đường miệng, hậu môn, dụng cụ tình dục, con đường tiếp xúc da trực tiếp [56],[57],[62].

#### *1.1.4.2. Sự loại bỏ HPV*

Theo dõi tình trạng nhiễm HPV ở 2048 phụ nữ tổn thương cổ tử cung CIN3 và UTCTC trong 2 năm cho thấy, tỉ lệ nhiễm HPV dai dẳng trên 6 tháng ở phụ nữ cao tuổi cao tuổi, đặc biệt nhóm hút thuốc lá và dùng thuốc tránh thai dạng tiêm. Những phụ nữ hút thuốc lá trên 20 điếu/ngày có tỉ lệ nhiễm HPV dai dẳng trên 6 tháng cao gấp 1,4 lần phụ nữ hút dưới 10 điếu/ngày. Sử dụng thuốc tránh thai bằng đường tiêm có tỉ lệ nhiễm HPV cao gấp 1,2 lần so với người không sử dụng. Tỉ lệ bệnh nhân nhiễm HPV nguy cơ cao dai dẳng trên 6 tháng cao hơn nhóm nguy cơ thấp 2,1 lần [63].

Trong 2 năm theo dõi, Plummer nhận thấy tỉ lệ nhiễm HPV giảm xuống còn 36% sau 6 tháng, 20% sau 12 tháng, 13% sau 18 tháng và chỉ còn 9% sau 2 năm nhiễm [64]. Sau 18 tháng, HPV nguy cơ cao như HPV16, HPV18, HPV31 và HPV33 bị loại bỏ với tỉ lệ thấp ở cả những phụ nữ có kết quả tế bào học cổ tử cung bình thường hoặc loạn sản [65]. Khan và cộng sự sau 10 năm sàng lọc theo dõi, đã chỉ ra rằng, 17,2% số phụ nữ nhiễm HPV16; 13,6% nhiễm HPV18 phát triển thành CIN3 hoặc ung thư [66].

Các công bố trên thế giới đã chỉ ra rằng HPV lây nhiễm qua tiếp xúc trực tiếp. Lây nhiễm HPV xuất hiện khoảng 24 giờ quan hệ tình dục với

người nhiễm. Hầu hết các HPV nguy cơ thấp bị loại bỏ sau 2 năm lây nhiễm; HPV nguy cơ cao như HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 tồn tại dai dẳng ở mô tổn thương loạn sản CIN và ung thư.

## **1.2. Ung thư sinh dục nữ**

Ung thư nói chung và ung thư sinh dục nữ (UTSDN) nói riêng, kết quả giải phẫu bệnh bao gồm mô tả không những về hình thái tế bào với những chi tiết cụ thể về nhân, bào tương mà cả khu vực gian bào có vai trò quyết định trong chẩn đoán. UTSDN, mà tiêu biểu là UTCTC đã được các nhà giải phẫu bệnh và lâm sàng phân chia cả về hình thái mô bệnh học, mô học và lâm sàng.

### **1.2.1. Ung thư cổ tử cung**

#### *1.2.1.1. Lịch sử phân loại tổn thương cổ tử cung:*

- Đầu thế kỷ 19, William mô tả biến đổi mô bệnh học ở tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung dạng xâm lấn mà sau này gọi là ung thư tại chỗ.

- Năm 1956, Reagan và Hamoic đưa ra khái niệm loạn sản (dysplasia) để ám chỉ các tế bào biểu mô không điển hình kém biệt hóa.

- Năm 1987, Richart với khái niệm CIN (cervical intraepithelial neoplasia) đã mô tả tổn thương từ dạng loạn sản nhẹ tới ung thư tại chỗ. CIN1 (loạn sản vừa) - lớp tế bào đáy (màng cơ bản) tăng sinh 1/3 dưới tầng biểu mô bào tương không rộng, không có hốc sáng, nhân to nhỏ không đều. CIN2 (loạn sản trung bình) - lớp tế bào đáy và cầu sừng xuất hiện ở 2/3 dưới tầng biểu mô, nhân to, tăng sắc, bào tương có các hốc sáng. CIN3 (loạn sản nặng) - cầu sừng cả lớp đáy xuyên suốt tầng biểu mô, nhân sẫm màu, to nhỏ không đều, nhân múi, nhân chia.

- Năm 1992, theo hệ thống phân loại của Bethesda, tổn thương tế bào biểu mô được chia thành 2 loại: tổn thương biểu mô sừng mức độ nhẹ (low- grade squamous intraepithelial lesion - LSIL) và tổn thương biểu mô sừng mức độ nặng (high grade squamous intraepithelial lesion - HSIL). LSIL gồm CIN1 hay loạn sản nhẹ, u nhú, HSIL gồm CIN2, 3, loạn sản vừa và nặng, ung thư tại chỗ.

- Hệ thống phân loại Bethesda 2001 và Bethesda 2014 bổ sung đã đề cập tới ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến [67].

#### *1.2.1.2. Phân loại ung thư cổ tử cung*

Theo phân loại giải phẫu bệnh về u cổ tử cung của Tổ chức Y tế Thế giới năm 2018, ung thư biểu mô cổ tử cung thành các loại tế bào sau: ung thư vảy, ung thư tế bào tuyến và các ung thư biểu mô khác.

#### **- Ung thư vảy**

+ Ung thư tế bào vảy

Sùng hóa

Không sùng hóa

Màng đáy hóa

Lympho biểu mô hóa

Ung thư vảy tế bào sáng

+ Vi xâm nhập: ung thư vảy tại chỗ

#### **- Ung thư tế bào tuyến**

+ Ung thư tế bào tuyến tiết nhày

+ Ung thư tế bào tuyến nội tiết

+ Ung thư tế bào trong

+ Ung thư tế bào tuyến khác

#### **- Ung thư biểu mô khác**

+ Ung thư tế bào tuyến vảy

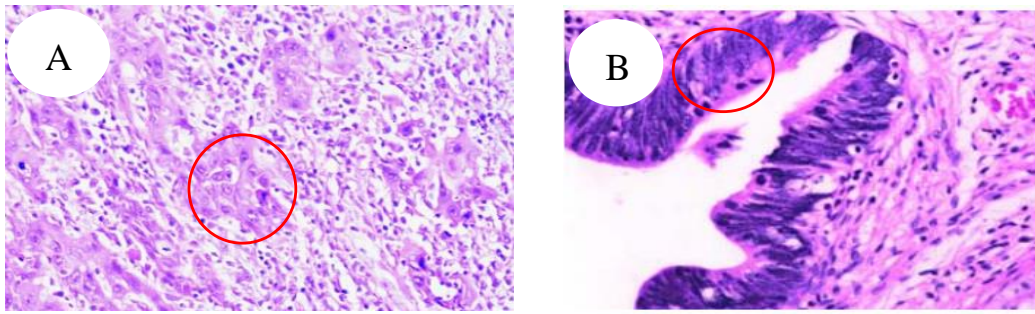
+ Ung thư tế bào kính

+ Ung thư thần kinh nội tiết

+ Ung thư tế bào tuyến bàng quang

+ Ung thư tế bào tuyến đáy [68]

Hình ảnh ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến được thể hiện ở hình 1.9.



**Hình 1.9: Hình ảnh tế bào ung thư cổ tử cung**

*A): ung thư tế bào vảy không sừng hóa: trong hình tròn màu đỏ là các tế bào hình đa diện, tập trung thành từng đám, nhiều tế bào nhân quái, không có cầu sừng; B): ung thư tế bào tuyến: trong hình tròn màu đỏ là các tế bào hình trụ xếp thành nhiều hàng, nhân to nhỏ không đều [69].*

Ung thư tế bào tuyến vảy là ung thư thể hỗn hợp giữa tế bào biểu mô tuyến và biểu mô vảy. Tế bào vảy kém biệt hóa tiết nhày nhưng không sừng hóa hoặc không có cầu sừng ở khu vực gian bào [69].

#### 1.2.1.3. Các yếu tố liên quan đến UTCTC

##### \* **Hút thuốc lá và UTCTC**

Các nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng hút thuốc lá có liên quan trực tiếp đến UTSD nữ. Khái niệm hút thuốc lá không chỉ dừng lại ở hiện tượng trực tiếp hút mà còn ở cả những cá thể “bị” hút. Phụ nữ hít phải khói thuốc lá có nguy cơ UTCTC cao gấp 1,7 lần [70]. Hơn nữa, thực nghiệm gây nhiễm khói thuốc lá lên sublineage tế bào CIN 1 nuôi cấy tách từ mô sinh thiết đã được biến nạp gen E6 của HPV và sublineage tế bào CIN 1 không gây biến nạp E6 của HPV cho thấy giảm lượng p53 và chết có lập trình của sublineage tế bào CIN1 có biến nạp cao hơn sublineage tế bào không có biến nạp gen E6 của HPV [71]. Ở nhóm hút thuốc lá, nguy cơ UTCTC ở những phụ nữ nhiễm HPV16 cao gấp 14,4 lần so với những không nhiễm HPV; trong khi ở nhóm không hút thuốc lá, nguy cơ UTCTC ở phụ nữ nhiễm HPV16 cao gấp 5,6 lần so với những phụ nữ không nhiễm [72].

Như vậy, hút thuốc lá trực tiếp hay gián tiếp đều làm tăng nguy cơ mắc UTCTC.

**\* Quan hệ tình dục và UTCTC**

Tỉ lệ phụ nữ có tiền sử sử dụng thuốc tránh thai từ 5-9 năm mắc UTCTC gấp 2,82 lần và trên 10 năm là 4,03 lần so với người không dùng thuốc tránh thai [73]. Theo kết quả nghiên cứu từ Hiệp hội nghiên cứu dịch tễ UTCTC Quốc tế, phụ nữ trong độ tuổi 20-30 có tiền sử 10 năm sử dụng thuốc tránh thai bằng đường uống có nguy cơ mắc UTCTC tại chỗ từ 7,3- 8,3 người/ 1000 phụ nữ ở các ước kém phát triển và 3,8-4,5 người/ 1000 phụ nữ ở các nước phát triển [74].

Tuổi bắt đầu quan hệ tình dục, số bạn tình liên quan tới UTCTC. Tuổi bắt đầu quan hệ tình dục càng sớm, nguy cơ ung thư cổ tử cung càng cao, cụ thể, với những phụ nữ quan hệ dưới 14 tuổi, nguy cơ là 3,5 lần so với người trên 25 tuổi. Những phụ nữ có trên 2 bạn tình, bắt đầu quan hệ tình dục ở tuổi <17 có nguy cơ UTCTC cao gấp 5,9 lần so với những người chỉ có 1 bạn tình và bắt đầu quan hệ tình dục ở độ tuổi >25 [75].

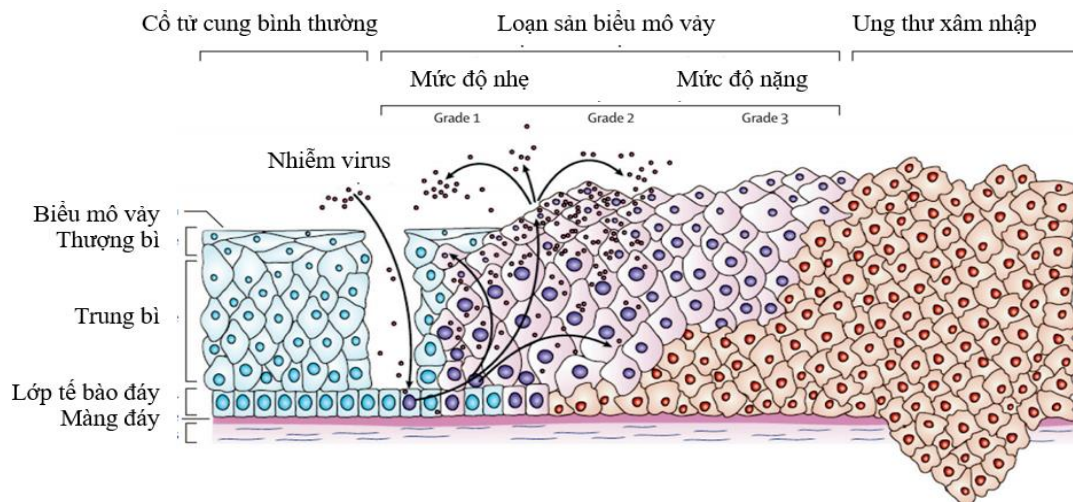
**\* HPV và UTCTC**

Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng HPV liên quan đến tổn thương cổ tử cung cũng như UTSDN. Tỉ lệ dương tính HPV tại các mô tổn thương cổ tử cung tăng dần theo mức độ tổn thương tế bào, từ <10% trong cộng đồng tới 20 - 30% ở đối tượng gái mại dâm và dao động từ 80 - 98% ở những bệnh nhân UTCTC. Chi tiết về tỉ lệ nhiễm HPV và tài liệu trích dẫn được mô tả trong mục 1.3.1.

Crosbie đã mô tả chi tiết các giai đoạn tổn thương sinh dục nữ liên quan đến HPV. Những tổn thương tới lớp biểu mô đáy tạo điều kiện thuận lợi cho HPV xâm nhập và nhân lên ở lớp tế bào đáy. Các tế bào mang hạt vi rút có các hình thái tổn thương khác nhau. HPV biến nạp vào nhiễm sắc thể chủ, tồn tại như thể nhân, phân chia cùng với sự phân bào của tế bào chủ. Các hình



thái tổn thương từ mức độ nhẹ như loạn sản từ 1/3 dưới lớp biểu mô (CIN1) cho tới 1/3 trên (CIN2), cho tới mức độ nặng khi biến đổi hình thái nhân và tế bào của toàn bộ tầng biểu mô (CIN 3), sự quá sản dẫn tới phá vỡ màng đáy xâm (ISC)xâm nhiễm xuống lớp dưới biểu mô [76]. HPV thoát khỏi sự kiểm soát của hệ thống miễn dịch sẽ tiếp tục tồn tại dai dẳng trong cơ thể chủ gây nên bệnh lý ung thư [77].



**Hình 1.10: Chu kỳ phát triển và lây nhiễm của HPV [76]**

#### 1.2.1.4. Phòng và điều trị UTCTC

Tùy vào giai đoạn UTCTC mà có các phương pháp điều trị khác nhau nhưng phẫu thuật loại bỏ là phổ biến nhất. Phẫu thuật loại bỏ khối u kết hợp xạ trị áp dụng cho UTCTC giai đoạn IB, IIA. Các tổn thương nặng hơn như từ giai đoạn IIB đến giai đoạn IV được kết hợp xạ trị bên ngoài và bên trong, Hóa trị liệu kết hợp xạ trị cũng được áp dụng mang đến hiệu quả điều trị đáng kể cho bệnh nhân ở giai đoạn III. Phối hợp các liệu pháp đã đạt được tỉ lệ sống sót lên 16% [69].

Sau 10 năm tiêm phòng vắc-xin HPV16,18; 66% các trường hợp không bị mắc CIN3+ [78].Vắc-xin L1HPV với tác dụng phòng nhiễm HPV 6, 11, 16, 18 làm giảm tỉ lệ loạn sản cổ tử cung ở mức độ nặng (CIN2, CIN3) sau 3,5 năm sử dụng liệu pháp vắc-xin với liều 40 mug HPV16 L1 VLP [79].

Nghiên cứu thực nghiệm cũng cho thấy hiệu quả của vắc-xin E6, E7HPV16 trong việc ức chế giáng hóa protein áp chế khối u p53, pRb, ức chế hoạt hóa telomerase [80]. Liệu pháp vắc-xin E7HPV16 có hiệu quả giảm tổn thương loạn sản cổ tử cung CIN3 xuống CIN2 sau 9 tuần điều trị [9].

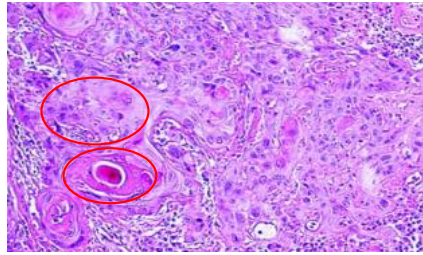
Cùng với sự phát triển của khoa học, liệu pháp vắc-xin hứa hẹn tiềm năng trong phòng UTCTC.

### **1.2.2. Ung thư âm đạo**

#### **1.2.2.1. Phân loại mô bệnh học UTAD**

Cũng như UTCTC, UTAD được WHO chia thành các loại tế bào ung thư biểu mô như sau:

- **Ung thư tế bào vảy**
  - + Sừng hóa
  - + Không sừng hóa
  - + Màng đáy hóa
- **Ung thư tế bào tuyến**
  - + Ung thư tế bào tuyến
  - + Ung thư tế bào tuyến nội tiết
  - + Ung thư tế bào trong
  - + Ung thư tế bào tuyến khác
- **Ung thư biểu mô khác**
  - + Ung thư tế bào tuyến vảy
  - + Ung thư tế bào tuyến trụ
  - + Ung thư tế bào tuyến đáy
  - + Ung thư tế bào nhỏ [81].



**Hình 1.11: Hình ảnh ung thư tế bào vảy sừng hóa âm đạo.**

*Trong hình tròn màu đỏ là hình ảnh các tế bào biểu mô hình đa diện to nhỏ không đều, nhiều vùng thoái hóa ngấm sừng, tạo cầu sừng [81].*

#### 1.2.2.2. Các yếu tố liên quan đến UTAD

Shah và cộng sự đã phát hiện sự liên quan giữa tuổi và chủng tộc liên quan với UTAD. Nhóm mắc UTAD có độ tuổi trung bình  $65,7 \pm 14,3$  tuổi; độ tuổi 70-79 có tỉ lệ mắc UTAD cao nhất. Trong số phụ nữ mắc UTAD, 66% trường hợp thuộc tộc người da trắng không phải Tây Ban Nha, 14% thuộc về người Mỹ gốc Phi, 12% thuộc về người Tây Ban Nha da trắng và 7% thuộc cư dân bán đảo Thái Bình Dương [82].

Cũng như UTCTC, UTAD liên quan đến số lần quan hệ tình dục, tuổi bắt đầu quan hệ tình dục, tiền sử hút thuốc lá. Những phụ nữ có 4-5 bạn tình có nguy cơ UTAD gấp 3,1 lần người có 1 bạn tình. Những người bắt đầu quan hệ tình dục ở độ tuổi dưới 17 có nguy cơ UTAD cao gấp 2,1 lần những người quan hệ tình dục sau 17 tuổi. Những phụ nữ hút thuốc lá có nguy cơ mắc UTAD gấp 2,1 lần so với người không hút. Đặc biệt, 30% trường hợp UTAD trong nghiên cứu của Daling có tiền sử điều trị UTCTC và chỉ số nguy cơ lên tới 3,9. Tuy nhiên, vắc-xin phòng nhiễm HPV16 có liên quan mạnh tới UTAD khi với OR lên tới 4,3 [83]. Như vậy, có thể kết luận rằng HPV16 có nguy cơ mắc UTAD nhiều hơn hút thuốc lá, tuổi quan hệ tình dục và số bạn tình.

#### 1.2.2.3 Phòng và điều trị UTAD

Chiếu xạ là phương pháp điều trị được áp dụng cho các trường hợp UTAD và tỉ lệ sống sau 5 năm khoảng 42% tùy thuộc vào giai đoạn ung thư [81].

Sau 24 tháng áp dụng liệu pháp vắc-xin phối hợp E6,E7HPV16 đã làm giảm đường kính tổn thương loạn sản âm đạo VAIN2 tới 40% và không phát hiện HPV16 tại nơi tổn thương [84].

### 1.2.3. Ung thư âm hộ

#### 1.2.3.1. Phân loại mô bệnh học UTAH

Các tổn thương sinh dục nữ khác như VAIN (vaginal intraepithelial neoplasia), VIN (vulva intraepithelial neoplasia), UTAH cũng được chẩn đoán như các tổn thương cổ tử cung.

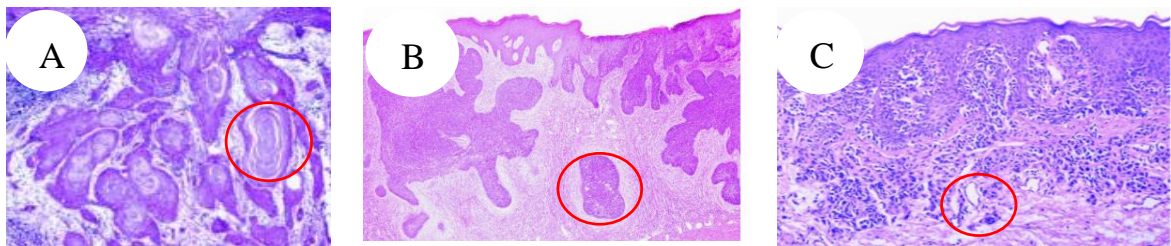
WHO phân chia tổn thương tế bào học UTAH thành 02 loại: ung thư tế bào biểu mô và ung thư tế bào hắc tố chi tiết như sau:

#### - Ung thư tế bào biểu mô

- + Ung thư tế bào vảy gồm các loại sừng hóa, không sừng hóa, màng đáy hóa....
- + Ung thư tế bào đáy
- + Bệnh Paget

#### - Ung thư tế bào hắc tố

Ung thư tế bào vảy âm hộ thường gặp hơn cả, chiếm tới 80% các trường hợp UTAH, ung thư tế bào đáy và ung thư tế bào hắc tố ít gặp hơn. Triệu chứng lâm sàng của UTAH rất nghèo nàn, thường bệnh nhân đến khám vì một vết loét hoặc khối u vùng âm hộ. Ung thư tế bào hắc tố thường xuất hiện vùng âm vật hoặc môi nhỏ [85].



**Hình 1.12: Hình ảnh ung thư âm hộ**

*Trong hình tròn màu đỏ ở tiêu bản A) ung thư tế bào vảy sừng hóa: đám tế bào sừng hóa xâm nhập mô đệm; B) ung thư tế bào tuyến: mô đệm bị xâm nhập bởi đám tế bào to nhỏ được vây quanh bởi các tế bào hình trụ nhân to nhỏ không đều, xếp song song với nhau; C) ung thư tế bào hắc tố: mô đệm bị xâm nhập bởi các khối tế bào to nhỏ khác nhau, nhân không rõ, bào tương chứa đầy hắc tố [85].*

### *1.2.3.2. Yếu tố liên quan đến UTAH*

Theo nghiên cứu của Lien và cộng sự, 95% các trường hợp mắc VIN có yếu tố nguy cơ cao như nhiễm HPV, hút thuốc lá hoặc suy giảm miễn dịch như nhiễm HIV, ghép tạng sẽ mắc VIN ở độ tuổi 30-50 và 5% các trường hợp tổn thương VIN này sẽ phát triển thành mụn cóc hoặc UTAH. 5% các trường hợp tổn thương VIN có liên quan đến tuổi, viêm nhiễm, stress oxy hóa và stress thiếu máu nhưng có tới 35% các trường hợp tổn thương VIN này sẽ phát triển thành UTAH sùng hóa [86]. Tuy nhiên, thời gian trung bình để ung thư hóa tế bào biểu mô vảy từ tổn thương VIN dưới 28 tháng và từ lichen sclerosus tới 84 tháng [87].

### *1.2.3.3. Phòng và điều trị UTAH*

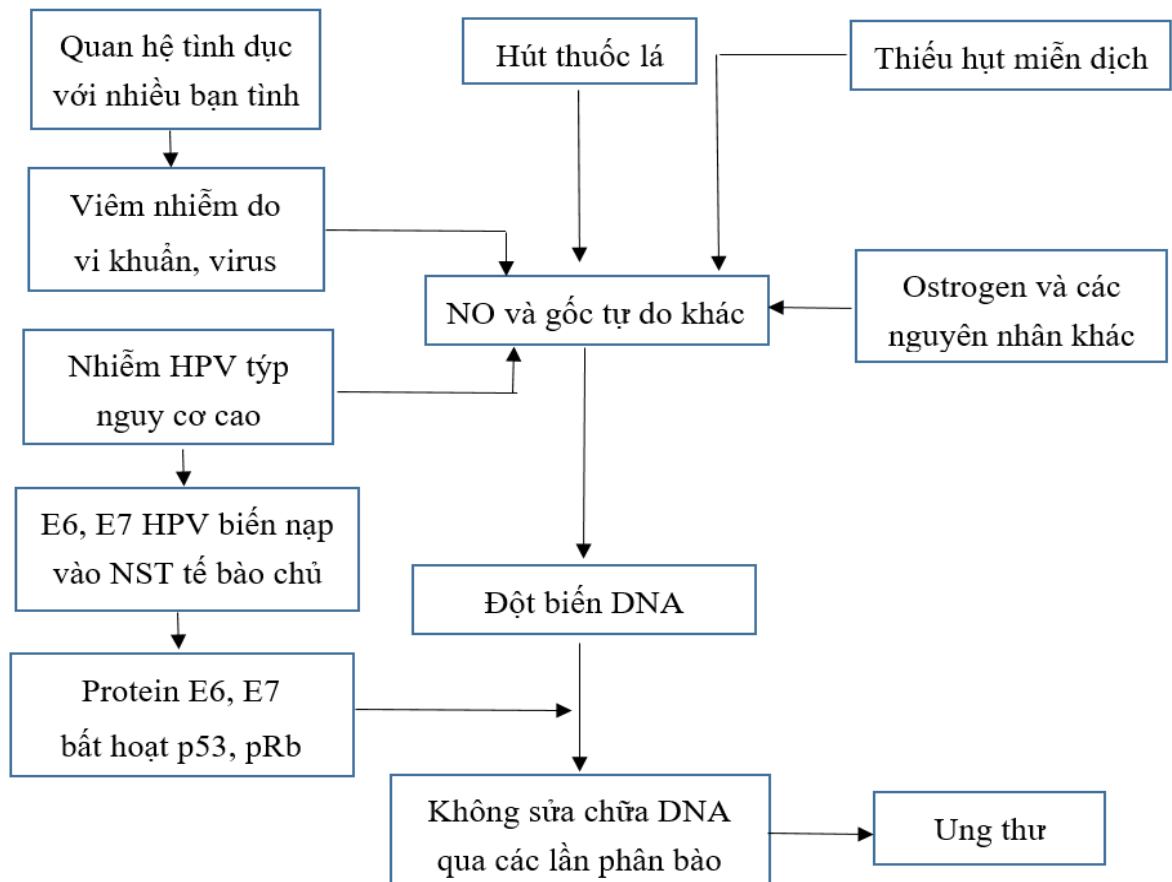
Phẫu thuật hoặc phẫu thuật kết hợp hóa trị liệu là phương pháp điều trị bắt buộc đối với UTAH [88].

### **1.2.4. Cơ chế ung thư sinh dục nữ**

Yếu tố vi rút và không vi rút đều có liên quan đến cơ chế gây ung thư nói chung và UTSDN nói riêng. Tóm tắt về các tác nhân gây ung thư được mô tả trong hình 1.13 [77]. NO (nitric oxid) - oxit nitơ là gốc tự do được hình thành từ acid amin L - arginin bởi enzyme NO synthase. Cũng như các gốc tự do khác, hàm lượng cao NO và nitro hoạt hóa tự do từ các phản ứng viêm hoặc nhiễm trùng có thể làm bổ sung 1 vài nucleotide trên chuỗi DNA khiến chuỗi DNA bị đứt gãy hoặc hình thành liên kết chéo giữa 2 mạch đơn. Nitro tự do biến đổi G:C thành T:A bằng cách hình thành 8-nitroguamin [89]. Bằng thực nghiệm, Wei và cộng sự đã chỉ ra rằng, với hàm lượng 0,25-05 mmol/L DETA-NO, sau 24 giờ gây nhiễm, số lượng gen E6, E7 của HPV được nhân lên gấp 2 lần. Cùng với sự gia tăng bản sao của gen E6, E7 là sự giảm đáng kể có ý nghĩa của protein p53 và pRb, giảm số lượng tế bào chết, tăng đứt gãy chuỗi DNA và tăng tần suất đột biến so với những tế bào không nhiễm HPV [90].

Theo zur Hausen, tổn thương LSIL có thể bắt đầu từ việc nhiễm HPV nguy cơ cao, HPV với các sublineage hoặc không do nhiễm HPV như: quan hệ tình dục nhiều bạn tình, đột biến gen, hút thuốc lá, đột biến gen do viêm nhiễm (nhiễm herpes simplex, vi khuẩn hoặc protozoal), hormon hoặc thiếu hụt miễn dịch, bệnh lý di truyền bẩm sinh. Đột biến gen và các dẫn xuất của oestrogen là yếu tố thuận lợi thúc đẩy các gen của vi rút tăng hoạt động và tăng cường sự lây nhiễm dai dẳng của vi rút HPV. Đó là điểm mấu chốt trong quá trình làm mất tính ổn định hệ gen tế bào chủ bởi tác động của gen E6, E7 của HPV. Tính ổn định của bộ gen chủ không còn, mà cụ thể là sự biến nạp của gen E6, E7 vào bộ nhiễm sắc thể chủ dẫn đến tổn thương ở mức độ nặng hơn, HSIL, thậm chí ung thư tại chỗ và ung thư xâm lấn [77].

Cơ chế bệnh sinh của UTSDN có thể tóm tắt như sau:



**Hình 1.13: Sơ đồ về cơ chế gây ung thư sinh dục nữ**

Vai trò của protein E6, E7 của HPV đối với quá trình tự sửa chữa của tế bào đã được mô tả cụ thể tại mục 1.1.3.6 và 1.1.3.7.

### 1.3. Nghiên cứu trong và ngoài nước về HPV và bệnh lý liên quan

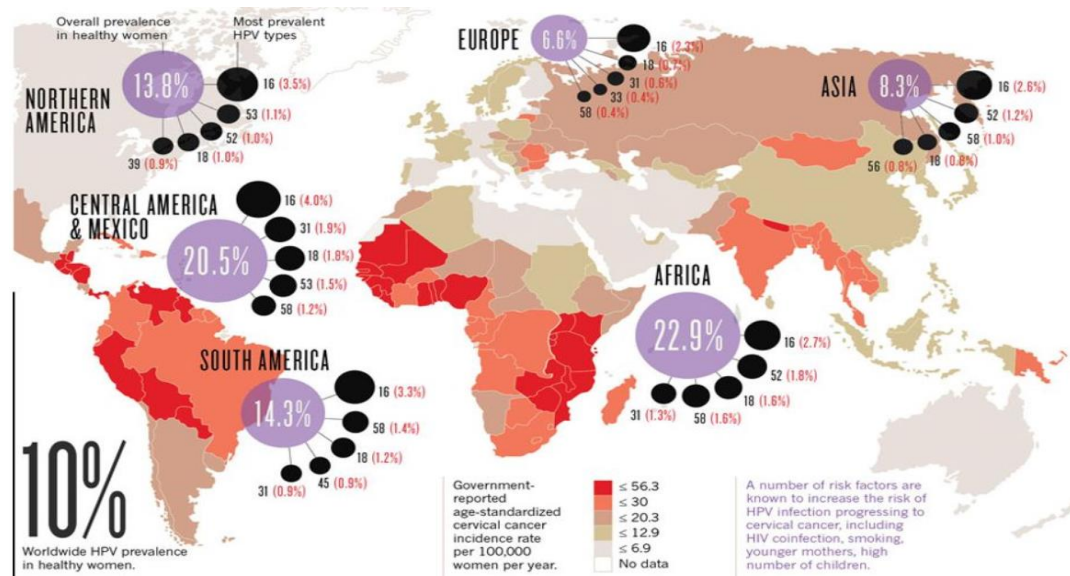
#### 1.3.1. HPV và bệnh lý sinh dục nữ

##### 1.3.1.1. HPV và bệnh lý cổ tử cung trên thế giới

Các nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng tỉ lệ nhiễm HPV khác nhau giữa các vùng địa lý, giữa các độ tuổi và sự phân bố loại HPV cũng khác nhau giữa các đối tượng nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, tác giả lần lượt đề cập tới tình trạng nhiễm HPV ở cộng đồng, đối tượng nguy cơ cao-gái mại dâm và những phụ nữ có kết quả mô bệnh học bất thường.

##### \* *Tình trạng nhiễm HPV cổ tử cung ở cộng đồng*

Theo nghiên cứu của James, khoảng 10% phụ nữ trên toàn thế giới nhiễm HPV, tỉ lệ cao nhất tập trung ở châu Phi-22,9%, thứ đến châu Mỹ, đứng thứ 3 là châu Á, với tỉ lệ trung bình là 8,3% [91].



**Hình 1.14: Tình trạng nhiễm HPV trên thế giới [91]**

Tại Italy, 8,8% phụ nữ trong cộng đồng nhiễm HPV, trong đó, số phụ nữ nhiễm HPV16 cao nhất (32,6%). Nhóm phụ nữ trong độ tuổi hoạt động tình dục có tỉ lệ nhiễm cao nhất, thấp dần từ nhóm tuổi từ 25-29 (14%), tiếp

đến nhóm từ 40-49 tuổi (11,5%) và nhóm phụ nữ trên 50 tuổi có tỉ lệ nhiễm thấp nhất (5%) [92].

Cũng như nghiên cứu của Ronce tại Italya, Sasagawa cũng đưa ra kết luận về tình trạng nhiễm HPV tại cộng đồng phụ nữ Nhật Bản, chủ yếu ở nhóm phụ nữ ở độ tuổi hoạt động tình dục từ và tỉ lệ nhiễm ở nhóm 16-50 tuổi chiếm 25% với các loại HPV phổ biến là: HPV52, HPV16 và HPV58 [93].

Tỉ lệ nhiễm HPV ở phụ nữ Thái Lan có kết quả tế bào học cổ tử cung bình thường là 8,2%, nhưng tỉ lệ nhiễm HPV ở nhóm phụ nữ có mô bệnh học bình thường cũng chỉ là 6,2%. Nhóm phụ nữ từ 20-30 tuổi nhiễm HPV cao nhất 21,3%. Nghiên cứu không chỉ ra chi tiết tình trạng nhiễm các loại HPV ở các đối tượng nghiên cứu [94].

#### ***\*Tình trạng nhiễm HPV ở gái mại dâm***

Từ các công bố về tỉ lệ nhiễm và phân bố genotype của HPV ở gái mại dâm trên thế giới, Soohoo đã chỉ ra tỉ lệ nhiễm HPV trung bình khoảng 42,7%; tỉ lệ nhiễm HPV16 là cao nhất (38,9%), tiếp đến HPV52 (32,7%) [95]

Tại Nhật Bản, tỉ lệ nhiễm HPV ở gái mại dâm là 52,6% (103/196), trong đó, HPV52 chiếm tỉ lệ cao nhất (29,1%) tiếp đến HPV16 (24,3%) và HPV56 (18,4%) [96].

Cũng không khác biệt so với Nhật Bản, tại Philippin, tỉ lệ HPV dương tính ở gái mại dâm là 57,2% (211/369). Trong số gái mại dâm có loạn sản tế bào biểu mô cổ tử cung, HPV52 được xác định là loại phổ biến nhất (23,2%), tiếp theo là HPV16 (19,6%), HPV58 (10,7%) [97].

Tuy nhiên, khi phân tích các sublineage E6, E7 của HPV16 đã được phát hiện ở đối tượng gái mại dâm tại Nhật Bản và Philippin, Ishizaki đã chỉ ra rằng, sublineage Asian phổ biến tại Nhật Bản (80%) nhưng European prototype lại phổ biến ở gái mại dâm Philippin (75%) [98].



Các nghiên cứu trên đã chỉ ra rằng gái mại dâm có tỉ lệ nhiễm HPV cao hơn hẳn so với phụ nữ trong cộng đồng nói chung. Nếu như trên thế giới, tỉ lệ nhiễm HPV16 là phổ biến thì tại 02 quốc gia châu Á, Nhật Bản và Philippin, nhiễm HPV52 là biến nhất.

**\* *Tình trạng nhiễm HPV tại mô UTCTC***

Với các mẫu bệnh phẩm nghiên cứu đa dạng từ phết cổ tử cung, khối đút nén, mẫu mô sinh thiết tươi từ những bệnh nhân đã được chẩn đoán ung thư hoặc tiền UTCTC đã được tác giả thu thập đưa vào nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu từ 175 bệnh nhân ung thư cổ tử cung xâm lấn trong độ tuổi 21-86 tuổi tại Brazil cho thấy, tỉ lệ nhiễm HPV tới 98,8%, đơn nhiễm chiếm 75,3%, trong đó HPV16 là phổ biến nhất, chiếm 77,6% [99].

HPV dương tính tới 91,5% (118/129) tại 129 mẫu sinh thiết mô UTCTC của phụ nữ Ma-rốc, trong đó, tỉ lệ nhiễm HPV16 tương đương 87,3% (103/118), HPV18-5,1% (6/118), HPV31-2,5% (3/118), HPV33-1,7% (2/118) và HPV35-0,9% (1/118). Các sublineage của HPV16 gồm European-58,3% African-31,1%, North American-11,6% [100].

Tại Italy, từ 171 khối nén UTCTC, Tornesello đã xác định được 81,8% (140/171) trường hợp nhiễm HPV, trong đó, tỉ lệ nhiễm HPV16 là 68,6% (96/140), HPV18-10% (14/140), đồng nhiễm HPV16,18-2,9% (4/140), HPV33-5,7% (8/140). Các lineage của HPV16 gồm có European (HPV16 E) chiếm 68,3% (43/63) và None European chiếm 31,7% (20/63). Các sublineage của HPV16 gồm European prototype T350 chiếm 9,5% (6/63), European G350 - 58,7% (37/63), African1-7,9% (5/63), Asian American - 23,9% (15/63) [101].

Tỉ lệ nhiễm HPV tại ung thư xâm nhập (ICC) của phụ nữ Nhật Bản là 93,6% (131/140) với HPV16 chiếm tỉ lệ cao nhất-40,5% (53/131); HPV18 đứng thứ 2-24,4% (32/131); HPV52-8,4% (11/131). Tuy nhiên, nhiễm HPV16

nhiều nhất ở nhóm bệnh nhân từ 40-49 tuổi -45,5%; nhiễm HPV18 và đồng nhiễm HPV16,18 cao nhất ở độ tuổi 20-29 với tỉ lệ 60% và 20% [102].

Từ 416 mẫu bệnh phẩm UTCTC tươi của phụ nữ Thái Lan, Chansaenroj và cộng sự đã công bố 94,7% (394/416) mẫu bệnh phẩm nhiễm HPV, trong đó, đơn nhiễm HPV chiếm tới 70,3%; nhiễm HPV16 chiếm tỉ lệ 35,8% (141/394) các trường hợp, HPV18-16,2%; đứng thứ 3 là nhiễm HPV58-4,6% (18/394) [103].

Từ 40 khối u UTCTC của phụ nữ Thái Lan, Chopijtt và cộng sự đã xác định được 100% (40/40) mẫu bệnh phẩm ung thư tế bào vảy nhiễm HPV, trong đó, nhiễm HPV16 chiếm 75% (30/40). Asian sublineage và European sublineage chiếm tỉ lệ lần lượt 58,7% và 41,3% [104].

Kết quả nghiên cứu từ các nước trên thế giới đều chỉ ra rằng, tỉ lệ nhiễm HPV tại cộng đồng không cao, thường dưới 20%, nhưng tăng lên đáng kể (50-60%) ở nhóm gái mại dâm và tăng rất cao (>80%) ở nhóm phụ nữ có UTCTC. Mặt khác, mặc dù HPV52 và 16 đều là những chủng thuộc nhóm nguy cơ cao nhưng phân bố khác nhau giữa các đối tượng. Mặc dù HPV52 phổ biến ở nhóm gái mại dâm nhưng HPV16 lại chiếm tỉ lệ cao nhất ở nhóm ung thư. Liệu tình trạng nhiễm và phân bố chủng HPV tại Việt Nam có khác biệt gì so với thế giới?

**\* *Tình trạng nhiễm HPV cổ tử cung của Việt Nam***

Nghiên cứu tại cộng đồng phụ nữ Việt Nam đã kết hôn tại 5 thành phố lớn cho thấy, tỉ lệ nhiễm HPV dao động từ 6,1-10,2%; tỉ lệ nhiễm HPV16 hoặc/và HPV18 dao động từ 3,1-7,4%. Dường như các vùng địa lý với những đặc điểm về lối sống đã tạo nên sự khác biệt về tỉ lệ nhiễm HPV nhưng đều cho thấy tỉ lệ nhiễm HPV trong cộng đồng người Việt Nam cũng như trên thế giới dưới 20% và nhiễm HPV16 là phổ biến [105].

Kết quả nghiên cứu trên 406 gái mại dâm, từ độ tuổi 16-47 tuổi tại Sóc Trăng cho thấy, tỉ lệ nhiễm HPV chiếm 85%, HPV52-11,4% (50/438); trong khi tỉ lệ nhiễm HPV16 chỉ là 6,6%; tiếp đến HPV58 và 62 đều chỉ dừng ở 4,3%; HPV18-3,9% [106]. Tại khu vực miền Bắc Việt Nam, 49,5% (139/281) gái mại dâm nhiễm HPV, đặc biệt phơi nhiễm với HPV52 là phổ biến, chiếm 28,1% (39/139); HPV16-18,7% (26/139); tỉ lệ nhiễm HPV18, HPV51, HPV58 đều chiếm 16,5% (23/139) [11]. Sublineage Asian chiếm tới 95,8% (23/24) các biến thể HPV16; không phát hiện sublineage European prototype tại gái mại dâm [98].

Sử dụng các cặp môi đặc hiệu HPV6, 11, 16, 18 nhằm phát hiện HPV tại khối nền UTCTC, Nguyễn Phi Hùng đã chỉ ra tỉ lệ HPV dương tính tới 84,4%; nhiễm HPV16 là 41,8%; HPV18-16,5%. Toàn bộ nhóm đối tượng nghiên cứu dưới 30 tuổi và trên 50 tuổi đều nhiễm HPV. Nhiễm HPV16 cao nhất ở độ tuổi 60-69 (66,7%) nhưng nhiễm HPV18 chiếm tỉ lệ cao nhất ở nhóm 50-59 tuổi (28%) [11].

Như vậy, cũng như kết quả của các nghiên cứu trên thế giới, tỉ lệ nhiễm HPV tăng dần từ trong cộng đồng tới đối tượng nguy cơ cao - gái mại dâm tới những bệnh nhân UTCTC, dù cho mẫu bệnh phẩm là khối nền đúc hay mẫu sinh thiết tươi. Nếu như HPV52 phổ biến ở đối tượng gái mại dâm thì HPV16 lại phổ biến tại bệnh nhân UTCTC. Cùng thuộc nhóm nguy cơ cao, nhưng có lẽ HPV52 đã bị loại bỏ khỏi cơ thể bởi hệ thống miễn dịch nên tỉ lệ HPV52 rất thấp so với HPV 16 ở bệnh nhân ung thư và HPV52 ít ác tính hơn HPV16.

#### *1.3.1.2. HPV và bệnh lý âm hộ trên thế giới*

Nghiên cứu tại Israel cho thấy, tỉ lệ nhiễm HPV tại tổn thương VIN3 (82,3% -14/17) cao hơn so với tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTAH sinh thiết (60% - 6/10). Tuy nhiên, tại mô UTAH dương tính HPV, tỉ lệ nhiễm HPV16 vẫn

chiếm tỉ lệ cao nhất, tới 66,6% (4/6), nhiễm HPV54 và HPV82 đều chiếm 16,7% (1/6), [107].

Tại Đức, tỉ lệ nhiễm HPV tại tổn thương VIN2,3 là 92,3% (169/183) cao hơn tại UTAH-60,4% (29/48). Sự sắp xếp phân bố genotype ở cả mô UTAH và VIN2,3 đều như nhau, cao nhất là HPV16, tiếp theo lần lượt HPV33, HPV31 và HPV18. Trong số bệnh nhân UTAH nhiễm HPV, tỉ lệ nhiễm HPV16 chiếm 66,5% (19/29), HPV3-13,8% (4/29), HPV31-6,9% (2/29) và HPV18-3,5% (1/29) [108].

Theo kết quả nghiên cứu từ Hà Lan của van de Nieuwenhof, tỉ lệ HPV dương tính tại 130 mẫu UTAH là 34,6% (45/130), trong đó, có tới 44,4% (20/45) bệnh nhân nhiễm HPV16, nhiễm HPV33 chiếm tới 15,6% (7/45) trong khi đó, HPV18 chỉ chiếm 6,7% (2/45) [109].

Tại Thái Lan, tỉ lệ HPV dương tính được tách ra từ khối nền UTAH chiếm tới 61,7% (29/47), trong đó nhiễm HPV16 chiếm 79,3% (23/29), HPV89- 6,9% (2/29) HPV58-3,4% (1/29) [110]

Các nghiên cứu về tỉ lệ nhiễm HPV tại bệnh lý âm hộ đều chỉ ra rằng tỉ lệ nhiễm HPV ở tổn thương tiền ung thư cao hơn tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTAH Tuy nhiên, HPV16 vẫn là phổ biến nhất; HPV18 không phải là loại phổ biến thứ 2 tại mô UTAH.

### *1.3.1.3 HPV và bệnh lý âm đạo trên thế giới*

Công bố từ Israel cho thấy, tỉ lệ nhiễm HPV tổn thương VAIN3 (92,3%) cao hơn so với tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTAD (4/6-66,6%). Tại mô UTAD, tỉ lệ nhiễm HPV16, HPV33, HPV82 đều chiếm tỉ lệ như nhau 25% (1/4) [107].

Tại Đức, tỉ lệ HPV dương tính tại khối đứcc nền tổn thương VAIN2, 3 lên tới 90,9%, trong đó nhiễm HPV16 chiếm 70% (7/10) nhưng không nhiễm HPV18, 33, 35 [108].

Theo nghiên cứu của Larsson, 53,6% (37/69 trường hợp) mô UTAD của phụ nữ Thụy Điển nhiễm HPV; trong đó, HPV16 chiếm tỉ lệ cao nhất 70,3% (26/37), tiếp theo là HPV18, HPV31, HPV33, HPV52 đều chiếm 5,4% (2/37) [111].

Tại Mỹ, 75% (45/60) mô UTAD nhiễm HPV, trong đó, nhiễm HPV16 chiếm 73,3% (33/45), HPV33-24,5% (11/45) và HPV18-2,2% (1/45) [112].

Cũng như UTAH, tỉ lệ mắc UTAD tại các nước trên thế giới rất thấp, chính vì vậy, các công bố về UTAH, UTAD cũng ít hơn UTCTC. Tuy nhiên, các nghiên cứu đều chỉ ra rằng tỉ lệ nhiễm HPV tại mô tiền ung thư cao hơn tại mô UTAD. Nhiễm HPV16 phổ biến nhất tại mô UTAD, đứng thứ 2 là HPV33. Nhiễm HPV18 và HPV52 không phải là loại phổ biến tại mô UTAH, UTAD.

### ***1.3.2. Liên quan giữa genotype của HPV và loại tế bào ung thư***

#### ***1.3.2.1. Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư UTCTC***

Tonesselo đã chỉ ra rằng, trong nghiên cứu của ông chỉ có 2 loại loại tế bào ung thư theo phân loại của WHO: ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến. Phần lớn (77,2%-132/171) UTCTC loại ung thư tế bào vảy, còn lại là ung thư tế bào tuyến. Số bệnh nhân nhiễm HPV ở loại ung thư tế bào vảy lên tới 85% (112/132) và nhóm ung thư tế bào tuyến cũng có tới 72% (28/39) số ca nhiễm HPV. Tại ung thư tế bào vảy, tỉ lệ nhiễm HPV16 cao hơn HPV18 (71% và 57%) nhưng tại mô ung thư tế bào tuyến, nhiễm HPV18 lại phổ biến hơn HPV16 (18% và 8%) [101].

Tại Thái Lan toàn bộ bệnh nhân UTCTC đều có ung thư tế bào vảy và tỉ lệ nhiễm HPV tại tế bào này là 100%, trong đó, nhiễm HPV16 chiếm tới 75% [104].

Trong nghiên cứu của Nguyễn Phi Hùng, 42 bệnh nhân UTCTC có xuất hiện các loại tế bào ung thư với tỉ lệ giảm dần là ung thư tế bào vảy, ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào hỗn hợp tuyến vảy. Nhiễm HPV16 và

HPV18 có sự khác biệt ở 3 loại tổn thương trên. Nhiễm HPV16 cao nhất tại ung thư tế bào vảy (47,6%), tiếp đến HPV18 nhưng nhiễm HPV18 tại ung thư tế bào tuyến cao hơn HPV16 (11,9% và 7,1%); mô ung thư tế bào hỗn hợp tuyến vảy chỉ nhiễm HPV18 với tỉ lệ 7,1%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,008$  [11].

Như vậy, mặc dù điều nghiên cứu từ các khối nền đúc nhưng các nghiên cứu có sự khác nhau về loại loại tế bào ung thư, tuy nhiên, loại ung thư tế bào vảy vẫn chiếm tỉ lệ cao nhất. Tỉ lệ nhiễm HPV và HPV16 tại ung thư tế bào vảy luôn chiếm ưu thế hơn so với ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào hỗn hợp tuyến vảy.

#### *1.3.2.2. Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư UTAH, UTAD*

Công bố về các loại tế bào UTAH, các nghiên cứu chỉ ra rằng ung thư tế bào vảy là loại tổn thương phổ biến. Có tới 88,2% (60/68) mô UTAH tại Mỹ và 59,3% (35/59) tại Israel thuộc loại ung thư tế bào vảy. Ung thư tế bào đáy chỉ chiếm 11,9% mô UTAH tại Israel; 3,0% tại Mỹ [107],[113]. Paget's âm hộ chiếm tới 13,5% (8/59) UTAH tại Israel; 8,8% tại Mỹ [107],[113]. Ung thư tế bào hắc tố và ung thư tế bào đáy không liên quan tới nhiễm HPV [114]

Theo công bố từ Ottawa, Canada, 02 loại loại tế bào học thường gặp tại mô UTAD là ung thư tế bào vảy (83,3%-10/12) và ung thư tế bào tuyến (16,7% - 2/12) [115]. Tại Mỹ, UTAD loại tế bào ung thư tế bào vảy chiếm 86% (49/57); ung thư tế bào tuyến chiếm 14% (8/57). Mặc dù nhiễm HPV16,18 được xác định tới 63,3% (37/49) tại mô UTAD loại ung thư tế bào vảy nhưng chỉ có 25% (2/8) tại ung thư tế bào tuyến nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ( $p=0.08$ ) [112]. Liên quan giữa diethylstilbestrol và ung thư tế bào trong âm đạo vẫn còn đang là vấn đề tranh cãi.

Các nghiên cứu trên thế giới về loại tế bào tại mô UTAH và UTAD đều chỉ ra rằng ung thư tế bào vảy là loại tổn thương phổ biến nhất từ 59-88%,

ung thư tế bào tuyến là loại tế bào thường gặp thứ 2 ở UTAD nhưng ung thư tế bào đáy lại đứng thứ 2 tại mô UTAH nhưng với tỉ lệ rất thấp, dưới 20% cho cả 2 loại ung thư. HPV16 được xác định ở ung thư tế bào vảy của cả UTAH và UTAD với tỉ lệ cao nhất nhưng HPV18 xuất hiện với tỉ lệ thấp, thậm chí không xác định được. Sự khác biệt về tình trạng nhiễm HPV16,18 với các loại tế bào UTAH, UTAD không có ý nghĩa thống kê.

Các nghiên cứu về HPV xác định từ các khối đứn nên UTCTC khá phổ biến ở các châu lục và các nước trên thế giới. Tuy nhiên, nghiên cứu về UTAH, UTAD rất ít và cỡ mẫu rất thấp. Chưa có nghiên cứu nào nghiên cứu genotype của HPV đồng thời cả UTCTC, UTAH, UTAD. Cho tới thời điểm hiện tại, chưa có công bố chính thức về phân bố genotype của HPV, lineage của HPV16 ở bệnh nhân UTCTC, UTAH, UTAD và liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư ở UTSDN. Chính vì vậy, chúng tôi cần nghiên cứu tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC, UTAH, UTAD sinh thiết tươi để nhằm mang đến giá trị xác thực nhất về genotype của HPV và lineage của HPV16 cũng như liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư UTSDN làm cơ sở dữ liệu cho hoạch định chiến lược vắc-xin phòng nhiễm và điều trị nhiễm HPV tại Việt Nam.

## **1.4. Các kỹ thuật phát hiện HPV và xét nghiệm mô bệnh học**

### ***1.4.1. Kỹ thuật phát hiện HPV***

#### ***1.4.1.1 Kỹ thuật tách chiết DNA của HPV từ mô ung thư***

DNA của HPV được tách chiết từ mẫu mô tươi hoặc khối đứn. Tuy nhiên, từ năm 1991, Greer và cộng sự đã công bố kích thước của sản phẩm DNA tách từ khối đứn được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR giảm dần theo thời gian bảo quản [116]. Mặc dù không có sự khác biệt nhưng tỉ lệ nhiễm HPV ở mẫu mô UTCTC tươi cao hơn tại khối đứn [117]. Việc sử dụng mẫu mô ung

thư tươi đảm bảo tính nguyên vẹn DNA của HPV trong các kỹ thuật khuếch đại gen L1 và E6, E7, tính chính xác của kết quả nghiên cứu.

Kit tách chiết DNA của Sigma-Aldrich với enzym thủy phân Proteinase K có tác dụng thủy phân các protein mô tươi thành các acid amin. Dưới tác dụng của alcol ethylic, DNA được rửa. Các bước rửa khối rửa nhằm thu hồi tối đa DNA HPV từ mẫu bệnh phẩm ung thư. Chi tiết qui trình tách DNA được mô tả trong phụ lục số 1.

Sản phẩm DNA sau tách chiết được đo độ tinh sạch tại bước sóng 260 và 280 nm. Các DNA có độ hấp thụ quang học tối đa ở bước sóng 260nm, sự hấp thụ tối đa của protein ở bước sóng 280nm là cơ sở để sử dụng chỉ số OD 260/280 như một tiêu chí đánh giá độ tinh sạch của DNA từ mô tách chiết.

#### *1.4.1.2 Khuếch đại gen của HPV*

##### **\* Khuếch đại gen của HPV bằng phản ứng PCR**

Phản ứng khuếch đại PCR nhằm khuếch đại đoạn gen đích lên nhiều lần so với số bản DNA ban đầu bằng các cặp mồi xuôi và ngược đặc hiệu. Phản ứng PCR trong nghiên cứu HPV được sử dụng để khuếch đại gen L1 phát hiện nhiễm HPV hoặc khuếch đại với nucleotide đã được biotin hóa nhằm phục vụ kỹ thuật lai trên màng. Phản ứng PCR với các dideoxynucleotid và cặp mồi tương ứng nhằm phục vụ kỹ thuật giải trình tự gen L1 hoặc trình tự gen E6, E7.

Gen L1 tương đối bền vững và ổn định nên L1 là căn cứ để xác định nhiễm HPV và xác định genotype của HPV. Các cặp mồi phát hiện gen L1 có khả năng phát hiện nhiều loại HPV như: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, và 74. Cặp mồi GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> khuếch đại đoạn gen L1 kích thước 150 bp có độ nhạy cao hơn cặp mồi MY09/MY11 (khuếch đại đoạn gen L1 kích thước 450 bp) [118].



Cặp mồi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> được thiết kế trên cơ sở cặp mồi gốc GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> khuếch đại đoạn gen L1 140bp của HPV có thay thế 1 nucleotid và tăng kích thước lên 10 bp với cặp mồi gốc đã tăng khả năng phát hiện HPV từ 0,7 lên 17,2%. Các loại HPV nguy cơ cao được cặp mồi bổ sung phát hiện với số bản copy nhiều hơn cặp mồi gốc GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> [119].

Cặp mồi gốc GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> và cặp mồi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> đã được Hoang và cộng sự khuếch đại thành công đoạn gen L1 kích thước 140 bp của HPV [10]. Đó là cơ sở khoa học cho việc sử dụng cặp mồi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> trong nghiên cứu nhằm tối ưu hóa khả năng phát hiện HPV tại mô UTSDN.

Phản ứng khuếch đại gen E6, E7 cũng đã được Ishizaki và cộng sự tối ưu hóa và khuếch đại thành công [198]

#### **\* Khuếch đại gen của HPV phản ứng real-time PCR**

Real-time PCR cho phép khuếch đại và xác định số lượng bản sao được tạo ra trong từng chu kỳ nhiệt. Kết quả DNA đích được hiển thị ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt dựa trên sự tỷ lệ thuận giữa tín hiệu huỳnh quang phát ra và số lượng bản sao DNA được tổng hợp.

Chất phát huỳnh quang chèn vào sợi đôi DNA làm bản sao DNA đích được tạo ra phát huỳnh quang khi có nguồn sáng kích thích. Chất phát quang thường được sử dụng là SYBR Green 1 hoặc các mẫu dò đặc hiệu (Taqman probe, Beacon probe, Hybridization probe...).

Phương pháp real-time PCR có thể thực hiện nhanh, giá thành không đắt, định lượng được sản phẩm DNA và RNA. Phương pháp này có thể phát hiện được 10.000 chuỗi gen sao chép/phản ứng.

#### *1.4.1.3 Phát hiện genotype của HPV*

#### **\* Kỹ thuật lai trên màng (hybridization dot blot)**

Kỹ thuật lai trên màng genoarrays phát hiện 21 loại HPV bao gồm 15 HPV nguy cơ cao (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66,

68) và 6 HPV nguy cơ thấp (6, 11, 42, 43, 44, CP8304 (81)). Kỹ thuật lai trên màng được tiến hành dựa trên nguyên lý: trên mỗi vòng tròn của màng lai có một sợi đơn DNA mẫu được cố định sẵn trên màng lai. DNA của HPV tách từ bệnh phẩm, sau khuếch đại gắn biotin, lai với DNA mẫu cố định sẵn trên màng lai hình thành chuỗi đôi DNA-biotin. Chuỗi đôi DNA-biotin mà trực tiếp là biotin tiếp tục liên kết với streptavidin-alkalinphosphat trong dung dịch enzym hình thành phức hợp enzyme miễn dịch cố định trên màng, sẽ thủy phân phức NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium, bromo-chloro-indolyl phosphate) hình thành hỗn hợp màu tím trên màng lai. Mỗi vòng tròn màu tím tương ứng với kết quả dương tính với 1 loại HPV theo qui ước của nhà sản xuất.

**\* Kỹ thuật giải trình tự trực tiếp sau lai tách dòng**

Kỹ thuật lai tách dòng sử dụng vector TOPO (có sẵn đầu tù, cho chỉ thị trắng/xanh) và enzyme lai nhằm kỳ vọng mỗi sợi đơn PCR DNA được lai với một vector và được nhân lên thành những dòng tế bào riêng biệt trong *E. coli*. Kỹ thuật tách dòng rất tốn kém thời gian và nhân lực nhưng cho kết quả trình tự DNA riêng biệt trong trường hợp đồng nhiễm mà kỹ thuật giải trình tự trực tiếp không thể có được.

Giải trình tự gen bằng phương pháp hoá học được phát minh những năm 1977 bởi Maxam và Gibert; cùng thời gian đó, Sanger đã phát minh phương pháp enzym giải trình tự DNA. Sản phẩm PCR được khuếch đại với nguyên liệu là các ddNTPs có gắn chất huỳnh quang được điện di trên mao quản chứa polyacrylamide. Sự phát sáng chất huỳnh quang dưới ánh sáng la-de được ghi nhận bởi bộ phận cảm quang dưới dạng các biểu đồ tương ứng các màu (A: đỏ, T: xanh da trời, G: cam, C: xanh lá cây).

### ***1.4.2 Xét nghiệm mô bệnh học***

Xét nghiệm mô bệnh học là xét nghiệm chẩn đoán xác định loại tổn thương. Các mô sau khi đúc nên được cắt lạnh, nhuộm HE và quan sát dưới kính hiển vi vật kính 100. Các loại tế bào ung thư sinh dục gồm ung thư biểu mô và ung thư tế bào khác. Ung thư biểu mô mà điển hình là ung thư tế bào vảy được định nghĩa là sự xâm nhập các tế bào vảy với độ biệt hóa đa dạng. Ung thư tế bào vảy có thể sừng hóa (keratinizing) hoặc không sừng hóa (non-keratinizing), màng đáy hóa (basaloid)... Ung thư tế bào vảy sừng hóa có các đảo sừng mà trung tâm là sừng được bao quanh bởi các vòng xoắn tế bào vảy. Vùng gian bào có các hạt sừng trong suốt và khu vực bào tương cũng sừng hóa. Nhân tế bào to hơn và chất nhiễm sắc tăng bất màu. Tế bào kém biệt hóa thường ở vùng ngoại vi của khối thâm nhiễm. Loại ung thư tế bào vảy không sừng hóa, các tế bào sừng hình đa giác có thể có rải rác tế bào sừng hóa và cầu sừng nội bào nhưng không có đảo sừng. Tế bào đơn độc hoặc tụ thành hợp bào, nhân không đồng đều. Nhân và tế bào có hiện tượng đa hình, nhân to nhưng chưa có nhân chia hạt nhiễm sắc không mịn [69].

Ung thư tế bào tuyến là loại ung thư biểu hiện sự biệt hóa của tuyến. Nhuộm hóa mô miễn dịch không những phân biệt được tổn thương lành hay ác tính mà còn căn cứ vào đó để phân nhóm phụ ung thư tế bào tuyến cũng phát hiện tuyến cổ trong hay tuyến niêm mạc tử cung. Khối u dương tính với receptor estrogen, vimentin, âm tính với kháng nguyên ung thư phôi (carcinoembryonic) thường có nguồn gốc từ cổ trong. Ung thư tế bào tuyến niêm mạc tử cung thường âm tính với receptor estrogen, vimentin nhưng dương tính với kháng nguyên ung thư phôi. Các tế bào tuyến vẫn đứng thành hàng ổn định, nội bào giàu chất nhầy, nhân bất màu kiềm [69].

Chi tiết về phân loại tế bào ung thư đã được mô tả ở mục 1.2.1.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 214 bệnh nhân UTCTC, UTAH, UTAD chẩn đoán tại Khoa Khám bệnh, Bệnh viện K Trung ương; Khoa Ngoại 1, Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh; Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Phụ sản Trung ương từ tháng 6 năm 2013 đến tháng 10 năm 2018.

##### 2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Các bệnh nhân mắc UTCTC, UTAH, UTAD nguyên phát.
- Bệnh nhân có thể mắc 01, 02 hoặc cả 03 trong số 03 ung thư: UTCTC, UTAH, UTAD.
- Bệnh nhân chưa được điều trị bằng hóa chất hoặc tia xạ.
- Các bệnh nhân được chẩn đoán ung thư bằng kết quả xét nghiệm mô bệnh học.
- Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu

##### 2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân mắc UTCT, UTAH, UTAD thứ phát
- Bệnh nhân mắc UTCT, UTAH, UTAD nguyên phát nhưng đang điều trị tia xạ hoặc hóa chất
- Không đồng ý tham gia nghiên cứu

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

##### 2.2.2. Cỡ mẫu

214 bệnh nhân được chọn trên cơ sở lấy mẫu thuận tiện. Các mẫu nghiên cứu sẽ được thu thập liên tục cho đến khi kết thúc nghiên cứu.

### **2.2.3. Các chỉ số nghiên cứu**

- Thông tin tuổi
- Xét nghiệm mô bệnh học từ bệnh phẩm sinh thiết hoặc phẫu thuật loại bỏ. Kết quả mô bệnh học là tiêu chuẩn vàng trong lựa chọn bệnh nhân, do đó, kết quả phải được đọc bởi các bác sỹ chuyên khoa Giải phẫu bệnh của các Bệnh viện nơi thu thập mẫu nghiên cứu.

- Kết quả về gen của HPV:

- Tỷ lệ nhiễm HPV
- Kết quả genotype của HPV bằng kỹ thuật genoarrays
- Kết quả lineage, sublineage E6, E7 của HPV16

### **2.2.4. Trang thiết bị, hóa chất**

#### **2.2.4.1 Trang thiết bị**

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

- Máy hấp vô trùng dụng cụ.
- Máy PCR Thermal cyclers, Biocompare
- Máy Hybri Max (Đức)
- Máy giải trình tự gen 310 Genetic Analyser
- Tủ lạnh sâu (-30°C, -80°C), tủ ấm.
- Lò vi sóng (Toshiba).
- Máy ly tâm để bàn Eppendorf (Đức), máy ly tâm lạnh Beckman (USA).
- Hệ thống điện di ngang Mupid (Nhật Bản).
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động: Chemidoc EQ-Bio-Rad (USA).
- Máy đo nồng độ DNA Nano Drop 1000 (Mỹ).
- Tủ ấm.
- Buồng hút.
- Pipette, pipette tip, polypropylene tube (0,1 µL - 1000 µL).

- Ống PCR, ống eppendorf 1,5ml, ống Falcon, găng tay, giấy thấm đã được vô trùng tuyệt đối.

#### 2.2.4.2. Hóa chất

- **Tách chiết DNA từ mô tươi:** Sigma-Aldrich

- **Kỹ thuật PCR:** dung dịch đệm, cặp mồi đặc hiệu, NTPs, Ampli *Taq* Gold (DNA polymerase),  $Mg^{2+}$ , nước cất 2 lần vô trùng.

- **Điện di sản phẩm PCR:** gel agarose, dung dịch TBE (boric acid EDTA), ethidium bromide, loading dye, thang DNA chuẩn 100 cặp base nito (marker 100 cặp base nito)

- **Kỹ thuật lai trên màng genoarrays:** Hydri-bio (Hongkong) gồm NTPs biotin hóa, DNA *Taq* polymerase,  $Mg^{++}$ , nước cất 2 lần; Hybridization Solution, Blocking Solution, NBT/BCIP

- **Kỹ thuật giải trình tự gen:** BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*) gồm *BigDye Terminator v3.0* (*dATP*, *dCTP*, *dGTP* và *dUTP*), *BigDye buffer*, cặp mồi đặc hiệu, dung dịch *formamide*.

#### 2.2.5. Quy trình nghiên cứu

2.2.5.1. Lựa chọn đối tượng nghiên cứu, lấy chấp thuận nghiên cứu, thu thập mẫu nghiên cứu

##### \* Lựa chọn bệnh nhân

Những bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng UTCTC, UTAH, UTAD nguyên phát bởi các bác sĩ chuyên khoa sản phụ khoa có chỉ định sinh thiết hoặc phẫu thuật toàn bộ khối u phục vụ chẩn đoán xác định ung thư hoặc phục vụ điều trị bệnh sẽ được lựa chọn tham gia vào nghiên cứu.

##### \* Lấy chấp thuận tham gia nghiên cứu

Cung cấp thông tin về nghiên cứu cho đối tượng nghiên cứu (giới thiệu về đề tài nghiên cứu, mục đích của nghiên cứu, giới thiệu về người nghiên

cứ, qui trình thực hiện nghiên cứu, những rủi ro có thể xảy ra, lợi ích của người tham gia nghiên cứu, đảm bảo tính bí mật của người nghiên cứu, nghĩa vụ của người tham gia nghiên cứu, sự tình nguyện tham gia hoặc rút ra khỏi nghiên cứu).

Lấy chấp thuận nghiên cứu.

**\* Thu thập mẫu nghiên cứu:**

01 mẫu bệnh phẩm ung thư tươi có kích thước 2x3mm được quản lạnh ở trong bình ni tơ lỏng cho đến khi được xét nghiệm tách HPV DNA. 01 mẫu bệnh phẩm tương ứng được cho vào dung dịch formol và bảo quản tại nhiệt độ 3-5°C trong thời gian 48-72 giờ để đợi đúc khuôn parafin để giải phẫu bệnh.

Những mẫu bệnh phẩm đã bảo quản trong ni tơ lỏng có kết quả mô bệnh học ung thư được lựa chọn phân tích gen của HPV. Mẫu bệnh phẩm loại trừ sẽ được xử lý như đối với chất thải công nghiệp gây nhiễm. Cụ thể các bệnh phẩm đó sẽ được hấp ứot tại nhiệt độ 121°C, áp suất 2 at, thời gian 20 phút để đảm bảo không còn khả năng gây nhiễm.

197 mẫu bệnh phẩm UTCTC, UTAH, UTAD thu thập từ Bệnh viện K Trung ương được phân tích gen tại Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản theo khuôn khổ đề tài hợp tác nghiên cứu cấp Nhà nước của Trường Đại học Y Dược Hải Phòng và Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản.

17 mẫu UTAH thu thập từ Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh được phân tích gen tại Trung tâm Nghiên cứu Gen và Protein của Trường Đại học Y Hà Nội khi nghiên cứu vẫn tiếp tục sau khi đề tài cấp Nhà nước đã kết thúc.

*2.2.5.2. Xét nghiệm mô bệnh học*

Mô ung thư sau khi đúc khuôn được cắt lát và nghiên cứu về đặc điểm mô, tế bào tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện K Trung ương, Bệnh viện Phụ sản Trung ương, và Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh.

### 2.2.5.3. Các kỹ thuật phân tích gen HPV

Các phương pháp thao tác với DNA chủ yếu thực hiện theo Sambrook và cộng sự (2007), một số phương pháp tiến hành theo các kit và hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### 2.2.5.3.1 Tách chiết DNA

Kỹ thuật tách chiết DNA của HPV bằng hoá chất của hãng Sigma-Aldrich (Đức) và tuân thủ theo qui trình của nhà sản xuất. Chi tiết được mô tả ở phụ lục số 2.

#### 2.2.5.3.2 Kiểm tra độ tinh sạch của DNA sau tách chiết

DNA được kiểm tra độ tinh sạch bằng đo tỉ lệ mật độ quang DNA ở 2 bước sóng 260 và 280 nm, giá trị cho phép từ 1,62-1,96. Sản phẩm DNA được bảo quản nhiệt độ (-20°C) đến (-30°C) để phục vụ cho kỹ thuật xác định genotype HPV.

#### 2.2.5.3.3 Xác định nhiễm HPV

##### \* Khuếch đại gen L1 của HPV

Khuếch đại đoạn gen L1 của HPV dài 140 bp bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> original, GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> modified và chu trình nhiệt đã được chuẩn hóa. Trình tự các cặp mồi được mô tả như bảng 2.1.

**Bảng 2.1: Trình tự nucleotid của các cặp mồi GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup>**

Tên mồi	Loại mồi	Trình tự	Kích thước (bp)
GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup>	GP5 <sup>+</sup>	5'-tttggtactgtgtagatactac-3'	23
original	GP6 <sup>+</sup>	3'-cttatactaaatgtacaaataaaaag-5'	25
GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup>	GP5 <sup>+</sup> M1	5'-tttRactgttgtWgatactac-3'	21
modified	GP5 <sup>+</sup> M2	5'-tgtWactgttgtWgataccac-3'	21



GP5 <sup>+</sup> M3	5'-gtWactgttRgacaccac-3'	20
GP6 <sup>+</sup> M1	3'-cttatactWaatgtcaaataWaaagtaa-5'	29
GP6 <sup>+</sup> M2	3'-cttaWactaaatgtYaaatacaaag-5'	25
GP6 <sup>+</sup> M3	3'-ctcaWactaaacgtYaaataaaaag-5'	25

(GP5<sup>+</sup>: môi xuôi'; GP6<sup>+</sup>: môi ngược; R: C hoặc T; W: A hoặc T; Y A hoặc G)

Quy trình khuếch đại gen L1 gồm các giai đoạn sau:

**+ Giai đoạn 1: Chuẩn bị master mix cho phản ứng PCR**

- Chuẩn bị effendorf 0,2ml đã đánh dấu sẵn thứ tự các mẫu
- Chuẩn bị hóa chất để thực hiện phản ứng
- Làm tan hoàn toàn hóa chất, trộn đều sau đó ly tâm nhẹ để toàn bộ dịch trên nắp ống rơi xuống
- Tiến hành pha hỗn hợp phản ứng theo bảng sau:

**Bảng 2.2: Thành phần phản ứng khuếch đại gen L1 của HPV bằng cặp môi GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> original và GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> modified**

Thành phần	Thể tích phản ứng (μL)	
	Môi GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup> original	Môi GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup> modified
Đệm 10X	3,0	3,0
NTPs 2mM	3,0	3,0
MgCl <sub>2</sub> 25mM	4,2	4,2
Môi	0,375	0,3
Ampli Taq Gold 5U/μL	0,3	0,3
Nước cất	16,125	16,2
DNA khuôn	3,0	3,0
Tổng	30	30

### + Giai đoạn 2: Chạy PCR

- Sau khi chuẩn bị hỗn hợp cho phản ứng, ly tâm nhanh các ống PCR để toàn bộ dịch dính trên thành và nắp ống xuống dưới và làm tan bọt.
- Xếp các ống master mix vào máy PCR
- Chọn chương trình nhiệt đã được cài đặt sẵn trong máy theo chu trình đã được tối ưu hóa.

**Bảng 2.3: Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen L1 của HPV với cặp mồi GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> original**

Chu trình	Giai đoạn		
	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	94°C-10 phút		
2-46 (mồi GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup> original)	94°C-45 giây	48°C-4 giây 38°C-30 giây 42°C-5 giây 66°C-5 giây	71°C-90 giây
2-46 (mồi GP5 <sup>+</sup> /6 <sup>+</sup> modified)	95°C-30 giây	45°C-30 giây	74°C-30 giây
Bảo quản ở 4°C			

- Ấn nút start để khuếch đại gen L1
- Sau khi chạy xong chương trình đưa máy về chế độ nghỉ và tắt máy
- Lấy mẫu ra khỏi máy PCR, bảo quản ở 4°C cho tới khi sử dụng.

\* **Điện di xác định sản phẩm gen L1 sau khuếch đại:** chi tiết được mô tả tại phụ lục số 3

\* **Giải trình tự xác định sản phẩm sau khuếch đại**

Những mẫu bệnh phẩm có kết quả điện di với băng rõ nét tương ứng với kích thước 140 bp được giải trình tự trực tiếp để kiểm tra xác định gen L1 của HPV.

Giải trình tự xác định sản phẩm sau khuếch đại được thực hiện theo qui trình và sử dụng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

Thể tích phản ứng khuếch đại được pha theo bảng 2.4

**Bảng 2.4: Thành phần và thể tích phản ứng khuếch đại gen L1 Bigdye**

Thành phần	Thể tích (µl)
Big Dye terminator V3.1 (2,5X)	1,0
Big Dye buffer 5X	3,5
Mồi (5pmol/µl)	1,5
Nước cất	12,0
Sản phẩm sau PCR đã được tinh sạch	2,0
<b>Tổng</b>	<b>20</b>

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR Bigdye được tiến hành như sau

**Bảng 2.5: Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen L1 với Bigdye**

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	96°C - 5 phút		
2-26	96°C - 10 giây	50°C - 5 giây	60°C - 4 phút
Bảo quản ở 4°C tránh ánh sáng			

- Các sản phẩm sau khi được khuếch đại bằng Big dye kit sẽ được tinh sạch bằng big Dye temination để loại bỏ toàn bộ big dye thừa và đem đọc trên máy giải trình tự gen ABI (Applied Biosystem)

- Các nucleotid trên gen sẽ được biểu hiện bằng các đỉnh (peak) với 4 màu tương đương với 4 loại nucleotid A,T,G,C.

Sản phẩm thu hồi được sau khi giải trình tự được so sánh với gen L1 của HPV sẵn có trên GenBank.

#### 2.2.5.3.4 Kỹ thuật xác định genotype HPV

##### \* Kỹ thuật lai trên màng genoarrays xác định genotype của HPV

Hoá chất genoarrays test kit của hãng Hydri-bio, Hongkong phát hiện được 21 loại HPV, bao gồm 15 loại nguy cơ cao (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68) và 6 loại nguy cơ thấp (6, 11, 42, 43, 44, CP8304 (81)).

##### - Các giai đoạn của kỹ thuật genoarrays

##### + Giai đoạn 1: Khuếch đại gen L1 HPV với nucleotide biotin hóa

Giai đoạn này được thực hiện theo các giai đoạn như qui trình chạy PCR chuẩn đã mô tả ở mục khuếch đại gen L1 của HPV. Tuy nhiên, có 1 số lưu ý đặc biệt cho phản ứng PCR biotin hóa

- Tiến hành pha master mix cho 173 mẫu bệnh phẩm nhiễm HPV theo thể tích và thành phần như bảng 2.6 dưới đây.

**Bảng 2.6: Thành phần và thể tích phản ứng PCR biotin hóa gen L1**

Thành phần	Thể tích (µL)
Master mix PCR có sẵn	23,25
DNA <i>Taq</i> polymerase	0,75
DNA khuôn	1
Tổng	25

- Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR được tiến hành như bảng 2.7 dưới đây

**Bảng 2.7: Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR biotin hóa gen L1**

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C-9 phút		
2-41	96°C-20 giây	55°C-30 giây	72°C-30 giây
Bảo quản ở 4°C			

## + Giai đoạn 2: Lai trên màng

- Biến tính sản phẩm PCR gắn biotyl: ủ sản phẩm ở 95°C trong 5 phút, sau đó cắm ngay trên đá.

- Chuẩn bị máy Hybri Max: rửa máy Hybri Max bằng nước cất, bơm hết nước, đợi máy đạt 45°C; đặt màng lai lên, cố định bằng khuôn nhiều giếng (mỗi giếng là 1 màng lai, tương ứng 1 bệnh nhân).

- Bỏ sung 0,8 ml dung dịch Hybridization Solution vào mỗi giếng, ủ 3 phút, bơm xả hết dung dịch.

- Bỏ sung 0,5 ml dung dịch Hybridization Solution. Bỏ sung tiếp toàn bộ sản phẩm PCR biotin hóa gen L1. Đậy nắp. Chuyển máy về 45°C, giữ 20 phút.

- Chuyển máy về 25°C. Trong khi đợi máy về 25°C, bật bơm, rửa màng 3 lần bằng dung dịch Hybridization. Khi máy đạt 30°C, bỏ sung 0,5 ml Blocking Solution. Bơm xả hết dung dịch.

- Bỏ sung tiếp 0,5 ml Blocking Solution, ủ 5 phút. Bơm xả hết dung dịch.

- Khi máy đạt 25°C, bỏ sung 0,5 ml dung dịch enzyme, ủ tiếp trong 3,5 phút. Bơm hết dung dịch. Chuyển máy về 36°C.

- Rửa màng 4 lần bằng dung dịch A.

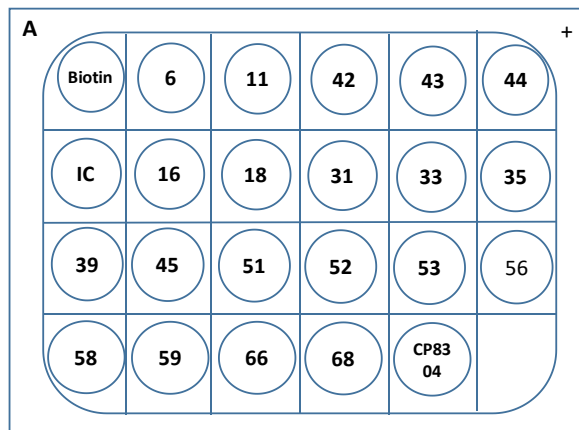
- Khi máy đạt 36°C, bỏ sung 0,5ml dung dịch NBT/BCIP vào giếng. Đậy nắp máy, đợi phản ứng trong 5 phút.

- Bơm hết dung dịch, rửa liên tục 3 lần bằng 0,8 ml dung dịch B.

- Rửa màng lai bằng 1 ml nước cất. Bơm hết dung dịch.

- Dỡ khuôn và sử dụng forcep lấy màng lai, phơi khô trên giấy thấm.

- Quan sát màu trên màng lai. Loại HPV tương ứng với vòng tròn có màu xanh



**Hình 2.1: Màn lai HPV với các DNA probe HPV loại tương ứng**

**\* Xác định phân nhóm dưới nhóm (lineage) của HPV16**

Những mẫu DNA của HPV16 được tiếp tục sử dụng giải trình tự gen E6, E7 của HPV16 để xác định phân nhóm dưới nhóm của HPV. Trình tự gen E6, E7 được xác định như sau:

**+ Khuếch đại gen E6, E7 của HPV16:**

DNA tinh sạch của HPV16 được sử dụng cho phản ứng PCR Bigdye với trình tự cặp mồi HPV16-E6, HPV16-E7 nhằm khuếch đại toàn bộ gen E6 kích thước 549 bp và toàn bộ gen E7 415 bp được mô tả chi tiết ở bảng 2.9.

**Bảng 2.8: Trình tự mồi E6, E7 của HPV16**

Tên mồi	Trình tự	Kích thước (bp)
HPV16-E6 F	5'-gaaatcgggtgaaccgaaac-3'	20
R	3'-acctctatgtgatgtaacg-5'	20
HPV16-E7 F	5'-gaccggtcgatgtatgtcttg-3'	21
R	3'-cttctcccatgccctacattac-5''	22

*F: mồi xuôi      R: mồi ngược*

Các giai đoạn của qui trình khuếch đại gen E6, E7 của HPV16 được thực hiện các bước như đã mô tả ở mục khuếch đại gen L1 của HPV.

- Thành phần và thể tích cho mỗi phản ứng khuếch đại gen E6, E7 HPV16 được trình bày chi tiết ở bảng 2.9

**Bảng 2.9: Thành phần và thể tích phản ứng khuếch đại gen E6, E7 của HPV16**

Thành phần	Thể tích (μL)
Nước cất	20
Đệm 10X	4
dNTPs 2mM	4
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5,6
Mồi	1,0
DNA <i>Taq</i> polymerase	0,4
DNA khuôn	4
Tổng	40

- Chu trình nhiệt của phản ứng khuếch đại được tiến hành như bảng 2.10

**Bảng 2.10: Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen E6, E7 của HPV16**

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C-10 phút		
2-41 mồi E6	95°C-30 giây	50°C-30 giây	72°C-45 giây
Mồi E7	95°C-30 giây	53°C-30 giây	72°C-45 giây
Bảo quản ở 4°C			

+ Điện di xác định sản phẩm sau khuếch đại gen E6, E7 của HPV16:

- Qui trình điện di được tiến hành như mục điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV.

- Bảng điện di với đoạn gen có kích thước 549 bp và E7 415 bp được xác định khuếch đại thành công đoạn gen E6, E7.

#### + Giải trình tự gen E6, E7:

Qui trình giải trình tự gen E6, E7 của HPV16 được thực hiện theo qui trình giải trình tự gen L1 như đã mô tả.

Trình tự các gen E6, E7 được so sánh với trình tự sẵn có trên GenBank để xác định phân nhóm dưới nhóm của HPV16 và xác định các điểm đột biến trên gen E6, E7 của HPV16.

### 2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

#### 2.3.1. Địa điểm nghiên cứu

##### \* Địa điểm thu thập số liệu

- Khoa khám bệnh, Bệnh viện K Trung ương.
- Khoa Ngoại 1, Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh
- Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện K Trung ương, Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh.

##### \* Địa điểm phân tích mẫu

- Khoa Y, Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản.
- Trung tâm Nghiên cứu Gen và Protein, Đại học Y Hà Nội.

#### 2.3.2. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 6 năm 2013 đến tháng 10 năm 2018

### 2.4. Xử lý số liệu

- Trình tự các nucleotide được đọc trên phần mềm Bioedit.
- Xác định các phân nhóm dưới nhóm của HPV bằng phần mềm MEGA.
- Số liệu sau khi làm sạch được nhập vào máy bằng phần mềm SPSS 20.0
- Phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS 20.0, sử dụng các thuật toán thống kê Khi bình phương (Chi-square) được sử dụng trong so sánh genotype của HPV với các loại tổn thương tế bào tại mô ung thư.



## **2.5. Đạo đức trong nghiên cứu**

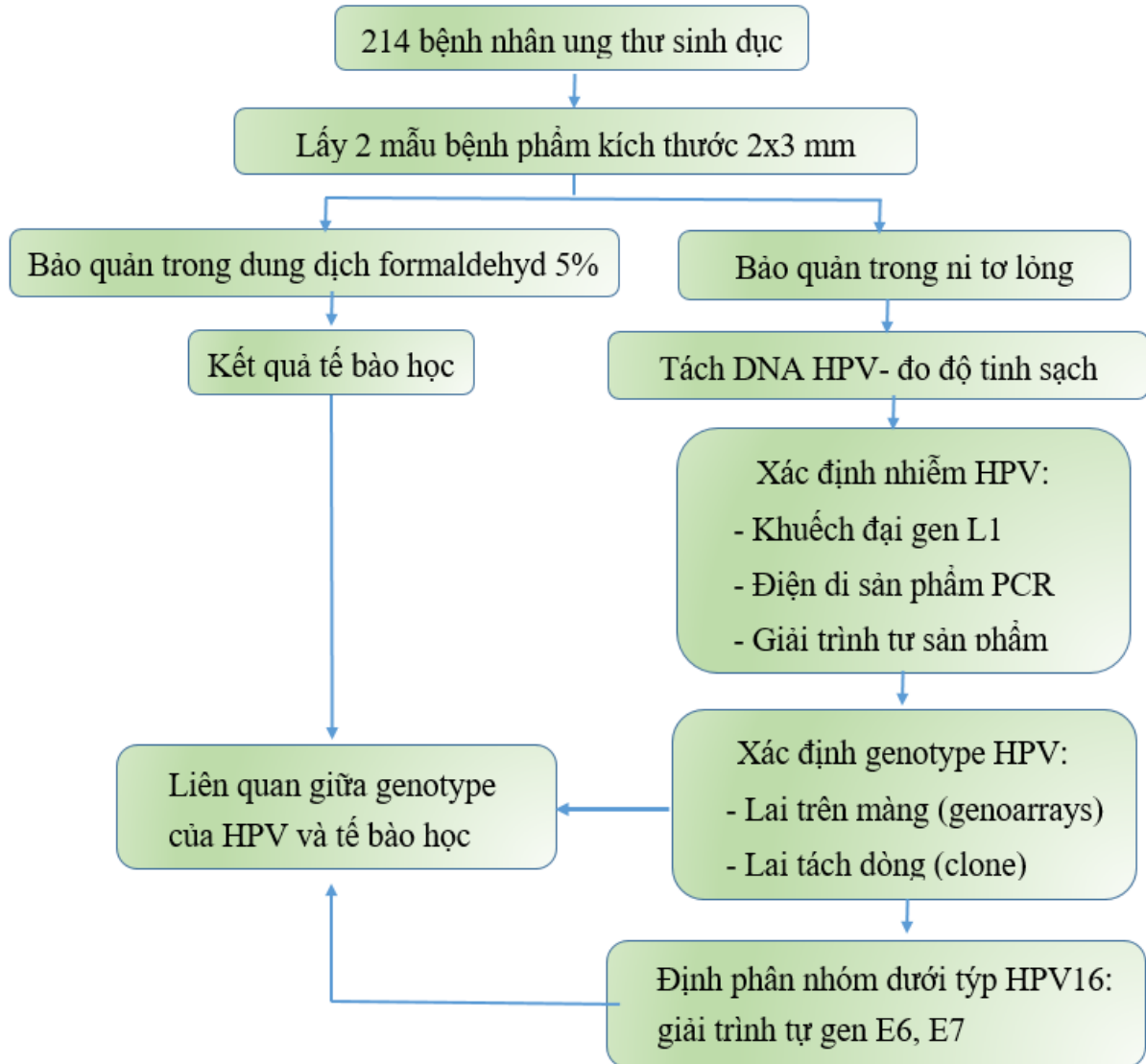
Nghiên cứu tuân thủ theo Đạo đức nghiên cứu Y học được thông qua bởi Hội đồng Y đức của trường Đại học Y Hải Phòng theo quyết định số 7/2011 HĐDD-YHP.

Bệnh nhân hoàn toàn đồng ý tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tham gia vào nghiên cứu. Các thông tin cá nhân được đảm bảo bí mật.

## **2.6. Kinh phí thực hiện đề tài**

Đề tài được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Nhà nước: “Hợp tác nghiên cứu tỉ lệ nhiễm và phân bố genotype của *Human Papillomavirus* trên một số bệnh ung thư ở phía Bắc, Việt Nam”.

## SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



### Chương 3

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Qua nghiên cứu 214 mẫu UTSDN, trong đó có 188 mẫu UTCTC, 2 mẫu UTAD và 24 mẫu UTAH thu thập từ Bệnh viện K Trung ương, Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh và Bệnh viện Phụ sản Trung ương, chúng tôi thu được những kết quả sau:

#### 3.1. Đặc điểm về tuổi của đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu có độ tuổi dao động từ 17 đến 87 tuổi nhưng tuổi trung bình chung khá cao:  $52,7 \pm 12,5$ . Chi tiết trong bảng 3.1.

**Bảng 3.1: Tuổi trung bình của nhóm đối tượng nghiên cứu**

Loại ung thư	$\bar{X} \pm SD$ (tuổi)
UTCTC (n=188)	$50,9 \pm 11,4$
UTAH (n=24)	$65,8 \pm 13,6$
UTAD (n=2)	$63,0 \pm 7,0$
UTSDN (n=214)	$52,7 \pm 12,5$

#### **Nhận xét**

Độ tuổi trung bình của nhóm ung thư UTCTC, UTAH, UTAD đều trên 50 tuổi. Tuy nhiên, nhóm bệnh nhân UTCTC có độ tuổi trung bình trẻ nhất  $50,9 \pm 11,4$ ; nhóm bệnh nhân UTAH có độ tuổi trung bình cao nhất,  $63,0 \pm 7,0$ .

Khi phân chia độ tuổi của các nhóm bệnh nhân theo từng nhóm tuổi <20; 20-29; 30-39; 40-49 và  $\geq 50$ , chúng tôi nhận thấy đa số (64,2%) bệnh nhân ở nhóm tuổi  $\geq 50$  và phân bố này cũng giống như khi xét ở từng nhóm ung thư. Chi tiết được mô tả ở bảng 3.2

**Bảng 3.2: Phân độ tuổi theo từng nhóm ung thư**

Loại ung thư		<20 tuổi	20-29 tuổi	30-39 tuổi	40-49 tuổi	≥ 50 tuổi	Tổng số
UTCTC	n	2	4	28	41	<b>113</b>	188
	%	1,1	2,1	14,9	21,8	<b>60,1</b>	100
UTAH	n	0	1	0	0	<b>23</b>	24
	%	0,0	4,2	0,0	0,0	<b>95,8</b>	100
UTAD	n	0	0	0	0	<b>2</b>	2
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>100</b>	100
UTSDN	n	2	5	28	42	<b>138</b>	214
	%	0,9	2,4	13,0	19,5	<b>64,2</b>	100

**Nhận xét**

Toàn bộ bệnh nhân UTAD (100%), hầu hết bệnh nhân UTAH (95,8%) và hơn nửa số bệnh nhân UTCTC (60,1%) thuộc nhóm tuổi trên 50. Tình trạng mắc UTCTC rải rác ở các độ tuổi, nhưng dường như tỉ lệ mắc tăng dần theo độ tuổi. Riêng nhóm UTAH chỉ có 1 bệnh nhân mắc độ tuổi 20-29.

**3.2. Phân bố genotype của HPV****3.2.1. Độ tinh sạch của DNA sau tách chiết**

Sau khi tách chiết theo qui trình hướng dẫn và bằng hóa chất của hãng Sigma-Aldrich từ mô UTSD tươi, sản phẩm DNA của HPV được kiểm tra độ tinh sạch trên máy Nano drop (Hitachi, Nhật Bản). Kết quả đo độ tinh sạch của các mẫu bệnh phẩm được ghi chi tiết ở phụ lục số 5.

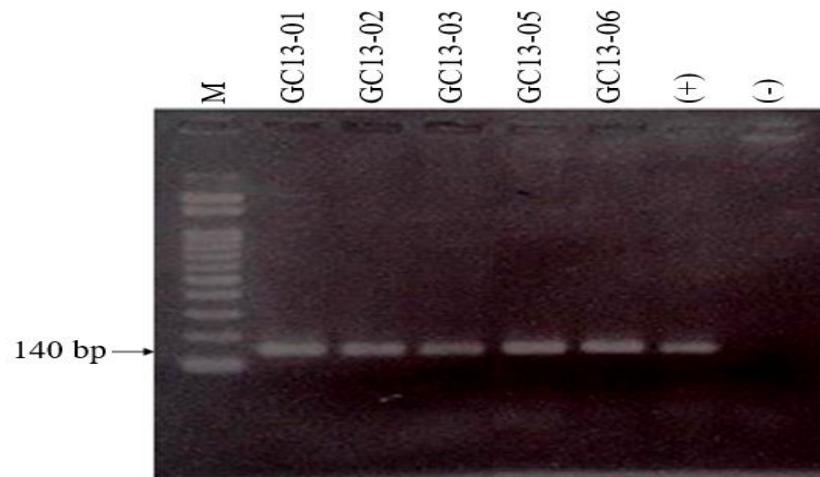
Tỉ lệ mật độ quang trung bình (OD) của các mẫu DNA sau tách chiết tại bước sóng 260 và 280 nm là  $1,81 \pm 0,06$ ; (dao động 1,62-1,96) trong giới hạn cho phép. Điều đó chứng tỏ các mẫu tách DNA đủ tinh sạch để sử dụng cho các kỹ thuật phân tích gen.

### 3.2.2. Tỷ lệ nhiễm HPV

Kết quả điện di sản phẩm PCR sau khuếch đại gen L1 của HPV với các cặp mồi gốc GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> original phát hiện được 158 mô UTCTC, 03 mô UTAH và 01 mô UTAD nhiễm HPV. Tiếp tục sử dụng cặp mồi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> modified để khuếch đại 52 mẫu bệnh phẩm ung thư âm tính với cặp mồi gốc, nghiên cứu phát hiện 10 mẫu bệnh phẩm UTCTC dương tính với HPV, nâng tổng số số mẫu nhiễm HPV lên 172/214, tương đương 80,4%.

#### 3.2.2.1. Tỷ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC

Qua kết quả điện di sản phẩm PCR sau khuếch đại gen L1 của HPV tách chiết từ mô UTCTC chỉ ra rằng 168/188 tương ứng với 89,4% mẫu bệnh phẩm UTCTC dương tính với HPV. Hình 3.1 đại diện cho kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTCTC



**Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTCTC.**

*M: Marker 100; (+): chứng dương - DNA của HPV16 với kích thước 140 bp; (-): chứng âm - nước cất, GC13-01 đến GC13-06: mã số bệnh nhân UTCTC.*

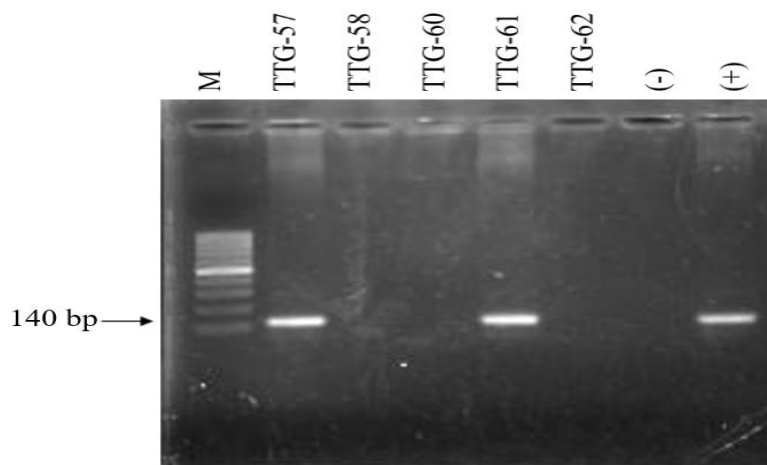
#### **Nhận xét:**

Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen L1 thu được có vạch đặc hiệu, rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước thu được là 140 bp tương ứng với đoạn gen L1 cần khuếch đại. Các chứng dương đều xuất hiện, chứng âm

không xuất hiện trên băng điện di chứng tỏ không có hiện tượng bị nhiễm ngoại lai. Tần suất xuất hiện các băng rất cao.

### 3.2.2.2. Tỷ lệ nhiễm HPV tại mô UTAH

Qua kết quả điện di sản phẩm PCR sau khuếch đại gen L1 của HPV tách chiết từ mô UTAH, chỉ ra rằng 3/24 mẫu bệnh phẩm dương tính, tương ứng với 12,5%. Hình 3.2 đại diện cho kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTAH.



**Hình 3.2: Kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTAH.**

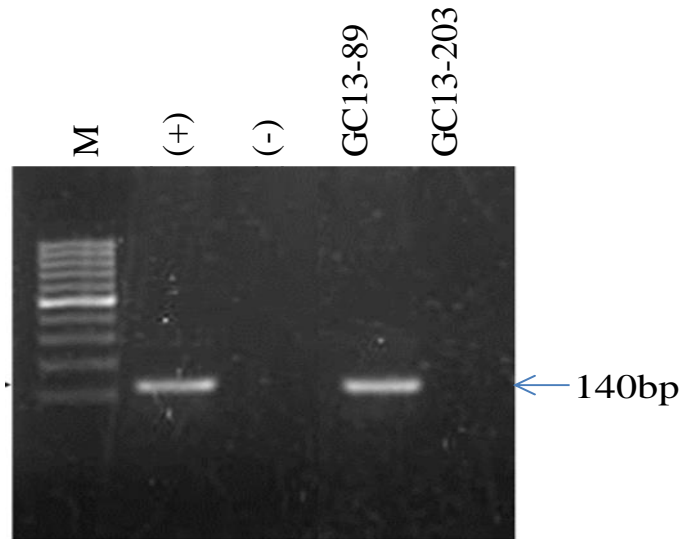
*M: Marker 100; (+): chứng dương chứng dương - DNA của HPV16 với kích thước 140 bp; (-): chứng âm - nước cất, TTG-57 đến TTG-62: mã số bệnh nhân UTAH*

#### **Nhận xét:**

Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen L1 thu được có vạch đặc hiệu, rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước thu được là 140 bp tương ứng với đoạn gen L1 cần khuếch đại. Các chứng dương đều xuất hiện, chứng âm không xuất hiện trên băng điện di chứng tỏ không có hiện tượng bị nhiễm ngoại lai. Tần suất xuất hiện các băng không cao.

### 3.2.2.3. Tỷ lệ nhiễm HPV tại mô UTAD

Qua kết quả điện di sản phẩm PCR sau khuếch đại gen L1 của HPV tách chiết từ mô UTAD, chúng tôi thu được 01 trong số 02 mẫu bệnh phẩm dương tính, tương ứng với 50%. Hình 3.3 là kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTAD



**Hình 3.3: Kết quả điện di sản phẩm sau khuếch đại gen L1 của HPV tại mô UTAD.**

*M: Marker 100; (+): chứng dương - DNA của HPV16 với kích thước 140 bp; (-): chứng âm - nước cất; GC13-89 và GC13-203: mã số bệnh nhân UTAH*

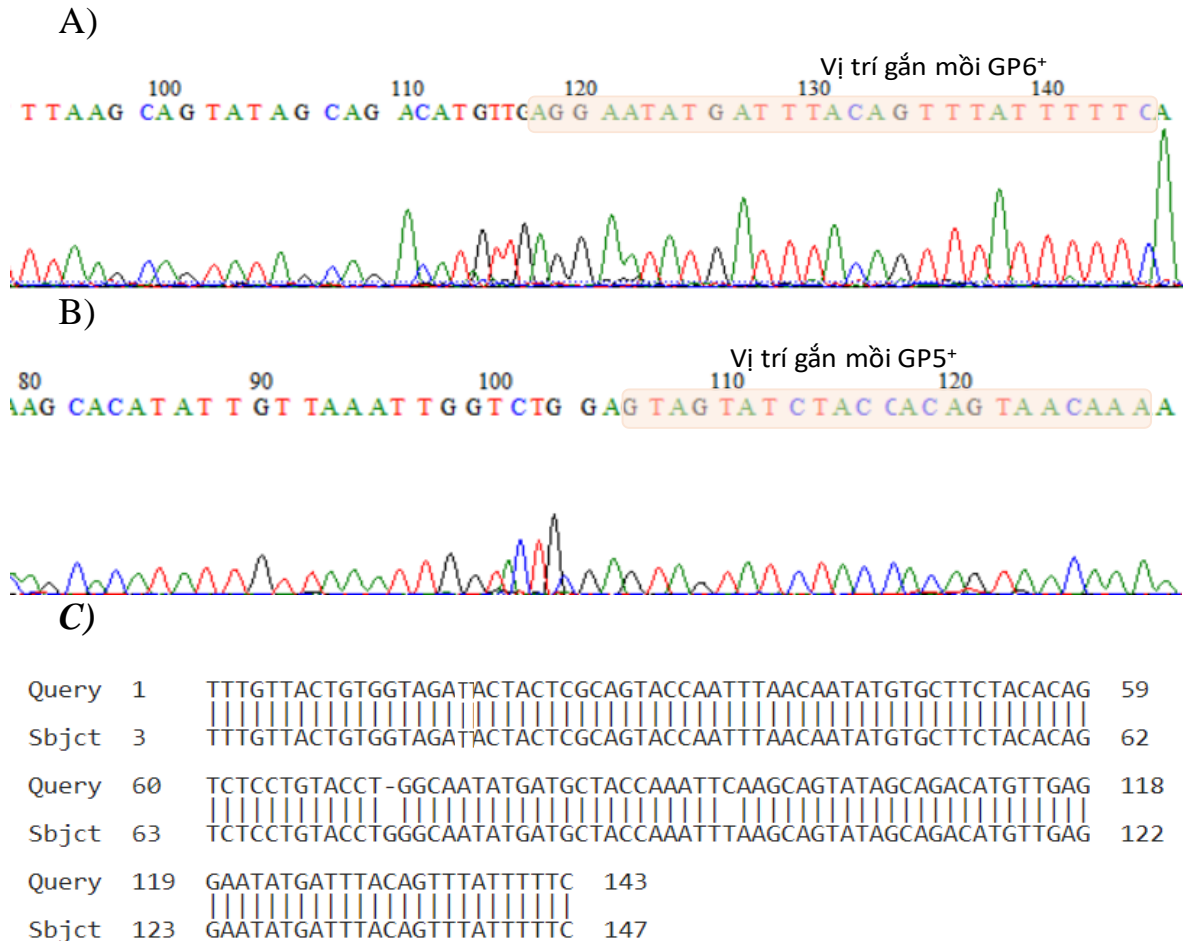
#### **Nhận xét:**

Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen L1 thu được có vạch đặc hiệu, rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước thu được là 140 bp tương ứng với đoạn gen L1 cần khuếch đại. Các chứng dương đều xuất hiện, chứng âm không xuất hiện trên băng điện di chứng tỏ không có hiện tượng bị nhiễm ngoại lai. Có 01 mẫu bệnh phẩm xuất hiện băng dương tính.

### 3.2.2.4 Giải trình tự xác định sản phẩm sau khuếch đại

Để khẳng định sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen L1 là đặc hiệu, chúng tôi lựa chọn ngẫu nhiên 05 sản phẩm PCR của 05 mẫu ung thư sinh dục

nữ để giải trình tự gen. Kết quả cho thấy trình tự thu được hoàn toàn tương đồng với trình tự của đoạn gen L1. Hình 3.4 là kết quả giải trình tự gen L1 của bệnh phẩm mã số GC13-166.



**Hình 3.4: Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR của đoạn gen L1.**

A) Trình tự đoạn gen theo chiều xuôi; B) Trình tự đoạn gen theo chiều ngược. Khung đỏ là vị trí mồi xuôi GP6<sup>+</sup> và mồi ngược GP5<sup>+</sup>; C) so sánh trình tự đoạn gen L1 140 bp sau khuếch đại trên GenBank. Query: Trình tự gen L1 của bệnh nhân, Sbjct: trình tự gen L1 mã AF548838.1 trên GenBank.

**Nhận xét:**

Các sóng tín hiệu của các nucleotid rõ ràng, không bị nhiễu. Đoạn gen đích khuếch đại theo chiều xuôi chứa trình tự mồi ngược (GP6<sup>+</sup>) và đoạn gen đích khuếch đại theo chiều ngược chứa trình tự mồi xuôi (GP5<sup>+</sup>)



của cặp mồi GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> original. Trình tự đoạn gen đích sau khuếch đại có độ tương đồng 99% so với đoạn gen L1 của HPV sẵn có trên GenBank. Như vậy, sản phẩm gen khuếch đại với cặp mồi GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> original và GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> modified có kích thước 140 bp chính là đoạn gen L1 cần khuếch đại của HPV.

### 3.2.2.5. Tỷ lệ nhiễm HPV tại mô UTSDN

**Bảng 3.3: Tỷ lệ nhiễm HPV tại mô ung thư sinh dục**

Loại ung thư	HPV dương tính		HPV âm tính		p
	n	%	n	%	
UTCTC (n=188)	<b>168</b>	89,4	<b>20</b>	10,6	
UTAH (n=24)	<b>3</b>	12,5	<b>21</b>	87,5	<0,001
UTAD (n=2)	1	50	1	50	
UTSDN (n=214)	172	80,4	42	19,6	

### **Nhận xét**

Tỷ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC cao nhất - 89,4% (168/188), nhiễm HPV tại mô UTAH thấp nhất - 12,5% (3/24). Xét chung cho cả 3 nhóm ung thư, 80,4% (172/214) mô UTSDN nhiễm HPV. Tình trạng nhiễm HPV tại mô UTCTC khác biệt với nhiễm HPV tại mô UTAH có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .

Khi xét phân bố tỷ lệ nhiễm HPV theo các lứa tuổi sinh học, sự khác biệt tỷ lệ nhiễm HPV theo nhóm tuổi không có ý nghĩa thống kê. Trái lại, khi phân chia độ tuổi theo độ tuổi sinh sản, sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm HPV có ý nghĩa thống kê.

**Bảng 3.4: Phân bố tỉ lệ nhiễm HPV theo độ tuổi sinh sản**

Độ tuổi		HPV dương tính		HPV âm tính		p
		n	%	n	%	
< 30 tuổi	(n=7)	6	85,7	1	14,3	
30-50 tuổi	(n=69)	63	91,3	6	8,7	0,016
≥ 50 tuổi	(n=138)	103	74,6	35	25,4	
Tổng số	(n=214)	172	80,4	42	19,6	

**Nhận xét**

Tỉ lệ nhiễm HPV ở nhóm bệnh nhân ở độ tuổi mãn dục thấp hơn nhóm bệnh nhân ở độ tuổi sinh đẻ có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,016$  ( $p < 0,05$ ).

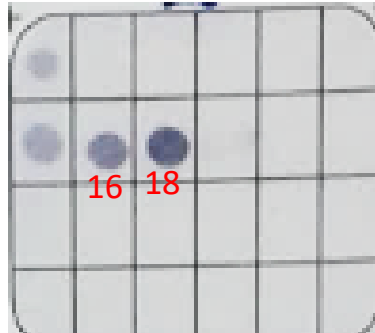
**3.2.3. Phân bố genotype của HPV**

Toàn bộ 172/214 mẫu bệnh phẩm nhiễm HPV được tiến hành xác định genotype. Bằng kỹ thuật genoarrays, 100% (172/172) mẫu xác định được genotype của HPV, chủ yếu là HPV nguy cơ cao.

Nghiên cứu xác định được 14 loại HPV, trong đó có 10 loại HPV nguy cơ cao, gồm: HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59; 02 loại có khả năng gây ung thư : HPV53 và 66; 02 HPV nguy cơ thấp 11, 81 cũng được tìm thấy trong nghiên cứu. Hình 3.5 dưới đây là một số hình ảnh đại diện cho kết quả nhiễm HPV.

## Hình ảnh bệnh nhân đồng nhiễm HPV (02 loại)

Đồng nhiễm HPV 16, 18



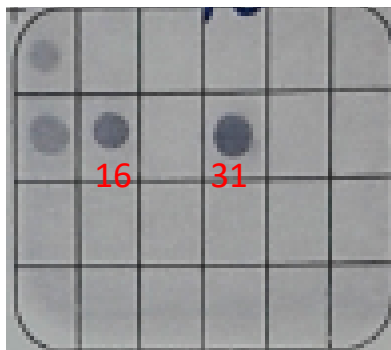
Bệnh nhân mã số GC13-26

Vị trí các loại HPV trên màng lai

A						+
Biotin	6	11	42	43	44	
IC	16	18	31	33	35	
39	45	51	52	53	56	
58	59	66	68	CP83 04		

IC: chứng nội

Đồng nhiễm HPV 16, 31



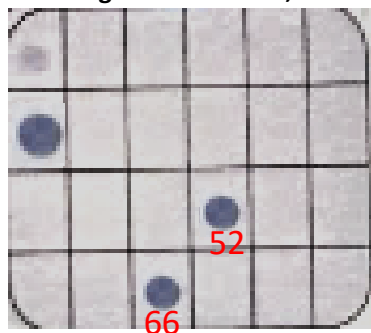
Bệnh nhân mã số GC13-70

Vị trí các loại HPV trên màng lai

A						+
Biotin	6	11	42	43	44	
IC	16	18	31	33	35	
39	45	51	52	53	56	
58	59	66	68	CP83 04		

IC: chứng nội

Đồng nhiễm HPV 52, 66



Bệnh nhân mã số GC13-85

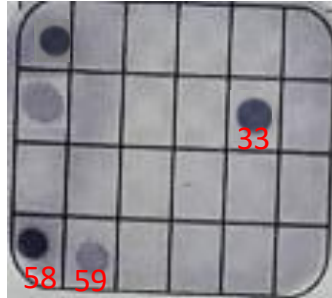
Vị trí các loại HPV trên màng lai

A						+
Biotin	6	11	42	43	44	
IC	16	18	31	33	35	
39	45	51	52	53	56	
58	59	66	68	CP83 04		

IC: chứng nội

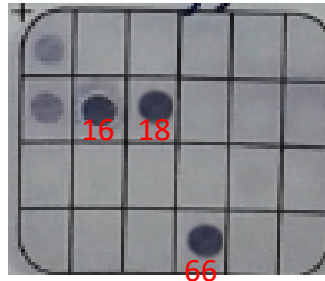
## Hình ảnh bệnh nhân đồng nhiễm HPV (03 loại)

Đồng nhiễm HPV 33, 58, 59



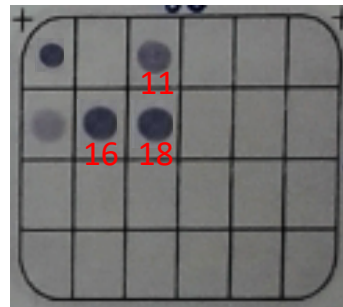
Bệnh nhân mã số GC13-54

Đồng nhiễm HPV 16, 18, 66



Bệnh nhân mã số GC13-35

Đồng nhiễm HPV 11, 16, 18



Bệnh nhân mã số GC13-66

Vị trí các loại HPV trên màng lai

A	Biotin	6	11	42	43	44	+
	IC	16	18	31	33	35	
		39	45	51	52	53	56
		58	59	66	68	CP83 04	

IC: chứng nội

Vị trí các loại HPV trên màng lai

A	Biotin	6	11	42	43	44	+
	IC	16	18	31	33	35	
		39	45	51	52	53	56
		58	59	66	68	CP83 04	

IC: chứng nội

Vị trí các loại HPV trên màng lai

A	Biotin	6	11	42	43	44	+
	IC	16	18	31	33	35	
		39	45	51	52	53	56
		58	59	66	68	CP83 04	

IC: chứng nội

**Hình 3.5: Hình ảnh phát hiện các loại HPV bằng phương pháp màng lai.**

*Biotin: ô gắn biotin; IC: mẫu chứng nội dương; ô có màu tím: HPV dương tính*  
**Nhận xét:**

Các chấm tròn màu tím thể hiện kết quả lai dương tính đều rõ nét, dễ quan sát. Ô chứng nội HPV có chấm tròn màu tím rõ nét dương tính là chứng tỏ phản ứng PCR không làm nhiễu kết quả lai điều đó chứng minh kết quả lai hoàn toàn chính xác. Các loại HPV được phát hiện đa số thuộc nhóm nguy cơ cao, phát hiện cả đơn nhiễm và đồng nhiễm HPV.

### 3.2.3.3 Phân bố genotype của HPV tại mô UTSDN

Kết quả phân bố genotype HPV tại mô ung thư sinh dục nữ được thể hiện qua bảng 3.5 và hình 3.6.

**Bảng 3.5: Phân bố genotype của HPV tại mô UTSD**

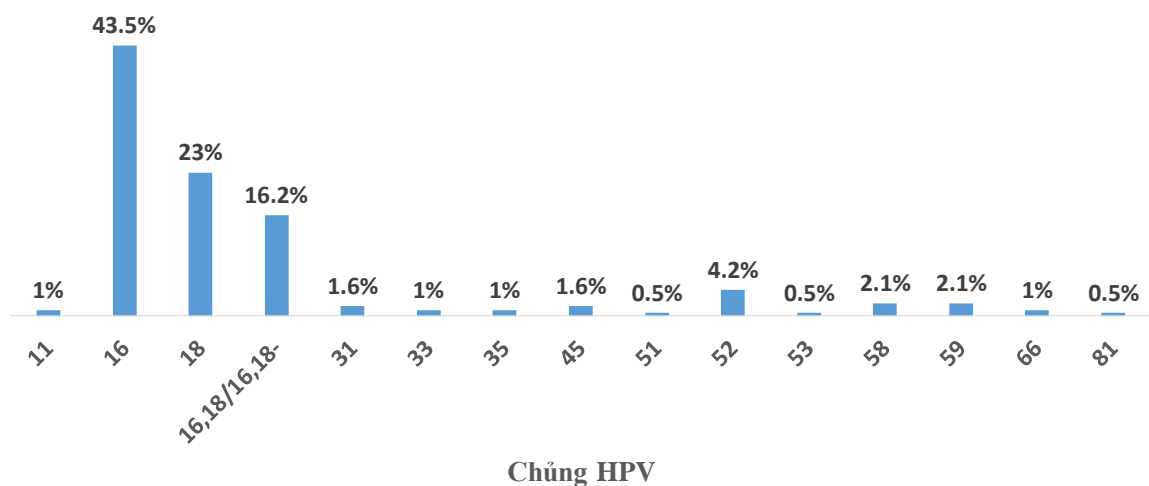
HPV genotype	Đơn nhiễm									Đông nhiễm													
	16	18	31	33	45	52	58	59		11	11	11	16	16	16	16	16	16	16	16	18	18	35
										16	16	35	18	18	31	33	45	45	52	66	52	58	58
											18	81		53			51						59
														66									
UTCTC (n=168)	70	42	2	1	1	3	2	3		1	1	0	29	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1
UTAH (n=3)	2	0	0	0	0	0	0	0		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UTAD (n=1)	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng số	(n=172)	73	42	2	1	1	3	2	3	1	1	1	29	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1
	%	42,4	24,4	1,2	0,6	0,6	1,7	1,2	1,7	0,6	0,6	0,6	16,8	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	2,3	0,6	0,6	0,6	0,6

**Nhận xét:**

Đơn nhiễm HPV là phổ biến ở tất cả các mô UTSDN, chiếm 73,4% (127/172). Tất cả các trường hợp đơn nhiễm đều nhiễm HPV nguy cơ cao.; trong đó, đơn nhiễm HPV16 chiếm tỉ lệ cao nhất, 57,5 % (73/127) các trường hợp đơn nhiễm và 42,4% (73/172) các trường hợp nhiễm HPV. Đơn nhiễm HPV18 chỉ chiếm 33,1% (42/127) các trường hợp đơn nhiễm và 24,4% (42/172) tổng số các trường hợp nhiễm HPV. Đơn nhiễm HPV 52 chiếm tỉ lệ rất khiêm tốn ở cả nhóm đơn nhiễm và đồng nhiễm.

Đồng nhiễm HPV16,18 hoặc đồng nhiễm HPV16,18 với loại khác vẫn chiếm đa số (18%-31/172 trường hợp nhiễm HPV và 68,8%-31/45 các trường hợp đồng nhiễm); tiếp theo là đồng nhiễm HPV16, HPV18. Số ít bệnh nhân (1,8%-3/172) nhiễm HPV nguy cơ thấp như HPV11, HPV81 được xác định từ các trường hợp đồng nhiễm với HPV nguy cơ cao.

Nhằm xác định chính xác phân bố của từng chủng HPV, chúng tôi tách từng chủng HPV để phân tích. Tỉ lệ nhiễm từng chủng được mô tả chi tiết ở hình 3.6.

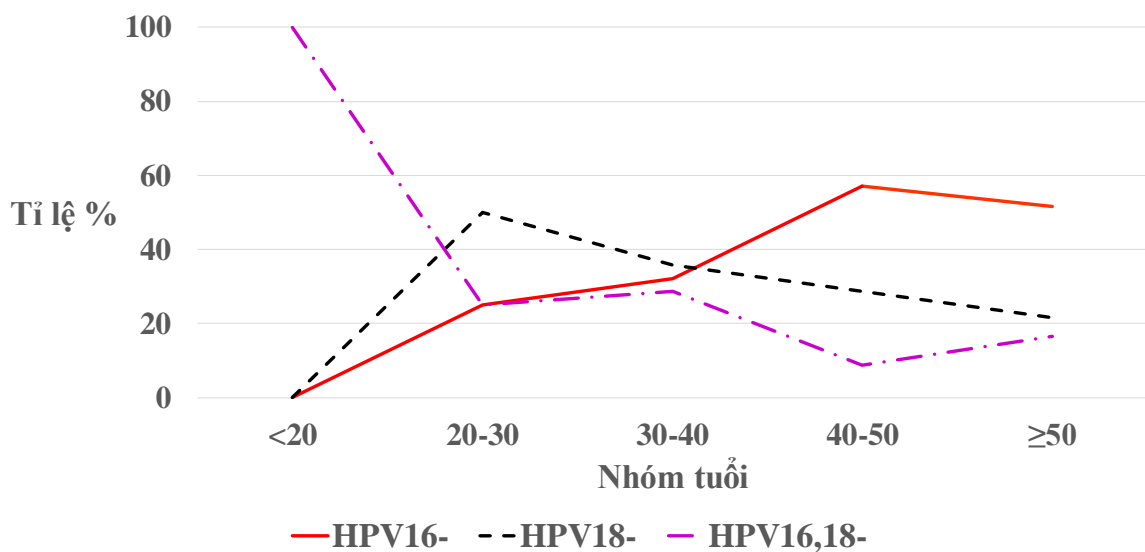


**Hình 3.6: Phân bố genotype của HPV theo chủng**

**Nhận xét:**

Nhiễm HPV16 chiếm tỉ lệ cao nhất, 43,5% (83/191); tiếp theo HPV18- 23% (44/191); đồng nhiễm HPV16, 18 hoặc HPV16, 18 với loại khác chiếm 16,2% (31/191). Nhiễm HPV52 đứng thứ 4, chiếm tỉ lệ rất thấp, 4,2% (8/191).

Để xác định sự phân bố genotype của HPV phổ biến nhất trong số 15 chủng theo tuổi, chúng tôi xét sự phân bố HPV16-, HPV18- và HPV16, 18- theo từng nhóm tuổi. Chi tiết ở hình 3.7.



**Hình 3.7: Phân bố tỉ lệ nhiễm HPV16-, HPV18- và HPV16, 18- theo nhóm tuổi**

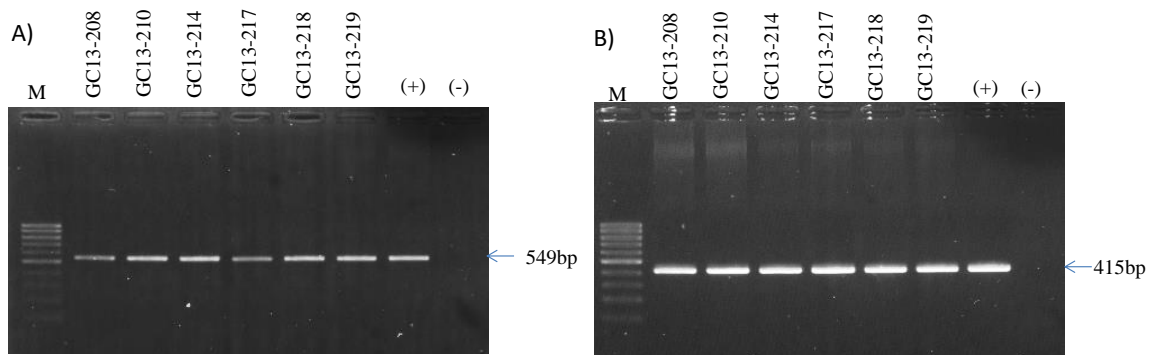
**Nhận xét**

Tỉ lệ nhiễm HPV16 tăng dần theo độ tuổi và đạt cao nhất ở nhóm tiền mãn dục, từ 40-50 tuổi. Nhiễm HPV18 cũng tăng dần theo độ tuổi và đạt tỉ lệ cao nhất ở độ tuổi sinh đẻ 20-40 tuổi và có xu hướng giảm dần ở độ tuổi trên 40. Đồng nhiễm HPV16,18 xảy ra ở tất cả bệnh nhân nhiễm HPV dưới 20 tuổi. Tuy nhiên, tỉ lệ đồng nhiễm HPV16,18 không ổn định theo sự tăng dần của độ tuổi.

### 3.2.4. Phân nhóm dưới nhóm và sublineage của HPV16

#### 3.2.4.1 Khuếch đại gen E6, E7 của HPV16

Sau khi khuếch đại toàn bộ gen E6, E7 của 114 mẫu bệnh phẩm UTCTC nhiễm HPV16 bằng 2 cặp mồi HPV16E6 và HPV16E7 đặc hiệu, chúng tôi đã tiến hành điện di trên gel 2%. Kết quả cho thấy 114/114 mẫu bệnh phẩm nhiễm HPV16 đã khuếch đại thành công cả gen E6 và E7. Hình ảnh đại diện kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện qua hình 3.8.



**Hình 3.8: Điện di sản phẩm sau khuếch đại bằng cặp mồi HPV16 E6, E7**  
*M: marker 100; (+); chứng dương; (-): chứng âm; GC13-208 đến GC13-219: mã bệnh nhân nhiễm HPV16; A) sản phẩm khuếch đại gen E6; B) sản phẩm khuếch đại gen E7.*

#### **Nhận xét:**

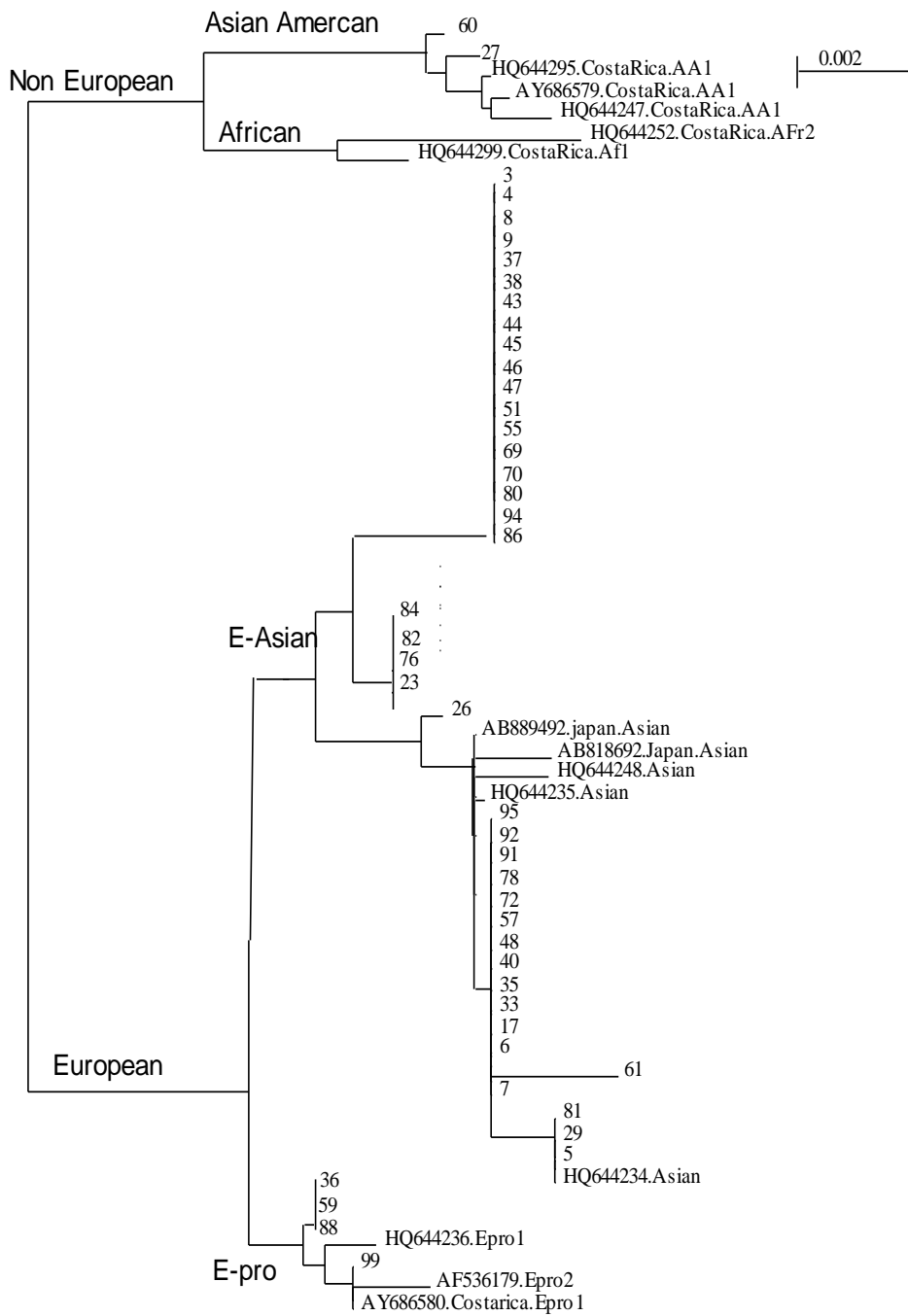
Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen E6, E7 thu được có vạch đặc hiệu, rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước thu được là 549 và 415 bp tương ứng với đoạn gen E6, E7 cần khuếch đại. Các chứng dương đều xuất hiện, chứng âm không xuất hiện trên băng điện di chứng tỏ không có hiện tượng bị nhiễm ngoại lai. Toàn bộ sản phẩm điện di đều xuất hiện trên băng điện di.



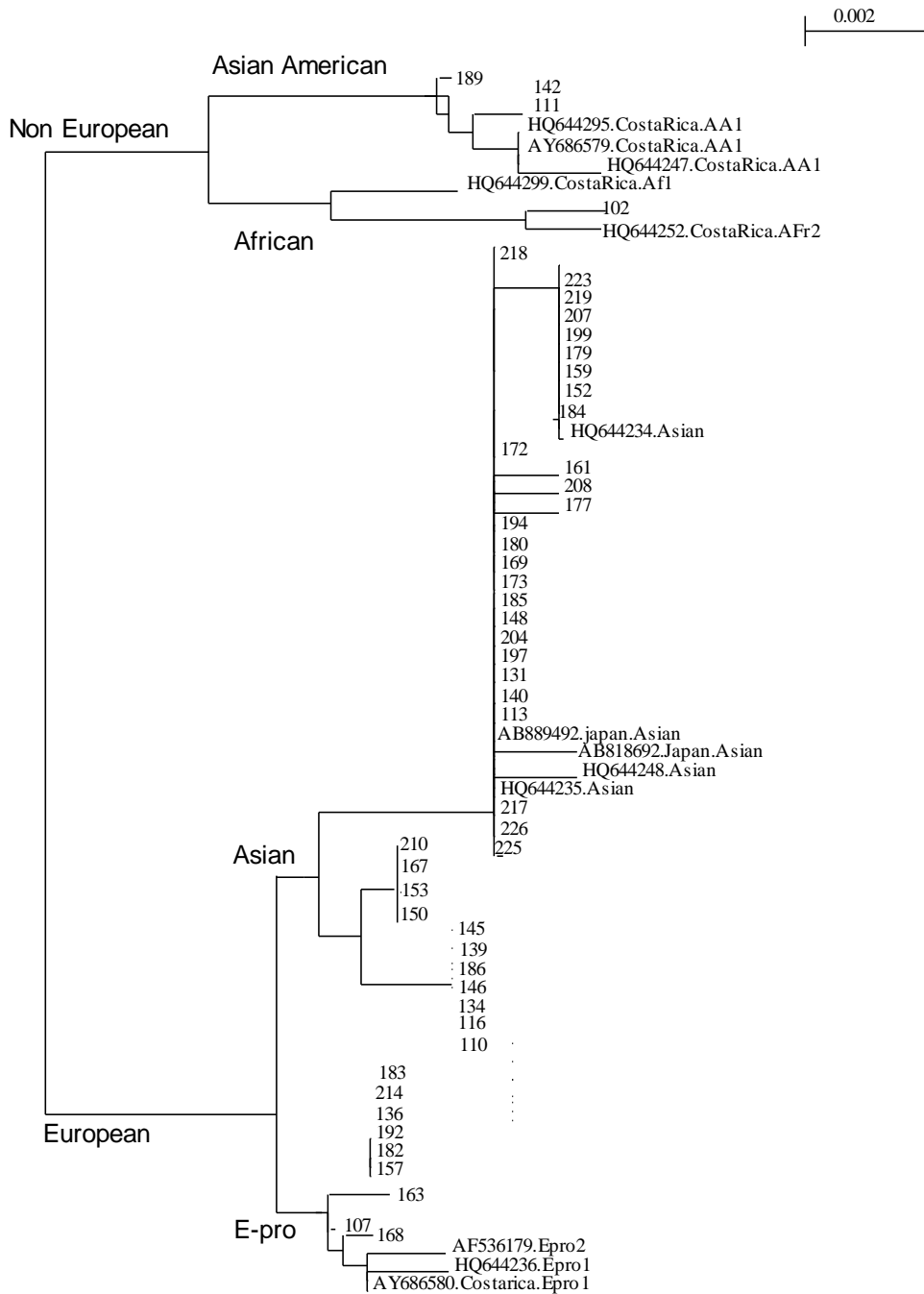
#### *3.2.4.2 Xác định phân nhóm dưới nhóm của HPV16 bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp gen E6, E7*

Sản phẩm khuếch đại gen E6 và E7 của HPV16 được tiến hành giải trình tự trực tiếp gen bằng cặp mồi HPV16 E6, E7 đặc hiệu. Từ 114 trường hợp nhiễm HPV16, 100 trường hợp UTCTC có trình tự gen E6, E7 của HPV rõ nét, không có trình tự nhiễu; 14 mẫu bệnh phẩm còn lại thu được các trình tự với các trình tự nhiễu, không rõ ràng nên được loại bỏ ra khỏi nghiên cứu.

Trình tự gen E6, E7 được phân tích bằng phần mềm Genetyx tree, kết quả thu về phân nhóm dưới nhóm của HPV16 đã được xác định. Hai phân nhóm dưới nhóm HPV16 gồm European và Non European. Phân nhóm dưới nhóm European lineage lại gồm 2 nhóm phụ Asian và European prototype sunlineage. Phân nhóm dưới nhóm Non European lineage có 2 nhóm phụ Asian American và African sublineage. Chi tiết trong hình 3.9 và 3.10.



**Hình 3.9: Hình ảnh phân nhóm dưới nhóm của HPV16 (50 bệnh phẩm UTCTC nhiễm HPV16, từ GC13-3 đến GC13-99)**



**Hình 3.10: Hình ảnh phân nhóm dưới nhóm của HPV16 (từ bệnh phẩm UTCTC nhiễm HPV16 tiếp theo, từ GC13-102 đến GC13-214).**

*HQ644295.CostaRica.AA1*: trình tự mã HQ644295, phân nhóm phụ dưới nhóm Asian American 1 [147]; *AY686579.CostaRica.AA1*: trình tự mã AY686579, phân nhóm phụ dưới nhóm Asian American 1 [148];

*HQ644247.CostaRica.AA1: trình tự mã HQ644247, phân nhóm phụ dưới nhóm Asian American 1 [22]; HQ644252.CostaRica.AFr2: trình tự mã HQ644252, phân nhóm phụ dưới nhóm African 2 [22]; AB818692. Japan.Asian: trình tự mã AB818692, phân nhóm phụ dưới nhóm Asian. [11]; HQ644248.Asian: trình tự mã HQ644248, phân nhóm phụ dưới nhóm Asian [22]; AB889492.Japan.Asian: trình tự mã AB889492, phân nhóm phụ dưới nhóm [11]; HQ644235.Asia trình tự mã HQ644235, phân nhóm phụ dưới nhóm Asia [22]; HQ644236. Epro1 trình tự mã HQ644271, phân nhóm phụ dưới nhóm European prototype [22]; AY686580.Costarica.Epro trình tự mã AY686580, phân nhóm phụ dưới nhóm European prototype [148]; các số thứ tự từ 3- 214: tương ứng với mã bệnh nhân GC13-3 đến GC13-214.*

**Nhận xét:**

Không có trường hợp nào nằm ngoài 2 nhánh chính European và Non European. European là lineage phổ biến nhất của HPV16, chiếm 94% (94/100), Non-European chỉ chiếm 6% (6/100). HPV16 European có 2 sublineage, trong đó European prototype chiếm số ít (14/94) còn lại phần lớn là Asian (80/94). HPV16 Non-European có 02 sublineage nhưng phần nhiều là Asian America (5/6) và African 2 chỉ có 1 trường hợp (1/6).

**3.2.4.3 Xác định đột biến sublineage E6, E7 của HPV16**

Khi so sánh trình tự của các gen E6 và E7 của HPV16 với trình tự trên GenBank, kết quả cho thấy có tất cả 14 vị trí đột biến trên gen E6 và 2 vị trí đột biến trên gen E7 dẫn đến thay đổi trình tự bộ ba mã hóa cho các acid amin tương ứng. Một vài hình ảnh đại diện cho các vị trí đột biến được thể hiện qua các hình minh họa dưới đây.

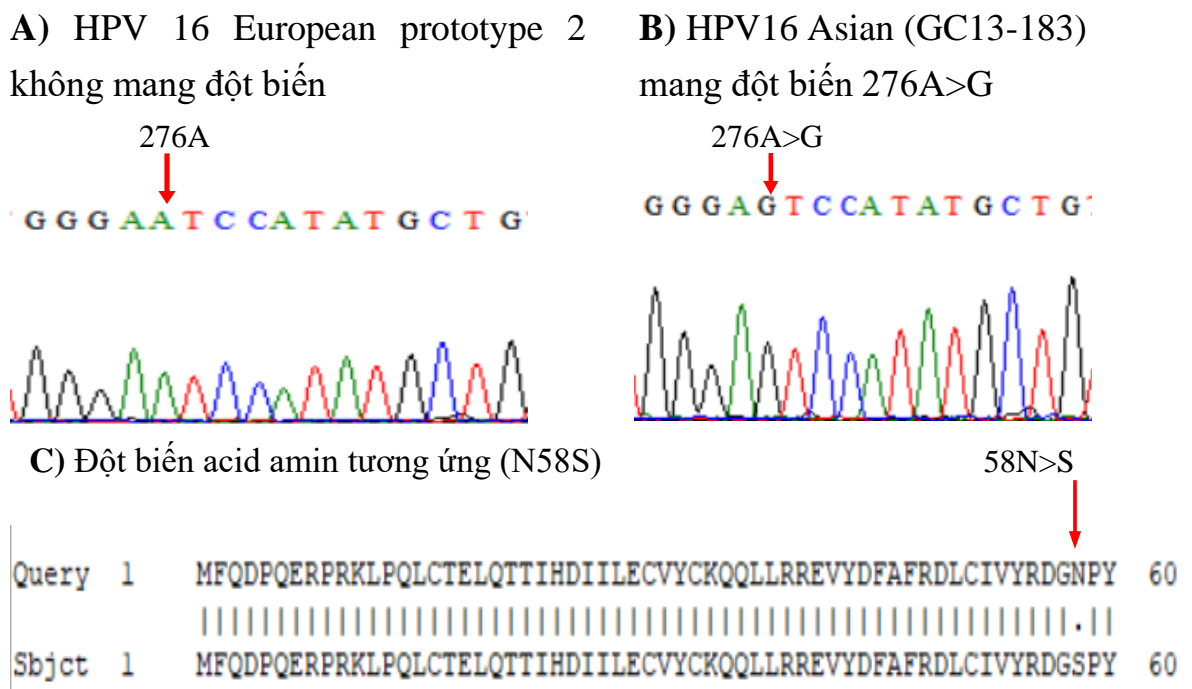
\* Đột biến trên gen E6

- Đột biến 178T>G; 183T>G; 293G>A của HPV16 Asian

**A)** HPV 16 European prototype 2 không mang đột biến



- Đột biến 276 A>G của HPV16 Asian



**Hình 3.12: Hình ảnh đột biến 276A>G trên gen E6 của HPV16 Asian**

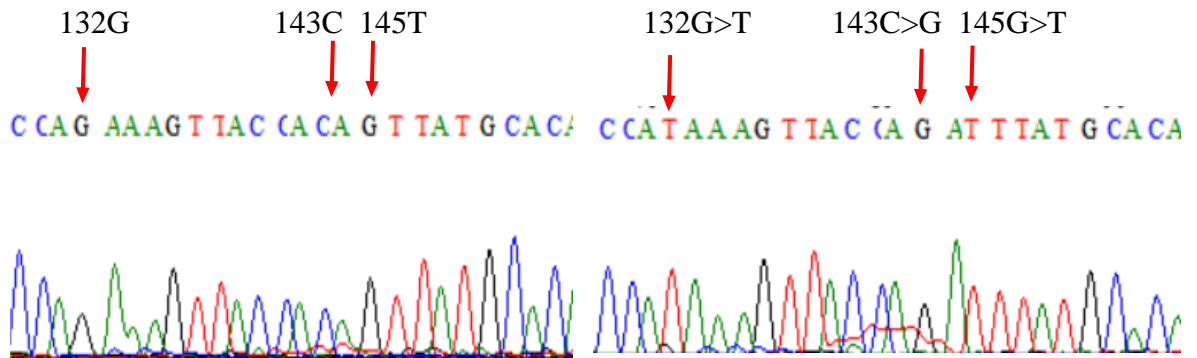
**Nhận xét:**

Hình ảnh giải trình tự gen E6 ở bệnh nhân GC13-183 cho thấy có đột biến thay thế nucleotid A thành nucleotid G tại vị trí 276. So sánh với trình tự trên GenBank thấy có thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại các vị trí 58 của protein E6, từ acid amin Serin thành Asparagin.

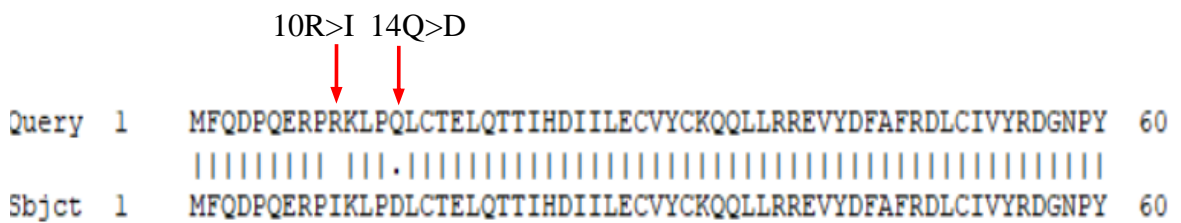


- Đột biến 132G>T; 143C>G; 145G>T của HPV16 African

A) HPV 16 European prototype 2 không mang đột biến      B) HPV16 African (GC13-102) mang đột biến 132G>T: 143C>G: 145G>T



C) Đột biến acid amin tương ứng (R10I; Q14D)



**Hình 3.14: Hình ảnh đột biến 132G>T: 143C>G: 145G>T trên gen E6 của HPV16 African**

**Nhận xét:**

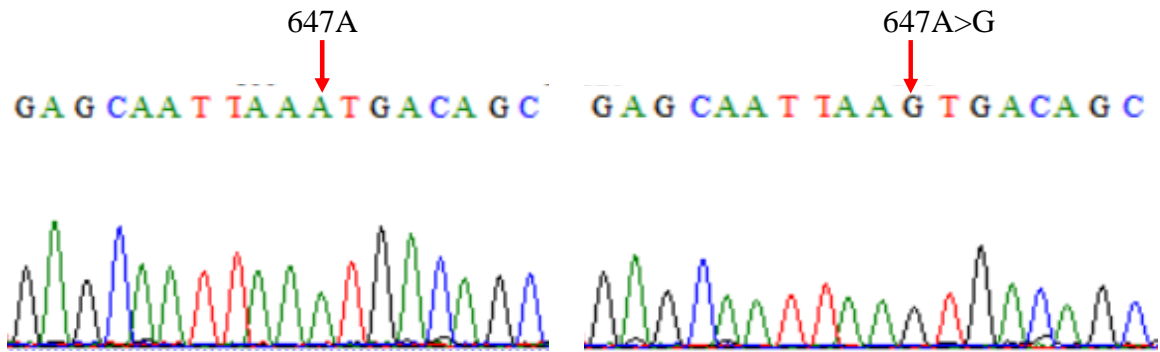
Hình ảnh giải trình tự gen E6 ở bệnh nhân GC13-102 cho thấy có đột biến thay thế nucleotid G thành nucleotid T tại vị trí 132; nucleotid C thành nucleotid G tại vị trí 143 và thay thế nucleotid G thành T ở vị trí 145. So sánh với trình tự trên GenBank thấy có thay đổi bộ ba mã hóa của các acid amin tại các vị trí 10 và 14 của protein E6, từ acid amin Arginin thành Isoleucin; acid amin Glutamin thành Aspartic.



\* Đột biến trên gen E7

- Đột biến 647A>G trên E7 của HPV16

A) HPV16 European prototype không mang đột biến      B) HPV16 Asian (GC13-61) mang đột biến 647A>G



C) Đột biến acid amin tương ứng (N29S)

29N>S

Query	1	MHGDTHYMDTTDYCYNDSSDDGAGADRAHYNVTCCKCDSTRCVSTHVDRTDMGTGVCCS	60
Sbjct	1	MHGDTHYMDTTDYCYSDSSDDGAGADRAHYNVTCCKCDSTRCVSTHVDRTDMGTGVCCS	60

**Hình 3.15: Hình ảnh đột biến 647A>G trên gen E7 của HPV16**

**Nhận xét:**

Hình ảnh giải trình tự gen E7 ở bệnh nhân GC13-61 cho thấy có đột biến thay thế nucleotid A thành nucleotid A tại vị trí 647 trên gen E6, E7 hay 98 tính riêng cho E7. So sánh với trình tự trên GenBank chỉ ra rằng có thay đổi bộ ba mã hóa của các acid amin tại vị trí 29, từ acid amin Asparagin thành Serin.

Chi tiết về sự phân bố các đột biến nucleotid và đột biến acid amin được trình bày ở bảng 3.6.

**Bảng 3.6: Phân bố đột biến nucleotide và acid amin thay thế trên gen E6, E7 của HPV16**

Phân nhóm dưới type (Lineage)	Phân nhóm phụ dưới type (Sublineage)	N	Biến đổi nucleotid và acid amin trên gen E6													Biến đổi nucleotid và acid amin trên gen E7					
			*Nucleotide											Acid amin		*Nucleotid	Acid amin				
			1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	5	6			
			3	4	4	7	7	8	8	7	7	9	1	3	5	7	7	4			
			2	3	5	6	8	2	3	6	7	3	5	5	0	0	1	7			
		E350T	Ref	G	C	G	G	T	A	T	A	T	G	C	C	T	A	G	A		
	Prototype	E350G	1	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	G	-	I27L/L83V	-	-	
		(5)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	L83V	-	-	
			1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	L83V	C	-	D4H
	European	E350T	1	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	N58S	-	-	
		(9)	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Asian		40	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D25E	-	G	N29S
		Asian a	1	-	-	-	-	G	-	G	-	-	-	-	-	-	-	D25E/I27R	-	G	N29S
		(44)	1	-	-	-	-	G	-	G	-	-	A	-	-	-	-	D25E/I27R/D64N	-	G	N29S
			1	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	G	-	-	-	D25E/S71C	-	G	N29S
			1	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D25K	-	G	N29S
	Asian b	35	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D25E	-	-	-	
	(36)	1	-	-	-	-	A	-	-	-	G	-	-	-	-	T	D25E/N58K/E89D	-	-	-	
Non	Asian-American	(5)	5	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	-	Q14H/H78Y/L83V	-	-	-
European	African2	(1)	1	T	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	R10L/Q14D/H78Y	-	G	N29S

Ref: trình tự gen E6, E7 tham khảo tải từ Genbank, mã số HQ644236 [120]

\*Trình tự nucleotide tương ứng với các vị trí: 132, 143, 145, 176, 178, 182, 183, 276, 277, 293, 315, 335, 350, 370 trên E6 và 571, 647 trên E7

***Nhận xét:***

Đột biến thay thế nucleotid xuất hiện tại 14 vị trí khác nhau (dẫn đến thay đổi 10 bộ ba mã hóa acid amin) trên gen E6 và 2 vị trí nucleotid khác nhau (dẫn đến thay đổi 02 bộ ba mã hóa acid amin) trên gen E7 của HPV16. Tại gen E6, đột biến tại nucleotid vị trí 178, thay thế nucleotid T thành nucleotid G hoặc A xuất hiện với tỉ lệ cao nhất 80% (80/100). Riêng đột biến 178T>G chiếm 44% (44/100) và 178T>A chiếm 36% (36/100). Như vậy, biến thể T178G của sublineage Asian hay Asian a chiếm 44%; biến thể T178A sublineage Asian hay Asian b chiếm 36%.

Tuy nhiên, chỉ có 1 trường hợp, đột biến nucleotide đồng thời xuất hiện cả 2 vị trí 176 và 178, nucleotid G tại vị trí 176 bị thay thế bởi A (176G>A) đồng thời nucleotid T ở vị trí 178 thay thế bởi G (178T>G) nên acid amin Aspartic bị đột biến thành acid amin Lysin. Còn lại 79 trường hợp thay thế acid amin Aspartic bằng Glutamic. Một số đột biến thay thế nucleotid làm biến đổi bộ ba mã hóa acid amin khác xuất hiện trên sublineage Asian a và Asian b với tỉ lệ thấp. Ví như đột biến thay thế 183T>G làm biến đổi bộ ba mã hóa acid amin Isoleucin thành Arginin (I27R) - 2%; 277T>G (acid amin Asparagin thay bằng Lysin tại vị trí 58 - N58K) và 370A>T (acid amin Glutamic thay bằng Aspartic - E89D) - 1%; 293G>A (acid amin Aspartic thay bằng Asparagin - D64N) - 1%; 315C>G (acid amin Serin thay bằng Cystein - S71C) - 1%.

Đột biến thay thế nucleotid T bằng nucleotid G tại vị trí 350 (350T>G) dẫn tới acid amin Leucin ở vị trí 83 bị thay thế bằng acid amin Valine (L83V) xuất hiện với tỉ lệ khá thấp, chỉ 10% (10/100). Trong số đột biến 350T>G, một nửa số đó thuộc về sublineage European prototype 1 hay E-350G, số còn

lại thuộc sublineage Asian-American1. Cũng trong số đột biến E-350G, duy nhất 1 trường hợp có đột biến 182A> C (I27L)

Duy nhất 1 trường hợp có đồng thời 4 điểm đột biến thay thế nucleotid: 132G>T, 143C>G, 145G>T, 335C>T dẫn tới đồng thời thay đổi bộ 3 mã hóa cho acid amin Arginin thành Isoleucin tại vị trí số 10, glutamin thay thế bằng aspartic tại vị trí số 14 và Histidin thay bằng Tyrosin tại vị trí số 78 trên protein E6. Các điểm đột biến này thuộc về sublineage African 2.

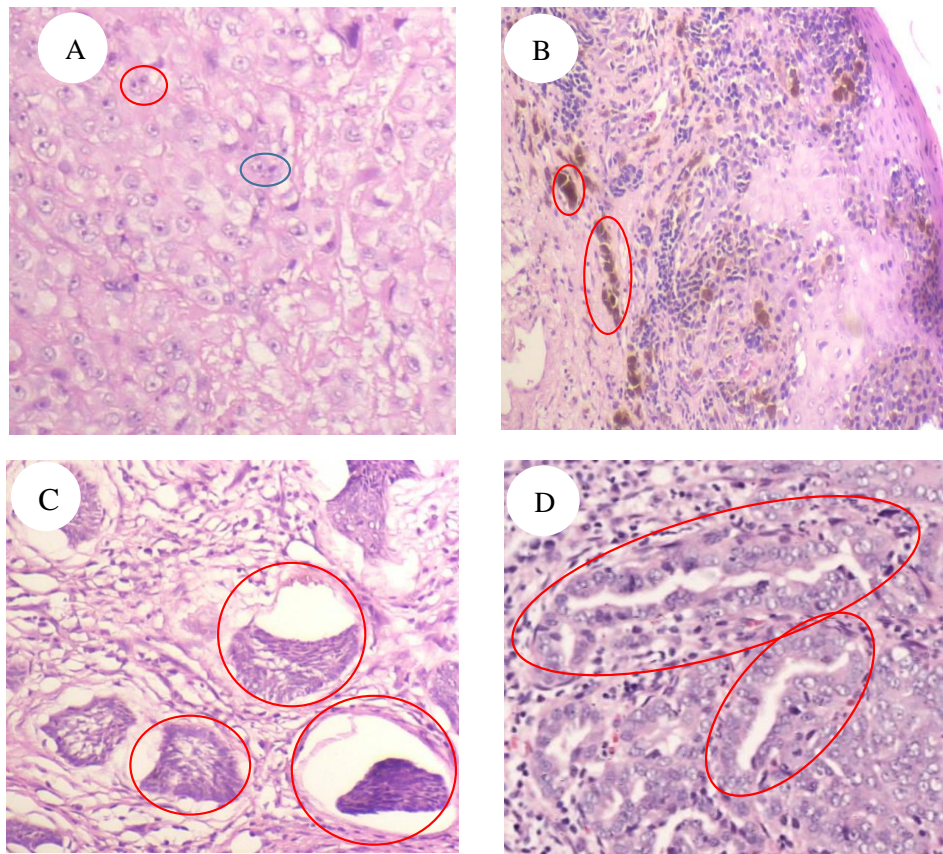
Tại vùng gen E7, chỉ có 2 vị trí đột biến thay thế nucleotid tại vị trí 571 (1% - 1/100) và 647 (45% - 45/100) dẫn tới thay đổi bộ ba mã hóa cho acid amin Aspartic thành Histidin tại vị trí số 4 và acid amin Asparagin thành Serin tại vị trí 29 trên protein E7.

Có tới 8% (8/100) các trường hợp không có đột biến thay thế nucleotid tại vị trí 350 và 178 hoặc 350 và 355. Số trường hợp này thuộc về sublineage E-350T.

### **3.3. Liên quan giữa genotype của HPV và loại tế bào ung thư**

#### **3.3.1. Loại tế bào tại mô ung thư**

Kết quả phân tích loại tế bào ung thư từ 214 bệnh nhân UTSDN cho thấy có 02 loại: tế bào ung thư gồm có ung thư tế bào biểu mô và ung thư hắc tố. Ung thư tế bào biểu mô gồm ung thư tế bào vảy, ung thư tế bào tuyến và một số loại ung thư tế bào khác như: ung thư hỗn hợp tuyến vảy, ung thư tế bào kính, ung thư tế bào thần kinh nội tiết, ung thư tế bào đáy tại mô UTSDN. Hình ảnh đại diện cho tổn thương ung thư tế bào vảy, ung thư tế bào tuyến, ung thư tế bào hắc tố và ung thư tế bào đáy được hiển thị ở hình 3.16.



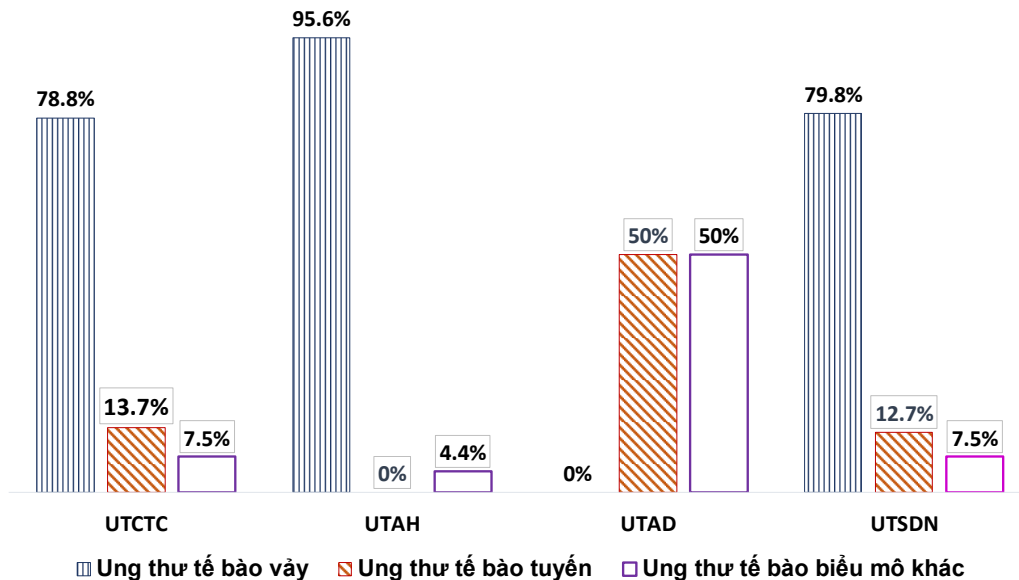
**Hình 3.16: Một số hình thái loại tế bào ung thư được nhuộm HE và quan sát ở vật kính 100**

Trong các hình tròn màu ở tiêu bản A): ung thư tế bào vảy không sừng hóa: hình các tế bào to nhỏ không đều sắp xếp thành từng đám, nhân không đều nhau; trong hình tròn màu xanh là hình ảnh tế bào nhân quai, trong hình tròn màu đỏ là hình ảnh tế bào nhân chia; B) hình ảnh ung thư tế bào hắc tố: các tế bào to nhỏ không đều, tập trung thành từng dải, tế bào chứa đầy hắc tố bào, xâm lấn mô đệm; C) ung thư tế bào đáy: các tế bào biểu mô sắp xếp thành từng đám, được bao bọc bởi những tế bào hình trụ, kiềm tính, nhân to nhỏ không đều xếp song song với nhau hình giậu; D) ung thư tế bào tuyến: các tế bào biểu mô sắp xếp hình ống tuyến, to nhỏ khác nhau, tế bào hình trụ, kiềm tính, nhân không đều.

**Nhận xét:**

Các tế bào ung thư tập trung thành từng đám, nhân tăng bất màu, kích thước to nhỏ không đều. Các tế bào vảy ung thư xếp cạnh nhau với kích thước nhân đa dạng, bất màu không đều. Tế bào hắc tố ung thư xếp thành dải, xâm nhập mô đệm, tế bào chứa đầy hắc tố, không quan sát rõ nhân. Các tế bào đáy ung thư tụ tập từng đám như tiểu đảo, quanh có các hốc rỗng. Tế bào tuyến ung thư nằm quanh các tuyến, chất nhân tăng bất màu.

Trong số 214 bệnh nhân UTSDN, 99,5% (213/214) trường hợp có tổn thương tế bào học loại ung thư tế bào biểu mô, chỉ duy nhất 01 trường hợp ung thư tế bào hắc tố, chiếm 0,5%. Khi phân tích tỉ lệ xuất hiện các loại tế bào ung thư biểu mô tại mô UTSDN, chúng tôi nhận thấy ung thư tế bào vảy chiếm tỉ lệ cao nhất - 79,8% (170/213), tiếp theo là ung thư tế bào tuyến chiếm 12,7% (27/213). Ngoài ra, các tế bào ung thư khác như tế bào tuyến vảy, tế bào kính, tế bào thần kinh nội tiết, tế bào đáy cũng xuất hiện với tỉ lệ thấp (7,5%-16/213). Chi tiết tỉ lệ từng loại tổn thương được hiển thị ở hình 3.17.



**Hình 3.17: Phân bố từng loại tế bào ung thư tại mô UTSDN**

### ***Nhận xét***

Tổn thương loại ung thư tế bào vảy thường gặp nhất ở mô UTCTC và UTAH (chiếm 78,7% (148/188) và 95,6% (22/23)). Ung thư tế bào tuyến ít gặp hơn ở mô UTCTC, chiếm 13,8% (26/188), không xuất hiện ở mô UTAH nhưng có 1 trong 2 bệnh nhân mắc UTAD có ung thư tế bào tuyến. Các loại ung thư thể hỗn hợp tuyến vảy, ung thư tế bào kính, ung thư tế bào thần kinh nội tiết chỉ chiếm 7,5% (14/188) các trường hợp UTCT, loại hỗn hợp tuyến vảy chỉ xuất hiện ở 1 bệnh nhân UTAD còn lại, ung thư tế bào đáy cũng chỉ xuất hiện 4,5% (1/23) bệnh nhân ung thư tế bào biểu mô âm hộ.

### ***3.3.2. Liên quan giữa genotype của HPV và loại tế bào ung thư***

#### ***3.3.2.1. Liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV với loại tế bào ung thư***

Để xác định sự khác biệt giữa genotype HPV với loại tế bào ung thư, trước hết, chúng tôi xem xét liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV với loại tế bào ung thư.

***Bảng 3.7: Liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV với loại tế bào ung thư***

<b>Nhiễm HPV</b>		<b>Ung thư tế bào biểu mô</b>	<b>Ung thư tế bào hắc tố</b>
HPV dương tính	n=172	172	0
	%	100	0
HPV âm tính	(n=42)	41	1
	%	97,6	2,4
Tổng số	n=214	213	1

### ***Nhận xét***

Toàn bộ số bệnh nhân nhiễm HPV mắc ung thư tế bào biểu mô (172/172). Bệnh nhân mắc ung thư tế bào hắc tố không nhiễm HPV; 41/42 số bệnh nhân không nhiễm HPV có tổn thương loại ung thư tế bào biểu mô. Không ghi nhận sự khác biệt giữa tình trạng nhiễm HPV và loại tế bào ung thư.

Chi tiết về liên quan giữa nhiễm HPV với các loại tế bào ung thư biểu mô được hiển thị ở bảng 3.8

**Bảng 3.8: Liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV với loại tế bào ung thư biểu mô**

Nhiễm HPV		Ung thư tế bào vảy	Ung thư tế bào tuyến	Ung thư tế bào biểu mô khác	p
HPV dương tính	n=172 %	140 81,4	19 11	13 7,6	0,34
HPV âm tính	(n=41) %	30 73,2	8 19,5	3 7,3	
Tổng số	n=213	170	27	16	

### **Nhận xét**

Trong nhóm nhiễm HPV có tới 81,4% (140/172) bệnh nhân mắc ung thư tế bào vảy; 11% (19/172) mắc ung thư tế bào tuyến và 7,5 % (13/172) mắc ung thư tế bào biểu mô khác. Không ghi nhận sự khác biệt giữa tình trạng nhiễm HPV với loại tế bào ung thư tại tế bào ung thư biểu mô với test Pearson - Chi square ( $p = 0,34$ ).

### **3.3.2.2 Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư**

Nhằm xác định sự phân bố khác biệt của HPV giữa các loại tế bào ung thư biểu mô, chúng tôi tiến hành phân tích liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư. Chi tiết ở bảng 3.9.



**Bảng 3.9: Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư biểu mô**

Nhiễm HPV		Ung thư tế bào vảy	Ung thư tế bào tuyến	Ung thư tế bào biểu mô khác	p
HPV16	n = 83	<b>76</b>	4	3	0,007
	%	<b>91,6</b>	4,8	3,6	
HPV16.18	n =31	23	5	3	
	%	74,2	16,1	9,7	
HPV18	n = 44	28	<b>10</b>	<b>6</b>	
	%	63,6	<b>22,7</b>	<b>13,7</b>	
Type khác	n =14	13	0	1	
	%	92,8	0	7,1	
Tổng	n =172	140	19	13	

**Nhận xét**

HPV16, HPV18 và HPV16,18 phân bố cao nhất ở loại ung thư tế bào vảy. Tỷ lệ nhiễm HPV16 ở ung thư tế bào vảy cao hơn ung thư tế bào tuyến và nhiễm HPV18 ở ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào khác cao hơn ung thư tế bào vảy. Sự khác biệt giữa phân bố HPV16, HPV 18 và đồng nhiễm HPV16, 18 với loại tế bào ung thư có ý nghĩa thống kê với  $p=0,007 (<0,05)$ .

**3.3.2.2 Liên quan giữa lineage của HPV16 với loại tế bào ung thư**

Do HPV16 phân bố tại ung thư tế bào vảy chiếm tỷ lệ cao nhất, do đó chúng tôi tiến hành xác định liên quan giữa phân nhóm dưới nhóm HPV16 với loại tế bào ung thư. Chi tiết ở bảng 3.10.

**Bảng 3.10: Liên quan giữa lineage của HPV16 với loại tế bào ung thư biểu mô**

Lineage		Ung thư tế bào vảy	Ung thư tế bào tuyến	Ung thư tế bào khác
European	n=94	<b>86</b>	5	3
	%	<b>91,5</b>	5,3	3,2
Non- European	n =6	<b>6</b>	0	0
	%	<b>100</b>	0	0
Tổng	n=100	<b>92</b>	5	3

#### **Nhận xét**

Phân nhóm dưới nhóm European phân bố ở tất cả các loại tế bào ung thư biểu mô; đặc biệt European và Non - European chiếm tỉ lệ cao nhất tại ung thư tế bào vảy. Các tế bào ung thư không phải là ung thư tế bào vảy đều không nhiễm HPV16 Non - European. Không ghi nhận sự khác biệt giữa phân nhóm dưới nhóm của HPV16 với loại tế bào ung thư biểu mô

Như đã mô tả ở mục 3.2.4.3, lineage của HPV16 có một số sublineage đã xác định, do đó, chúng tôi tiếp tục tìm sự liên quan giữa sublineage của HPV16 với loại tế bào ung thư, chi tiết được mô tả tại bảng 3.11

**Bảng 3.11: Liên quan giữa sublineage của HPV16 với loại tế bào ung thư biểu mô**

Sublineage		Ung thư tế bào vảy	Ung thư tế bào tuyến	Ung thư tế bào khác
Asian	n = 80	<b>72</b>	5	3
	%	<b>90,0</b>	6,3	3,7
European prototype	n = 14	<b>14</b>	0	0
	%	<b>100</b>	0	0
Asian American a	n = 5	<b>5</b>	0	0
	%	<b>100</b>	0	0
African a	n = 1	<b>1</b>	0	0
	%	<b>100</b>	0	0
Tổng số	n = 100	<b>92</b>	5	3

**Nhận xét:**

Sublineage Asian xuất hiện ở tất cả các dạng loại tế bào ung thư biểu mô. Tất cả các sublineage đều xuất hiện ở ung thư tế bào vảy. Tuy nhiên, sự khác biệt về nhiễm sublineage Asian ở các loại tế bào ung thư biểu mô không có ý nghĩa thống kê.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Đặc điểm về tuổi của đối tượng nghiên cứu

Tuổi trung bình chung của nhóm đối tượng nghiên cứu khá cao, hầu hết ở độ tuổi đã suy giảm hoạt động tình dục ( $52,7 \pm 12,5$ ). Riêng nhóm mắc UTCTC có độ tuổi trung bình ( $50,9 \pm 11,4$ ) trẻ hơn 2 nhóm ung thư còn lại. Đặc biệt, cả 02 bệnh nhân UTAĐ đã ở độ tuổi mãn dục ( $\geq 50$  tuổi); hầu hết bệnh nhân UTAH và đa số bệnh nhân UTCTC cũng ở độ tuổi này. Kết quả khi phân chia tuổi của đối tượng nghiên cứu thành các nhóm cho thấy tỉ lệ mắc UTCTC tăng dần theo lứa tuổi; từ 1,1% ở nhóm <20 tuổi; 2,1% - nhóm 20-29 tuổi; 14,9% - nhóm 30-39 tuổi; 21,8% - nhóm 40-49 tuổi và 60,1% - nhóm từ 50 tuổi trở lên. Khi tính chung cho cả nhóm đối tượng, hơn 3/5 số đối tượng nghiên cứu ở độ tuổi trên 50. Vậy, sự khác nhau về phân bố độ tuổi ở từng loại ung thư của nhóm nghiên cứu liệu có liên quan tới tình trạng nhiễm HPV cũng như nguyên nhân gây ung thư ở các mô ?

Kết quả về độ tuổi trung bình mắc UTSDN của nghiên cứu cũng hoàn toàn tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới. Theo Tornessello M.L, tuổi trung bình của những bệnh nhân mắc UTCTC là  $55,0 \pm 15,0$  tuổi, cao hơn nhóm bệnh nhân có kết quả mô bệnh học cổ tử cung bất thường như CIN [120]. Faezed K, trong nghiên cứu của mình cũng chỉ ra rằng, nguy cơ mắc UTCTC tăng dần ở những phụ nữ trên 30 tuổi và cao nhất ở nhóm 55-65 tuổi [121]. Tại Israel, tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân mắc UTAH là 72,4 tuổi và UTAĐ là 63 tuổi; 72,9% bệnh nhân UTAH và 36,8% bệnh nhân UTAĐ trên 70 tuổi [107]. Với một nước phát triển như Đức, độ tuổi trung bình mắc UTAH cũng khá trẻ so với các nghiên cứu trên  $55 \pm 15,5$  [108]. Bên cạnh đó, bệnh nhân mắc UTAH tại Thái Lan cũng ở độ tuổi trung bình  $57,9 \pm 13,2$  [110].

Như vậy, những bệnh nhân dù mắc UTCTC, UTAH hay UTAD, dù ở Việt Nam hay các nước khác, đa số đều ở độ tuổi mãn dục.

Tế bào chế có lập trình và sự hình thành khối u đã lý giải cho độ tuổi trung bình khá cao ở nhóm đối tượng nghiên cứu. Dưới tác động của các yếu tố trong môi trường như: tia tử ngoại, thuốc lá, hóa chất... và các phản ứng viêm đã hình thành các gốc tự do. Các gốc tự do gây đột biến trên chuỗi đơn DNA[123]. Các tế bào luôn tự sửa chữa các DNA khiếm khuyết trước mỗi lần phân bào [124]. Protein p53 được mã hóa bởi gen TP53 vốn được biết đến như một tác nhân áp chế khối u thông qua hoạt động duy trì tính ổn định của bộ gen. Sự đứt gãy DNA và các yếu tố kích thích như stress oxy hóa, sốc thẩm thấu, nhiễm vi rút kích thích hoạt động của p53 [44]. Vai trò làm chậm lại chu trình phân bào, cho phép các DNA tổn thương được sửa chữa thuộc về protein p53. p53 cũng đồng thời khởi động chết tế bào có lập trình nếu DNA bị tổn thương nặng. Do đó, bất hoạt p53 dẫn tới tích lũy tế bào chứa gen đột biến và là cơ sở hình thành khối u [43].

Các tế bào cần cả một khoảng thời gian dài trải qua tác động của các yếu tố gây tổn thương DNA. Chính sự tích lũy các đột biến DNA qua mỗi lần phân bào không được sửa chữa dẫn tới biểu hiện ung thư của hầu hết bệnh nhân đã ở độ tuổi khá cao.

## **4.2. Phân bố genotype của HPV**

### **4.2.1. Độ tinh sạch DNA của HPV sau tách chiết**

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, Sigma Alderich, mỗi mẫu mô bệnh phẩm tươi với khối lượng khoảng 2mg sẽ được cắt nhỏ bằng dao phẫu thuật vô khuẩn. Enzym proteinase K với vai trò thủy phân các protein được bổ sung vào trong quá trình tách DNA nhằm thủy phân các protein, giảm thiểu tối đa sự có mặt của protein trong dịch sau tách chiết. DNA được rửa bởi alcol ethanol và thu hồi từ dung dịch bằng cách ly tâm với tốc độ 6,500xg, loại bỏ

dịch trong. DNA tinh sạch được hòa tan trở lại và kiểm tra độ tinh sạch trên máy Spectrophotometric.

DNA hấp thụ ánh sáng tối đa ở bước sóng 260 nm và thấp hơn ở bước sóng 280 nm. Ngược lại, protein hấp thụ ánh sáng tối đa ở bước sóng 280 nm và thấp hơn ở bước sóng 260 nm. Chính vì vậy, áp dụng công thức tính độ tinh sạch của DNA của Maniatis [125]:

$$A_{260}/A_{280} = \frac{(\epsilon_{260,p} \times (\%P) + \epsilon_{260,n} \times (\%N))}{(\epsilon_{280,p} \times (\%P) + \epsilon_{280,n} \times (\%N))}$$

Cho thấy, tỉ lệ mật độ quang trung bình của DNA và protein trong nghiên cứu ở 2 bước sóng 260 và 280 nm là  $1,81 \pm 0,06$ , dao động từ 1,62 - 1,96. Kết quả trên chỉ ra rằng, protein trong mẫu bệnh phẩm đã được loại bỏ và DNA đủ tinh sạch và nồng độ DNA trong dung dịch đủ lớn để sử dụng cho các bước kỹ thuật phân tích gen tiếp theo .

#### **4.2.2. Tỉ lệ nhiễm HPV**

Các nghiên cứu trước cho thấy rằng, gen muợn L1 của HPV, mặc dù với kích thước 140 cặp base nito nhưng đã được sử dụng để xác định nhiễm HPV [10],[96],[97]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, cặp môi gốc GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> original được sử dụng để khuếch đại gen L1 nhằm đạt được số bản DNA đủ nhiều để phát hiện nhiễm HPV tại các mẫu bệnh phẩm. Với những mẫu bệnh phẩm âm tính, chúng tôi tiếp tục sử dụng cặp môi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> để phát hiện. Kết quả chỉ ra rằng 10/20 bệnh phẩm UTCTC âm tính với cặp môi gốc GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> original đã được phát hiện bởi cặp môi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup>. Từ năm 1995, de Roda Husman đã thành công trong việc sử dụng cặp môi GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> thay thế cho cặp môi GP5/6 để phát hiện HPV. Độ nhạy của cặp môi GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> cao hơn cặp môi (từ 39% đã tăng lên 43%), đặc biệt, những loại HPV thường gặp như HPV6, 11, 16, 18, 31, 33 âm tính với cặp môi gốc nhưng vẫn phát hiện được bằng cặp môi bổ sung [126]. Năm 2008, Yamada và cộng sự cũng

đã sử dụng cặp mồi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/MGP6<sup>+</sup> nhằm giảm thiểu tình trạng bắt nhầm giữa cặp mồi và DNA của HPV [127]. Như vậy, sử dụng 02 cặp mồi đã tăng khả năng phát hiện nhiễm HPV tại mô UTCTC. Khi đối chiếu với kết quả genotype của 10 mẫu bệnh phẩm được phát hiện nhiễm HPV bằng cặp mồi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup>, nghiên cứu chỉ ra rằng 4/10 trường hợp đơn nhiễm HPV18, 3/10 trường hợp đơn nhiễm HPV52; 01 trường hợp đồng nhiễm HPV18,52; 01 trường hợp nhiễm HPV16 và 01 trường hợp nhiễm HPV31. Như vậy, cặp mồi bổ sung tăng hiệu quả phát hiện không chỉ HPV18 mà còn cả HPV52, HPV16 và HPV31.

Sản phẩm DNA của gen L1 sau khuếch đại tiếp tục được điện di trên gel agarose 2%, nhuộm bromide và chụp lại bằng tia UV. Những đoạn băng kích thước 140 cặp base nitơ đủ sắc nét để quan sát được bằng mắt thường là bằng chứng cho sự nhiễm HPV tại mẫu bệnh phẩm.

Kết quả của nghiên cứu đã chỉ ra 80,4% các mẫu bệnh phẩm UTSDN nhiễm HPV, trong số đó, tỉ lệ nhiễm HPV cao nhất tại mô UTCTC (89,4%), thấp nhất là UTAH (2,5%). Cho tới thời điểm hiện tại, các nghiên cứu về UTSDN trên thế giới mới chỉ dừng lại ở các nghiên cứu riêng biệt UTCTC, UTAH, UTAĐ mà ít có nghiên cứu tiến hành đồng thời trên cả 03 nhóm ung thư trên, do đó chưa có căn cứ để so sánh với tỉ lệ nhiễm HPV trong nhóm đối tượng của nghiên cứu. Chính vì vậy, nghiên cứu tách riêng từng nhóm ung thư để phân tích.

Xét nhóm UTCTC, các nghiên cứu trước đó trên thế giới chỉ ra các tỉ lệ nhiễm HPV khác nhau, nhưng đều dao động từ 80-98% [93],[99],[100],[101]. Tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC xâm lấn ở Brazil là 98,8%; tại mô sinh thiết ở Maroc - 91,5% [99],[100]. Tại Italy, tỉ lệ nhiễm HPV xác định từ khối nền đường như thấp hơn (81,8%) [126]. Có lẽ, những đặc điểm về địa lý, văn hóa, môi trường, lối sống dẫn tới tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC khác nhau ở các

vùng. Hơn nữa, HPV không phải là tác nhân trực tiếp gây tổn thương DNA mà là các yếu tố môi trường như khói thuốc lá, hóa chất...[123]. Với lối sống khác nhau, các tác nhân gây tổn thương DNA khác nhau có lẽ đã dẫn tới tỉ lệ nhiễm HPV khác nhau ở các vùng địa lý khác nhau.

Bằng nghiên cứu trên thực nghiệm, Wei đã chứng minh được rằng, khói thuốc lá làm tăng khả năng sao chép của gen ung thư E6 HPV trong các dòng tế bào nhiễm HPV sinh thiết từ tổn thương CIN nuôi cấy tăng. Tăng tần suất đột biến DNA của tế bào có thể nhận HPV [71]. Nitro oxyd (NO) sinh ra từ các phản ứng viêm làm thay đổi đáng kể tỉ lệ UTCTC trên thực nghiệm [74]. Những phụ nữ có sử dụng thuốc tránh thai trên 10 năm có tỉ lệ mắc UTCTC cao hơn gấp 4,1 lần so với nhóm không sử dụng thuốc tránh thai [73]. Những tác nhân trên đột biến trên chuỗi DNA, cần tới sự sửa chữa DNA ở các pha G1/S [44],[128]. Dưới tác dụng của protein p53 và protein Rb, DNA được sửa chữa trước mỗi lần phân bào bằng các cơ chế khác nhau. Chỉ khi protein p53 và Rb bị bất hoạt hoặc giáng hóa bởi protein E6, E7 của HPV, vai trò sửa chữa DNA tế bào của chúng mới bị vô hiệu hóa, dẫn tới hình thành khối u [45].

Ngay tại Việt Nam, nghiên cứu của Nguyễn Phi Hùng và cộng sự tiến hành xác định HPV từ khối u, sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen E6 chỉ để khuếch đại gen sớm E6 của HPV6, 11, 16, 18 thì tỉ lệ nhiễm HPV chỉ có 84,4% [11]. Việc chỉ sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho 4 loại HPV trên đã bỏ qua nhiều loại HPV có thể có nhiễm tại mẫu bệnh phẩm, dẫn tới tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC không xác thực. Ưu thế vượt trội của nghiên cứu là sử dụng mẫu bệnh phẩm tươi (sinh thiết), cặp mồi có độ nhạy, độ chính xác ở thời điểm hiện tại, do đó tỉ lệ nhiễm HPV của nghiên cứu phản ánh chính xác tỉ lệ nhiễm HPV và phân bố các loại HPV tại mô UTCTC của phụ nữ Việt Nam.



Với nhóm UTAH, tỉ lệ nhiễm HPV của nghiên cứu rất khác biệt so với các nghiên cứu trên thế giới. Xác định HPV trên mẫu bệnh phẩm mô UTAH sinh thiết tươi, 2 nghiên cứu tại châu Âu như, Sieger E. đã chỉ ra rằng tỉ lệ nhiễm HPV ở phụ nữ UTAH tại Israel 60%, Hample và cộng sự cũng cho thấy tỉ lệ đó ở Đức là 60,4% (29/48) [107],[108]. Tuy nhiên, khi xác định từ khối đúc nên, van de Nieuwenhof đưa ra tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTAH tại Hà Lan chỉ là 34,6% [109]. Nhưng tại Thái Lan, Siriaunkgul và cộng sự đã khuếch đại gen L1 bằng kỹ thuật PCR lồng với 2 cặp mồi: cặp mồi MY để khuếch đại đoạn gen 450 cặp base ni tơ và cặp mồi GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> để khuếch đại đoạn gen L1 kích thước 140 cặp base ni tơ, chỉ ra rằng tỉ lệ nhiễm HPV tại những mẫu bệnh phẩm ung thư biểu mô âm hộ tách từ khối nên lên tới 61,7% (29/47) [110]. Trong khi đó, kết quả của nghiên cứu chỉ là con số rất khiêm tốn: 12,5% (3/24) mẫu UTAH sinh thiết tươi nhiễm HPV. Không chỉ yếu tố địa lý, văn hóa, lối sống mà cỡ mẫu, loại bệnh phẩm và cả kỹ thuật phân tử sử dụng trong nghiên cứu đã tạo nên sự khác biệt rõ rệt trong các nghiên cứu. Có lẽ, với phụ nữ Việt Nam, HPV không phải là yếu tố chính can thiệp vào quá trình hình thành UTAH.

Cũng như kết quả của các nghiên cứu trên thế giới, so với UTCTC, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTAH thấp hơn rất nhiều so với UTCTC. Có lẽ do cấu tạo mô học của âm hộ vừa là lớp biểu mô vảy sừng hóa khác với cổ tử cung, toàn bộ niêm mạc được bao phủ bởi biểu mô vảy không sừng hóa dẫn tới mức độ tổn thương khác nhau, dẫn tới sự nhiễm HPV khác nhau. Hơn nữa, có thể các tổn thương âm hộ ở vị trí dễ được phát hiện bởi cả bệnh nhân và bác sĩ hơn tổn thương cổ tử cung nên được phát hiện và điều trị sớm, dẫn tới cả số lượng bệnh nhân lẫn tỉ lệ nhiễm HPV giảm rõ rệt.

Zannoni và cộng sự đã phát hiện 2 receptor của estrogen: ER $\alpha$  mất hoàn toàn, ER $\beta$  giảm và protein E-cadherin cũng giảm ở những bệnh nhân UTAH âm tính với HPV [129]. Hormon estrogen được tiếp nhận bởi thụ thể trên màng nhân tế bào. Estrogen tác động đến biểu hiện gen p53 bằng việc gắn vào điểm đầu sao mã của p53. Hơn nữa, nhóm tuổi của phụ nữ mắc UTAH cao nhất trong số UTSD. Lượng estrogen giảm làm giảm quá trình tổng hợp p53, giảm sửa chữa DNA tổn thương. Cùng với thụ thể estrogen khiến protein tiền ung thư E-cadherin giảm, giảm liên kết giữa các tế bào [130]. Phải chăng, hormon estrogen là yếu tố chủ yếu tác động đến UTAH chứ không phải là HPV?

Nếu như tỉ lệ thô mắc UTCTC trong cộng đồng là 13/100000 phụ nữ trên 15 tuổi, thì tỉ lệ UTAD thấp hơn rất nhiều lần, chỉ từ 0.1-0.2/100000 [131]. Chính vì vậy, suốt 4 năm thu thập số liệu, chúng tôi chỉ tiếp cận được 2 phụ nữ mắc UTAD. Dù chỉ có 01 trong số 02 mẫu bệnh phẩm đã xác định được HPV nhưng tỉ lệ nhiễm HPV ở mô UTAD cũng tương đương so với nghiên cứu của Larsson tại Thụy Điển - 53,6%, (37/59) nhưng thấp hơn so với nghiên cứu của Siegler tại Israel - 66,7% (4/6) [107],[111]. Nếu như yếu tố nguy cơ hàng đầu của UTCTC là HPV thì với UTAD, có lẽ HPV cũng không phải là ngoại lệ. Theo Castle, tại Costa Rica, tỉ lệ nhiễm HPV tại cả bệnh phẩm âm đạo và cổ tử cung bệnh không có sự khác biệt với  $p = 0,3$  [132]. Nhưng rõ ràng, qua các nghiên cứu đã liệt kê ở trên về UTCTC và UTAD thì tỉ lệ nhiễm HPV ở mô UTCTC cao hơn nhiều so với UTAD.

Để khẳng định UTSDN không chỉ do bởi nhiễm HPV mà còn do các yếu tố khác, đặc biệt là hormon sinh dục nữ, chúng tôi đã phân chia tuổi của đối tượng nghiên cứu thành các nhóm tuổi sinh học: <20, 20-30, 30-40, 40-50 và từ 50 tuổi trở lên nhưng không thấy có sự khác biệt về tỉ lệ nhiễm HPV ở các nhóm tuổi. Khi phân chia độ tuổi của nhóm đối tượng theo độ tuổi sinh

sản: <30 tuổi, 30-50 và từ 50 tuổi trở lên, nghiên cứu đã chỉ ra nhóm UTSDN ở độ tuổi mãn dục  $\geq 50$  nhiễm HPV ít hơn các nhóm tuổi còn lại có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ ; mặc dù như đã đề cập ở trên, tỉ lệ UTSDN ở độ tuổi  $\geq 50$  cao nhất. Có lẽ nhiễm HPV dai dẳng từ tuổi trẻ cùng với sự suy giảm hormon sinh dục nữ và các tác động của yếu tố môi trường khiến cho ung thư phát triển ở độ tuổi  $\geq 50$ . Sự không tương đồng về tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC, UTAD và UTAH có lẽ bắt nguồn từ sự khác biệt về cấu tạo mô học, tính chất tổn thương.

#### **4.2.3. Phân bố genotype của HPV**

Kỹ thuật lai thâm điểm ngược trên màng (reverse dot blot hybridization - RDBH) sử dụng chuỗi DNA đơn (DNA probe) của mỗi HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 6, 11, 42, 43, 44, CP8304 (81) gắn sẵn trên từng ô riêng biệt của màng lai. DNA đích được biotin hóa bằng cách khuếch đại với các acid nucleic có gắn biotin. Sự bắt cặp đặc hiệu giữa sợi đơn DNA đích và DNA probe tạo chuỗi kép DNA cố định trên màng. Chuỗi kép DNA chứa biotin sẽ liên kết đặc hiệu với hỗn hợp streptavidin - alkaline phosphat trong dung dịch enzym, có tác dụng thủy phân gốc phosphat ra khỏi phức nitro blue tetrazolium, bromo-chloro-indolyl phosphat dẫn tới sự hình thành phức màu tím. Phức màu tím xuất hiện ở mẫu nhiễm loại HPV tương ứng dương tính. Các liên kết giữa các thành phần phản ứng có độ đặc hiệu cao. Hơn nữa, trên màng lai cũng có chứng nội HPV dương tính và chúng chỉ có biotin nhằm loại trừ những trường hợp HPV âm tính giả.

Ưu thế vượt trội của kỹ thuật RDBH so với kỹ thuật giải trình tự DNA trực tiếp (DNA direct sequencing) chính là phát hiện nhiễm nhiều loại HPV trong mỗi lần thực hiện kỹ thuật. Hơn nữa, độ nhạy, độ chính xác của kỹ thuật RDBH cũng cao hơn kỹ thuật giải trình tự DNA trực tiếp khi tiến hành trên trực khuẩn lao và tương đương nhau khi xác định loại HPV [133],[134]. Như vậy, lựa chọn kỹ thuật RDBH là hoàn toàn đủ độ tin cậy cho nghiên cứu.

Tất cả các mẫu nhiễm HPV trong nghiên cứu đều thuộc nhóm HPV nguy cơ cao dù đơn nhiễm hay đồng nhiễm nhiều loại và tình trạng đơn nhiễm HPV chiếm đa số, tới 73,4 %. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Tonesello M.L [101]. Nhưng ngược lại, đồng nhiễm HPV lại phổ biến ở gái mại dâm - 61,2% [10]. Với đặc trưng của HPV nhóm nguy cơ cao, sau sẽ bỏ lại vỏ protein, chỉ sợi DNA được khi xâm nhập, biến nạp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ tạo thể nhân và cũng được nhân lên cùng với nhiễm sắc thể trong mỗi chu kỳ tế bào [32]. Các gen sớm E biểu hiện protein tác động lên tế bào chủ. Với số lượng khoảng 50 bản sao trong 1 tế bào, protein E1 có vai trò như enzym tháo xoắn DNA helicase, protein E2 tương tác với E1 cùng gắn vào vị trí sao chép *ori* tạo phức hợp E1-E2-*ori*, liên kết chặt chẽ với DNA tế bào chủ [30],[34]. Protein E4 tăng cường sùng hóa tế bào [37]. Protein E5 hoạt hóa thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô và tăng điều hòa yếu tố phát triển mạch máu, ức chế con đường chết tế bào [37],[38]. Như vậy, protein E5 có vai trò rất lớn trong việc thúc đẩy sự phát triển tế bào. Protein E6 tăng giáng hóa protein p53, ngăn chặn sự tự sửa chữa DNA, duy trì sự biến nạp ổn định của HPV trên DNA của tế bào chủ [46]. Protein E7 gắn với protein áp chế khối u pRb, ức chế chu trình chết của tế bào [53]. Các protein của HPV ác tính có chức năng duy trì bộ gen HPV trong tế bào chủ và duy trì tốc độ phân bào không kiểm soát dẫn tới sự hình thành khối u. Với sự hiện hữu của các protein của HPV, khi các DNA tế bào chủ bị tổn thương do các tác nhân vật lý hay hóa học sẽ được tích lũy và nhân lên liên tục qua các lần phân bào là cội nguồn cho các khối u ác tính ra đời. Các hạt vi rút hoàn chỉnh được giải phóng cùng với sự bong ra các tế bào chết khi các tế bào nhiễm vi rút phân chia tiến tới bề mặt lớp biểu mô bắt đầu chu kỳ lây nhiễm mới [20]. Sau khi xâm nhập vào tế bào chủ, hầu hết các HPV loại nguy cơ thấp sẽ bị loại bỏ bởi hệ thống miễn dịch. Những vị trí acid amin trên E6 bị nhận diện bởi hệ thống miễn dịch như: 3, 11, 14, 25, 27, 55, 58, 60, 78, 83 và trên E7 như 22- 26

[135]. Có lẽ đột thay thế các acid amin tương ứng với các vị trí trên khiến hệ thống miễn dịch của cơ thể chủ không nhận diện được. Đó cũng là lý do khiến HPV loại nguy cơ cao tồn tại và gây các bệnh lý u trên cơ thể chủ.

Xét phân bố genotype của HPV tại mô UTSDN, chúng tôi chia làm 2 nhóm, đơn nhiễm và đồng nhiễm HPV. Ở nhóm đơn nhiễm, nhiễm HPV16 cao nhất, chiếm tới 57,5% (73/127); tiếp đến là HPV18, 33,1% (42/127); đứng thứ 3 là HPV52 chiếm tỉ lệ thấp - 2,3% (3/127). HPV nguy cơ cao khác như HPV31, HPV33, HPV45, HPV58, HPV59 chỉ chiếm tỉ lệ rất thấp 0,8% - 1,6%. Trong nhóm đồng nhiễm, đồng nhiễm HPV16,18 phổ biến nhất, tới 68,8% (31/45); tiếp theo lần lượt là HPV16 và loại khác 22,2% (10/45), nhiễm HPV18 và loại khác 4,4% (2/45). Trong nhóm đồng nhiễm này, nhiễm HPV52 hoặc cùng với HPV16 hoặc với HPV18. Tính cho cả 2 nhóm đơn nhiễm và đồng nhiễm, tỉ lệ nhiễm HPV16, HPV18, HPV52, đồng nhiễm HPV16,18 lần lượt là 47,6% (80/168), 26,2% (44/168), 4,8% (8/168) và 17,9% (30/168) ở mô UTCTC và 48,3% (83/172), 25,6% (44/172), 4,6% (8/172) và 17,4% (30/172) ở mô UTSDN. Khi tính theo số chủng (chủng), nhiễm HPV16 vẫn là cao nhất - 43,5%, tiếp đến HPV18 - 23%, HPV16,18 - 16,2% và thứ 4 là HPV52 - 4,2%. Kết quả này cũng không có sự khác biệt khi tách riêng từng nhóm ung thư như UTCTC. Nhóm UTAH, UTAD cũng cho thấy nhiễm HPV16 là phổ biến nhất.

Sự phân bố genotype của HPV tại mô UTSDN trong nghiên cứu này so với các nghiên cứu khác trên thế giới, tuy tỉ lệ nhiễm có khác nhau nhưng tỉ lệ nhiễm HPV16 chiếm đa số vẫn là đặc trưng cho tất cả các nghiên cứu. Từ Brazil, tỉ lệ nhiễm HPV16 là 77,6%; Maroc - 87,3% cho tới Italy - 68,6%; Nhật Bản 40,5%; Thái Lan 35,8%; nhiễm HPV18 đứng thứ 2 tại mô UTCTC [99],[100],[101],[102],[103]. Tuy số lượng bệnh nhân UTAD, UTAH có ít hơn rất nhiều so với UTCTC nhưng HPV16 vẫn là phổ biến nhất [107], [108],[109], [110].

So với tình trạng nhiễm HPV tại gái mại dâm Việt Nam, Philippin, Nhật Bản..., nhiễm HPV52 chiếm tỉ lệ cao nhất, tiếp đến HPV16, thì tại nghiên cứu này cũng như các nghiên cứu khác trên thế giới về UTSDN, tỉ lệ nhiễm HPV16 và 18 lại phổ biến hơn HPV52 [10],[96],[97]. Như vậy, có sự khác biệt về tình trạng nhiễm HPV ở các đối tượng nghiên cứu khác nhau hay nói cách khác, độ ác tính khác nhau giữa HPV16, 18 và HPV52 gây nên các tình trạng bệnh lý khác nhau. Có lẽ, HPV52 không ác tính bằng HPV16 và HPV18, đã được loại bỏ trong quá trình nhiễm bởi hệ thống miễn dịch của cơ thể chủ. HPV16, 18 với độ ác tính cao đặc trưng cho UTSDN, HPV52 đặc trưng cho khả năng lây nhiễm nhưng nguy cơ ung thư hóa thấp hơn rất nhiều so với HPV16, 18.

Như vậy, vắc xin sử dụng phòng nhiễm HPV đang sử dụng tại Việt Nam, được thiết kế trên trình tự gen L1 của HPV, nhằm tạo hệ thống miễn dịch loại bỏ capsid HPV bám vào tế bào chủ vẫn đủ sức thuyết phục. Tuy nhiên, bổ sung các loại khác như HPV 31, 33, 45, 52, 58, 59 là cần thiết.

Độ ác tính của các loại HPV nguy cơ cao còn được thể hiện qua phân bố của genotype theo nhóm tuổi. Chúng tôi không xác định được HPV đơn lẻ tại nhóm bệnh nhân mắc UTSDN dưới 30 tuổi nhưng đã xác định được cả 2 loại HPV16 và HPV18 đồng nhiễm tại mô UTCTC của 100% bệnh nhân dưới 20 tuổi. Nhiễm HPV16 tăng dần từ độ tuổi 30, đạt tối đa ở độ tuổi tiền mãn kinh 40-50 và giảm dần ở độ tuổi trên 50; tuy nhiên, phân bố HPV16 ở nhóm trên 50 tuổi dường như cao hơn ở nhóm dưới 40 tuổi. Tỉ lệ nhiễm HPV18 cũng xuất hiện ở nhóm trong độ tuổi sinh đẻ và giảm dần sau 40 tuổi. Biểu đồ 3.3 đã thể hiện sự ác tính khi đồng nhiễm HPV16, 18 ở tuổi trẻ là rất cao với nguy cơ ung thư 100% và sự tồn tại dai dẳng của HPV16, HPV18. Theo Plummer, HPV đã tự loại bỏ khỏi mô cổ tử cung ở 43% phụ nữ sau 6 tháng nhiễm HPV, không để lại tổn thương giải phẫu bệnh, và sau 18 tháng, tỉ lệ tự

loại bỏ HPV lên tới 65%. Tuy nhiên, HPV16, 18, 31, 33 vẫn tồn tại dai dẳng nhất và chỉ có 19% trường hợp HPV16 tự loại bỏ sau 18 tháng nhiễm ở bệnh nhân có bất thường mô bệnh học cổ tử cung [64]. Phải mất 10 năm, sự tích lũy các đột biến nhiễm sắc thể qua các lần phân bào mà 17,2% số phụ nữ nhiễm HPV16; 13,6% nhiễm HPV18; 3,0% đồng nhiễm HPV16 hoặc HPV18 có kết quả mô bệnh học bình thường phát triển thành CIN3 và ung thư [66].

Qua tổn thương trên bề mặt lớp tế bào biểu mô, HPV sẽ xâm nhập vào lớp màng đáy của tế bào chủ, sử dụng vật chất di truyền trong tế bào chủ, nhân lên với số lượng bản sao mã rất thấp. Bằng cách này, HPV đã không bị hệ thống miễn dịch chủ phát hiện. Các protein muộn chỉ được biểu hiện khi tế bào mang vi rút phân chia đến lớp tế bào sừng, nơi các tế bào thâm quyền miễn dịch như tế bào dendritic và tế bào Langerhans khó có thể kiểm soát. Do đó, không có sự ly giải tế bào, không có hiện tượng tế bào chết và cũng không có biểu hiện viêm [136].

Như vậy, trải qua cả một thời gian dài nhân lên trong tế bào chủ, những HPV nguy cơ cao không bị loại bỏ, sẽ tác động lên quá trình phân bào dẫn đến hình thành bệnh lý ác tính. Chính vì vậy, ở độ tuổi hoạt động tình dục, nguy cơ nhiễm HPV rất cao. Sự tích lũy các tổn thương đến khi biểu hiện bệnh hầu hết ở độ tuổi mãn dục. Câu hỏi đặt ra với nghiên cứu, bằng cách nào, HPV16 có thể thoát khỏi hệ thống miễn dịch của tế bào chủ. Liệu phân nhóm dưới nhóm của HPV16 có khác biệt gì so với các nghiên cứu trên thế giới?

#### **4.2.4. Sublineage HPV16**

Từ 114 mẫu bệnh phẩm nhiễm HPV16, chúng tôi đã tiến hành giải trình tự toàn bộ gen E6 kích thước 549 bp và gen E7 kích thước 415 bp của HPV16 qua các bước: khuếch đại gen E6, E7; điện di xác định sản phẩm sau khuếch đại và giải trình tự trực tiếp. Cặp mồi và thể tích các phản ứng

khuếch đại gen E6, E7 của HPV16 đã được Ishizaki cùng cộng sự tiến hành thành công và được sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi [98].

Các hình ảnh điện di của toàn bộ 114 mẫu bệnh phẩm đã khuếch đại được thể hiện qua các băng điện di sắc nét, rõ ràng với kích thước tương đồng với kích thước dự đoán ban đầu. Tuy nhiên, khi tiến hành giải trình tự, chỉ có 100 mẫu bệnh phẩm UTCTC cho trình tự nucleotid đầy đủ và rõ ràng. Còn lại 14 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi không tiến hành pha loãng giải trình tự lần 2 vì với số lượng 100 trình tự đã đủ tin cậy để phân tích số liệu.

Để thuận lợi cho việc phát hiện đột biến trên gen E6, E7 của HPV16, chúng tôi sử dụng đoạn gen E6, E7 của HPV16 sublineage European prototype từ nghiên cứu đã được công bố trên GenBank để so sánh [120]. Nhằm phát hiện phân nhóm dưới nhóm HPV16, chúng tôi áp dụng tiêu chí chẩn đoán của Huertas-Salgado [19]. Hầu hết HPV16 trong nghiên cứu (94% - 94/100) thuộc nhóm European, phần lớn số đó (85% - 80/94) thuộc sublineage Asian và hơn nửa số sublineage Asian (55% - 44/80) là loại As (a), số còn lại là As (b). Sublineage European prototype chiếm số lượng ít hơn nhiều, 14,9% (14/94) với 2 loại đột biến G350 (35,7% - 5/14) và T350 (64,3% - 9/14). Nhóm Non European với tỉ lệ thấp-6%, trong đó chủ yếu là sublineage Asian American a (83,3% - 5/6) và chỉ có 1 trường hợp mang sublineage African a. Như vậy, nếu tính cho toàn bộ trường hợp nhiễm HPV16, sublineage Asian là phổ biến nhất, (80% - 80/100) với 2 loại Asian a (44% - 44/100) và Asian b (36% - 36/100); tiếp theo là sublineage European prototype (14%) cho 2 loại T350 (9%) và G350 (5%); sublineage Asian-American a (5%) và African a (1%).

Nếu sublineage European prototype là phân nhóm dưới type phổ biến nhất tại mô UTCTC ở Maroc (58,3%), Italy (69%) và miền Bắc Trung Quốc (67,3%) thì sublineage Asian lại phổ biến với Thái Lan (58,7%) và miền Nam



Trung Quốc (65,5%) [100],[101],[104],[137],[138]. Vì vậy, góp phần với nghiên cứu của 2 nước bạn Châu Á, nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra rằng sublineage Asian là phân nhóm phổ biến nhất của HPV16 tại Việt Nam nói riêng và Châu Á nói chung.

Khi xét cụ thể các vị trí đột biến sai nghĩa trên cả 2 gen E6 và E7, chúng tôi thấy rằng, trong 16 vị trí acid nucleotid bị biến đổi, đột biến chủ đạo trên gen E6 của nghiên cứu xảy tại vị trí nucleotid T178 tương ứng với bộ 3 mã hóa acid amin số 25 aspartic (D25), chiếm 80%, tiếp theo đến đột biến tại nucleotid 350 tương ứng với acid amin leucin số 83 (L83V) chiếm (10,1%). Đột biến D25E, L83V liên quan với việc nhiễm HPV16 dai dẳng có ý nghĩa thống kê [139]. Acid amin aspartic tại vị trí 25, motif trên gen E6, có ái lực với HLA - A2 [140]. Do vậy, đột biến tại vị trí này dẫn tới giảm khả năng nhận diện của hệ thống miễn dịch, HPV16 tồn tại dai dẳng trong cơ thể chủ.

Bằng thực nghiệm, Zehbe và cộng sự đã chứng minh L83V, R10G làm tăng sùng hóa lớp tế bào đáy [141]. Dù không có E7, chỉ riêng đột biến L53V cũng đủ biến đổi tế bào sùng thành bất tử [142].

Tần suất các đột biến E6 trên HPV16 có sự khác nhau 1% đột biến tại acid amin số 10 - R10L; 6% đột biến tại acid amin số 14 (Q14H và Q14D), 80% đột biến tại acid amin số 25 (D25E); 3% tại acid amin số 27 (I27R và I27L); 2% tại acid amin số 58 (N58S và N58K); 1% D64N; 1% S71C; 6% - H78Y; 5% L83V; 1% E89D đã mô tả trên gen E6 và 1% đột biến D4H, 46% đột biến N29S trên gen E7 tạo ra 12 đột biến acid amin. Các đột biến tại vị trí acid amin số 10, 14, 27, 58, 78, 83 đơn lẻ hay phối hợp đều có tác dụng ức chế hoạt động sao chép của p53, tăng gắn kết với E6BP có ý nghĩa. Riêng đột biến L83V tác động lên cả quá trình giáng hóa p53, ức chế sao chép p53, giáng hóa yếu tố Bax và gắn với R6BP [143]. Kết quả của những đột biến đều ức chế quá trình tự sửa chữa DNA mỗi lần phân bào và ức chế tế bào chết có lập trình.

Hai motif của E6 thuộc về đoạn xoắn peptid từ acid amin 30-33 đến 63-68 và 106-108 đến 130-142 tạo các “zinc fingers” [45]. Các motif, đặc biệt acid amin 128 trên E6 của HPV16 có vai trò trọng yếu trong cơ chế gây bệnh của HPV16 thông qua việc liên kết với E6-AP qua chuỗi peptid gồm 18 acid amin từ acid amin 391 đến 408 trên E6-AP, tạo phức hợp E6, E6-AP bền vững và tiếp tục liên kết với yếu tố áp chế khối u p53 [45]. Hơn nữa, chính acid amin 128 trên E6 của HPV16 còn gắn với các protein khác như Paxillin, IRF. E6 HPV16 còn tác động lên sự phân bào và sửa chữa phân bào qua hoạt động gắn với PDZ tại đoạn peptid từ vị trí acid amin 148-151 trên E6 [145]. Nhưng thú vị thay, các vị trí này hầu như không hề bị đột biến để bảo toàn hoạt động của E6 HPV16. Các đột biến D64N, S71C và E89D xảy ra với tỉ lệ rất thấp 1%, duy chỉ có đột biến D64N thuộc về vùng “zinc finger” nhưng chưa có nghiên cứu nào công bố về tác động của các đột biến này tới vai trò của protein E6.

So với gen E6, gen E7 dường như bền vững hơn. Với 2 vị trí đột biến sai nghĩa tại acid nucleic số 571 và 647 dẫn đến biến đổi 2 acid amin tại vị trí số 4 (D4H) và vị trí 29 (N29S). Đột biến N29S xảy ra phổ biến hơn, chiếm 97,8% (45/46) các đột biến trên gen E7. Kết quả của nghiên cứu cũng tương đồng với nghiên cứu tại Thái Lan và Trung Quốc [102],[139]. Tuy nhiên, cả 2 đột biến này đều xảy ra ở ngoài vùng bảo tồn của HPV, không ảnh hưởng đến độ bền vững, hoạt động của protein E7 trên HPV16 [145]. Acid amin asparagin ở vị trí 29 nằm ở vùng đầu amin tận của chuỗi peptid E7, thuộc vùng nhận diện của lympho T độc [146]. Zhang và cộng sự đã chứng minh rằng sự nhiễm dai dẳng HPV16 và đột biến N29S không có ý nghĩa thống kê [139]. Hơn nữa, tỉ lệ xuất hiện đột biến N29S cao hơn D25E ở những gái mại dâm có mô bệnh học bình thường trái ngược với kết quả của nghiên cứu [98]. Do vậy, có lẽ đột biến N29S trên protein E7 giúp cho HPV16 thoát khỏi sự kiểm soát của tế bào T độc khiến cho HPV16 có thể trốn thoát khỏi hệ thống miễn dịch, nhưng một mình đột biến N29S chưa đủ mạnh để thuyết phục sự tồn tại dai dẳng của HPV16.

Trên thực nghiệm, các đột biến D25E, L83V và N29S đều có khả năng tạo vùng quyết định kháng nguyên mới trên tế bào lympho T và B. [147]. Như vậy, căn cứ vào các đột biến trên gen E6, E7 của HPV16 cũng như phân bố genotype của HPV, có thể thiết kế kháng thể kháng E6, E7.

Với những kết quả khả quan về việc sử dụng vaccin E6E7HPV ở trong thực nghiệm và trên những bệnh nhân mắc CIN3, VIN như đã trình bày ở mục 1.2.1.4, 1.2.2.4 cùng với kết quả về phân bố genotype, phân nhóm dưới nhóm của HPV16 và các đột biến trên E6, E7 nghiên cứu đóng góp đáng kể vào chiến lược vắc-xin phòng nhiễm HPV và liệu pháp vắc-xin điều trị tiền ung thư ở những bệnh nhân nhiễm HPV sinh dục có loạn sản tế bào biểu mô.

### **4.3. Liên quan giữa genotype và loại tế bào ung thư**

#### **4.3.1. Loại tế bào ung thư**

Căn cứ vào phân loại loại tế bào ung thư của tổ chức Y tế thế giới và kết quả của nghiên cứu, UTSDN được chia làm 02 nhóm chính: ung thư biểu mô và ung thư tế bào hắc tố. Ung thư biểu mô được chia làm 3 loại: ung thư tế bào vảy, ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào biểu mô khác như: ung thư thể hỗn hợp tuyến vảy, ung thư tế bào kính, ung thư thần kinh nội tiết [69],[85],[88]. Khi xét chung cho cả 3 loại ung thư hay xét riêng UTCTC và UTAH, chúng tôi thấy rằng, tỉ lệ bệnh nhân mắc ung thư tế bào vảy chiếm tỉ lệ cao nhất, tới gần 4/5 số bệnh nhân ung thư; tiếp theo là ung thư tế bào tuyến. Riêng UTAD chỉ có ung thư tế bào tuyến và ung thư thể bào khác.

So sánh với kết quả của các nghiên cứu trước, chúng tôi thấy có sự tương đồng nhất định giữa các nghiên cứu. Với UTCTC, tỉ lệ mắc ung thư tế bào vảy luôn chiếm ưu thế. Cụ thể như ở Italy, có tới 77,2% bệnh nhân UTCTC loại ung thư tế bào vảy; 22,8% là ung thư tế bào tuyến; nhưng ở Thái Lan, do nghiên cứu từ các tế bào bong mà toàn bộ tế bào UTCTC là loại ung thư tế bào vảy [101],[104]. Tương tự như vậy, các nghiên cứu về UTAH cũng cho thấy loại ung thư tế bào vảy là phổ biến, chiếm tới 88,2%, số còn lại là

ung thư tế bào đáy – 3% và bệnh Paget 8,8% [148]. Nếu như theo nghiên cứu trên thế giới, ung thư tế bào vảy chiếm tới 90% UTAD thì chỉ còn 2 - 4% UTAD ở phụ nữ trẻ do nhiễm diethylstilbestrol [149]. Thực tế, trong nghiên cứu của chúng tôi, cả 2 trường hợp UTAD đều ở độ tuổi cao (58 và 68 tuổi) nhưng chỉ mắc ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào kính. Sự khác biệt này có lẽ do cỡ mẫu UTAD của chúng tôi quá ít không có ý nghĩa thống kê.

Sự khác nhau về tỉ lệ ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến có lẽ do bởi cấu tạo mô bệnh học của cổ tử cung, âm hộ và âm đạo. Xét về mặt cấu tạo mô học, âm hộ được cấu tạo từ các tế bào biểu mô vảy tầng sừng hóa dày mỏng khác nhau. Các tuyến của âm hộ cũng cấu tạo từ các tế bào biểu mô trụ tiết nhày ở vùng nang ống, biểu mô trong vùng ống và biểu mô vảy ở vùng mở của ống tuyến [150]. Bao phủ niêm mạc âm đạo là lớp biểu mô vảy tầng glycogen hóa mà không sừng hóa với các thụ thể steroid trong nhân. Lớp đáy được cấu tạo từ các tế bào trụ đơn nằm trên màng đáy. Lớp biểu mô tầng không sừng hóa trên bề mặt của âm đạo được glycogen hóa dưới tác dụng của hormon sinh dục nữ estrogen kéo dài tới tận cổ tử cung. Bản thân các tế bào biểu mô âm đạo không tiết nhày mà chất nhày âm đạo được tiết ra từ tuyến Bartholin và Skene hoặc từ cổ trong cổ tử cung. Lớp tế bào biểu mô vảy không sừng hóa của cổ ngoài tử cung giống như âm đạo, được chia thành 3 lớp: lớp tế bào đáy có nhiệm vụ tái tạo các tế bào mới, lớp giữa – đảm nhiệm tỉ lệ phù hợp giữa các tế bào biểu mô, lớp trên cùng là các tế bào trưởng thành [151]. Cổ trong của cổ tử cung được cấu tạo từ biểu mô trụ tiết nhày với các tuyến nằm xen kẽ mở ra bề mặt cổ trong cổ tử cung [150]. Có lẽ chính sự tiết nhày các tế bào biểu mô tiết nhày, lớp glycogen trong nội bào đã giúp loại trừ các tác nhân xâm nhập vào tế bào, do đó, tỉ lệ ung thư tế bào tuyến thấp hơn ung thư tế bào vảy.

### **4.3.2. Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư**

#### **4.3.2.1. Liên quan giữa tỉ lệ nhiễm HPV với loại tế bào ung thư**

Tỉ lệ nhiễm HPV tại các loại tế bào ung thư có khác nhau rõ rệt. Toàn bộ các tế bào nhiễm HPV đều là tế bào ung thư biểu mô. Hay nói cách khác, 80,8% (172/213) tế bào ung thư biểu mô nhiễm HPV. Ung thư loại tế bào hắc tố không nhiễm HPV. Nếu xét trong nhóm nhiễm HPV ở tế bào ung thư biểu mô thì ung thư tế bào vảy chiếm tỉ lệ cao nhất (81,4%), tiếp đến ung thư tế bào tuyến (11%) rồi ung thư tế bào biểu mô khác (7,6%). Tuy nhiên, khi xét ở từng loại tế bào ung thư biểu mô, HPV vẫn dương tính cao nhất tại ung thư tế bào vảy (82,3%-140/170), tiếp đến ung thư tế bào tuyến (70,4%-19/27), và một số ung thư tế bào khác, trong đó có ung thư tế bào kính. Tuy nhiên, sự khác nhau về tình trạng nhiễm HPV tại các loại tế bào ung thư không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Kết quả về tình trạng nhiễm HPV tại từng loại tế bào ung thư của nghiên cứu hoàn toàn tương tự với kết quả của Tornesseno, HPV dương tính tới 84,9% ở ung thư tế bào vảy và 71,8% tại ung thư tế bào tuyến [101]. Nhưng tại Trung Quốc, có tới 97,6% ung thư tế bào vảy và 74,5 % ung thư tế bào tuyến dương tính với HPV [147]. Thậm chí, tại Thái Lan, 100% trường hợp nhiễm HPV là ung thư tế bào vảy [104]. Không những kỹ thuật phân tích sử dụng khác nhau, bệnh phẩm khác nhau dẫn đến tỉ lệ nhiễm HPV khác nhau ở các loại tế bào ung thư mà có lẽ đặc điểm về lối sống, địa lý cũng đóng góp vào sự khác biệt đó.

Theo Gonzalez, số bạn tình, tuổi bắt đầu quan hệ tình dục, thời gian sử dụng thuốc tránh thai đều có nguy cơ gây ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến. Tuy nhiên, tuổi quan hệ tình dục sớm và tình trạng hút thuốc hiện tại có nguy cơ ung thư tế bào vảy cao hơn ung thư tế bào tuyến ở UTCTC [152]. Béo phì liên quan tới ung thư tế bào tuyến cao hơn ung thư tế bào vảy [153]. Vậy, nguyên nhân nào dẫn tới tỉ lệ nhiễm HPV tại ung thư tế bào vảy

cao hơn ung thư tế bào tuyến? Như đã bàn luận ở mục 4.2.2 về tỉ lệ nhiễm HPV tại các mô UTSDN và cơ chế gây bệnh của HPV, qua tổn thương trên bề mặt lớp biểu mô, HPV xâm nhập vào lớp tế bào sát màng đáy, biến nạp vào DNA của tế bào chủ nhân lên với số lượng thấp. Khi các tế bào biểu mô mang theo các HPV phân bào và trưởng thành cho tới khi tới lớp trên cùng sẽ bong ra. Các HPV nguy cơ thấp bị loại bỏ dần qua một vài lần phân bào. Các HPV nguy cơ cao biến nạp vào DNA tế bào chủ, tác động lên quá trình sửa chữa DNA của tế bào chủ và đồng thời tạo các hạt vi rút hoàn chỉnh [31]. Một số thụ thể tế bào, trong đó có heparan sulfate proteoglycan (HSPG) đóng vai trò quan trọng trong việc tiếp nhận L1 HPV và cho phép HPV xâm nhập vào tế bào biểu mô [154],[155],[156],[157]. IgA được tiết bởi các tương bào, chịu tác động của tế bào tuyến trong cổ tử cung, đóng vai trò miễn dịch tại chỗ, có tác dụng loại bỏ HPV [158],[159]. Chất nhày do tế bào tuyến sinh dục tiết ra có tác dụng tăng hiệu quả của đáp ứng miễn dịch của các IgA [160]. Hơn nữa, ung thư tế bào tuyến hình thành từ những vùng mô ở sâu hơn ung thư tế bào vảy nên khả năng bị tổn thương khó hơn ung thư tế bào vảy [161]. Có lẽ đây chính là lý do dẫn tới sự khác biệt rõ rệt trong vấn đề nhiễm HPV tại tế bào biểu mô vảy và biểu mô tuyến.

Người ta chưa tìm thấy yếu tố cụ thể nào liên quan ung thư tế bào đáy âm hộ. Mặc dù ung thư tế bào đáy vùng da đầu mặt cổ liên quan đến nhiễm tia tử ngoại, nhưng khó có thể đưa ra được bằng chứng nhiễm tia tử ngoại liên quan đến ung thư tế bào đáy âm hộ [162]. Tuy nhiên, HPV cũng không phải là yếu tố liên quan đến ung thư tế bào đáy âm hộ [163].

Ung thư tế bào hắc tố liên quan tới đồng nhiễm HPV16. Có thể HPV tác động trực tiếp lên tế bào hắc tố melanin hoặc gián tiếp như yếu tố hỗ trợ cùng với các gốc tự do có nguồn gốc từ lichen xơ hóa hay bạch biến âm hộ [164].

Như vậy, chính vị trí phân bố, đặc điểm cấu tạo và chức năng của các tế bào dẫn tới đặc điểm bệnh lý cũng khác nhau và tình trạng nhiễm HPV khác nhau.

#### 4.3.2.2. Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư

Các loại HPV được xác định từ các mẫu bệnh phẩm như: HPV 11,16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59, 66, 71, 81 đơn nhiễm hay đồng nhiễm đều phân bố tại ung thư tế bào vảy. Ung thư tế bào tuyến chỉ đơn nhiễm HPV16, HPV18, đồng nhiễm HPV16, 18; HPV 18, 52 và HPV11, 16, 18. Các UTBM khác cũng chỉ đơn nhiễm HPV16, 18 hoặc đồng nhiễm HPV16, 18; chỉ duy nhất 1 trường hợp đồng nhiễm HPV33, 58, 59. Các kết quả về phân bố genotype của HPV theo mô bệnh học đã chỉ ra rằng: dường như các HPV nguy cơ cao đều có liên quan tới ung thư tế bào vảy, chỉ có HPV16 hoặc/và 18 mới liên quan tới ung thư tế bào tuyến. HPV16 phân bố tại tất cả các dạng tổn thương tế bào. Khi chỉ xét liên quan giữa HPV16, HPV18, HPV16,18 với ung thư tế bào vảy, ung thư tế bào tuyến, kết quả cũng cho thấy nhiễm HPV16 tại ung thư tế bào vảy cao hơn ung thư tế bào tuyến và ngược lại, nhiễm HPV18 tại ung thư tế bào tuyến cao hơn ung thư tế bào vảy có ý nghĩa thống kê với  $p=0.007$ . Như vậy, mặc dù các loại HPV nguy cơ cao đều có liên quan tới ung thư tế bào vảy nhưng HPV16 có liên quan cao hơn cả và HPV18 liên quan tới ung thư tế bào tuyến.

Mặc dù xác định HPV từ mẫu đút và mẫu bệnh phẩm từ châu lục khác biệt, tuy không chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê hay không, nhưng Tornessello cũng đưa ra những kết quả tương đồng với nghiên cứu như: tỉ lệ nhiễm HPV16 ở ung thư tế bào vảy cao hơn ung thư tế bào tuyến, ngược lại, tỉ lệ nhiễm HPV18 ở ung thư tế bào tuyến cao hơn ung thư tế bào vảy [101]. Có một sự khác biệt trong nghiên cứu của Tornessello về phân bố genotype của HPV. Ngoài HPV16, HPV18 xác định từ ung thư tế bào tuyến, tác giả còn

xác định được 3 HPV loại khác như: HPV 31, 33, 45 mặc dù Tornessello đã dùng kỹ thuật PCR lồng với 2 cặp môi MY09/MY11 và GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> có độ nhạy thấp hơn cặp môi GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> và cặp môi bổ sung MGP5<sup>+</sup>/MGP6<sup>+</sup> mà nghiên cứu sử dụng [127]. Cũng tương tự như Tornessello, Chen cũng chỉ ra rằng dù HPV16 và HPV18 đều phân bố cả ở ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến nhưng HPV18 phân bố nhiều hơn ở ung thư tế bào tuyến [147].

Không chỉ nghiên cứu từ Italy, Trung Quốc chỉ ra sự tương đồng mà ngay nghiên cứu từ hơn 10 nghìn mẫu bệnh phẩm từ các tế bào bong, từ sinh thiết UTCTC trên các châu lục đều cho thấy HPV16 xác định từ ung thư tế bào vảy cao hơn ung thư tế bào tuyến có ý nghĩa thống kê với  $p < 0.001$  và ngược lại với HPV18 [161].

Như vậy, kết quả về sự liên quan về phân bố genotype của HPV với loại tế bào ung thư của nghiên cứu hoàn toàn giống như kết quả của các nghiên cứu trước. Sự khác nhau về kỹ thuật, về loại bệnh phẩm cũng không ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Nhưng sự khác nhau về phân bố HPV16, HPV18 tại ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến có nguyên nhân từ đặc điểm cấu tạo của HPV16 và HPV18 hay sự khác biệt về cấu tạo giữa tế bào biểu mô vảy và tế bào biểu mô tuyến vẫn còn chưa có căn cứ phù hợp. Mặc dù đã phân tích đến mức độ sublineage của HPV18 nhưng Chen và cộng sự cũng như các nghiên cứu trước đó cũng không đưa ra được bằng chứng về sự liên quan của HPV18 với ung thư tế bào tuyến [161],[165]. HPV16 vượt qua các matrix ngoại bào bao quanh lớp tế bào đáy sừng hóa bằng việc sử dụng các receptor ngoại bào heparan sulfat và receptor không heparan sulfat trong khi HPV18 chỉ có khả năng xâm nhập qua các receptor heparan sulfat [157]. Điều đó chỉ cho thấy sự ác tính vượt trội của HPV16 với các HPV khác.

#### 4.3.2.3. Liên quan giữa lineage của HPV16 với loại tế bào ung thư

Với 4 sublineage của HPV16 mà chúng tôi phân tích được, sublineage Asian xuất hiện ở tất cả các dạng loại tế bào ung thư như ung



thư tế bào vảy, ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào biểu mô khác, trong đó tỉ lệ xuất hiện ở ung thư tế bào vảy là cao nhất, tới 90%, 4 sublineage bao gồm European prototype; Asian-American a, African 2 còn lại chỉ xuất hiện ở ung thư tế bào vảy.

Kết quả của nghiên cứu cũng tương tự như của Chopjitt, sublineage Asian chiếm 73,9% ung thư tế bào vảy [104]. Nhưng theo nghiên cứu của Tornesellor, tỉ lệ sublineage European tại ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến dường như không có sự chênh lệch đáng kể (69 và 67%), kết quả này rất khác biệt so với nghiên cứu, European chỉ xuất hiện ở ung thư tế bào vảy mà không có ở ung thư tế bào tuyến [101].

Tại Mexico, mặc dù sublineage European xuất hiện tới 64,5% tại ung thư tế bào vảy nhưng chỉ 53,8% tại ung thư tế bào tuyến nhưng ngược lại, sublineage Asian American xuất hiện tại ung thư tế bào tuyến nhiều hơn tại ung thư tế bào vảy (30,2% và 46,2%). Không những vậy, nghiên cứu còn chỉ ra nguy cơ ung thư của các sublineage; với Asian American-a là 69,0; European là 13.25 [166]. Một điều rõ ràng dễ nhận thấy là sự phân bố các sublineage tại UTSDN và liên quan của các sublineage với các loại loại tế bào ung thư rất khác nhau giữa các châu lục. Sự khác biệt về yếu tố địa lý, nhân chủng học dẫn đến sự khác nhau về các loại sublineage HPV16 xác định tại nơi tổn thương, sự phân bố khác nhau ở các tế bào tổn thương. Không những vậy, cần có các nghiên cứu nhiều hơn về vai trò của từng vị trí đột biến đối với hệ thống miễn dịch và thụ thể tiếp nhận ở từng loại tế bào.

Như đã bàn luận ở mục 4.2.4, các sublineage HPV16 được xác định căn cứ vào vị trí acid nucleic bị đột biến trên E6. Sublineage Asian có đột biến tại nucleotid 178, 1 trong 3 acid nucleic thuộc bộ 3 mã hóa cho acid amin aspartic, thuộc vùng nhận diện miễn dịch của các tế bào thẩm quyền miễn dịch [140]. Như vậy, vai trò của sublineage Asian T178 đối với HPV16 đang biến nạp trong DNA của tế bào biểu mô vảy, biểu mô tuyến và các tế

bào biểu mô khác trốn thoát khỏi sự nhận diện của các tế bào có thẩm quyền miễn dịch.

Các sublineage European proto-type, Asian American a đều mang đột biến T350 hoặc G350 thuộc vùng mã hóa cho acid amin leucin tại vị trí 83. Đột biến G350 dẫn tới thay đổi acid amin leucin thành valin, làm tăng khả năng sùng hóa tại tế bào biểu mô sùng. Có lẽ vì vậy mà trong nghiên cứu, sublineage European prototype và Asian American a không xuất hiện ở ung thư tế bào tuyến.

## KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu genotype của *Human Papillomavirus* trên 214 bệnh nhân ung thư sinh dục nữ tại Bệnh viện K Trung ương, Bệnh viện Phụ Sản Trung ương, Bệnh viện Ung bướu Thành phố Hồ Chí Minh, đề tài đã đưa ra một số kết luận sau:

### **1. Genotype của HPV tại các mô ung thư cổ tử cung, âm hộ, âm đạo**

- 80,4% (172/214) bệnh nhân ung thư sinh dục, 89,4% (168/188) bệnh nhân ung thư cổ tử cung, 50% (1/2) bệnh nhân ung thư âm đạo và 12,5% (3/24) ung thư âm hộ nhiễm HPV.

- 73,4% (127/172) các trường hợp ung thư sinh dục đơn nhiễm HPV; 10 loại HPV nguy cơ cao được xác định từ các mô ung thư sinh dục gồm HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59.

- Nhiễm HPV16 chiếm tỉ lệ cao nhất - 43,5%; tiếp theo là HPV18 - 23%, đồng nhiễm HPV16, 18 chiếm 16,2%. Nhiễm HPV52 chỉ chiếm 4,2%.

- 94% (94/100) các trường hợp nhiễm HPV16 thuộc lineage European; sublineage Asian chiếm tỉ lệ cao nhất, 80% (80/100); European prototype - 14%, Asian-American a - 5% và African 2-1%.

### **2. Mối liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào tại mô ung thư**

- Ung thư biểu mô chiếm 99,5% (213/214), trong đó, ung thư biểu mô vảy chiếm tỉ lệ cao nhất (79,8% - 170/213).

- 100% trường hợp nhiễm HPV thuộc loại ung thư biểu mô. Bệnh nhân có ung thư tế bào vảy liên quan tới nhiễm HPV16, ung thư tế bào tuyến liên quan tới HPV18 có ý nghĩa thống kê với  $p=0,007$ .

- Sublineage Asian xuất hiện ở tất cả các loại tế bào ung thư, 90% ở ung thư tế bào vảy. Ung thư tế bào vảy nhiễm tất cả các sublineage của HPV16, riêng sublineage Asian chiếm 78,3%.

**KHUYẾN NGHỊ**

- Vắc-xin L1 phòng nhiễm HPV cần được bổ sung các loại HPV31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59.
- Vắc-xin sublineage Asian của E6E7 HPV16 điều trị cho loạn sản ung thư sinh dục nữ cho cần được nghiên cứu và áp dụng.

## **DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Nguyễn Thị Phương Mai, Phạm Văn Thức, Hiroshi Ichimura, Phạm Văn Hán, Tạ Thành Văn (2014). Phân bố genotype của *Human Papillomavirus* trên bệnh nhân ung thư cổ tử cung ở phía Bắc, Việt Nam. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, số 6 (92), 1-8.
2. Nguyễn Thị Phương Mai, Nguyễn Phi Hùng, Nguyễn Hùng Cường, Nguyễn Bảo Trân, Nguyễn Thị Minh Ngọc, Hoàng Thị Thanh Huyền, Hiroshi Ichimura, Tạ Thành Văn (2014). Liên quan giữa genotype của *Human papillomavirus* và tổn thương mô bệnh học trên bệnh nhân ung thư cổ tử cung ở phía Bắc, Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam*, số 1, 1-4.
3. Nguyễn Thị Phương Mai, Phạm Văn Thức, Phạm Văn Hán, Nguyễn Hùng Cường, Hoàng Thị Thanh Huyền, Hiroshi Ichimura, Tạ Thành Văn (2015). Biến thể E6, E7 của *Human papillomavirus* 16 trên bệnh nhân ung thư cổ tử cung ở phía Bắc, Việt Nam. *Tạp chí Y học thực hành*, số 966, 423-426.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I et al (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J. Cancer*, **144**, 1941-1953
2. The Globan Cancer Observatory, Vietnam.  
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/704-viet-nam-factsheets.pdf>, xem 3/11/ 2019
3. Li N, Franceschi S, Howell-Jones et al (2011) Human papillomavirus type distribution in 30.484 invasive cervical cancer worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int. J. Cancer*, **128**, 927-935.
4. Siegler E., Segev Y., Mackuli L et al (2016). Vulvar and vaginal cancer, vulvar intraepithelial neoplasia 3 and vaginal intraepithelial neoplasia3: experience of a referral institute, *Isr Med Assoc*, **18(5)**, 286-289.
5. Graham SV (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *J. Fut. Micro.* **5(10)**, 1493–1506.
6. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J (2015) International standardization and classification of human papillomavirus types. *J. Virol*, 476, 314-344.
7. Muñoz N (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med*, **6**, 518-527
8. Sean R. G, Proma P, Lysander M. et al (2013). Influences on parental acceptance of HPV vaccination in demonstration project in Uganda and Vietnam. *J. Vacc*, **31**, 3072-3078.
9. Kawana K, Adachi K, Kojima S. et al (2014). Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine*, **32**, 6233-6239.

10. Hoang T.T.H, Ishizaki A, Nguyen H.C et al (2013). Infection with high risk HPV types among femal sex workers in northern Vietnam. *J.Med. Virol*, **85**, 288-294.
11. Nguyễn Phi Hùng, Nguyễn Thị Lan Anh, Tạ Văn Tờ và cộng sự (2011). Nghiên cứu xác định các type HPV thường gặp trong ung thư cổ tử cung, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **15(2)**, 160-167.
12. Chen RW (2004) Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Helsinki*, 12.
13. Modis Y, Trus B.L, Harrison S.C (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *J. Embo*, **21**, 4754-4762
14. World Health Organization (2007). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. *Inter. Agen for research on cancer*, **Volum 90** Human papillomavirus, p47, 49.
15. de Villers E, Fauquet C, Brocker TR et al (2004). Classification of papillomaviruses. *J.Viro*, **324**, 17-27
16. Chen Z, Shiffman M, Herrero R et al (2011). Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16(HPV16) related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PloS ONE*, **6(5)**, e20183.
17. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J (2015). International standardization and classification of human papillomavirus types. *J. Virol*, 476, 314-344.
18. Smith B, Chen Z, Reimers L et al (2013). Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PloS ONE*, **6(6)**, 321375.
19. Huertas-Salgado A, Martís-Gamez, Moreno P et al (2010). E6 molecular sublineages of human papillomavirus (HPV) type 16: an update and unified criterion for clustering and nomenclature. *J. Virol*, **410**, 201-215.

20. Doorbar J, Quint W, Banks L et al (2012). The biology and life cycle of Human papillomaviruses. *Vaccine* **30S**, 55-70.
21. Wolf M, Garcea R.L, Grigoriev N et al (2010). Subunit interaction in bovine papillomavirus. *Proc. Natl. Acad. Ci. USA*, **107(14)**, 6289-6303.
22. Ryndock E, Conway M.J, Alam S et al (2014). Role for human papillomavirus type 16 L1 cysteine residual 161, 229 and 379 genome encapsidation and capsid stability. *PLoS ONE*, **9 (6)**, e99488..
23. Johnson K.M, Kines R.C, Roberts J.N et al (2009). Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J. Virol*, **83**, 2067-2074
24. Richards R.M, Lowy D.R, Schiller J.T et al (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1522-1527.
25. Day P.M, Lowy D.R, Schiller J.T, (2008). Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J. Virol*, **82**, 12565-12568.
26. Vera-Bravo R, Ocampo M, Urquiza M et al (2003). Human papillomavirus type 16 and 18 L1 protein peptid binding to VERO and HeLa cell inhibits their VLPs binding. *Int. J. Canc*, **107**, 416- 424.
27. Dasgupta J, Bienkowska-Haba M, Ortega M.E, et al (2011). Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus. *J. Bio. Chem*, **286**, 2617-2624.
28. Nelson L.M, Rose R.C, Moroianu J (2002). Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J. Bio. Chem*, **277**, 23958-23964.
29. Witte L, Zoughlami Y, Aengeneyndt B, et al (2008). Binding of human papillomavirus L1 virus-like particles to dendritic cells is mediated through heparan sulfates and induces immune activation. *J. Immu*, **212**, 679-691.



30. Fahey L.M, Raf A.B, Silva D.M.D et al (2009). A major role for the minor capsid protein of human papillomavirus type 16 in immune escape. *J. Immu*, 183, 6151-6156.
31. Hughes F.J, Romanos M.A (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ ATPase. *Nucleic Acid Research*, **21**(25), 5817-5823.
32. Egawa N, Nakahara T, Ohno S et al (2012). The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J. Virol*, **86**(6), 3276-3283.
33. Castro-Munoz LJ, Manzo-Merino J, Munoz-Bello JO et al (2019). The human papillomavirus E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response. *J. Sci. Rep*, **9**(1), 13620.
34. Stenlund A (2003). E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *J. Embo*, **22**(4), 954-963.
35. Doorbar J (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *J. Virol*, **445**, 80-98.
36. Roberts S, Ashmole I, Loretta J (1994). Mutational Analysis of Human Papillomavirus E4 Proteins: Identification of Structural Features Important in the Formation of Cytoplasmic E4/Cytokeratin Networks in Epithelial Cells. *J. Virol*, **68**, 6432-6445.
37. Tomakidi P, Cheng H, Kohl A et al (2000). Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur J Cell Biol*. **79**(6):407-412.
38. Rodriguez M.I, Finbow M.E, Alonso A (2000). Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *J. Onco*, **19**, 3727- 3732.
39. Villa-Morales M, Fernández-Piqueras J (2012). Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy. *Expe Opio on Ther Targ*, **16**, 85-101.

40. Kabsch K, Mossadegh N, Kohl A et al (2004). The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL-and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *J. Int*, **47**, 48-56.
41. Regan J.A, Laimins L.A (2008). Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. *J. Virol*, **82**, 10042-10051.
42. Halavaty KK, Regan J, Mehta K et al (2014). Human papillomavirus E5 oncoproteins bind the A4 endoplasmic reticulum protein to regulate proliferative ability upon differentiation. *J. Virol*, **452**, 223-230
43. Chen J (2015). Signaling pathways in HPV-associated cancers and their therapeutic implications. *J. Med. Virol*, **25**, 24-53.
44. Rufini A, Tucci P, Celardo I et al. (2013) Senescence and aging: critical roles of p53. *J. Onco*, **32**, 5129-5143
45. Tomaic V (2016). Function roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies diverse anatomical sites. *J. Cancer*, **8**, 95.
46. Mesplede T, Gagnon D, Bergenon-labrecque F et al (2012). p53 degradation activity, expression and subcellular localization of E6 protein from 29 human papillomavirus genotype. *J Virol*, **86**, 94-107.
47. Vanitha K.S, Christian K, Miranda T et al (2011). PDZ domain: the building blocks regulating tumorigenesis. *J. Biochem* ,**439**, 195-205.
48. Lee C, Laimins L.A (2004). Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31. *J Virol*, **78**, 12366-12377
49. Chen J, Zhao K, Li R et al (2014). Activation of PI3K/Akt/MTOR pathway and dual inhibitors of PI3K and MTOR in endometrial cancer. *J. Curr. Med. Chem*, **21(26)**, 3070-3080.
50. Jafri M. A, Ansari S. A, Alqahtani M. H et al (2016). The role of telomere and telomerase in cancer and advances in telomerase targeted therapies. *J. Geno. Med*, **8(69)**, 102-105

51. Liu X, Dakic A, Zhang Y. et al (2009). HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *J. Proc. Nat. Acad. Scie*; **106**, 18780-18785.
52. Mc Laughlin-Dubin E.E., Munger K (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *J. Virol*, **384** (2), 335-344
53. Huh K, Zhou X, Hayakawa H et al (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Virol*, **81**, 9737-9747.
54. Hwang SG, Lee D, Kim J et al (2002). Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J. Bio. Chem*, **277**, 2923-2930.
55. McLaughlin-Drubin M.E, Huh K-W, Münger K et al (2008). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J Virol*, **82**, 8695-8705.
56. Widdice L, Ma Y, Jonte J et al (2013). Concordance and transmission of human papillomavirus within heterosexual couples observed over short intervals. *J. Infect Dis*, **207**(8), 1286-1294.
57. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X et al (2008). Transmission of human papillomavirus in heterosexual couple. *J. Emerg Infect Dis.*, 14(6) 888-894.
58. Liu M, He Z, Zhang C et al (2015). Transmission of genital human papillomavirus infection in couples: a population-based cohort study in rural China. *J. Nat. Sci. Report*, **5**, 10986.
59. Kasap B, Yetimalar H, Keklik A et al (2011). Prevalence and risk factors for human papillomavirus DNA in cervical cytology. *Euro. J. Obst. Gyne. Repo. Biol*, **159** (1).

60. Deacon J.M, Evans C.D, Yule R et al (2000). Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case - control study nested within the Manchester cohort. *Brit. J. Canc*, **88(11)**, 1565-1572.
61. Jensen K.E, Schmiedel S, Norild B et al (2013). Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow up. *Brit. J. Canc*, **108**, 234-239.
62. Taylor S, Bunge E, Bakker M et al (2016). The incidence, clearance and persistence of non-cervical human papillomavirus infections: a systematic review of the literature. *BMC J. Infec. Dise*, **16(293)**.
63. Maucort – Boulch D, Plummer M, Philip E.C et al (2010). Predictors of human papillomavirus persistence among women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int. J. Canc*, **126**, 684-691.
64. Pummer M., Shiffman M., Castle P.E et al (2007). A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J. Inf. Dis*, **195(11)**, 1582-1589.
65. Bulkman N.W.J, Berkhof J, Bulk S et al (2007). High risk HPV type - specific rates in cervical screening. *J. Canc*, **96**, 1419-1424.
66. Khan M.J, Castle P.E, Lorincz A.T et al (2005). The elevated 10 - year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Nat. Canc. Int.*, **97(14)**, 1072-1079.
67. Ritu N, David C.W (2015) The Pap test and Bethesda 2014. *J. Acta. Cyto*, **59**, 121-132.
68. WHO histological classification of tumors of the uterine cervix <https://screening.iarc.fr/atlasclassifwho.php> Xem ngày 12/11/2019.

69. Well M, Ostor AG, Crum CP. Epithelial tumor.  
<http://iarc.fr/en/publication.pdf-online.pat/gen.bb4/bb4-chapter5.pdf> dă  
xem 30/12/2018.
70. Su B, Qin MXS, Xue MXS (2018). The relation of passive smoking  
with cervical cancer. *J. Med.*, **97(46)**, e13061.
71. Wei L, Giergo A. M, Chu M et al (2014). Tobacco exposure in increased  
E6 and E7 oncogen expression, DNA damage and mutation rates in  
cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes. *J. Canc*,  
**35(10)**, 2373-2381.
72. Gunnell AS, Tran TN, Torrang A et al (2006). Synergy between  
cigarette smoking and human papillomavirus type 16 in cervical cancer  
in situ development. *J. Canc. Epi. Bio. Prev*, **15(11)**, 2141-2147.
73. Moreno V, Bosch F.X, Munoz N et al (2002). Efect of oral  
contraceptives on risk of cervical cancer in women with human  
papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study, *J.*  
*Lancet*, **359(9312)**, 1085-1092.
74. Appleby P, Beral V et al (2007). Cervical cancer and hormon  
contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16.573  
women with cervical cancer and 35.509 wwomen without cervical  
cancer form 24 epidemiological studies. *J. Lancet*, **370(9599)**, 1609-  
1621.
75. International Collaboration of Epidemiological studies of cervical  
cancer (2015). Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative  
reanalysis of invidual data on 15461 women with cervical carcinoma  
and 29164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological  
studies. *J. Canc. Epi. Bio. Prev*, **18(4)**, 1060-1069.
76. Crosbie E.J, instein M.H, Tranceschi S et al (2013) Human  
pappilomavirus and cervical cancer. *J. Lancet*, **382 (9895)**, 889-899.

77. zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *J. Nat*, **2**, 342-350.
78. Lehtinen M, Lagheden C, Loustarinen T et al (2017). Ten year follow-up of human papillomavirus vaccine efficacy against the most stringent cervical neoplasia end-point-registry-based follow-up of three cohorts from randomized trials. *J. Brish. Med*, **7**(8), e015867.
79. Mao C, Koutsky LA, Ault KA et al (2006). Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *J. Obs. Gyne*. **107**(1):18-27.
80. Bryant G, Vermeer DW, Spanos WC et al (2012). A non-oncogenic HPV16E6/E7 vaccine enhances treatment of HPV expressing tumors. *J. Can. Gen. Ther*, **19**(10), 667-674.
81. WHO. Histological classification of tumours of the vagina.  
[http://iarc.fr/en/publications/pdf\\_online/pat-gen/bb4/bb4-chapter6.pdf](http://iarc.fr/en/publications/pdf_online/pat-gen/bb4/bb4-chapter6.pdf)  
đã xem 30/12/2018.
82. Shah CA, Goff BA, Lowe K et al (2009). Factors affecting risk of mortality in women vaginal cancer. *J Obs. Gyn*. **113**(5), 1038-1045.
83. Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM et al (2002) A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *J. Gyn. Oncol*. **84**(2), 263-270.
84. Baldwin PJ, van de Burg SH, Boswell CM et al (2003). Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *J. Clin. Can. Reach*, **9**, 5205-5213.
85. WHO. WHO histological classification of tumor of the vulvar  
[https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/1461](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/1461). Xem ngày 12/11/2019.

86. Lien NH, Kay JP, Robert AS et al (2016). Squamous precursor lesions of the vulva: current classification and diagnostic challenges. *J. Pathol*, **48(4)**, 291-302.
87. de Nieuwenhof H.P, Bulten J, Hollema H. et al (2011). Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *J. Mod. Pathol*, **25**, 297-305.
88. Hacker N.F, Eifel P.J, der Velden J (2015). Cancer of the vulva. *Int. J. Gynec. Obs*, **131**, S97-99.
89. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S et al (2006). Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Bio Chem*. **387**, 365- 372.
90. Wei L, Gravitt PE, Song H et al (2009). Nitric oxide induces early viral transcription coincident with increased DNA damage and mutation rates in human papillomavirus – infected cells. *J. Cancer Res*, **69 (11)**.
91. James M.C (2012). Human papillomavirus (HPV) has become synonymous with cervical cancer, but its actual foot print is much bigger, *J. Nature*, 488.
92. Ronce G, Ghisetti V, Segnan N (2005). Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. *Eur. J. Canc*, **41(2)**, 297-305.
93. Sasagawa T, Maehama T, Ideta K et al (2016). Population-based study for human papillomavirus (HPV) infection in young women in Japan: A multicenter study by the Japanese human papillomavirus disease education research survey group (J-HERS). *J. Med. Virol*, **88(2)**, 324-335.
94. Swangvaree S.S, Kongkaew P, Ruqsui P (2010). Prevalence of high-risk human papillomavirus infection and cytologic results in Thailand. *Asia. Pac. J. Canc. Prev*, **11(6)**, 1465-1468.

95. Soohoo M, Blas M, Byraiah G et al (2013). Cervical HPV infection in female sex workers: a global perspective. *J. Open AIDS*, **7**, 58-66
96. Matsushita K, Sasagawa T, Miyashita M et al (2011). Oral and cervical Human Papillomavirus infection among female sex workers in Japan. *Jpn. J. Inf. Dis*, **64**, 34-39.
97. Miyashita M, Agdamag D. M, Sasagawa T et al (2009). High risk HPV types in lesion of the uterine cervix of female commercial sex worker in the Philippines. *J. Med. Virol*, **81**, 545-551.
98. Ishizaki A, Matsushita K, Hoang H.T.T et al (2013). E6 and E7 sublineages of human papillomavirus-16 and-52 in Japan, the Philippines and Vietnam. *J. Med. Virol*, **85**, 1069 -1076.
99. d'Oliveira C.M, Fregnani J.H.T.G, Carvalho J.P et al (2013). Human papillomavirus genotype distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *J. Bio. Med. Cen*, **13**, 357.
100. Qmichou Z, Khyatti M, Beraho M et al (2013). Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroc woman. *BMC J. Infect. Dis*, **13**, 378.
101. Tornesello M.L, Losito S, Benincasa G et al (2011). Human papillomavirus (HPV) genotype and HPV16 sublineages and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *J. Gyne. Onc*, **121**, 32-42.
102. Onuki M, Matsumoto K, Satoh T et al (2009). Human papillomavirus infection among Japanese women: age - related prevalence and type - specific risk for cervical cancer. *J.Can. Sci*, **100(7)**, 1312-1316.
103. Chansaenroj J, Junyangdikul P, Chinchai T et al (2014). Large scale study of HPV genotypes in cervical cancer and different cytological cervical specimens in Thailand. *J. Med. Virol*, **86**, 601-607.
104. Chopjitt P, Ekalaksananan T, Pientong C et al (2009). Prevalence of human papillomavirus type 16 and its sublineages in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand. *Int. J. Inf. Dis*, **13**, 212-219.



105. Lan T.H Vu, Dieu Bui, Ha T.T Le (2013). Prevalence of cervical infection with HPV type 16 and 18 in Vietnam: implications for vaccine campaign. *BMC J. Canc*, **13(53)**.
106. Brenda Y. H, Nguyen T.V (2008). Cervical human papillomavirus infection among female sex workers in southern Vietnam. *J. Inf. Agen. Canc*, **3(7)**.
107. Siegler E, Segev Y, Mackuli L et al (2016). Vulvar and vaginal cancer, vulvar intraepithelial neoplasia 3 and vaginal intraepithelial neoplasia3: experience of a referral institute. *Isr. J. Med. Assoc*, **18(5)**, 286-289.
108. Hampl M, Sarajuuri H, Wentzensen N et al (2006). Effect of human papillomavirus vaccines on vulvar, vaginal, and anal intraepithelial lesions and vulva cancer. *J. Obst. Gyne*, **108(6)**, 1361-1368.
109. de Nieuwenhof H.P, van Kempen L.C.L.T, de Hullu J. A et al (2009). The Etiologic role of HPV in vulvar squamous cell carcinoma fine tuned. *J. Canc. Epi. Bio. Prev*, **18(7)**, 2061-2067.
110. Siriaunkgul S, Settakorn J, Sukpan K et al (2014). HPV detection and genotyping in vulvar squamous cell carcinoma in northern Thailand. *Asia. Pac. J. Can. Prev*, **15(8)**, 3773-3778.
111. Larsson G.L, Helenius G, Andersson S et al (2013). Prognostic impact of *human papillomavirus* (HPV) genotyping and HPV-16 subtyping in vaginal carcinoma. *J. Gyne. Onco*, **129**, 406-411.
112. Sino AK, Saraiya M, Thompson TD et al (2014). Human papillomavirus genotype prevalence in invasive vaginal cancer from a registry-based population. *J. Obs.Gyne*, **123(4)**, 817-821.
113. Siegel DA, Wilson R, Wilkinson EJ et al (2017). Evaluation of the vulvar cancer histology code reported by central cancer registries: importance in epidemiology. *J. Arch. Pathol. Lab. Med.*, **141 (1)**, 139-143.

114. Elhood H, Kim J, Yemelyanova A et al (2014). Basal cell carcinomas of the vulva: high-risk human papillomavirus DNA detection, p16 and BerEP4 expression. *J. Am. Surg. Pathol.*, **38**(4), 542-547.
115. Samant R, Lau B, E C et al (2007). Primary vaginal cancer treated with concurrent chemoradiation using Cis-platinum. *J Rad. Onco. Bio. Phys.*, **69**(3), 746-750.
116. Greer CE, Lund JK, Manos MM (1991). PCR amplification fro paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long term storage and prospective. Cold Spring Harbor Lab press, **1**, 46-50
117. Odida M, Sanjose S, Sandin S et al (2010). Comparison of Human papillomavirus detection between freshly frozen tissue and paraffin embedded tissue of invasive cervical cancer. *J Inf. Agent Canc*, **5**, 15.
118. Venceslau EM, Bezerra MM, Lopes ACM et al (2014) HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> in patient with cytologic and/or colposcopic changes. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, **50**(4), 280-285.
119. Soderlund –Strand A, Carlson J, Dillner J (2009). Modified genneral primer PCR system for sensitive detection of multiple types of oncogenic Human papillomavirus. *J. Clin. Micro*, **47**(3) 541-546
120. Smith B, Chen Z, Reimers L et al (2011). Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PloS ONE*, **6**(6), 321375
121. Tornessello M.L, Duraturo M.L, Botti G et al (2006). Prevalence of alpha papillomavirus genotypes in cervical squamous intraepithhial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. *J. Med. Virol*, **78**, 1663-1672.
122. Faezed K, Jaleh H, Nafiseh K, et al (2013). Epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus infection among Iranian women – analyses of national data and systematic review of the literature. *J. Gyne. Onco*, **128**, 227-271.

123. Giglia-Man G, Zotter A and Vermeulen W (2011). DNA damage response. *J. Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3** (1).
124. Mjelle R, Hegre SA, Aas PA et al (2015). Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. *J. DNA repair* **30**(2015), 53-67
125. Maniatis T, Fritsch E.F and Sambrook J. (1982). Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor.
126. de Roda H.A, Walboomers M.M, van de Brule J.C et al (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J.Gen. Virol*, **76**, 1057-1062.
127. Yamada R, Sasagawa T, Kirumbi W.L et al (2008). Human papillomavirus infection and cervical abnormalities in Nairobi, Kenya, an area with high prevalence of human immunodeficiency virus infection. *J. Med. Virol*, **80**, 847-855.
128. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *J. Cell Profil*, **36**, 131-149
129. Zannoni G.F, Prisco M.G, Gaetano V, et al (2011). Changes in the expression of oestrogen receptors and E-cadherin as molecular markers of progression from normal epithelium to invasive cancer in elderly patients with vulvar squamous cell carcinoma: a pilot study. *J. Histoy, Wiley*, **58**(2), 265-293.
130. Berger C.E, Qian Y, Chen X et al (2013). The p53-estrogen receptor loop in cancer. *J. Curr. Mol. Med*, **13**(8),1229-1240.
131. Human papillomavirus and related disease report.  
<http://www.hpvcenter.net>. Xem ngày 30/10/2019

132. Castle PE, Rodriguez AC, Porras C et al (2007). A comparison of cervical and vaginal human papillomavirus. *J. Sex. Trans. Dis*, **34(11)**, 849-855.
133. Guo Q, Li G, Wei J et al (2016). Reverse dot blot hybridization for detection of *gyrA* mutation for rapid diagnosis of *mycobacterium tuberculosis* resistant to fluorouinolones. *Int. J. Clin. Exp. Path*, **9(1)**, 208-215.
134. Hernandez E H, Preda O, Alonso S et al (2013). Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in formalin fixed paraffin-embedded specimens with the HPV direct flow CHIP system. *Open Virol. J*, **7**, 91-95.
135. Crook T, Tidy J.A, Vousden K et al (1991). Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and transactivation. *J. Cell*, **67**, 547-556
136. Grabowska A.K and RiemerA.B (2012). The invisible enemy – how human papillomavirus avoid recognition and clearance by the host immune system. *J. Open Virol.*, **6**, 249-256
137. Shang Q, Wang Y, Fang Y et al (2011). Human papillomavirus tyep 16 variant analysis of E6, E7 and L1 genes and Long Contron Region in identification of cervical carcinomas in patients in Northeast China. *J. Clin. Micro.*, **49(7)**, 2656-2663
138. Wu Y, Chen Y, Li L et al (2006). Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J. Gene. Virol*, **87**, 1181-1188.
139. Zhang L, Liao H, Yang B et al (2015). Sublineages of human papillomavirus type 6 predispose toward persistent infection. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*, **8 (7)**, 8453-8459.

140. Kast W. M, Brandt M P, Sidney J et al (1994). Role of HLA-A motif in identification of potential CTL epitopes in *Human Papillomavirus* type 16E6 and E7 protein. *J. Immu*, **152**, 3904-3912.
141. Zehbe I, Lichtig H, Westerback A et al (2011). Rare human papillomavirus 16 E6 sublineages reveal significant oncogenic potential. *J. Mole. Canc*, **10**, 77.
142. Togtema K, Jackson R, Richart C et al (2015). The human papillomavirus 16 European-T350G E6 sublineage can immortalize but not transform keratinocytes in the absence of E7. *J. Virol*, **485**, 274-282.
143. Lichtig H, Algrisi M, Botzer L.E et al (2006). HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *J. Virol*, **350**, 216-227.
144. Munger K, Baldwin A. Edwards M et al (2004). Mechanisms of Human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol*, **78(21)**, 11451-11460.
145. Watanabe S, Kanda T, Sato H et al (1990). Mutation analysis of human papillomavirus type 16 E7 functions. *J. Virol*, **64(1)**, 207-214.
146. Kadish A.S, Romney S.L, Ledwidge R et al (1994). Cell-mediated immune responses to E7 peptides of human papillomavirus (HPV) type 16 are dependent on the HPV type infecting the cervix whereas serological reactivity is not type-specific. *J. Gene. Virol*, **75**, 2277-2284.
147. Chenzhang Y, Wen Q, Ding X et al (2017). Identification of the impact on T- and B-cell epitopes of human papillomavirus type -16 E6 and E7 sublineage in Southwest China. *J. Immu. Letter*, **181**, 26-30.
148. Alkatout I, Segubet M, Garbrecht N et al (2015). Vulva cancer epidemiology, clinical presentation and management option. *Int. J. Women Health*, **7**, 305-313

149. Merino M.J (1991) Vaginal cancer: the role of infection and environmental factors. *Ame. J. Obs. Gyne*, **165**, 1255-1262.
150. Heller D.S (2015). Normal histology of the female genital tract. *J. Obst. Path. Clin*, **18**, 13-38.
151. Kuman R.J (2002). Blausrein's Pathology of the female genital tract. 4<sup>th</sup> edition, *J. Spinger*, 154-156.
152. Gonzalez A.B, Sweetland S, Green J (2004). Comparison of risk factors for squamous cell and adenocarcinomas of the cervix: a meta-analysis. *British J. Canc*, **90**, 1787-1791.
153. Lacey J.V Jr, Swanson C.A, Brinton L.A et al (2003). Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *J. Canc*, **98(4)**, 814-821.
154. Giroglou T, Florin L, Schafer F et al (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol*. **75**, 1565-1570.
155. Johnson K.M, Kines R.C, Roberts J.N et al (2009). Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J. Virol*, **83**, 2067-2074.
156. Joyce J.G, Tung J.S, Przysiecki C.T et al (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem*, **274**, 5810-5822.
157. Dasgupta J, Bienkowska-Haba M, Ortega M.E (2011). Structural basic of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus. *J. Bio. Chem*, **286(4)**, 2617-2624.
158. Misset J (2013). Mucosal immunity of the female genital tract after HPV infection and vaccination. Master Thesis. Utrecht University Respository.

159. Giraldo P.C, Goncalves A.K, Eleuterio J (2006). Secretory immunoglobulin A: a protective factor in the genital mucosa. *Brazilian J. Inf. Dis*, **10(4)**, 232-234.
160. Vaerman J.P and Ferrin J (1975). Local immunological response in the vagina, cervix and endometrium. *J. Acta Endo. Suppl (Copenhem)*, **194**, 281-305.
161. Clifford G.M, Smith J.S, Plummer M et al (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British J. Canc*, **88(1)**, 63-73.
162. Banda J.E.A, Mendes S.H.F, Fernandes S.S. et al (2016). Basal cell carcinoma of vulva: a case report. *Int. Obs. Gyn*, **5(3)**.
163. Elwood H, Kim J, Yemelyanova A et al (2014). Basal cell carcinomas of the vulva: high-risk human papillomavirus DNA detection, p16 and BerEP4 expression. *Ame. J. Path*, **38(4)**, 542-547.
164. Rohwedder A, Philips B, Malfetano J et al (2002). Vulvar malignant melanoma associated with human papillomavirus DNA: report of two cases and review of literature. *Ame. J. Der.* **24(3)**, 230-240.
165. Chen A.A, Gheit T, Franceschi S et al. (2015). Human papillomavirus 18 genetic variation and cervical cancer risk worldwide. *J. Virol*, **89(20)**, 10680-10687.
166. Ortiz-Ortiz J, Alarcon-Romeo L.C, Jimenez-Lopez M.A et al (2015). Asociation of human papollomavirus 16E6 sublineages with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *J. Virol*, **12**, 29.

## PHỤ LỤC SỐ 1

### QUI TRÌNH TÁCH CHIẾT DNA TỪ MÔ TƯƠI THEO KIT CỦA SIGMA ALDERICH

#### 1. Giải phóng DNA từ mô

- Nghiền/cắt nhỏ 25 mg mô trên đá, cho vào type li tâm 1,5-2 ml
- Bổ sung 180  $\mu\text{L}$  dung dịch lysis và 20  $\mu\text{L}$  proteinase K.
- Ủ ở 55°C từ 2-4h cho tới khi mô bị tiêu hoá hoàn toàn.
- Bổ sung 200  $\mu\text{L}$  dung dịch lysis. Vortex 15 giây.
- Ủ tiếp 70°C trong 10 phút



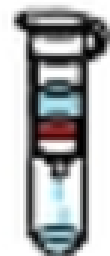
#### 2. Gắn DNA lên cột

- Chuẩn bị cột: rửa cột bằng 500  $\mu\text{L}$  Column Preparation Solution, ly tâm 12,000xg trong 1 phút, loại bỏ dịch.
- Gắn DNA lên cột: bổ sung 200  $\mu\text{L}$  ethanol vào dung dịch DNA, vortex 5-10 giây. Chuyển dung dịch sang cột. Ly tâm 6,500xg trong 1 phút



#### 3. Rửa DNA

- Chuyển cột sang ống nghiệm mới. Bổ sung 500  $\mu\text{L}$  Wash Solution, ly tâm 6,500xg trong 1 phút.
- Chuyển cột sang ống nghiệm mới. Thêm 500  $\mu\text{L}$  Wash Solution, ly tâm 12,000xg trong 3 phút.





#### 4. Hòa tan DNA tinh sạch

- Chuyển cột sang ống nghiệm mới (có nắp). Bổ sung 200  $\mu$ L Elution Solution, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, ly tâm 6,500xg trong 1 phút. Thu hồi dịch sau ly tâm.
- Dung dịch DNA tinh sạch được bảo quản ở nhiệt độ -20°C



## PHỤ LỤC SỐ 2

### QUI TRÌNH ĐIỆN DI SẢN PHẨM PCR

#### 1. Cách làm gel agarose 2,0%

- Cân 2g bột agarose
- Bổ sung 10ml boric acid EDTA (TBE)
- Hóa tan bột agarose bằng lò vi sóng.
- Đợi agarose tan hết, để nguội 55- 60°C
- Chuẩn bị khuôn, tùy thuộc vào số lượng giếng cần cho điện di mà cài lược làm giếng từ 6 – 8 - 12 răng
- Đổ vào khuôn gel.
- Đợi gel khô, bảo quản gel trong túi nilon kín ở nhiệt độ phòng

#### 2. Cách pha dung dịch TBE 10X (Tris; acid boric; EDTA):

Tris 0,89M; acid boric 0,89M; EDTA 0,02M

#### 3. Tiến hành kỹ thuật điện di

- Chuẩn bị dung dịch mẫu và dung dịch cần điện di theo thể tích sau:

Thành phần	Ống mẫu (μl)	Ống bệnh nhân (μl)
Gene ladder 100	5	=
Dye	-	2
Sản phẩm PCR	-	5
Nước cất	7	5
<b>Tổng số</b>	12	12

- Đưa gel agarose vào máy điện di, cho TBE đến ngập gel
- Dùng pipet và đầu côn nhỏ hút lần lượt dung dịch ở mỗi ống đưa vào giếng
- Máy điện di 80-100V (Mupid, Nhật Bản), điện di trong khoảng 30 phút cho tới khi vạch thuốc nhuộm cách mép trên của gel 2m thì tắt máy.
- Lấy gel ra khỏi bể điện di, ngâm trong dung dịch Ethidium bromide 20 phút.
- Rửa gel qua bể nước cất.
- Đưa gel vào soi dưới đèn UV, chụp ảnh.

### PHỤ LỤC SỐ 3

#### KẾT QUẢ ĐỘ TINH SẠCH DNA CỦA HPV SAU TÁCH CHIẾT

STT	Mã bệnh nhân	OD	STT	Mã bệnh nhân	OD	STT	Mã bệnh nhân	OD
1	GC13-01	1.66	38	GC13-44	1.8	75	GC13-89	1.87
2	GC13-02	1.94	39	GC13-45	1.76	76	GC13-90	1.88
3	GC13-03	1.8	40	GC13-46	1.79	77	GC13-91	1.83
4	GC13-04	1.84	41	GC13-47	1.77	78	GC13-92	1.88
5	GC13-05	1.79	42	GC13-48	1.82	79	GC13-93	1.88
6	GC13-06	1.86	43	GC13-49	1.79	80	GC13-94	1.88
7	GC13-07	1.84	44	GC13-50	1.73	81	GC13-95	1.86
8	GC13-08	1.8	45	GC13-51	1.79	82	GC13-96	1.62
9	GC13-09	1.8	46	GC13-52	1.88	83	GC13-97	1.71
10	GC13-10	1.82	47	GC13-54	1.81	84	GC13-98	1.85
11	GC13-11	1.88	48	GC13-55	1.91	85	GC13-99	1.88
12	GC13-12	1.76	49	GC13-56	1.69	86	GC13-100	1.75
13	GC13-14	1.84	50	GC13-57	1.82	87	GC13-101	1.91
14	GC13-15	1.92	51	GC13-58	1.85	88	GC13-102	1.76
15	GC13-17	1.86	52	GC13-59	1.78	89	GC13-103	1.84
16	GC13-19	1.95	53	GC13-60	1.82	90	GC13-104	1.81
17	GC13-21	1.94	54	GC13-61	1.83	91	GC13-105	1.73
18	GC13-22	1.9	55	GC13-62	1.84	92	GC13-107	1.8
19	GC13-23	1.9	56	GC13-66	1.84	93	GC13-109	1.8
20	GC13-24	1.89	57	GC13-69	1.81	94	GC13-110	1.83
21	GC13-25	1.89	58	GC13-70	1.81	95	GC13-111	1.87
22	GC13-26	1.87	59	GC13-72	1.81	96	GC13-112	1.7
23	GC13-27	1.87	60	GC13-73	1.83	97	GC13-113	1.79
24	GC13-29	1.87	61	GC13-74	1.82	98	GC13-114	1.79
25	GC13-30	1.89	62	GC13-76	1.89	99	GC13-116	1.79
26	GC13-31	1.82	63	GC13-77	1.83	100	GC13-117	1.81
27	GC13-33	1.84	64	GC13-78	1.63	101	GC13-119	1.81
28	GC13-34	1.88	65	GC13-79	1.84	102	GC13-120	1.83
29	GC13-35	1.84	66	GC13-80	1.85	103	GC13-121	1.86
30	GC13-36	1.84	67	GC13-81	1.89	104	GC13-122	1.81
31	GC13-37	1.81	68	GC13-82	1.85	105	GC13-123	1.75
32	GC13-38	1.7	69	GC13-83	1.76	106	GC13-124	1.77
33	GC13-39	1.85	70	GC13-84	1.88	107	GC13-125	1.8
34	GC13-40	1.85	71	GC13-85	1.82	108	GC13-126	1.76
35	GC13-41	1.83	72	GC13-86	1.86	109	GC13-127	1.86
36	GC13-42	1.83	73	GC13-87	1.88	110	GC13-128	1.79
37	GC13-43	1.81	74	GC13-88	1.86	111	GC13-129	1.62

<b>STT</b>	<b>Mã bệnh nhân</b>	<b>OD</b>	<b>STT</b>	<b>Mã bệnh nhân</b>	<b>OD</b>	<b>STT</b>	<b>Mã bệnh nhân</b>	<b>OD</b>
112	GC13-130	1.82	146	GC13-169	1.77	181	GC13-209	1.8
113	GC13-131	1.8	147	GC13-171	1.73	182	GC13-210	1.73
114	GC13-132	1.71	148	GC13-172	1.78	183	GC13-211	1.84
115	GC13-133	1.96	149	GC13-173	1.75	184	GC13-212	1.9
116	GC13-134	1.82	150	GC13-174	1.74	185	GC13-213	1.86
117	GC13-136	1.79	151	GC13-175	1.74	186	GC13-214	1.82
118	GC13-137	1.77	152	GC13-176	1.76	187	GC13-215	1.83
119	GC13-139	1.83	153	GC13-177	1.72	188	GC13-216	1.8
120	GC13-140	1.76	154	GC13-178	1.74	189	GC13-217	1.8
121	GC13-141	1.73	155	GC13-179	1.77	190	GC13-218	1.79
122	GC13-142	1.81	156	GC13-180	1.7	191	GC13-219	1.65
123	GC13-143	1.66	157	GC13-181	1.71	192	GC13-220	1.85
124	GC13-144	1.85	158	GC13-182	1.73	193	GC13-221	1.83
125	GC13-145	1.79	159	GC13-183	1.76	194	GC13-223	1.83
126	GC13-146	1.66	160	GC13-184	1.75	195	GC13-224	1.83
127	GC13-147	1.85	161	GC13-185	1.74	196	GC13-225	1.84
128	GC13-148	1.8	162	GC13-186	1.74	197	GC13-226	1.81
129	GC13-150	1.82	163	GC13-187	1.78	198	TTG-1	1.79
130	GC13-151	1.77	164	GC13-189	1.72	199	TTG -2	1.86
131	GC13-152	1.78	165	GC13-190	1.75	200	TTG -3	1.84
132	GC13-153	1.74	166	GC13-191	1.74	201	TTG -51	1.8
133	GC13-154	1.8	167	GC13-192	1.72	202	TTG -52	1.8
134	GC13-155	1.84	168	GC13-194	1.68	203	TTG -53	1.82
135	GC13-156	1.78	169	GC13-195	1.8	204	TTG -54	1.75
136	GC13-157	1.72	170	GC13-197	1.74	205	TTG -55	1.91
137	GC13-159	1.84	171	GC13-198	1.78	206	TTG -56	1.76
138	GC13-160	1.8	172	GC13-199	1.8	207	TTG -57	1.84
139	GC13-161	1.82	173	GC13-201	1.82	208	TTG -58	1.81
140	GC13-163	1.76	174	GC13-202	1.8	209	TTG -59	1.73
141	GC13-164	1.78	175	GC13-203	1.76	210	TTG -60	1.8
142	GC13-165	1.82	176	GC13-204	1.8	211	TTG -62	1.8
143	GC13-166	1.64	177	GC13-205	1.78	212	TTG -63	1.88
144	GC13-167	1.84	178	GC13-206	1.88	213	TTG -64	1.83
145	GC13-168	1.73	179	GC13-207	1.8	214	TTG -65	1.87
			180	GC13-208	1.84			

## PHỤ LỤC SỐ 4

### DANH SÁCH BỆNH NHÂN UNG THƯ CỔ TỬ CUNG, ÂM HỘ, ÂM ĐẠO TẠI PHÒNG KHÁM SỐ 5 KHOA KHÁM BỆNH BỆNH VIỆN K TRUNG ƯƠNG (5/7-5/12/2013)

Phục vụ đề tài: *Nghiên cứu genotype của Human Papillomavirus trên  
một số ung thư sinh dục nữ*

STT	HỌ VÀ TÊN BỆNH NHÂN	NĂM SINH	NGÀY LẤY BỆNH PHẨM	CHẨN ĐOÁN MÔ BỆNH HỌC
1	Trần Thị H.	1983	5/7/2013	K tế bào thần kinh nội tiết
2	Hoàng Thị B.	1955	8/7/2013	K tế bào vảy
3	Bùi Hải A.	1977	8/7/2013	K tế bào vảy
4	Nguyễn Thị Đ.	1952	8/7/2013	K tế bào vảy
5	Lê Thị H.	1960	9/7/2013	K tế bào vảy
6	Hồ Thị H.	1974	9/7/2013	K tế bào vảy
7	Phạm Thị L.	1969	9/7/2013	K tế bào vảy
8	Nguyễn Thị M.	1958	9/7/2013	K tế bào vảy
9	Nguyễn Thị L.	1954	10/7/2013	K tế bào vảy
10	Vũ Thị Th.	1957	10/7/2013	K tế bào vảy
11	Triệu Thị Đ.	1968	10/7/2013	K tế bào vảy
12	Hồ Thị B.	1965	11/7/2013	K tế bào vảy
13	Tạ Thị Đ.	1960	12/7/2013	K tế bào vảy
14	Nguyễn Thị B.	1944	12/7/2013	K tế bào vảy
15	Nguyễn Kim T.	1953	15/7/2013	K tế bào vảy
16	Lê Thị Th.	1952	15/7/2013	K tế bào vảy
17	Lương Thị Th.	1965	15/7/2013	K tế bào vảy
18	Bùi Thị X.	1945	15/7/2013	K tế bào vảy
19	Bùi Thị D.	1965	15/7/2013	K tế bào vảy
20	Mai Thị Ch.	1942	16/7/2013	K tế bào tuyến
21	Nguyễn Thị Th.	1960	17/7/2013	K tế bào tuyến
22	Nguyễn Thị G.	1960	17/7/2013	K tế bào vảy

23	Hoàng Thị D.	1961	17/7/2013	K tế bào vảy
24	Vương Thị T.	1958	17/7/2013	K tế bào vảy
25	Vũ Thị L.	1938	17/7/2013	K tế bào tuyến
26	Trần Thị L.	1945	18/7/2013	K tế bào vảy
27	Chu Thị Th.	1976	18/7/2013	K tế bào vảy
28	Hà Thị Th.	1959	18/7/2013	K tế bào tuyến
29	Đặng Thuý H.	1976	19/7/2013	K tế bào vảy
30	Nguyễn Thị Q.	1955	22/7/2013	K tế bào vảy
31	Đỗ Thị Th.	1969	22/7/2013	K tế bào vảy
32	Nguyễn Thu H.	1981	22/7/2013	K tế bào tuyến
33	Đào Thị Hải Y.	1975	22/7/2013	K tế bào tuyến
34	Bùi Thanh Th.	1973	23/7/2013	K tế bào vảy
35	Vũ Thị Th.	1940	25/7/2013	K tế bào vảy
36	Nguyễn Thị M.	1955	25/7/2013	K tế bào vảy
37	Nguyễn Thị Đ.	1931	25/7/2013	K tế bào vảy
38	Nguyễn Thị H.	1963	26/7/2013	K tế bào vảy
39	Nguyễn Thị M.	1958	29/7/2013	K tế bào vảy
40	Nguyễn Thị H.	1951	29/7/2013	K tế bào vảy
41	Chu Thị H.	1963	29/7/2013	K tế bào vảy
42	Lê Thị Ng.	1956	30/7/2013	K tế bào vảy
43	Nguyễn Thị Ng.	1958	30/7/2013	K tế bào vảy
44	Vũ Thị H.	1960	31/7/2013	K tế bào vảy
45	Phạm Thị T.	1930	31/7/2013	K tế bào vảy
46	Hồ Thị L.	1936	1/8/2013	K tế bào vảy
47	Lê Thị Ng.	1948	1/8/2013	K tế bào tuyến vảy
48	Lê T Lan H.	1969	2/8/2013	K tế bào vảy
49	Nhâm Thị Th.	1980	5/8/2013	K tế bào vảy
50	Nguyễn Thị L.	1976	5/8/2013	K tế bào thần kinh nội tiết
51	Trần T Thanh Th.	1981	5/8/2013	K tế bào tuyến
52	Nguyễn Thị Th.	1960	5/8/2013	K tế bào vảy
53	Nguyễn Thị T.	1964	5/8/2013	K tế bào vảy

54	Trần Thị D.	1954	7/8/2013	K tế bào vảy
55	Phạm Thị H.	1959	8/8/2013	K tế bào vảy
56	Nguyễn Thị Đ.	1954	9/8/2013	K tế bào tuyến
57	Nguyễn Thị Ph.	1955	12/8/2013	K tế bào vảy
58	Trần Thị M.	1962	12/8/2013	K tế bào vảy
59	Nguyễn Thị M.	1953	13/8/2013	K tế bào vảy
60	Lê Thị H.	1975	13/8/2013	K tế bào tuyến
61	Nguyễn Thị Ng.	1973	13/8/2013	K tế bào tuyến
62	Hồ Thị L.	1951	13/8/2013	K tế bào vảy
63	Nguyễn Hồng Ch.	1964	14/8/2013	K tế bào vảy
64	Vũ Thị H.	1969	14/8/2013	K tế bào vảy
65	Nguyễn Thị Hồng V.	1959	14/8/2013	K tế bào vảy
66	Phạm Thanh Th.	1990	14/8/2013	K tế bào vảy
67	Nguyễn Thị Cẩm H.	1974	15/8/2013	K tế bào vảy
68	Lương Thị N.	1955	15/8/2013	K tế bào vảy
69	Trần Thị Ph.	1957	16/8/2013	K tế bào vảy
70	Đỗ Thị Thái H.	1972	19/8/2013	K tế bào vảy
71	Vũ Thị Th.	1950	19/8/2013	K tế bào vảy
72	Đinh Thị H.	1952	19/8/2013	K tế bào vảy
73	Nguyễn Thị H.	1942	19/8/2013	K tế bào vảy
74	Phạm Thị B.	1955	20/8/2013	K tế bào vảy
75	Trần Thị V.	1955	20/8/2013	K tế bào kính
76	Nguyễn Thị T.	1959	21/8/2013	K tế bào vảy
77	Phan Thị S.	1962	22/8/2013	K tế bào tuyến
78	Bùi Thị Th.	1976	22/8/2013	K tế bào vảy
79	Hoàng Thị H.	1977	23/8/2013	K tế bào thần kinh nội tiết
80	Lê Thị O.	1960	23/8/2013	K tế bào vảy
81	Ngô Thị Đ.	1996	27/8/2013	K tế bào vảy
82	Đặng Thị Thanh Y.	1973	27/8/2013	K tế bào vảy
83	Nguyễn Thị L.	1951	27/8/2013	K tế bào thần kinh nội tiết
84	Nguyễn Thị Thu Tr.	1989	29/8/2013	K tế bào vảy

85	Nguyễn Thị S.	1950	29/8/2013	K tế bào vảy
86	Hoàng Thị V.	1953	4/9/2013	K tế bào tuyến
87	Phạm Thị D.	1950	4/9/2013	K tế bào vảy
88	Nguyễn Thị N.	1952	4/9/2013	K tế bào vảy
89	Nguyễn Thị L.	1950	4/9/2013	K tế bào vảy
90	Nguyễn Thị S.	1970	5/9/2013	K tế bào tuyến vảy
91	Nguyễn Thị N.	1953	5/9/2013	K tế bào vảy
92	Lê Thị Ch.	1956	10/9/2013	K tế bào vảy
93	Trần Thị H.	1962	11/9/2013	K tế bào vảy
94	Bùi Thị Th.	1960	11/9/2013	K tế bào vảy
95	Nguyễn Thị Ch.	1955	11/9/2013	K tế bào vảy
96	Trần Thị L.	1963	11/9/2013	K tế bào vảy
97	Nguyễn Thị D.	1955	13/9/2013	K tế bào vảy
98	Vũ Thị Ngh.	1960	16/9/2013	K tế bào vảy
99	Phạm Thị T.	1965	17/9/2013	K tế bào vảy
100	Nguyễn Thị Q.	1958	17/9/2013	K tế bào tuyến
101	Đỗ Thị V.	1973	18/9/2013	K tế bào vảy
102	Tô Thị L.	1957	18/9/2013	K tế bào tuyến
103	Lê Thị C.	1944	18/9/2013	K tế bào vảy
104	Trần Thị H.	1954	18/9/2013	K tế bào tuyến
105	Cao Thị T.	1948	19/9/2013	K tế bào vảy
106	Nguyễn Thị K.	1955	19/9/2013	K tế bào vảy
107	Bùi Thị M.	1950	19/9/2013	K tế bào vảy
108	Vũ Thị T.	1957	19/9/2013	K tế bào vảy
109	Dương Thị Th.	1931	20/9/2013	K tế bào vảy
110	Trần Thị Kim Th.	1974	20/9/2013	K tế bào vảy
111	Nguyễn Thị Q.	1943	23/9/2013	K tế bào vảy
112	Nguyễn Thị Th.	1955	23/9/2013	K tế bào vảy
113	Nguyễn Thị Th.	1980	24/9/2013	K tế bào vảy
114	Đỗ Thị T.	1955	24/9/2013	K tế bào vảy
115	Hồ Thị Hoài H.	1971	24/9/2013	K tế bào tuyến
116	Nguyễn Thị Mai S.	1952	24/9/2013	K tế bào vảy



117	Bùi Thị Ph.	1954	26/9/2013	K tế bào vảy
118	Phạm Thị S.	1950	26/9/2013	K tế bào vảy
119	Nguyễn Thị Ch.	1964	30/9/2013	K tế bào vảy
120	Bùi Thị T.	1962	1/10/2013	K tế bào vảy
121	Nguyễn Thị Thùy L.	1994	1/10/2013	K tế bào tuyến
122	Nguyễn Thị H.	1953	1/10/2013	K tế bào vảy
123	Lê Thị Th.	1964	1/10/2013	K tế bào vảy
124	Bùi Thị T.	1972	1/10/2013	K tế bào vảy
125	Nguyễn Thị M.	1954	3/10/2013	K tế bào vảy
126	Hoàng Thị T.	1951	3/10/2013	K tế bào vảy
127	Trần Thị H.	1942	4/10/2013	K tế bào vảy
128	Giao Thị H.	1962	4/10/2013	K tế bào vảy
129	Lê Thị V.	1941	7/10/2013	K tế bào tuyến
130	Vũ Thị T.	1962	7/10/2013	K tế bào vảy
131	Nguyễn Thị Ánh V.	1980	8/10/2013	K tế bào vảy
132	Bùi Thị S.	1959	8/10/2013	K tế bào vảy
133	Lưu Thị L.	1953	9/10/2013	K tế bào vảy
134	Cao Thị L.	1968	10/10/2013	K tế bào tuyến vảy
135	Nguyễn Thị Đ.	1968	14/10/2013	K tế bào vảy
136	Quang Thị H.	1960	15/10/2013	K tế bào vảy
137	Bùi Thị N.	1961	16/10/2013	K tế bào vảy
138	Trần Thị S.	1948	17/10/2013	K tế bào vảy
139	Trần Thị Nh.	1948	17/10/2013	K tế bào vảy
140	Đinh Thị Minh Th.	1964	21/10/2013	K tế bào vảy
141	Phạm Thị Th.	1952	21/10/2013	K tế bào tuyến
142	Vũ Thị L.	1975	22/10/2013	K tế bào vảy
143	Dương Tiểu C.	1977	24/10/2013	K tế bào vảy
144	Bùi Thị H.	1959	24/10/2013	K tế bào vảy
145	Lê Thị Phong L.	1974	25/10/2013	K tế bào vảy
146	Nguyễn Thị X.	1965	28/10/2013	K tế bào vảy
147	Lê Thị Minh Ng.	1977	28/10/2013	K tế bào tuyến
148	Lưu Thị Cẩm H.	1973	28/10/2013	K tế bào vảy
149	Vũ Thị M.	1960	29/10/2013	K tế bào vảy

150	Ngô Thị L.	1959	29/10/2013	K tế bào vảy
151	Nông Thị Đ.	1965	29/10/2013	K tế bào vảy
152	Nguyễn Thị H.	1986	29/10/2013	K tế bào tuyến
153	Vũ Thị Nh.	1960	30/10/2013	K tế bào vảy
154	Nguyễn Thị Ch.	1955	30/10/2013	K tế bào vảy
155	Trương Diệp H.	1971	1/11/2013	K tế bào vảy
156	Nguyễn Thị Ng.	1966	1/11/2013	K tế bào vảy
157	Tông Thị H.	1971	4/11/2013	K tế bào tuyến
158	Nguyễn Thị M.	1964	4/11/2013	K tế bào vảy
159	Vũ Thị D.	1970	4/11/2013	K tế bào vảy
160	Lê Hải Y.	1978	4/11/2013	K tế bào vảy
161	Nguyễn Thị Kh.	1962	4/11/2013	K tế bào vảy
162	Nguyễn Thị C.	1947	5/11/2013	K tế bào vảy
163	Nguyễn Thị Y.	1980	5/11/2013	K tế bào thần kinh nội tiết
164	Nguyễn Thị Nh.	1941	5/11/2013	K tế bào vảy
165	Trần Thị L.	1961	6/11/2013	K tế bào vảy
166	Hoàng Thị Nh.	1952	7/11/2013	K tế bào vảy
167	Vũ Thị Th.	1969	12/11/2013	K tế bào vảy
168	Nguyễn Thị H.	1975	12/11/2013	K tế bào vảy
169	Đào Thị Ng.	1963	13/11/2013	K tế bào tuyến
170	Duy Thị Nh.	1963	14/11/2013	K tế bào vảy
171	Nguyễn Thị B.	1965	15/11/2013	K tế bào vảy
172	Đoàn Thị L.	1958	15/11/2013	K tế bào vảy
173	Trần Thị Kim H.	1963	15/11/2013	K tế bào vảy
174	Giang Thị Ch.	1983	18/11/2013	K tế bào tuyến
175	Lương Thị Th.	1945	19/11/2013	K tế bào tuyến
176	Hoàng Bích Ng.	1960	19/11/2013	K tế bào vảy
177	Nguyễn Thị H.	1966	20/11/2013	K tế bào vảy
178	Hoàng Thị S.	1964	20/11/2013	K tế bào vảy
179	Vũ Thị H.	1942	20/11/2013	K tế bào tuyến
180	Nguyễn Thị Ph.	1960	21/11/2013	K tế bào tuyến
181	Đỗ Thị V.	1958	22/11/2013	K tế bào tuyến
182	Lương Thị N.	1972	26/11/2013	K tế bào vảy

183	Trần Thị B.	1964	26/11/2013	K tế bào vảy
184	Nguyễn Thị D.	1976	27/11/2013	K tế bào vảy
185	Phạm Thị Nh.	1968	27/11/2013	K tế bào tuyến
186	Vũ Thị T.	1938	27/11/2013	K tế bào vảy
187	Nguyễn Thị H.	1962	28/11/2013	K tế bào vảy
188	Phạm Thị S.	1955	28/11/2013	K tế bào vảy
189	Nguyễn Thị H.	1977	28/11/2013	K tế bào vảy
190	Nguyễn Thị L.	1957	29/11/2013	K tế bào vảy
191	Phạm Thị Th.	1971	2/12/2013	K tế bào tuyến
192	Mẫn Thị M.	1970	2/12/2013	K tế bào tuyến
193	Hoàng Thị D.	1987	2/12/2013	K tế bào vảy
194	Phạm Thị K.	1971	4/12/2013	K tế bào vảy
195	Hoàng Thị L.	1954	5/12/2013	K tế bào vảy
196	Cao Thị Ng.	1960	5/12/2013	K tế bào vảy
197	Đặng Thị H.	1964	5/12/2013	K tế bào vảy

Xác nhận của thầy hướng dẫn

Xác nhận của bệnh viện



GS.TS Tạ Thành Văn



THẠC SĨ Y KHOA - BSKK II UNG THƯ  
Chu Hoàng Hạnh



BỆNH VIỆN  
CƠ SỞ TÂN TRIỀU  
PHÒNG KÊ HOẠCH TỔNG HỢP

Ths.Bs. Lại Phú Hải Sơn

**DANH SÁCH BỆNH NHÂN UNG THƯ ÂM HỘ, ÂM ĐẠO TẠI  
KHOA GIẢI PHẪU BỆNH, BỆNH VIỆN PHỤ SẢN TRUNG ƯƠNG  
Năm 2017 – 2018**

*Phục vụ đề tài: Nghiên cứu genotype của Human Papillomavirus trên  
một số ung thư sinh dục nữ*

STT	HỌ VÀ TÊN	NĂM SINH	MÃ HỒ SƠ
1	Hoàng Thị M.	1958	1700016604
2	Nguyễn Thị Ng.	1932	1700038710
3	Trần Thị T.	1956	1700204224

Xác nhận của thầy hướng dẫn



GS.TS Tạ Thành Văn

Xác nhận của bệnh viện

*Pháp y học GFB*  
*ML*

*Lê Quang Vinh*

*16/8/2019*

*Bệnh viện Phụ sản Trung Ương  
xác nhận dự án của PGS-TS Lê Quang  
Vinh là đúng*



*ThS. Mai Trọng Dũng*

**DANH SÁCH BỆNH NHÂN UNG THƯ ÂM HỘ, ÂM ĐẠO TẠI KHOA  
NGOẠI 1, BỆNH VIỆN UNG BƯỚU THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH,  
NĂM 2018**

*Phục vụ đề tài: Nghiên cứu genotype của Human Papillomavirus trên  
một số ung thư sinh dục nữ*

STT	Họ và tên	Năm sinh	Mã hồ sơ
1	Đỗ Thị T.	1958	19881/18
2	Trịnh Thị C.	1951	17281/18
3	Phan Thị Mỹ L.	1961	21827/18
4	Nguyễn Thị M.	1960	20530/18
5	Vũ Thị L.	1942	23255/18
6	Đặng Thị C.	1958	22341/18
7	Nguyễn Thị B.	1958	25170/18
8	Bạch Thị L.	1993	25654/18
9	Nguyễn Thị Ngọc A.	1951	25242/18
10	Võ Thị S.	1953	23541/18
11	Võ Thị H.	1963	28083/18
12	Hồ Thị T.	1951	32371/18
13	Sơn Thị L.	1963	35467/18
14	Phạm Thị T.	1933	31712/18

Ngày 09 tháng 01 năm 2019

Xác nhận của bệnh viện Ung bướu tp Hồ Chí Minh      Xác nhận của khoa Ngoại 1

BS. Tạ Thanh Liều là BS. Phó Trưởng khoa Ngoại 1

TRƯỞNG PHÒNG KẾ HOẠCH TỔNG HỢP



BS. Quách Thanh Khánh

BS. TẠ THANH LIỀU

Xác nhận của thầy hướng dẫn

GS.TS Tạ Thành Văn