

**BÁO CÁO TÓM TẮT
NHIỆM VỤ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP NHÀ NƯỚC
THEO NGHỊ ĐỊNH THƯ**

Hợp tác quốc tế theo Nghị định thư Việt Nam - Nhật Bản

**“HỢP TÁC NGHIÊN CỨU TỶ LỆ NHIỄM VÀ PHÂN BỐ GENOTYPE
CỦA HUMAN PAPILOMAVIRUS TRÊN MỘT SỐ BỆNH UNG THƯ
Ở PHÍA BẮC VIỆT NAM”**

Thời gian: 2013-2015

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. Phạm Văn Hán

Nhóm nghiên cứu:

PGS.TS. Phạm Văn Hán, GS.TS. Hiroshi Ichimura, TS.BS. Nguyễn Hùng Cường,
TS.BS. Phan Lê Thu Hằng, TS. BS. Azumi Ishizaki, TS.BS Hoàng Thị Thanh Huyền,
ThS. Nguyễn Thị Minh Ngọc, ThS. Nguyễn Bảo Trân, ThS. Phạm Thị Tâm,
ThS. Chu Hồng Hạnh, ThS. Ngô Mai Hương; ThS. Lê Thị Thu

Đối tác nước ngoài: Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản

Đại diện:

GS.TS. Hiroshi Ichimura, Trưởng khoa Virus và Sức khỏe quốc tế; Trưởng phòng Hợp tác quốc tế Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản

TS. Azumi Ishizaki, Khoa Virus và Sức khỏe quốc tế, Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản



Human Papillomavirus (HPV) là tác nhân thường gặp nhất trong các nhiễm trùng lây truyền qua đường tình dục. HPV có vai trò quan trọng trong sự hình thành ung thư cổ tử cung, âm hộ, âm đạo, hậu môn, dương vật, ung thư phổi và một số ung thư vùng hầu họng. HPV có hơn 200 genotype khác nhau, tám genotype HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, và 58) được thống kê là những genotype phổ biến nhất, có liên quan tới hơn 90% các trường hợp UTCTC trên toàn thế giới. Điểm quan trọng là quá trình diễn biến từ nhiễm virus HPV đến ung thư thường trải qua một thời gian dài. Quá trình tiến triển từ mức độ loạn sản nhẹ, loạn sản vừa, loạn sản nặng đến ung thư tại chỗ (giai đoạn tổn thương có thể phục hồi) và đến giai đoạn ung thư xâm nhập có thể kéo dài từ 10 - 25 năm. Đây chính là cơ hội có ý nghĩa cho việc phát hiện nhiễm HPV, sàng lọc những người có nguy cơ mắc ung thư liên quan nhiễm HPV nhằm giúp quá trình điều trị đạt hiệu quả cao với các tổn thương tiền ung thư và ung thư giai đoạn sớm.

Nhóm nghiên cứu mong muốn tìm hiểu về tỷ lệ nhiễm và một số yếu tố liên quan, phân bố genotype, sự liên quan giữa genotype HPV với tổn thương tế bào học tại cơ quan bị ung thư, đặc biệt là các biến chủng E6, E7 HPV của các genotype phổ biến của HPV trên các nhóm bệnh nhân ung thư nhằm có được các thông tin khoa học quan trọng trong đánh giá hiệu quả của việc sử dụng vacxin hiện nay và đề xuất chiến lược phát triển vacxin phòng và điều trị phòng lây nhiễm HPV tốt hơn tại Việt Nam

Được sự ủng hộ và cho phép của Bộ Khoa học và Công nghệ, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu (nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ theo nghị định thư số 128/2013/HĐ-NĐT giữa Bộ Khoa học và Công nghệ và Trường Đại học Y Hải Phòng): “Hợp tác nghiên cứu tỷ lệ nhiễm và phân bố genotype của *Human papillomavirus* trên một số bệnh ung thư ở phía Bắc, Việt Nam”

1. Mục tiêu nghiên cứu:

1. *Xác định tỷ lệ nhiễm HPV và một số yếu tố liên quan trên một số bệnh ung thư ở phía Bắc Việt nam.*
2. *Xác định sự phân bố genotype của HPV tại các cơ quan bị ung thư.*
3. *Đánh giá sự liên quan giữa genotype HPV với tổn thương tế bào học tại cơ quan bị ung thư.*

2. Đối tượng phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang. Mẫu nghiên cứu sau thu thập được tiến hành phân tích tại Khoa Giải phẫu bệnh bệnh viện K Trung ương, Labo Trung tâm trường Đại học Y Dược Hải Phòng, Khoa Virus học và Hợp tác quốc tế trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản.

Tổng số 972 mẫu bệnh phẩm mô ung thư (*ung thư cổ tử cung, ung thư âm hộ, ung thư âm đạo, ung thư dương vật và ung thư hậu môn*) được thu thập từ 972 bệnh nhân ung thư đến khám và điều trị tại bệnh viện K Trung ương trong thời gian từ 3/2013-6/2014.

Đề tài nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng Y đức của Trường Đại học Y Dược Hải Phòng số 7/2011/HĐĐĐ theo đúng quy định về Đạo đức trong nghiên cứu khoa học của Bộ Y tế, Việt Nam và được sự đồng ý chấp thuận tham gia của bệnh nhân.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả về khoa học

3.1.1. Tỷ lệ nhiễm của HPV trên các loại mẫu mô ung thư:

Tổng số 972 mẫu bệnh phẩm mô ung thư (*ung thư cổ tử cung, ung thư âm hộ, ung thư âm đạo, ung thư dương vật và ung thư hậu môn*) được thu thập từ 972 bệnh nhân ung thư đến khám và điều trị tại bệnh viện K Trung ương trong thời gian từ 3/2013-6/2014. Có 852 mẫu cho kết quả xét nghiệm HPV dương tính (xác định nhiễm và genotype HPV thông qua vùng gen L1) chiếm tỷ lệ 87,7%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra tỷ lệ nhiễm HPV ở các loại mô ung thư: Ung thư cổ tử cung: 92,5%; ung thư âm đạo: 81,6%; ung thư âm hộ: 89,1%; ung thư hậu môn: 64,9% và ung thư dương vật: 84,6%.

3.1.2. Tỷ lệ phân bố genotype của HPV trên các loại mẫu mô ung thư:

Tỷ lệ phân bố các genotype của HPV trên mô ung thư CTC: 17 loại genotype (13 loại genotype nguy cơ cao và 4 loại genotype nguy cơ thấp). Các genotype có tần suất xuất hiện cao nhất lần lượt là HPV16, 18, 71 và 11. Trên mô ung thư âm đạo: 13 loại genotype (9 loại genotype nguy cơ cao và 4 loại genotype nguy cơ thấp) và các genotype có tần suất xuất hiện cao nhất lần lượt là HPV16, 18, 11, 58, 51 và 45. Trên mô ung thư âm hộ: 13 loại genotype (9 loại genotype nguy cơ cao: HPV16, 18, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 82; 4 genotype nguy cơ thấp: 6, 11, 71 và 81) và các genotype có tần suất hiện diện cao nhất là HPV16, 11, 18, 58, 45 và 6. Trên mô ung thư hậu môn: Có 10 loại genotype khác nhau (gồm 7 loại genotype nguy cơ cao HPV16, 18, 33, 35, 45, 51, 58); 3 loại genotype nguy cơ thấp (HPV 6, 11, và 81). Các genotype có tần suất hiện diện cao nhất là HPV 18, 16, 11 và 35. Trên mô ung thư dương vật: Có 14 loại genotype khác nhau (gồm 7 loại genotype nguy cơ cao HPV16, 18, 35, 39, 45, 51, 53, 58, 82); 5 loại genotype nguy cơ thấp (HPV 6, 11, 42, 71 và 81) và các genotype có tần suất hiện diện cao nhất là HPV16, 18, 11, 45, 35, 51, 71 và 6.

3.1.3. Liên quan giữa genotype HPV với tổn thương tế bào học tại cơ quan bị ung thư và kết quả xác định các biến thể và đột biến nucleotid vùng gen E6,E7 của HPV16:

Trong 972 mẫu mô ung thư, kết quả phân loại mô bệnh học cho thấy mẫu mô ung thư tế bào vảy chiếm đa số (79,7%), tiếp đến là ung thư tế bào tuyến (15,6%), các ung thư khác chiếm tỷ lệ thấp (4,7%). Tỷ lệ nhiễm HPV trên tổn thương ung thư tế bào vảy cao hơn trên tổn thương ung thư tế bào tuyến ($p < 0,001$). Trên các loại ung thư đều thấy sự hiện diện của HPV genotype nguy cơ cao gồm 16; 18 với tỷ lệ rất cao (từ hơn 50% đến 80%). Ngoài ra có sự hiện diện của các genotype 35,39,45,51, 58, 59 và 66 với các tỷ lệ thấp hơn. Chúng tôi cũng thấy sự hiện diện của các genotype HPV nguy cơ thấp gồm 6,11 và đặc biệt là genotype 71,81

111/714 mẫu bệnh phẩm có kết quả xét nghiệm HPV dương tính với genotype 16 được thực hiện được phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu của vùng gen E6/E7 và giải trình tự hoàn chỉnh 2 vùng vùng gen E6, E7 để xác định subgenotype HPV 16 (biến thể) và tìm các đột biến nucleotide (hay các axit amin tương ứng) trên 2 vùng gen này.

Kết quả xác định các biến thể và đột biến nucleotid vùng gen E6,E7 của HPV genotype 16 của chúng tôi đã chỉ ra: HPV16 phổ biến nhất tại mô UTCTC tại miền Bắc Việt Nam. Trong số này biến thể dòng châu Âu (nhóm European Asian và nhóm European prototype) chiếm tỷ lệ đa số (94%), biến thể dòng không châu Âu (nhóm Asian American và African) chiếm tỷ lệ rất thấp (6%). Đột biến im lặng lặp lại mới A thay thế cho G xuất hiện ở gần một nửa số biến thể Asian.

Kiểu phân bố của các biến thể E6 và E7 và đột biến axit amin đặc biệt của HPV16 (E6 D25E; E7 N29S) được tìm thấy trong nghiên cứu. Nhóm biến chủng European Asian HPV-16 với đột biến E7 N29S được xác định có liên quan với sự phát triển của ung thư cổ tử cung ở các nước châu Á. Tuy không có sự tương quan rõ rệt giữa tế bào ung thư cổ tử cung và các biến thể của HPV16, nhưng có mối liên quan chặt chẽ giữa tế bào ung thư cổ tử cung và đột biến ở HPV16 E6 D25E đã được quan sát trong nghiên cứu này (chiếm tỷ lệ $79/80 = 98,75\%$ trong nhóm biến chủng European Asian. Cùng với sự phân bố phổ biến của biến thể European Asian, đột biến T178G, T178A (D25E) cũng là đột biến chủ đạo của nhóm này. Cũng chính đột biến D25E/D25K trên motif của gen E6-HPV16, khiến HPV16 thoát khỏi sự kiểm soát của hệ miễn dịch HLA-A2.1 tồn tại dai dẳng và gây tổn thương ác tính. Đột biến A647G (N29S) xảy ra ngay tại vùng CKII, liền kề với motif của gen E7 vị trí ảnh hưởng trực tiếp đến pRB.

8 đột biến nucleotide mới xuất hiện ở biến thể này chưa được công bố từ bất kỳ nghiên cứu nào trước đó, bao gồm G94A, C94G, G176A (D25K), T277G (N58K), A293G (D64N), C315G (S71C), A370T (E89D). Riêng đột biến im lặng G94A chiếm tới 34% trong tổng số các biến thể và 42% biến thể Asian. Trên gen E7, đột biến im lặng G666A xuất hiện tại riêng biến thể European Asian chiếm 34%. Những đột biến mới này có thể là điểm đặc trưng cho các chủng HPV16 tại Việt Nam.

Một điểm khá mới trong nghiên cứu này đó là những trường hợp đột biến im lặng G94A tại gen E6 ở phân nhóm European Asian cũng đồng thời xuất hiện ở nucleotide thứ 666 trên gen E7 chiếm 34%. Vậy, yếu tố nào đã tác động tới sự xuất hiện đột biến im lặng lặp lại trên cả gen E6 và E7 của HPV16? Tác giả Burns đã đưa ra giả thuyết về vai trò của APOBEC3 - một DNA cytosine deaminase với vai trò khử nhóm amin của cytosine (C) thành uracil (U). Tăng điều hoà APOBEC3B gây biến đổi C thành U, mở đầu cho một loạt đột biến có thể xuất hiện. Trong hầu hết trường hợp, U bị loại bỏ hoặc được thay thế tạm thời bằng adenine (A) trong quá trình tổng hợp DNA, dẫn đến C thành T (hay G thành A ở sợi đơn đối diện). Hoặc U được sửa chữa bởi uracil DNA glycosylase, nhưng cũng chính vì sự sửa chữa này mà enzym DNA polymerase không nhận diện được dẫn đến thay thế base đối diện và bỏ qua A.

Trên cơ sở phân tích biến thể E6, E7 và các đột biến trên 2 vùng gen này nhóm nghiên cứu đang xây dựng giả thuyết phải chăng sự tích lũy đột biến tại gen E6 và E7 là do tác động của APOBEC deaminase tới DNA của HPV. Quá trình tích lũy các đột biến này là nguyên nhân đưa tới sự thay đổi chu trình chết theo chương trình của tế bào (bất tử hóa tế bào) và là cơ sở hình thành u. Chúng tôi cho rằng những nghiên cứu sâu hơn về vai trò của đột biến ở HPV16 E6 D25E; E7 N29S là cần thiết để xác nhận rõ hơn nguy cơ thật sự gây ung thư của chúng.

3.2. Kết quả về đào tạo và hợp tác quốc tế:

Trong khuôn khổ triển khai các nội dung của đề tài chúng tôi đã đào tạo được: 3 NCS Việt Nam (1 NCS tại Nhật và 2 NCS trong nước); 1 thạc sỹ và 3 giảng viên có cơ hội tham gia đào tạo các khóa học ngắn hạn tại Nhật Bản. Tổ chức cho một NCV Việt Nam tham gia báo cáo hội nghị quốc tế tại TOKYO Nhật Bản về HPV tháng 12/2014.

Tổ chức được 1 đoàn công tác của trường Đại học Y Dược Hải Phòng sang thăm và làm việc với Đại học Kanazawa và Đại học Okayama. Mở rộng hợp tác với 2 trường Nhật Bản trong lĩnh vực nghiên cứu, đào tạo và trao đổi học viên, giảng viên.

3.3. Kết quả về chuyển giao công nghệ và các sản phẩm báo cáo chuyên đề:

Đã hoàn thành 5 sản phẩm khoa học là các báo cáo chuyên đề được Hội đồng nghiệm thu đánh giá đạt các tiêu chí khoa học, đúng và đủ theo yêu cầu. 2 qui trình và phương pháp kỹ thuật được ứng dụng trong nghiên cứu đang được các nghiên cứu viên ứng dụng tại một số bệnh viện phục vụ cho chẩn đoán; theo dõi quá trình điều trị bệnh nhân nhiễm HPV là Phương pháp xác định genotype của HPV bằng kỹ thuật ADN microarray và giải trình tự gen; Phương pháp đánh giá mức độ tổn thương tế bào học tại cơ quan ung thư và sự tích hợp của HPV (gen E6, E7) vào ADN của tế bào chủ.

3.4. Đăng các bài báo quốc tế:

Nhóm nghiên cứu đã công bố các kết quả khoa học trong nước và quốc tế về tỷ lệ nhiễm, phân bố genotype, các biến chủng E6, E7 HPV của các genotype phổ biến của HPV trên các nhóm bệnh nhân ung thư cổ tử cung, âm hộ, âm đạo, dương vật, hậu môn ở khu vực miền Bắc, Việt Nam. Đăng 2 bài trên tạp chí quốc tế *Journal Medical Virology* và 8 bài báo khoa học trên các Tạp chí Y học có uy tín của Việt Nam.

4. Kết luận và kiến nghị:

Vắc xin hiện nay đang được sử dụng tại Việt Nam phòng nhiễm 4 genotype (6,11,16,18) hoàn toàn vẫn phát huy tác dụng tốt. Bên cạnh HPV genotype 6,11,16,18; các genotype 35, 45, 51, 58 và 71 cũng chiếm một tỷ lệ nhiễm đáng kể. Vì vậy chúng ta cần có một chiến lược nghiên cứu về vắc xin liên quan đến HPV genotype 35, 45, 51, 58 và 71 để có thể phòng lây nhiễm HPV triệt để hơn.

Sàng lọc phát hiện sớm các bệnh nhân nhiễm HPV, ung thư sinh dục và hậu môn đồng thời can thiệp điều trị sớm thư để giảm tỷ lệ tử vong của nhóm bệnh nhân này

Cần nghiên cứu sâu hơn về biến thể E6, E7 HPV16 và HPV18; vai trò của đột biến ở HPV16 E6 D25E; E7 N29S để xác nhận rõ hơn nguy cơ thật sự gây ung thư của chúng.

MỘT SỐ HÌNH ẢNH CỦA NHÓM NGHIÊN CỨU
TRONG QUÁ TRÌNH TRIỂN KHAI NHIỆM VỤ Ở TRONG NƯỚC VÀ Ở NHẬT
BẢN

