

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN QUANG TRUNG

MỐI LIÊN QUAN GIỮA ĐỘT BIẾN GEN PRE-S/S
CỦA HBV VÀ UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, NĂM 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN QUANG TRUNG

MỐI LIÊN QUAN GIỮA ĐỘT BIẾN GEN PRE-S/S
CỦA HBV VÀ UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

NGÀNH: BỆNH TRUYỀN NHIỄM VÀ CÁC BỆNH NHIỆT ĐỚI

MÃ SỐ: 9720109

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. PGS.TS PHẠM THỊ LỆ HOA

2. PGS.TS HOÀNG ANH VŨ

TP. HỒ CHÍ MINH, NĂM 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được công bố ở bất kỳ nơi nào.

Tác giả luận án

Nguyễn Quang Trung

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
MỤC LỤC.....	ii
DANH MỤC VIẾT TẮT- THUẬT NGỮ ANH-VIỆT	iv
DANH MỤC BẢNG.....	v
DANH MỤC HÌNH	vii
DANH MỤC SƠ ĐỒ - BIỂU ĐỒ	viii
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. Dịch tễ bệnh nhiễm vi rút viêm gan B và ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến vi rút viêm gan B	3
1.2. Cấu trúc và chu trình sống của vi rút viêm gan B trong tế bào gan... 6	
1.3. Cơ chế gây ung thư biểu mô tế bào gan liên quan với vi rút viêm gan B	12
1.4. Kỹ thuật chẩn đoán đột biến gen trên vi rút viêm gan B	17
1.5. Các nghiên cứu về đột biến gen của vi rút viêm gan B liên quan với ung thư biểu mô tế bào gan.....	19
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	35
2.2. Đối tượng nghiên cứu	35
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	36
2.4. Cỡ mẫu của nghiên cứu.....	36
2.5. Xác định các biến số độc lập và phụ thuộc.....	37
2.6. Kỹ thuật đo lường và tiêu chuẩn chẩn đoán trong nghiên cứu	45
2.8. Phương pháp phân tích số liệu.....	53
2.9. Đạo đức trong nghiên cứu.....	53
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	57
3.1. Đặc điểm chung của dân số nghiên cứu.....	57
3.2. Mô tả các đặc điểm đột biến trên gen pre-S/S	61

3.3. Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo các đặc điểm bệnh nhân	68
3.4. Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo ung thư biểu mô tế bào gan	76
3.5. Phân tích các yếu tố liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan.....	82
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	86
4.1. Đặc điểm dân số xã hội, lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu	86
4.2. Mô tả các đặc điểm đột biến trên gen pre-S/S	89
4.3. Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo các đặc điểm của bệnh nhân	93
4.4. Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo ung thư biểu mô tế bào gan	94
4.5 Các yếu tố liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan	102
Hạn chế của đề tài	108
KẾT LUẬN	110
KIẾN NGHỊ	112
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC VIẾT TẮT- THUẬT NGỮ ANH-VIỆT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Aa	Amino acid	Axit amin
Anti-HBc	Hepatitis B core Antibody	Kháng thể kháng kháng nguyên lõi của vi rút viêm gan B
Anti-HBs	Hepatitis B surface Antibody	Kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt của vi rút viêm gan B
APRI	Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio index	Chỉ số tỷ số AST trên tiểu cầu
ARFI	Acoustic Radiation Force Impulse Imaging	Hình ảnh xung lực bức xạ âm
BANC		Bệnh án nghiên cứu
BMI	Body Mass Index	Chỉ số khối cơ thể
CH	Chronic hepatitis	Viêm gan mạn
ER	Endoplasmic reticulum	Lưới nội bào
HBcAg	Hepatitis B core Antigen	Kháng nguyên lõi của vi rút viêm gan B
HBeAg	Hepatitis B e Antigen	Kháng nguyên e của HBV
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen	Kháng nguyên bề mặt của HBV
HBV	Hepatitis B virus	Vi rút viêm gan B
HCC	Hepatocellular carcinoma	Ung thư biểu mô tế bào gan
HSBA		Hồ sơ bệnh án
LHBs	Middle HBV surface protein	Protein bề mặt lớn của HBV
LC	Liver cirrhosis	Xơ gan
MHBs	Middle HBV surface protein	Protein bề mặt trung bình của HBV
MHR	Major hydrophilic region	Vùng ưa nước chính
ORF	Open reading frame	Khung đọc mở
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
ULN	Upper limit normal	Giới hạn trên của bình thường

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1: Bảng thống kê đột biến của vi rút viêm gan B liên quan đến HCC.....	33
Bảng 2.1: Cặp mồi khuếch đại toàn bộ vùng gen S của HBV.....	49
Bảng 2.2: Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng PCR.....	50
Bảng 2.3: Thành phần cho phản ứng cycle sequencing.....	50
Bảng 2.4: Chương trình PCR cycle sequencing.....	51
Bảng 3.1: Đặc điểm dân số xã hội (n=300).....	57
Bảng 3.2: Đặc điểm tiền căn về thói quen (n=300)	58
Bảng 3.3: Đặc điểm tiền căn lây nhiễm và tiền căn gia đình (n=300).....	58
Bảng 3.4: Đặc điểm lâm sàng (n=300)	59
Bảng 3.5: Đặc điểm liên quan với vi rút viêm gan B (n=300).....	59
Bảng 3.6: Các chỉ số xét nghiệm máu (n=300).....	60
Bảng 3.7: Đặc điểm phân bố đột biến vùng pre-S1 và pre-S2.....	61
Bảng 3.8: Đặc điểm phân bố đột biến vùng gen S	64
Bảng 3.9: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo nhóm tuổi	68
Bảng 3.10: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo giới	69
Bảng 3.11: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo tình trạng xơ gan	70
Bảng 3.12: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo tình trạng HBeAg.....	71
Bảng 3.13: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo kiểu gen của HBV	72
Bảng 3.14: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo tải lượng HBV DNA	74
Bảng 3.15: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo HBsAg định lượng.....	75
Bảng 3.16: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo tình trạng đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs.....	76
Bảng 3.17: Phân bố đột biến gen pre-S/S và HCC	76
Bảng 3.18: Liên quan giữa đột biến gen vùng pre-S1 và HCC	77
Bảng 3.19: Liên quan giữa đột biến gen tại vùng chức năng pre-S1 và HCC.....	78
Bảng 3.20: Liên quan giữa đột biến gen vùng pre-S2 và HCC	79
Bảng 3.21: Liên quan giữa đột biến gen vùng S và HCC (n=297).....	79
Bảng 3.22: Liên quan giữa đột biến tại vùng chức năng gen S và HCC (n=297)	80

Bảng 3.23: Phân tích đa biến các đột biến điểm gen pre-S/S liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan (n=284)	81
Bảng 3.24: Liên quan giữa đặc điểm chung và HCC.....	82
Bảng 3.25: Liên quan giữa đặc điểm tiền căn và HCC.....	82
Bảng 3.26: Liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và HCC (n=300)	83
Bảng 3.27: Liên quan giữa các xét nghiệm máu và HCC (n=300).....	83
Bảng 3.28: Phân tích đa biến các yếu tố liên quan đến HCC (n=284)	84

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Phân bố tỷ lệ nhiễm vi rút viêm gan B trên thế giới	3
Hình 1.2: Cấu trúc một virion của vi rút viêm gan B.....	6
Hình 1.3: Cấu trúc và tổ chức bộ gen của vi rút viêm gan B	7
Hình 1.4: Cấu trúc gen pre-S/S của vi rút viêm gan B.....	8
Hình 1.5: Các vùng chức năng pre-S của vi rút viêm gan B.....	10
Hình 1.6: Cấu trúc các protein vỏ của vi rút viêm gan B.....	10
Hình 1.7: Chu trình sống của vi rút viêm gan B	12
Hình 1.8: Cơ chế gây ung thư gan do nhiễm vi rút viêm gan B	16
Hình 1.9: Cấu trúc e-pre-S trong biến thể môi nội spPS1	25

DANH MỤC SƠ ĐỒ - BIỂU ĐỒ

Sơ đồ 3.1: Quy trình xác định đột biến gen trên vi rút viêm gan B.....	48
Sơ đồ 3.2. Sơ đồ thực hiện nghiên cứu.....	55
Sơ đồ 3.3. Sơ đồ phân tích trong nghiên cứu.....	56

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới có khoảng 2 tỷ người tiếp xúc với vi rút viêm gan B, trong đó có hơn 257 triệu trường hợp nhiễm mạn tính và khoảng 820.000 ca tử vong mỗi năm^{1,2,3}. Việt Nam nằm trong vùng tây Thái Bình Dương, thuộc khu vực có tỷ lệ lưu hành vi rút viêm gan B (HBV) cao từ 7-12%. Các công trình giám sát nhận định rằng có khoảng 20-30% những người nhiễm vi rút viêm gan B mạn diễn tiến tới xơ gan và ung thư gan trong suốt đời sống mặc dù đây là một bệnh lý đã có thuốc điều trị đặc hiệu và có vắc xin phòng ngừa^{4,5}.

Ung thư gan đứng hàng thứ 6 trong những bệnh ung thư thường gặp trên thế giới và tỷ lệ mắc ung thư gan cao nhất ở các nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam. Bệnh viêm gan vi rút B mạn chính là nguyên nhân gây ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), với tỷ lệ ước tính là 60% đến 80% các trường hợp^{6,7}. Mức độ phổ biến và nghiêm trọng của bệnh này thúc đẩy các nhà khoa học tìm hiểu sâu hơn về quá trình nhiễm lâu dài của vi rút viêm gan B trong cơ thể người, lý do tại sao nhiễm vi rút có thể dẫn đến HCC⁸.

Cấu trúc virion, sự phức tạp bộ gen của vi rút viêm gan B đã được biết đến từ lâu, và nhiễm vi rút viêm gan B trong thời gian dài cùng sự khiếm khuyết khả năng sửa lỗi trong quá trình sao chép của vi rút đã dẫn đến các đột biến trên bộ gen. Đột biến trên gen S có thể xảy ra tự nhiên hoặc ở những người đã có tiêm ngừa vắc xin, sử dụng globulin miễn dịch đối với vi rút viêm gan B hay do dùng thuốc kháng vi rút. Tác giả Mikael Gencay và cộng sự ghi nhận tần suất biến đổi HBsAg MHR cao nhất ở dân Châu Á, những thay đổi axit amin (116, 120, 122 và 123) ở vùng S làm cho vi rút trốn thoát khỏi miễn dịch, gây ra tình trạng nhiễm vi rút tiềm ẩn hoặc thất bại trong chẩn đoán tầm soát bằng những xét nghiệm tìm HBsAg thường qui⁹ và điều này khiến cho một số ít bệnh nhân mang cùng lúc HBsAg và anti-HBs trong máu^{10,11}.

Ngoài ra, các đột biến trên vùng gen pre-S/S cũng đã được nhắc đến trong y văn là có liên quan đến xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan¹². Khi khảo sát về đột biến mất đoạn pre-S, so sánh giữa kiểu gen B và C, thì tác giả Chen BF nhận

thấy rằng đột biến mất đoạn pre-S có liên quan tình trạng viêm mạn và khả năng sinh ung thư². Còn theo nghiên cứu của Zhang A Y và cộng sự tại Hong Kong, các đột biến mất đoạn và đột biến điểm (tại các codon 4, 27, 167) trên vùng pre-S của HBV hiện diện ở tần suất cao hơn ở nhóm bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn có HCC so với nhóm bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn không có HCC¹³.

Như vậy, một số nghiên cứu về đột biến gen pre-S/S của vi rút viêm gan B đã thực hiện ở các quốc gia nằm trong vùng lưu hành cao. Tuy nhiên, do nhiều nguyên nhân như sự phân bố kiểu gen của vi rút khác nhau tùy theo khu vực địa lý, hạn chế về số lượng mẫu quan sát, khác nhau về tiêu chí chọn bệnh hay do sự khác nhau về chủng tộc và di truyền của bệnh nhân mà các kết quả nghiên cứu về đột biến gen pre-S/S của vi rút viêm gan B chưa có sự nhất quán. Ở người Việt Nam, vấn đề ảnh hưởng của đột biến gen pre-S/S đối với HCC thì như thế nào? Hoặc nói cách khác, loại đột biến nào có thể dẫn đến HCC ở dân số người Việt Nam? Đây là câu hỏi nghiên cứu cần được tìm hiểu của các bác sĩ lâm sàng chuyên khoa gan tại Việt Nam khi phải đối mặt với khá nhiều các tình huống này.

Phòng khám Viêm gan- Khoa Khám bệnh của Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh là một trung tâm lớn để chẩn đoán, theo dõi, điều trị bệnh nhân viêm gan nói chung trong đó có viêm gan do vi rút gần như cho cả khu vực miền Nam. Trung Tâm Y sinh học phân tử của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh là nơi có thể tiến hành được các xét nghiệm giải trình tự gen của HBV. Với những thuận lợi trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quan sát về đột biến gen của vi rút viêm gan B, nhằm kiểm chứng mối liên quan với ung thư biểu mô tế bào gan sẽ giúp hiểu rõ hơn về cơ chế bệnh sinh của bệnh lý này.

Mục tiêu nghiên cứu:

1. Mô tả đặc điểm các loại đột biến trên vùng pre-S/S của vi rút viêm gan B ở những người nhiễm vi rút viêm gan B mạn tại Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.
2. Xác định liên quan giữa đột biến vùng pre-S/S của vi rút viêm gan B với ung thư biểu mô tế bào gan ở người nhiễm vi rút viêm gan B mạn tại Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

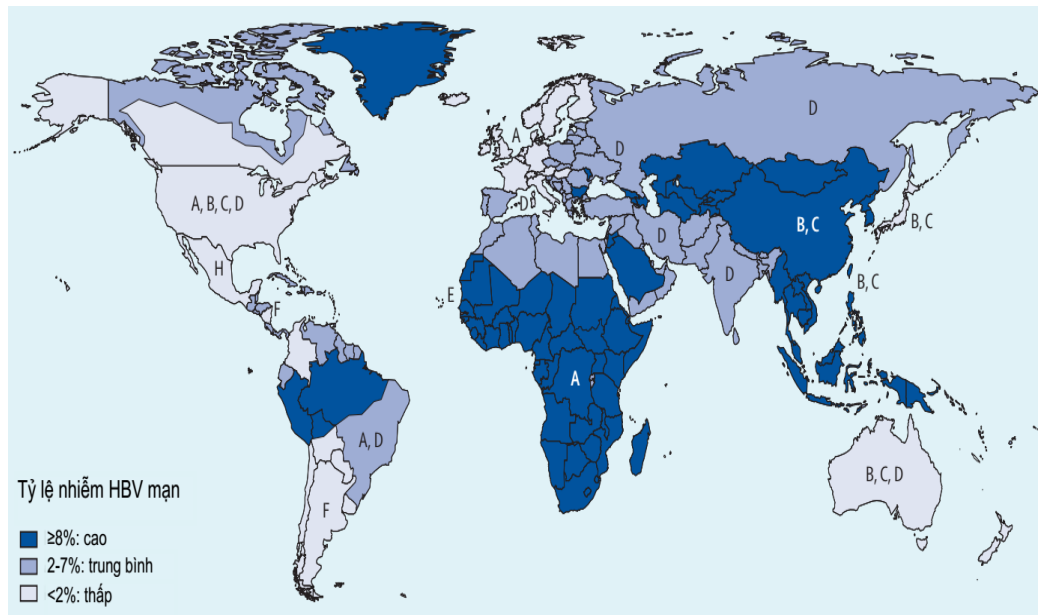
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Dịch tễ bệnh nhiễm vi rút viêm gan B và ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến vi rút viêm gan B

1.1.1. Dịch tễ bệnh nhiễm vi rút viêm gan B

➤ Tỷ lệ nhiễm và đường lây truyền vi rút viêm gan B trên thế giới

Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới năm 2022, có khoảng 2 tỷ người trên thế giới đã từng tiếp xúc với HBV, trong đó có hơn 257 triệu người nhiễm vi rút mạn tính. Tỷ lệ người có HBsAg mạn tính dao động từ 2% đến 20% trong cộng đồng và gây ra khoảng 820.000 ca tử vong mỗi năm^{1,2,3}.



Hình 1.1: Phân bố tỷ lệ nhiễm vi rút viêm gan B trên thế giới

(Nguồn: WHO, 2015)¹⁴

Tỷ lệ lưu hành của vi rút viêm gan B được chia làm 5 khu vực khác nhau:

- (i) Vùng lưu hành cao: có $\geq 8\%$ người có HBsAg (+) trong dân số.
- (ii) Vùng lưu hành trung bình cao: có 5-7% người có HBsAg (+) trong dân số.
- (iii) Vùng lưu hành trung bình thấp: có 2-5% người có HBsAg (+) trong dân số.
- (iv) Vùng lưu hành thấp: có $< 2\%$ người có HBsAg (+) trong dân số.
- (v) Vùng không xác định là không có số liệu thống kê dân số mang HBsAg.

Người sống ở khu vực Châu Phi, Châu Á, vùng Amazon và Trung Đông là những vùng có tỷ lệ lưu hành HBV cao với số người bị nhiễm vi rút mạn tính khoảng 200 triệu người, vì vậy họ có nguy cơ nhiễm vi rút trong suốt cuộc đời rất cao ($\geq 60\%$). Ngoài ra, đường lây truyền của HBV chủ yếu tại các khu vực này là lây qua đường chu sinh, nghĩa là lây từ mẹ sang con hoặc trong thời gian trẻ nhỏ hơn 2 tuổi. Trái lại, ở các khu vực có tỷ lệ lưu hành bệnh thấp như Mỹ, Tây Âu và Úc thì nguy cơ nhiễm vi rút trong suốt cuộc sống $< 20\%$ và đường lây chủ yếu là lây truyền hàng ngang ở tuổi trưởng thành qua quan hệ tình dục và sử dụng chung bơm tiêm có mang mầm bệnh. Khu vực có tỷ lệ lưu hành trung bình có nguy cơ nhiễm HBV trong suốt cuộc sống từ 20-60%^{1,15}.

➤ **Tỷ lệ nhiễm vi rút viêm gan B tại Việt Nam**

Việt Nam nằm trong khu vực Tây Thái Bình Dương là vùng có tỷ lệ lưu hành HBV cao (từ 7-12%). Năm 2007, tác giả Lê Việt thực hiện khảo sát 1200 mẫu máu từ những người cho máu ở tỉnh Quảng Trị, kết quả ghi nhận có 11,4% mẫu có HBsAg dương tính, 51,7% anti-HBc dương tính¹⁶. Năm 2012, một nghiên cứu khác được thực hiện tại 4 thành phố lớn là Hà Nội, Hải Phòng, Khánh Hòa và Cần Thơ, khảo sát 8654 mẫu máu cũng ghi nhận tỷ lệ có HBsAg là 10,7%¹⁷.

➤ **Phân bố các kiểu gen của vi rút viêm gan B trên thế giới**

Năm 2007, có 8 kiểu gen của HBV (A, B, C, D, E, F, G, H) được phân biệt dựa trên sự khác biệt bộ gen lớn hơn 8% và một số kiểu gen phụ đã được xác định và có phân bố địa lý nhất định trên thế giới¹⁸ (Hình 1.1). Các kiểu gen của HBV có liên quan đến đột biến vùng precore (PC) hay vùng basal core promoter (BCP) làm giảm hay không tạo ra được HBeAg, đó là kiểu gen B, C và D, điều này hay xảy ra ở những bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn HBeAg âm tính tại Châu Á. Nhiễm chồng kiểu gen khác hoặc nhiễm cùng lúc nhiều kiểu gen có thể khiến bệnh gan nặng hơn. Kiểu gen C thường gặp hơn ở những bệnh nhân xơ gan. Kiểu gen B của HBV liên quan đến sự phát triển của ung thư biểu mô tế bào gan ở độ tuổi sớm hơn¹⁹.

Lưu hành chủ yếu tại Việt Nam là kiểu gen B và C. Năm 2008, một kiểu gen ký hiệu là “I” từng được nhận diện tại Việt Nam, Lào, Trung Quốc, Ấn Độ và

cộng đồng người Việt Nam sống ở Pháp và Canada xem như là một kiểu gen mới tại Việt Nam²⁰. Tuy nhiên, kiểu gen này chưa được thừa nhận là kiểu gen mới vì sự khác biệt di truyền trung bình của thể tái tổ hợp HBV A/C/G của Việt Nam là <8% so với toàn bộ cấu trúc gen của kiểu gen C^{21,22,23}.

Cho tới năm 2020, người ta đã xác định được 10 kiểu gen chính của HBV (A-J)^{24,25}. Chẩn đoán xác định kiểu gen của HBV ngày càng được quan tâm vì một số nghiên cứu cho thấy kiểu gen HBV có liên quan đến các vấn đề sau:

- Tỷ lệ chuyển huyết thanh HBeAg: kiểu gen B có tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh HBeAg cao hơn kiểu gen C;
- Bệnh cảnh lâm sàng: suy gan cấp, viêm gan thể bùng phát thường gặp ở kiểu gen D hơn các kiểu gen khác;
- Diễn tiến của bệnh: kiểu gen C dễ diễn tiến đến HCC nhất và là yếu tố nguy cơ độc lập của HCC;
- Đáp ứng với điều trị: kiểu gen A và B đáp ứng tốt với interferon và Peg-interferon hơn C và D.

1.1.2. Dịch tễ ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến vi rút viêm gan B

Trên thế giới

Vào năm 2020, ung thư gan là bệnh ung thư được chẩn đoán phổ biến đứng hàng thứ sáu và là nguyên nhân gây tử vong do ung thư đứng hàng thứ ba trên toàn thế giới, với khoảng 906.000 ca mắc mới và 830.000 ca tử vong²⁶. Tỷ lệ mắc và tử vong ở nam giới cao hơn từ 2 đến 3 lần so với nữ giới xảy ra ở hầu hết các khu vực trên thế giới^{7,8}.

Tỷ lệ mắc ung thư gan cao nhất tại các nước đang phát triển, phổ biến nhất là các quốc gia thuộc khu vực châu Á như Mông Cổ (Trung Á), Thái Lan, Campuchia, Việt Nam (Đông Nam Á), và châu Phi như Ai Cập (Bắc Phi) và Niger (Tây Phi). Mông Cổ là nước có tỷ suất mắc bệnh cao nhất với 85,6 trường hợp trên 100.000 dân và Trung Quốc là nơi có số lượng người mắc bệnh nhiều nhất với hơn 120 triệu người mắc ung thư gan. Tỷ lệ mắc ung thư gan trên 100.000 dân ở khu vực Đông Nam Á là 21,2 trường hợp ở nam giới, kết quả này cao hơn gấp 3 lần ở nữ giới với tỷ lệ là 7,1 trường hợp⁸.

Tại Việt Nam

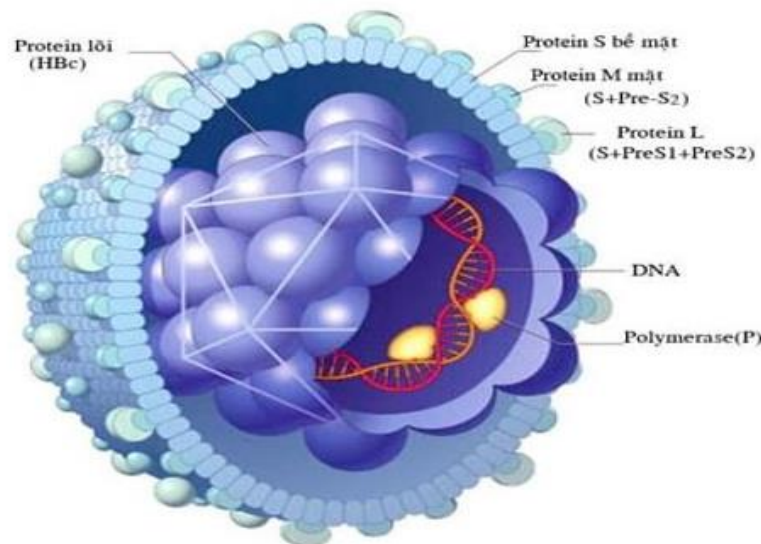
Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới năm 2020, trong số gần 200.000 ca mắc mới và hơn 100.000 ca tử vong do ung thư tại nước ta thì ung thư gan xếp hàng đầu với 26.418 trường hợp mắc mới chiếm 14,5% và là nguyên nhân tử vong của 20.256 trường hợp chiếm 20,6%. Tỷ suất mắc ung thư gan trong vòng 5 năm tính đến thời điểm thống kê là 29,55 ca/ 100.000 dân. Tỷ suất mắc mới sau khi hiệu chỉnh cho nhóm tuổi ở nam là 38,0/100.000 người gấp gần 4 lần so với nữ là 9,8/100.000 người²⁷.

1.2. Cấu trúc và chu trình sống của vi rút viêm gan B trong tế bào gan

1.2.1 Cấu trúc virion và bộ gen của vi rút viêm gan B

HBV thuộc gia đình Hepadnaviridae²⁸. Trong huyết thanh, HBV hiện diện ở 3 dạng cấu trúc:

- (i) Các tiểu thể hình cầu có đường kính 22 nm chiếm đa số.
- (ii) Các tiểu thể hình ống hoặc hình sợi có đường kính 22 nm và chiều dài thay đổi, có thể đến 200 nm, hình thành bởi các tiểu thể hình cầu chồng lên nhau.



Hình 1.2: Cấu trúc một virion của vi rút viêm gan B

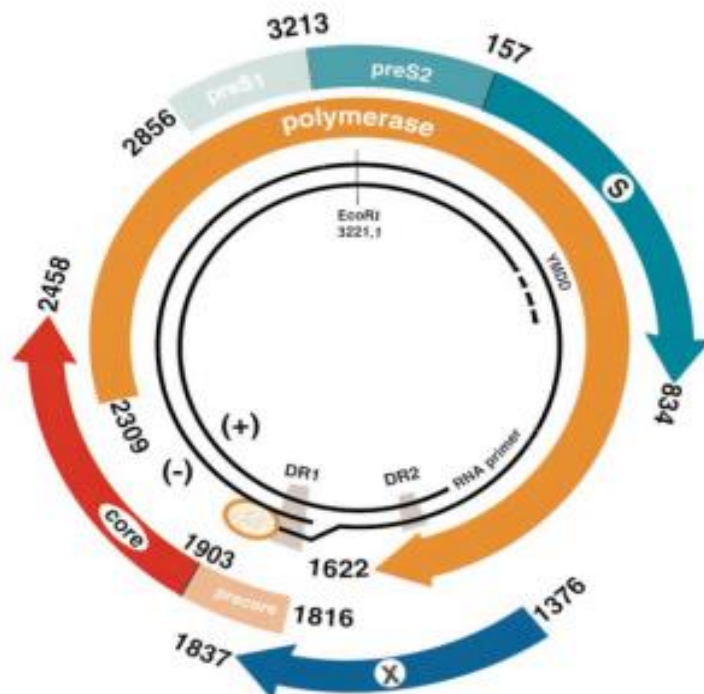
(Nguồn: Fauquet, 2005)²⁸

- (iii) Các virion hoàn chỉnh, trước đây gọi là tiểu thể Dane có kích thước lớn, đường kính 42- 44 nm. Cấu tạo gồm vỏ bọc lipoprotein bên ngoài chứa 3 dạng

kháng nguyên bề mặt (pre-S1, pre-S2 và S), và lõi nucleocapsid bên trong đường kính 28 nm, được cấu thành bởi kháng nguyên lõi HBcAg bao bọc xung quanh một phức hợp gồm sợi DNA chuỗi kép và DNA polymerase (Hình 1.2)²⁹.

Bộ gen của HBV là DNA có chiều dài xấp xỉ 3,2 kb (3200 cặp bazơ) và trọng lượng phân tử 2×10^6 dalton. Trong nhân tế bào gan, DNA của HBV hiện diện ở dạng sợi DNA vòng tháo xoắn (rcDNA: relaxed circular DNA), gồm 2 sợi^{29,30}.

+ **Sợi dài L** (sợi âm) nằm ngoài, có chiều dài đầy đủ gồm 3,2 kb, mang toàn bộ thông tin di truyền của HBV. Đầu 5' của sợi âm liên kết đồng hóa trị với enzyme sao chép ngược của vi rút. Sợi L bao gồm thông tin mã hóa cho 4 khung đọc mở (ORF: opening reading frame) S, C, P và X nằm gối chồng lên nhau, với 6 codon bắt đầu, 4 promoter (preS1, preS2, core và X) và 2 thành phần enhancer (EN-I và EN-II). ORF-S mã hóa cho kháng nguyên bề mặt HBsAg; ORF-C mã hóa cho kháng nguyên lõi HBcAg và HBeAg; ORF-X mã hóa cho protein HBx và ORF-P mã hóa cho DNA polymerase.



Hình 1.3: Cấu trúc và tổ chức bộ gen của vi rút viêm gan B

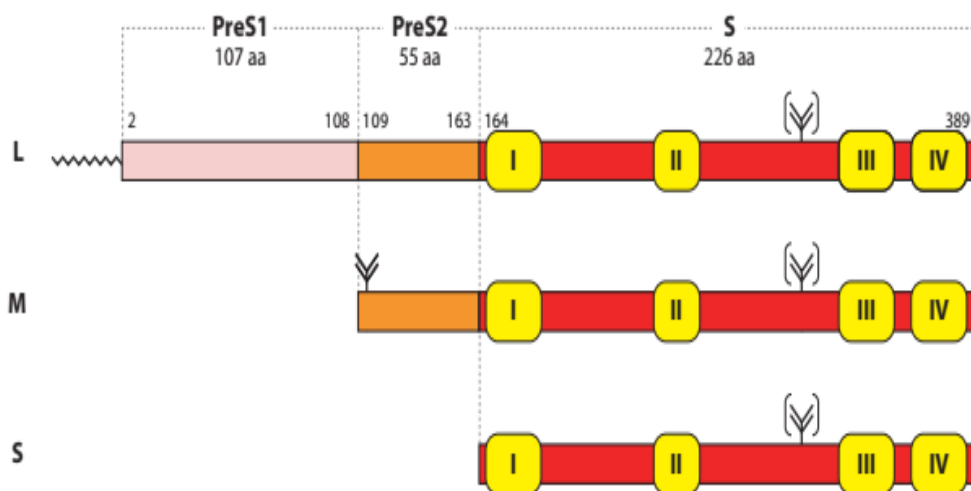
(Nguồn: Hunt C.M., 2000)³¹

Vùng khởi động (promoter) và vùng tăng cường (enhancer): ở mỗi đầu của các khung đọc mở. Vùng khởi động là vị trí gắn của bộ gen HBV với RNA polymerase của tế bào khi quá trình tổng hợp RNA từ khuôn mẫu DNA được khởi phát. Nằm kế cận vùng khởi động là vùng tăng cường. Chính tại vị trí gen kích hoạt này, các protein của vi rút hoặc của tế bào gắn kết vào và kích hoạt gen khởi động để khởi động quá trình sao chép.

+ **Sợi ngắn S** (sợi dương) nằm trong, chiều dài thay đổi từ 50% đến 100% chiều dài bộ gen do khi được tổng hợp tiếp thêm ở phía đầu 3'. Đầu 5' của sợi dương liên kết với các oligonucleotid^{30,32}.

1.2.2. Chức năng sinh học các gen pre-S/S của vi rút viêm gan B

Gen pre-S/S có ba codon khởi đầu trong một khung đọc mở, tùy thuộc vào vị trí khởi đầu được dịch mã giữa S, pre-S1 hoặc pre-S2 mà mã hóa ra 3 loại protein là protein vỏ nhỏ (S), protein vỏ trung bình (M) và protein vỏ lớn (L). Protein vỏ nhỏ chứa 226 axit amin do gen S quy định là các protein chính tạo nên HBsAg. Protein vỏ trung bình là phần protein của gen S chứa thêm thành phần pre-S2 với 55 axit amin bổ sung. Protein vỏ lớn chứa thêm phần pre-S1 liên kết vào các protein trung bình với phần mở rộng có thêm 108 hoặc 119 axit amin bổ sung, tùy thuộc vào kiểu gen và được thấy nhiều hơn trong các hạt virion^{29,30} (Hình 1.3 và Hình 1.4).



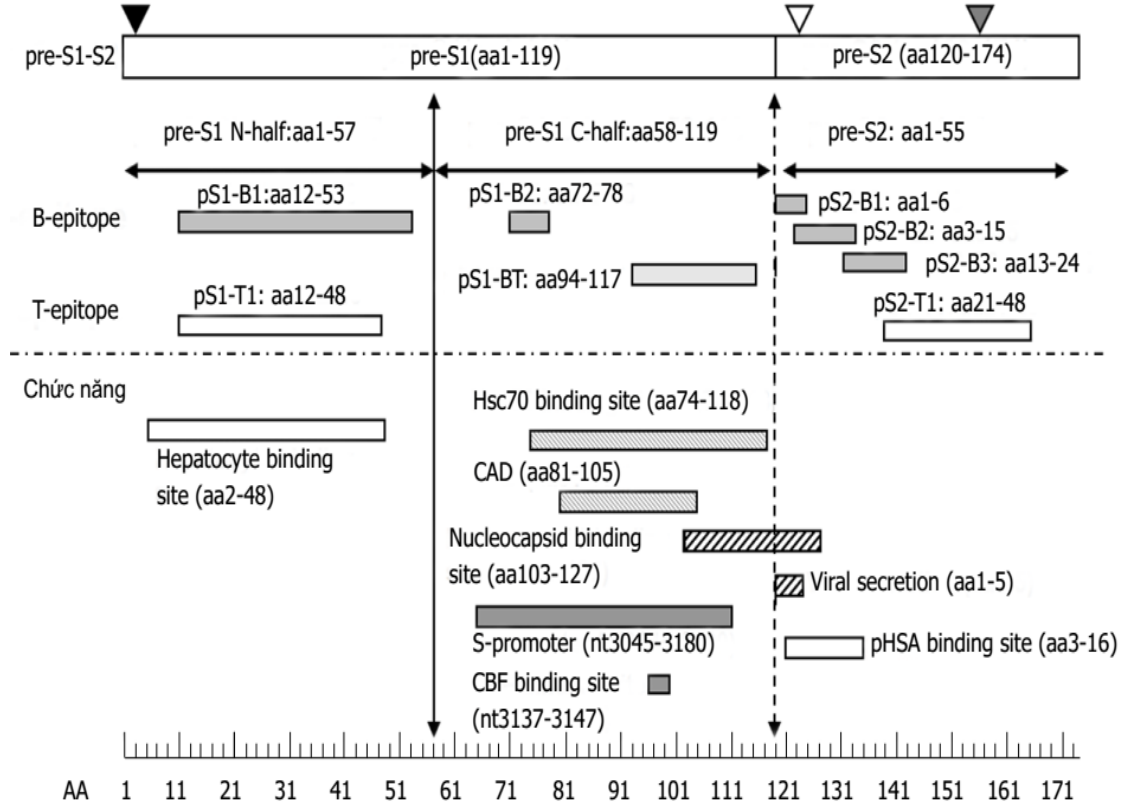
Hình 1. 4 : Cấu trúc gen pre-S/S của vi rút viêm gan B

(Nguồn: Stefan Seitz, 2020)³³

Vùng pre-S (pre-S1 và pre-S2) của protein L quan trọng cho sự nhân lên của vi rút và chứa nhiều vị trí chức năng. Đầu N tận của pre-S1 có vị trí gắn kết tế bào gan (Hepatocyte binding site- aa2-48) hay NTCP (sodium taurocholate co-transporting polypeptide), rất cần thiết cho sự gắn kết của HBV với tế bào gan; đầu C tận của pre-S1 có vị trí S promoter và vị trí gắn kết với yếu tố liên kết CCAAT (CBF binding site: CCAAT binding factor) hay còn gọi là vị trí cho cấu trúc liên kết kép, cần thiết cho quá trình phiên mã S RNA; vị trí gắn kết protein sốc nhiệt 70 (Hsc70: heat-shock protein 70) và yếu tố quyết định gắn kết với tế bào chất (CAD: cytosolic anchorage determinant), quan trọng đối với cấu trúc liên kết kép của protein L; vị trí gắn nucleocapsid (NBS: nucleocapsid binding site), cần thiết cho quá trình tạo hình thái virion. Vùng pre-S2 có các vị trí tiết vi rút (VS: viral secretion); và vị trí polyme hóa albumin của người (pHSA: polymerized human albumin)^{34,35}. Vùng pre-S cũng đóng vai trò thiết yếu trong tương tác với những đáp ứng miễn dịch vì nó chứa epitope của cả tế bào B và tế bào T (Hình 1.5)^{36,37}. Ngược lại, vai trò sinh học protein M trong vòng đời của vi rút vẫn còn gây tranh cãi. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy protein M không cần thiết cho sự nhân lên của vi rút, hình thành các virion, hoặc sự lây nhiễm. Huang và cộng sự³⁸ đã xác định vai trò điều hòa mới của protein M, có thể trải qua quá trình phân giải protein để tạo ra MHBs (middle HBV surface proteins) (aa 1-57 của protein M) để điều chỉnh lại quá trình phiên mã của vùng S promoter. Ngoài ra, vùng pre-S2 của protein M gắn với pHSA (aa 3-16), nhưng ý nghĩa của sự liên kết này vẫn chưa được biết rõ³⁶.

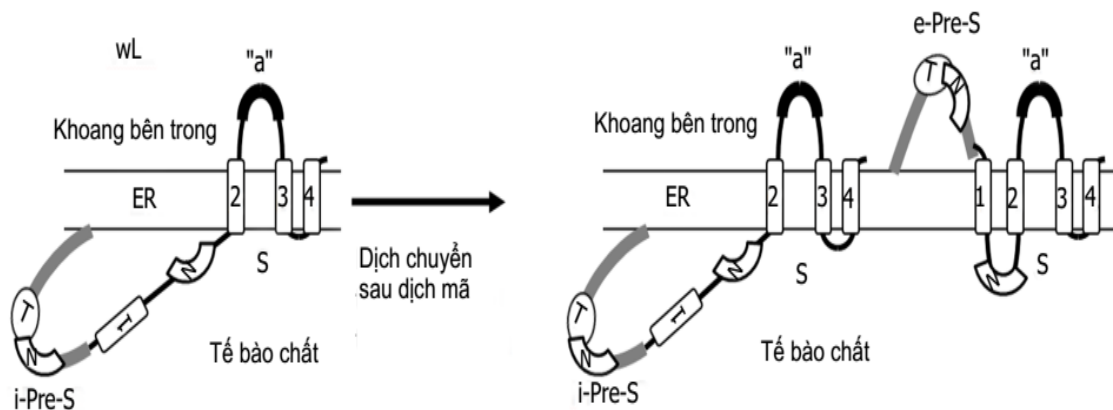
Các protein vùng S cần thiết cho quá trình hình thành và tiết của virion, và chúng cũng chứa những epitope cho cả tế bào B và tế bào T¹⁰. Protein vỏ HBV được tổng hợp ở lưới nội bào (ER). Protein vỏ HBV có 4 vùng xuyên màng (TM: transmembrane 1-4) trải rộng khắp ER với các vòng lặp axit amin bên trong và bên ngoài tế bào chất (Hình 1.6). Vòng lặp TM1 lưỡng tính (aa 15–30) và TM2 kỵ nước (aa 78–104) được phân cách bằng vòng tế bào ưa nước I (CYL-I). Vòng lặp liên kết TM2 và TM3 nằm ngoài ER bao gồm aa 99-169, trong vòng lặp này có vùng được gọi là vùng a (aa 122-148), có ý nghĩa lâm sàng và vi rút quan trọng vì

đây là vùng quyết định kháng nguyên chính của HBV trực tiếp chống lại đáp ứng anti-HBs của ký chủ. Phần đầu C tận của S lại là phần kỵ nước với TM3 (aa169–199) và TM4 (aa 203– 224).



Hình 1. 5: Các vùng chức năng pre-S của vi rút viêm gan B

(Nguồn: Bing- Fang Chen, 2018)²



Hình 1. 6: Cấu trúc các protein vỏ của vi rút viêm gan B

(Nguồn: Bing- Fang Chen, 2018)²

Những cấu trúc xuyên màng của protein M giống hệt protein S. Ngược lại, protein L có hai cấu trúc xuyên màng. Về mặt sinh học, CAD của vùng pre-S1 tương tác với protein Hsc70, vì thế nó ngăn chặn sự chuyển dịch đồng dịch mã pre-S để duy trì vùng pre-S của protein L³⁹. Trong quá trình hình thành, xấp xỉ một nửa phân tử protein L sau dịch mã vùng pre-S chuyển vào vùng pre-S của nó trong ER, từ đó tạo ra cấu trúc liên kết kép (Hình 1.6)⁴⁰. Protein L đóng vai trò chức năng song hành trong vòng đời của vi rút bằng cách định hướng vùng pre-S ở cả tế bào chất bên trong (i-pre-S: inside) và khoang bên ngoài (e-pre-S: outside) vi rút, vị trí i-pre-S cho vỏ bọc capsid và e-pre-S để liên kết với thụ thể⁴⁰.

1.2.3. Chu trình sống của vi rút viêm gan B trong tế bào gan

Chu trình trong tế bào của HBV đã được hiểu tương đối rõ và thời gian nhân lên của nó là khoảng 2,6 ngày. Ở những người nhiễm HBV, có thể có đến 10^{21} vi rút được tạo ra mỗi ngày (Hình 1.7).

(1) Sau khi vào cơ thể, phần vỏ của HBV bám vào màng tế bào gan nhờ sự nhận biết thụ thể trên màng tế bào, sau đó vi rút hòa nhập với protein màng tế bào và xâm nhập vào bên trong tế bào gan.

(2) Sau khi vào tế bào chất, nucleocapsid được giải phóng và chỉ có phần lõi chứa DNA và enzym DNA polymerase đi vào nhân tế bào gan.

(3,4) Tại nhân tế bào gan, rcDNA (partial double-stranded viral genome: bộ gen của HBV) được chuyển đổi thành DNA dạng vòng đồng hóa trị (cccDNA: covalently close circular DNA), một dạng plasmid DNA đặc biệt được cấu trúc bởi các protein histone và không histone, tồn tại bền vững một thời gian dài trong tế bào gan. Tương tự như nhiễm sắc thể, nó được điều hòa bởi của các chất đồng hoạt hóa phiên mã, chất ức chế và enzyme. cccDNA có nhiều vị trí gắn kết với các yếu tố phiên mã đặc hiệu của gan. Các bản phiên mã HBV khác nhau được vận chuyển vào tế bào chất, nơi chúng được dịch mã hoặc sử dụng làm khuôn mẫu gen để sao chép RNA cho các thế hệ tiếp theo của vi rút.

(5) mRNA được chuyển ra tế bào chất và giải mã tạo thành các protein của vi rút (protein lõi, protein polymerase, protein X, protein bề mặt) trong tế bào chất.

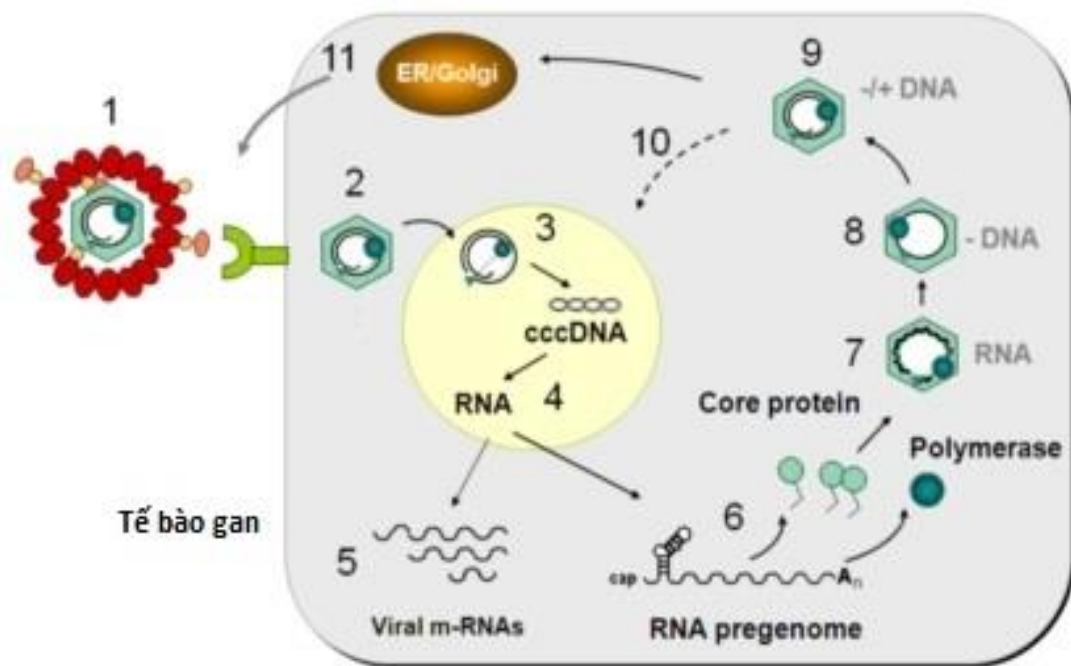
(6) Protein lõi (core protein) bao bọc RNA tiền genome (RNA pregenome)

(7) Enzym polymerase tạo thành capsid.

(8,9) RNA tiền genome sẽ sao chép ngược thành DNA.

(10) Capsid chứa DNA mới được tổng hợp này có thể phóng thích DNA vào nhân tế bào gan để tạo thành cccDNA.

(11) Trường hợp Capsid chứa DNA được ghép thêm phần vỏ bọc trong mạng lưới nội bào (ER) và thể Golgi, sau đó phóng thích ra khỏi tế bào gan dưới dạng virion hoàn chỉnh^{30,41}.



Hình 1.7: Chu trình sống của vi rút viêm gan B

(Nguồn: Keiji Ueda, 2021)⁴¹

1.3. Cơ chế gây ung thư biểu mô tế bào gan liên quan với vi rút viêm gan B

Yếu tố nguy cơ gây HCC là tình trạng viêm mạn dẫn đến viêm hoại tử mạn tính⁴². HCC liên quan vi rút viêm gan, HBV là nguyên nhân phổ biến nhất trên thế giới; cơ chế nền tảng của ung thư gan gây ra do HBV là sự tích hợp DNA của nó vào trong bộ gen người làm thay đổi chương trình chuyển hóa tế bào⁴³ và thay đổi đáp ứng miễn dịch của ký chủ; những protein của vi rút ảnh hưởng đến con đường truyền tín hiệu, đáp ứng với stress tế bào và những đáp ứng viêm.

Điều hòa gen

HBV là loại hepadnavirus duy nhất có thể tích hợp DNA của nó vào bộ gen của tế bào gan ký chủ gây mất tính ổn định bộ gen. Điều này dẫn đến việc tạo ra những protein có thể làm thay đổi sự biểu hiện của các gen sinh ung hoặc những yếu tố ức chế khối u^{44,45}.

HBV có thể gia tăng biểu hiện yếu tố ATF7 (activating transcription factor 7) bằng cách điều hòa ngược miR-340-5p, tương tác với HSPA1B (heat shock protein family A member), khởi động sự tăng sinh và ức chế tình trạng chết tế bào ảnh hưởng tới sự phát triển ung thư gan⁴⁶.

CccDNA của HBV là yếu tố quan trọng phát triển HCC. Sự tích hợp DNA của HBV vào gen của tế bào gan đóng vai trò quan trọng trong quá trình sao chép ngược và nhân lên của vi rút, tạo ra HBx hoặc protein pre-S2/S, đóng góp đến quá trình sinh ung thư bằng cách ảnh hưởng tới biểu hiện gen hoặc hoạt hóa những con đường tín hiệu sinh ung⁴⁷.

Thêm vào đó, RNA không mã hóa đoạn dài yếu tố tăng trưởng β (lncRNA-ATB: transforming growth factor beta-activated long non-coding RNA), một yếu tố sinh ung thư mới, được kích hoạt bởi yếu tố tăng trưởng β (TGF- β : transforming growth factor beta), làm gia tăng những khối u di căn, tế bào gan ung thư và cũng liên quan đáng kể với nhiễm HBV⁴⁸.

Điều hòa miễn dịch

Nhiễm HBV mạn tính là yếu tố nguy cơ chính của tổn thương gan và HCC. Trong viêm gan do vi rút mạn, sự phát triển xơ hóa, xơ gan và HCC liên quan với đáp ứng miễn dịch của ký chủ chống lại những tế bào gan bị nhiễm vi rút. Những xáo trộn chức năng của tế bào T chuyên biệt đối với vi rút là yếu tố chính làm mất khả năng đáp ứng miễn dịch thải trừ những tế bào bị nhiễm mầm bệnh, mặt khác điều đó ảnh hưởng đến sự phát triển của bệnh⁴⁹. T CD8 gây độc tế bào là những tế bào miễn dịch then chốt chống lại khối u. Cơ chế hoạt động của những tế bào miễn dịch này khởi phát HCC chủ yếu thông qua sự tiết các cytokine và các yếu tố tăng trưởng, chính các yếu tố này làm tăng sinh tế bào khối u và ức chế hiện tượng chết theo chương trình của những tế bào bất thường này.

Tự thực bào, một cơ chế bảo vệ và đề kháng quan trọng phổ biến ở những tế bào có nhân, liên quan đến đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và thu được của cơ thể và đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa nội mô và sinh lý của tế bào gan. Suy giảm tự thực bào có thể giải thích cho cơ chế bệnh sinh của viêm gan. Vai trò tự thực bào trong HCC là song song. Trong giai đoạn sớm của quá trình sinh ung thư, tự thực bào đóng vai trò là yếu tố ức chế khối u, ngăn chặn sự mất ổn định của bộ gen bằng cách dọn dẹp những protein và những phân tử bị tổn thương; trong giai đoạn sau của sự phát triển khối u, những tế bào nền và tế bào ung thư sử dụng tự thực bào để tạo ra những chất dinh dưỡng vi môi trường khối u, khởi phát và tạo ra tiến trình hình thành HCC. Thêm vào đó, tự thực bào những tế bào u và cả tế bào ký chủ trong vi môi trường xung quanh cũng thúc đẩy sự hình thành và phát triển khối u⁵⁰.

Trong viêm gan HBV mạn, tế bào T bị kích thích liên tục bởi những kháng nguyên của vi rút. Protein chết theo chương trình PD-1 (programmed cell death protein 1) và tế bào T điều hòa CD4+Foxp3+ là những yếu tố ức chế và hoạt hóa miễn dịch, đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì cân bằng. HBV ổn định về mặt di truyền nhưng các thay đổi kháng nguyên của nó xuất hiện, điều này dẫn đến hoạt hóa miễn dịch làm mất năng lượng hoặc rối loạn chức năng tế bào gan. HBsAg được tạo ra quá nhiều và những phân tử vi rút là thành phần chủ yếu của pre-S1 và pre-S2 có thể trốn thoát kháng thể của ký chủ và nhiễm vào những tế bào mới⁵¹.

Protein của vi rút điều hòa những con đường truyền tín hiệu

Điều hòa những con đường truyền tín hiệu bởi các protein của vi rút là một trong những cơ chế sinh HCC của HBV. HBx, một trong những protein của HBV, đóng vai trò chính trong sự xuất hiện và di căn của ung thư gan. HBx gây tăng điều hòa MSL2 (male specific lethal) trong những lớp tế bào gan ung thư chuyển nhiễm HBx ổn định và chuột biến đổi gen HBx bằng cách hoạt hóa tín hiệu Yap (yes-associated protein)/ FoxA1, tạo ra vòng điều hòa ngược dương tính (HBx/MSL2/cccDNA/HBV) điều chỉnh cccDNA của HBV và thúc đẩy sự sinh HCC. HBx khởi phát sự polymer hóa actin và du nhập tế bào gan ác tính bằng cách điều chỉnh protein calmodulin⁵². Zhou và cs đề xuất rằng HBx bắt giữ proton và

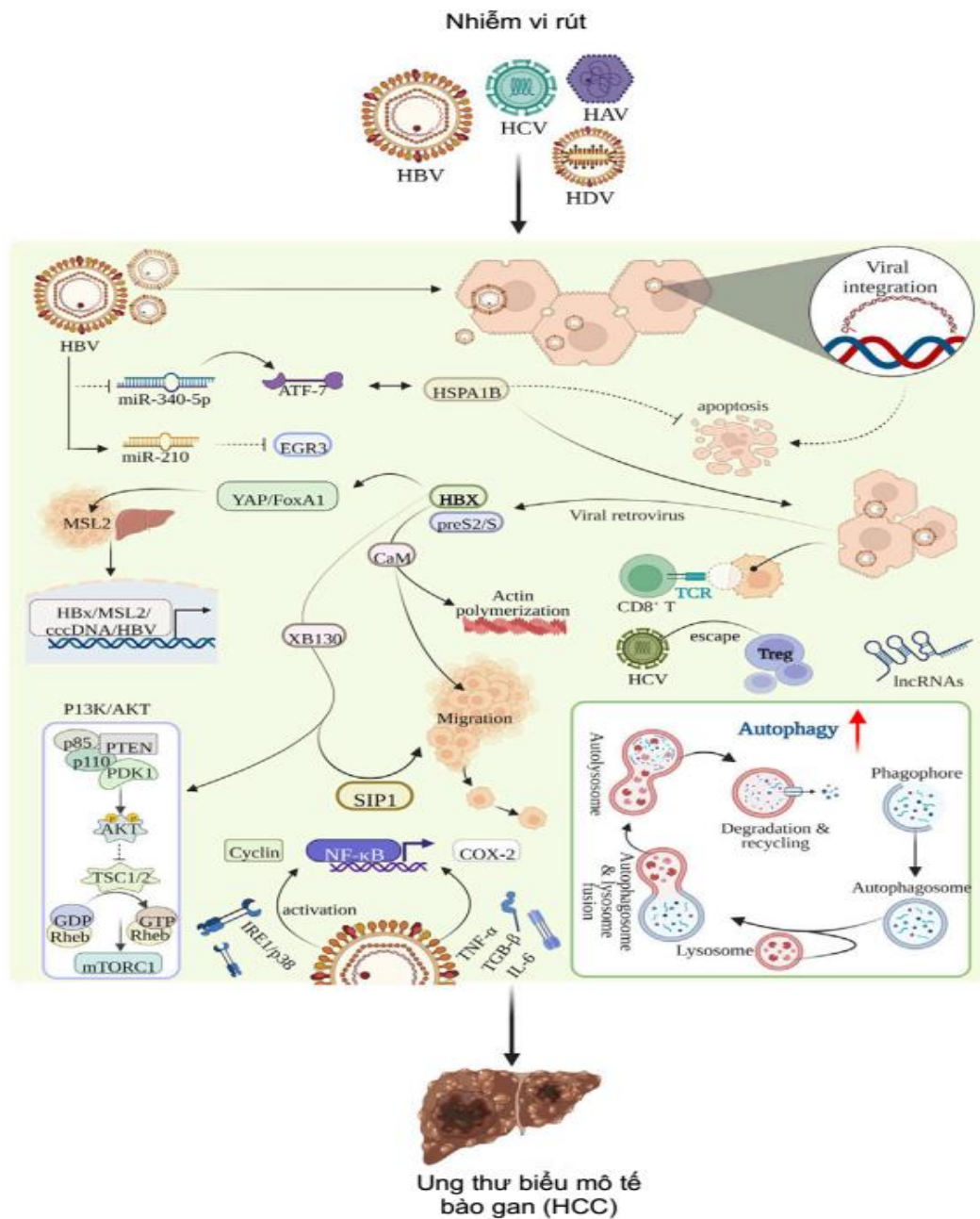
ion chlor và gây ra sự biểu lộ collagen ở gan, hình thành các cầu nối hydro mạnh mẽ với các proton, HBx và collagen tích tụ HCl cục bộ gây ra xơ gan ở một số bệnh nhân, tiến triển tới ung thư gan⁵³. HBx điều chỉnh các quá trình sinh học trong tế bào HepG2 và thúc đẩy phát triển HCC bằng cách kích hoạt P13K (XB130-mediated phosphatidylinositol 3- kinase)/ AKT⁵⁴. HBx làm tăng biểu hiện protein tương tác Smad 1 (SIP1: Smad- interacting protein 1) và tuyển dụng nó để thúc đẩy E-cadherin ngăn chặn quá trình phiên mã E-cadherin và hậu quả là giảm sự biểu hiện E-cadherin ngăn chặn sự kết dính và gắn kết giữa các tế bào, từ đó thúc đẩy khả năng xâm lấn của khối u. Sau khi chuyển đổi vector HBx, mức độ biểu hiện của lncRNA-ATB và TGF- β gia tăng trong những tế bào HepG2, đi kèm với tăng tự thực bào, có thể là cơ chế tiềm tàng mà qua đó HBV có thể gây ra HCC¹³.

Các protein bề mặt lớn của HBV (LHBs: large HBV surface proteins) chứa vùng pre-S1 nguyên vẹn gắn kết với polypeptide đồng vận chuyển natri taurocholate thụ thể HBV trên tế bào gan tạo điều kiện cho sự xâm nhập của vi rút. Đột biến pre-S2 LHBs là các protein sinh ung thư quan trọng của vi rút. Ví dụ, protein bề mặt biến thể pre-S2 gắn với JAB1 và gây sự chuyển vị hạt nhân của JAB1, từ đó kích hoạt p27/retinoblastoma/Cdk2/cyclin A và thúc đẩy sự tiến triển chu kỳ tế bào⁵⁵.

Stress oxy hóa và stress lưới nội bào

Stress oxy hóa và stress lưới nội bào được quan sát trong bệnh viêm gan mạn gây ra bởi vi rút và với khả năng sinh ung, dẫn đến sản xuất một số lượng lớn các cytokine và chemokine. Căng thẳng lưới nội bào trong đại thực bào kích hoạt GSK-3 β tiền viêm, yếu tố hạt nhân kappa B (NF- κ B) và con đường protein kinase được hoạt hóa mitogen (MAPK), và tín hiệu căng thẳng có thể lan truyền đến từng tế bào gan thông qua các chất trung gian mạnh mẽ. Điều này kích hoạt phản ứng chết tế bào qua trung gian protein trong những tế bào không phải nhu mô gần đó⁵⁶. Biểu hiện của LHBs ở người nhiễm HBV mạn cũng kích hoạt phản ứng quá tải ER kéo dài, dẫn đến kích hoạt con đường truyền tín hiệu căng thẳng ER. Việc gấp sai protein gây đột biến pre-S kích hoạt đáp ứng của protein mở và truyền tín hiệu qua trung gian căng thẳng lưới nội bào, bao gồm hoạt hóa qua trung gian IRE1/p38 của

NF- κ B và COX-2, dòng chảy canxi, phân cắt calpain và sự biểu hiện quá mức của cyclin A, dẫn đến sự trùng lặp quá mức của centrosome⁵⁵



Hình 1.8: Cơ chế gây ung thư gan do nhiễm vi rút viêm gan B

(Nguồn: Gao, 2022)⁵⁷

Tình trạng viêm

HCC là một ví dụ nổi tiếng của u gây ra bởi tình trạng viêm, những yếu tố viêm và miễn dịch bao gồm tế bào T, cytokine, đóng vai trò quan trọng trong sự

phát triển HCC, bao gồm interleukin-6, interferon- α , TGF- β , và những cytokine khác. HCC liên quan HBV được gây ra chủ yếu do những đáp ứng viêm và miễn dịch của ký chủ, sự chuyển dạng sinh u trong những ung thư liên quan thường do tình trạng viêm kéo dài và xơ gan⁴⁷. Nồng độ IL-6 và IL-1 gia tăng bất thường ở những bệnh nhân HCC, và có nhiều sợi collagen trong mô gan ung thư. Can thiệp vào cXcr3 (c-X-c motif chemokine receptor 3) có thể ức chế sự tăng sinh và xâm nhập của tế bào. Nó cũng có thể làm giảm nồng độ biểu hiện của chuỗi $\alpha 1$ của collagen típ 1 và các protein trong con đường Tlr5/ Myd88, thúc đẩy quá trình chết chương trình trong những tế bào HBV-1X-2⁵⁸.

1.4. Kỹ thuật chẩn đoán đột biến gen trên vi rút viêm gan B

Những tiến bộ công nghệ gần đây đã giúp việc phát hiện các đột biến trong HBV DNA trở nên dễ dàng hơn. Nhiều phương pháp tiếp cận được sử dụng để phát hiện các đột biến gen của HBV, trong đó phản ứng chuỗi polymerase (PCR) kết hợp giải trình tự Sanger là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất²⁴. Các phương pháp tiếp cận khác bao gồm phân tích đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn (RFLP), giải trình tự dựa trên dòng nhân bản (cloning sequencing) và kỹ thuật PCR thời gian thực (realtimePCR) cũng được sử dụng trong khảo sát đột biến gen của HBV²⁴. Các đột biến của vi rút viêm gan B đã được tìm thấy ở cả bệnh nhân cấp tính và mạn tính trong tất cả bốn khung đọc mở của HBV: vùng pre-S và S, vùng P (polymerase), vùng pre-C và C, vùng X².

1.4.1. Kỹ thuật PCR đa hình chiều dài cắt giới hạn (PCR- RFLP)

Đây là kỹ thuật nghiên cứu tính đa hình của các đoạn DNA dựa trên nguyên lý sử dụng các enzyme cắt giới hạn (Restriction Enzyme - RE). Phương pháp này xác định sự biến đổi của gen thông qua sự vắng mặt của các vị trí cắt giới hạn. Nguyên tắc của kỹ thuật này dựa trên tính đặc hiệu của các enzyme cắt giới hạn tại vị trí nhận biết của chúng trên DNA. Bộ gen DNA sẽ được cắt bằng các RE và chạy điện di qua gel agarose, được thấm qua màng lai và lai với một mẫu dò DNA (được đánh dấu phóng xạ) liên kết với một trình tự đặc biệt. Sự khác biệt vị trí cắt giữa hai cá thể sẽ tạo ra những đoạn cắt khác nhau để cho ra các sản phẩm lai riêng biệt và được nhận diện bằng cách so với sản phẩm chuẩn.

Kỹ thuật PCR-RFLP có ưu điểm vì là chỉ thị sinh học đồng trội cho phép phân biệt được cá thể đồng hợp và dị hợp. Người ta dùng phản ứng PCR để khuếch đại vùng gen cần khảo sát, sau đó sản phẩm khuếch đại được cắt bằng các enzyme cắt giới hạn, sản phẩm cuối cùng được qua phản ứng điện di để đọc kết quả. Kỹ thuật PCR-RFLP bỏ qua bước lai phóng xạ nên giá thành rẻ hơn, ít nguy hiểm hơn và thường được sử dụng để tạo dòng, xác định tình trạng dị hợp tử hay sự methyl hóa các gen⁵⁹.

1.4.2. Kỹ thuật giải trình tự gen

Phương pháp giải trình tự cổ điển hay giải trình tự Sanger, phương pháp này dùng các đoạn mồi bổ sung đặc hiệu với trình tự mục tiêu, thêm vào ống phản ứng DNA polymerase, deoxynucleotid-dNTPs và một lượng giới hạn các nucleotid tận cùng (terminator, là dideoxynucleotid - ddNTPs). Phản ứng được thực hiện trong bốn ống, mỗi ống cho một loại ddNTP khác nhau. Bắt đầu từ đoạn mồi có gắn phóng xạ tại đầu 5', DNA polymerase kéo các dNTP để tổng hợp mạch đơn bổ sung với mạch DNA gốc. Sự tổng hợp mạch đơn sẽ bị dừng tại vị trí ddNTP (thay vì sẽ tiếp tục kéo dài với dNTP) do ddNTP bị mất gốc OH tại carbon thứ 3 nên không thể gắn dNTP tiếp theo. Vì vậy trong ống phản ứng sẽ hình thành các mạch đơn DNA có chiều dài khác nhau tương ứng vị trí trình tự các nucleotid trên đoạn DNA gốc. Kết quả được ghi nhận bằng điện di trên gel polyacrylamide biến tính.

Ngày nay, phản ứng giải trình tự được thực hiện trên máy tự động sử dụng các ddNTP có gắn huỳnh quang mang màu khác nhau tùy từng loại nucleotid. Trong quá trình điện di, mỗi khi có một vạch điện di đi qua chùm tia laser thì vạch điện di sẽ phát sáng. Sự phát sáng này được bộ phận mắt cảm quang ghi nhận và lưu lại thành một đỉnh cường độ sáng trong biểu đồ. Máy sẽ so dòng tự động các đỉnh sáng tương ứng với các màu để phân tích thành trình tự của đoạn DNA. Nếu sử dụng điện di mao quản thì tùy thuộc vào số lượng ống mao quản mà người làm thí nghiệm có thể chạy số mẫu nhiều hay ít cùng một lúc. Phương pháp giải trình tự phát hiện các thay đổi trình tự nucleotid của một đoạn DNA và đây là cơ sở để phát hiện các đột biến gen, đa hình nucleotid đơn trong cá thể hoá liệu pháp điều

trị, định danh các vi khuẩn, vi nấm dựa trên giải trình tự DNA của gen qui định RNA của ribosome, v.v....

Bước tiến mới của giải trình tự gen là sự ra đời của giải trình tự thế hệ mới (next generation sequencing), với các tiến bộ về công nghệ, giải trình tự bộ gen có thể thực hiện tại phòng thí nghiệm tiêu chuẩn có thiết bị giải trình tự thế hệ mới, kết quả có trong thời gian ngắn cùng với chi phí thấp hơn đáng kể, có thể phát hiện được các tác nhân nhiễm trùng mới, phát hiện được các đột biến với tỷ lệ rất thấp. Giải trình tự thế hệ mới là công cụ không thể thiếu trong phát hiện và định lượng các đột biến trong ung thư, bệnh di truyền⁶⁰.

1.4.3. Kỹ thuật Real-time PCR sử dụng mẫu dò DNA

Nhằm phát hiện các đột biến đã biết trên các mẫu bệnh phẩm. Các đột biến được phát hiện bằng cách sử dụng các đoạn dò đặc hiệu có đánh dấu huỳnh quang. Đoạn dò là những đoạn oligonucleotid sợi đơn có trình tự có thể bắt cặp bổ sung với một trình tự đặc hiệu trên DNA đích. Khi có mặt sản phẩm khuếch đại đặc hiệu trong ống phản ứng thì sẽ có sự bắt cặp của probe lên trình tự đặc hiệu của sản phẩm khuếch đại. Đoạn dò phát huỳnh quang khi nhận được nguồn sáng kích thích. Cường độ huỳnh quang phụ thuộc số lượng đoạn dò bắt cặp được với sản phẩm khuếch đại. Sản phẩm khuếch đại càng nhiều, tín hiệu huỳnh quang càng lớn⁶¹.

1.5. Các nghiên cứu về đột biến gen của vi rút viêm gan B liên quan với ung thư biểu mô tế bào gan

Vi rút viêm gan B sao chép thông qua phiên mã ngược RNA nhưng vì không có chức năng hiệu chỉnh nên các lỗi trong quá trình sao chép DNA của nó xảy ra với tỷ lệ cao hơn nhiều so với các vi rút DNA khác². Hình thành quần thể gồm các biến thể vi rút có khả năng đáp ứng nhanh chóng với áp lực chọn lọc nội sinh (đáp ứng miễn dịch của vật chủ) và chọn lọc ngoại sinh (liệu pháp kháng vi rút hoặc quá trình lây truyền vi rút). Những đột biến của HBV như vậy làm thay đổi các epitope quan trọng đối với sự nhận biết miễn dịch của vật chủ, làm tăng cường khả năng nhân lên của vi rút và chống lại các thuốc điều trị kháng vi rút, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho vi rút gắn kết hoặc xâm nhập vào tế bào. Các đột biến này

bao gồm mất đoạn pre-S, đột biến điểm pre-S, đột biến vùng S, các biến thể nối pre-S, đột biến gen C, BCP (basal core promoter), đột biến gen P và gen X^{2,62}.

1.5.1. Đột biến gen vùng pre-S và S

Nhiều quốc gia đã báo cáo các đột biến và biến thể gen S. Vùng pre-S/S được xác định là có mức độ không đồng nhất di truyền cao nhất trong bộ gen của vi rút viêm gan B, nơi phát hiện ra nhiều đột biến điểm, mất đoạn và tái tổ hợp. Khi sử dụng các globulin miễn dịch hoặc vắc xin để gây ra liệu pháp miễn dịch, những thay đổi di truyền này sẽ tự xảy ra. Những thay đổi trong vùng a ảnh hưởng đến HBsAg và khiến không thể phát hiện được HBsAg trong các xét nghiệm sàng lọc thường quy. Vùng pre-S của bộ gen vi rút chứa phần lớn các trình tự đột biến, và tỷ lệ này có thể khác nhau tùy thuộc vào kiểu gen của HBV. Đột biến mất đoạn vùng pre-S, đột biến điểm vùng pre-S, đột biến nối pre-S1, đột biến đầu C tận và đột biến vô nghĩa pre-S/S là năm loại đột biến khác nhau trong vùng S^{2,63}. Các đột biến T53C, mất đoạn pre-S1, đột biến codon bắt đầu pre-S2, C7A, A2962G, C2964A và C3116T trong khu vực pre-S có liên quan đáng kể đến việc tăng nguy cơ HCC^{64,65}.

Một số nghiên cứu ghi nhận việc mất đoạn ở nửa đầu C tận của vùng pre-S1 thường gặp ở bệnh nhân viêm gan mạn tính (CH) hoặc xơ gan (LC). Ngược lại ở những bệnh nhân HCC thì đột biến mất đoạn pre-S2 chiếm đa số. Có sự khác nhau trong các đột biến mất đoạn pre-S giữa bệnh nhân CH và LC^{64,65,66}. Ngoài ra, sự mất đoạn ở S promoter và nửa đầu C tận của vùng pre-S1 thường xuyên được quan sát thấy ở cả hai kiểu gen B và C. Ở bệnh nhân CH, tình trạng mất đoạn ở pre-S1 và 4 vị trí chức năng (S promoter, Hsc70, CAD và NBS) nằm ở nửa đầu C tận của vùng pre-S1 gặp ở cả hai kiểu gen. Trong khi sự mất đoạn ở nhóm HBV kiểu gen B cao hơn so với nhóm kiểu gen C (88,9% so với 36,4%, $p = 0,028$). Ở những bệnh nhân LC, không có sự khác biệt đáng kể nào được quan sát thấy giữa hai nhóm có kiểu gen này⁶⁷.

Nghiên cứu của tác giả Hyon Suk Kim năm 2018 thực hiện trên 898 bệnh nhân tại 3 quốc gia là Trung Quốc (407 mẫu), Việt Nam (258 mẫu) và Hàn Quốc (233 mẫu). Nghiên cứu cho thấy có 660 bệnh nhân phát hiện đột biến chiếm 73,5%.

Đột biến xuất hiện nhiều nhất là K122R (22,4%) trên vùng chức năng MHR của gen S⁶⁸.

Theo nghiên cứu của Lin năm 2012, cho tới nay đã ghi nhận được có 5 loại đột biến mất đoạn pre-S xuất hiện tự nhiên, bao gồm: (i) Đột biến mất đoạn nửa đầu C tận pre-S1 (dps1); (ii) và (iii) Đột biến mất đoạn pre-S1 (dpS12a và dpS12b); (iv) và (v) Đột biến mất đoạn pre-S2 (dpS2a và dpS2b); được thực hiện nghiên cứu *in vitro*⁶⁹. Các phân tích chức năng chỉ ra rằng chúng có thể được chia thành hai nhóm: S promoter (dpS1 và dpS12a) và không phải S promoter (dpS12b, dpS2a và dpS2b). Phân tích Northern blot cho thấy RNA gen S có thể được phiên mã trong các đột biến mất đoạn không phải S promoter và tỷ lệ RNA pre-S1 tương đương với RNA S. Ngược lại, đột biến mất đoạn khởi động ở gen S không thể phiên mã RNA S một cách hiệu quả và có mức RNA pre-S1 cao hơn, gây ra tỷ lệ nghịch giữa RNA pre-S1 so với RNA S. Các phân tích Western blot và xét nghiệm ELISA chỉ ra rằng sự tích tụ trong tế bào của các protein vỏ có trong tất cả các tế bào có gen đột biến mất đoạn pre-S, đặc biệt là trong các tế bào đã có đột biến mất đoạn S promoter. Phân tích miễn dịch huỳnh quang cho thấy rằng các protein L đột biến không giống như các protein khác, biểu hiện là kiểu nhuộm dạng hạt trong các biến thể loại bỏ S promoter và kiểu nhuộm quanh nhân trong các biến thể không loại bỏ S promoter⁶⁹.

1.5.1.1. Đột biến mất đoạn vùng pre-S

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sự mất đoạn ở vùng pre-S có liên quan đến các bệnh gan tiến triển. Sự mất đoạn ở vùng pre-S thường được tìm thấy ở nửa đầu C tận (từ aa 58 đến 119) của pre-S1 và đầu N tận (từ aa 1 đến 23) của pre-S2⁶⁶. Việc lập bản đồ gen cho thấy tất cả các vùng gen bị mất đoạn đều chứa các epitope cho tế bào T và B, kèm theo mất một hoặc nhiều vị trí chức năng như S promoter, vị trí T, NBS và codon bắt đầu của M⁶⁵. Hầu hết các báo cáo đều chỉ ra rằng mất đoạn ở vùng pre-S1 hoặc pre-S2 có liên quan đến sự phát triển HCC ở người lớn^{10,65}. Những khác biệt này có thể là do sự phổ biến của các kiểu gen (hoặc kiểu gen phụ) khác nhau ở các quốc gia⁷⁰. Biswas và cộng sự đã nghiên cứu sự liên kết của các loại đột biến pre-S với kiểu gen HBV, kết quả cho thấy rằng sự mất

đoạn ở pre-S1 là 55% và phổ biến ở HBV kiểu gen D; đột biến codon bắt đầu ở pre-S2 là 56% và phổ biến ở HBV kiểu gen A; đột biến mất đoạn ở pre-S2 là 42,85% và phổ biến ở HBV kiểu gen C⁶⁷.

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng cả hai kiểu gen HBV B và C đều có tần suất mất đoạn cao ở nửa đầu C tận của vùng pre-S1 và đầu N tận của vùng pre-S2 (lần lượt là 86% và 79,1% ở nhóm HBV kiểu gen B; 69,8% và 72,1% ở nhóm HBV kiểu gen C). Lập bản đồ epitope cho thấy rằng sự mất đoạn ở một số vị trí epitope là thường xuyên xảy ra ở cả hai kiểu gen. Lập bản đồ chức năng cho thấy tần suất mất đoạn ở ba vị trí chức năng (NBS, codon bắt đầu của M và vị trí VS) nằm ở ranh giới giữa vùng pre-S1 và pre-S2 (aa 103-127) cao hơn đáng kể trong nhóm HBV kiểu gen B (với $p < 0,05$). Mối tương quan của mất đoạn pre-S với kiểu gen HBV tùy theo các kết quả lâm sàng khác nhau. Sự khác biệt đáng kể đã được tìm thấy giữa bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen B và C là tình trạng tiến triển gây ra HCC. Tuy nhiên ở Châu Á, hai kiểu gen B và C thường tồn tại trên cùng một bệnh nhân nên việc thực hiện nghiên cứu còn nhiều hạn chế⁷¹. Một số nghiên cứu ở Đài Loan cho thấy đột biến mất đoạn pre-S2 có liên quan đến sự phát triển của HCC và tỷ lệ lưu hành kiểu gen B cao hơn HBV kiểu gen C. Ngược lại, ở Hàn Quốc kiểu gen C lưu hành phổ biến hơn và đột biến mất đoạn N pre-S1 làm xóa bỏ codon bắt đầu của protein L làm gia tăng sự phát triển của HCC. Những kết quả này chỉ ra rằng xu hướng mất đoạn pre-S khác nhau ở các kiểu gen HBV khác nhau. Do đó, sự khác biệt về tỷ lệ lưu hành kiểu gen hoặc kiểu gen phụ ở các quốc gia khác nhau có thể ảnh hưởng đến mô hình mất đoạn pre-S liên quan đến HCC².

Vùng pre-S1 và pre-S2 chứa một số epitope cho tế bào T và B, do đó đóng vai trò thiết yếu trong việc tương tác với các phản ứng miễn dịch của vật chủ. Đột biến phổ biến nhất ở pre-S là mất đoạn pre-S, dẫn đến phản ứng miễn dịch kém hiệu quả. Sự xóa bỏ pre-S cũng làm giảm sự biểu hiện của các protein bề mặt, dẫn đến sự tích tụ các protein vỏ và các phần tử vi rút viêm gan B trong tế bào, hình thành tế bào gan dạng kính mờ, gây căng thẳng lưới nội chất và tổn thương DNA dạng oxy hóa⁷². Những thay đổi này cuối cùng dẫn đến sự hình thành ung thư gan. Đột biến mất đoạn ở pre-S có tỷ lệ phổ biến ở kiểu gen C cao hơn kiểu gen B, và

được báo cáo là có liên quan chặt chẽ với nhiễm HBV âm thầm và khả năng hình thành phát triển HCC⁷³.

1.5.1.2. Đột biến điểm vùng pre-S/S

Chen và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu so sánh tình trạng đột biến gen của HBV giữa nhóm bệnh nhân HCC với nhóm đối chứng, bệnh nhân HCC có tỷ lệ đột biến vùng pre-S cao hơn và cụ thể là thay thế axit amin ở codon 4 (W4P/R), 7 (K7T/N) và 81 (A81T) ở vùng pre-S1 và codon bắt đầu (M1V/I/A) ở vùng pre-S2. Ngược lại, tần suất thay thế axit amin codon 2 (Q2K/R) ở vùng pre-S2 thấp hơn so với nhóm bệnh nhân đối chứng. Có sự khác nhau trong đột biến điểm pre-S giữa kiểu gen HBV, so với bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen B thì bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen C được phát hiện có tần số thay thế axit amin cao hơn ở các codon 4, codon 7 và codon 81 trong các gen pre-S1⁷⁴.

Năm 2015, Zhang và cộng sự cũng báo cáo rằng cả 2 nhóm bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen B và C thì tần số đột biến điểm cao hơn ở 11 codon (4, 27, 51, 54, 60, 62, 100, 125, 137, 166 và 167) ở nhóm không bị HCC (với $p < 0,05$). Tuy nhiên, những nghiên cứu cùng chiều thời gian khác chỉ ra rằng đột biến ở 11 codon này có liên quan đến HCC và những đột biến này xuất hiện tối thiểu 10 năm trước khi phát triển thành HCC. Nhiều phân tích hồi quy logistic cho thấy đột biến điểm tại codon 51 và 167 là những yếu tố độc lập liên quan đến HCC⁶⁵. Vào năm 2017 Zhang tiếp tục thực hiện nghiên cứu khác sử dụng giải trình tự sâu để kiểm tra mối quan hệ giữa các kiểu gen HBV với sự phát triển của HCC. Nghiên cứu chia 2 nhóm, nhóm 32 bệnh nhân viêm gan B mạn tính có HCC và nhóm chứng gồm 32 bệnh nhân viêm gan B mạn tính không có HCC. Nhóm bệnh nhân HCC có tỷ lệ mất đoạn pre-S và đột biến điểm cao hơn ở các codon 4, 27, 167 so với nhóm bệnh nhân đối chứng ($p < 0,05$)¹³. Một nghiên cứu khác có kết quả cho thấy đột biến điểm C2964A, A2962G và C3116T trong vùng pre-S1; C7A và T53C trong vùng pre-S2 có liên quan đến tăng nguy cơ HCC và đột biến mới C105T trong vùng pre-S2 có liên quan nghịch với nguy cơ HCC⁷³.

Mun và cộng sự đã chứng minh rằng sự thay thế axit amin F141L trong vùng pre-S2 làm tăng nguy cơ HCC ở những đối tượng nhiễm HBV kiểu gen C và

đột biến F141L-LHBs có thể gây ra sự tiến triển chu kỳ tế bào bằng cách điều chỉnh giảm chức năng p53 và p21, đồng thời điều hòa tăng kinase 4 và cyclin A. Trong một thử nghiệm hình thành khuẩn lạc, tần số hình thành khuẩn lạc trong các dòng tế bào biểu hiện F141L-LHBs cao gấp đôi so với vi rút hoang dã. Điều này cho thấy rằng F141L-LHBs có thể có một vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của HCC bằng cách gây ra sự tăng sinh và biến đổi tế bào⁷⁵.

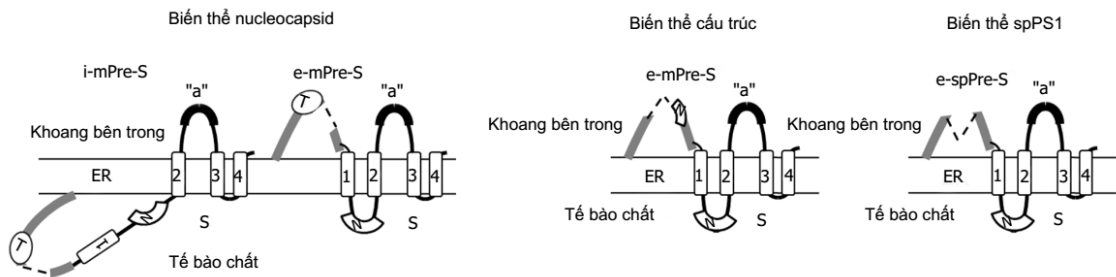
Vai trò gây bệnh của đột biến điểm vùng S là chủ đề của nhiều nghiên cứu. Từ năm 1988, các đột biến gen S được quan sát thấy trong huyết thanh của trẻ em đã được tiêm chủng ở Ý với sự hiện diện đồng thời của cả HBsAg và anti-HBs. Những đứa trẻ này bị nhiễm bệnh từ mẹ và trình tự gen S của chúng tiết lộ sự thay thế glycine (G) thành arginine (A) ở vị trí 145 trong vùng a của gen S, gây ra những thay đổi cấu trúc cho phép vi rút chống lại kháng thể do vắc xin tạo ra⁷⁶. G145R là một đột biến giúp vi rút trốn thoát miễn dịch do vắc-xin gây ra và thường gặp ở các nước có tỷ lệ lưu hành vi rút viêm gan B cao và thực hiện chương trình tiêm chủng mở rộng. Các đột biến khác sau đó được tìm thấy trong vùng a như T116N, P120S/E, I/T126A/N/S, Q129H/R, M133L, K141E, P142S, D144A/E và được coi là đột biến trốn thoát miễn dịch^{76,77}.

Trong các nghiên cứu gần đây, người ta đã quan sát thấy ở một số bệnh nhân đã điều trị đạt được sự ổn định tình trạng nhiễm vi rút, có sự tái hoạt vi rút viêm gan B trở lại dẫn đến đợt cấp viêm gan mạn, rối loạn chức năng tổng hợp, suy gan và tử vong⁷⁶. Salpini và cộng sự đã chỉ ra rằng 75,9% bệnh nhân nhiễm HBV tái hoạt là những người có nhiều đột biến, cụ thể là 8/13 đột biến nằm trong vòng lặp ưa nước chính MHR (M103I, L109I, T118K, P120A, Y134H, S143L, D144E, S171F) và 5/13 trong epitope tế bào T thuộc lớp I (C48G, V96A, L175S, G185E, V190A)⁷⁸.

1.5.1.3. Đột biến môi nối pre-S1

Các vị trí cho và nhận môi nối RNA có ở nhiều nơi trong bộ gen của HBV. Do đó, quá trình nối RNA có thể xảy ra và kéo theo sự xóa bỏ các nucleotid tại các vị trí cụ thể. Cho đến nay, nhiều loại gen RNA nối đã được xác định và phân lập từ huyết thanh và mô gan của bệnh nhân nhiễm HBV⁷⁹. Có nhiều hình

thức loại bỏ trên *in vitro* khác nhau tùy thuộc các biến thể nổi khác nhau và các biến thể nổi khác nhau tùy theo kiểu gen. Trong bộ gen của HBV, có 5 vị trí cho mỗi nối thường gặp là nucleotid 2067, 2447, 2471, 2985, 2087 và 5 vị trí nhận mỗi nối thường gặp ở vị trí nucleotid 489, 2350, 2236, 2902, 282⁸⁰. Một số nghiên cứu đã báo cáo rằng các biến thể của HBV ghép nối tăng cường sự nhân lên của vi rút hoang dã ở bệnh nhân viêm gan mạn; những biến thể này có liên quan đến bệnh gan tiến triển⁸¹. Chưa có nhiều thông tin về các đặc điểm phân tử của biến thể mỗi nối mới spPS1. Báo cáo về mỗi nối spPS1 dẫn đến xóa 183 nucleotid ở nửa đầu C tận của vùng pre-S1 làm mất hoàn toàn hai vị trí chức năng S promoter và vị trí cho cấu trúc liên kết kép, xóa một phần NBS và tạo ra của một protein L nối liền (spL, xóa 61 axít amin, aa 58-118). Sự xóa bỏ S promoter sẽ dẫn đến giảm RNA S (do đó dẫn đến mức độ thấp hoặc không có protein M và S) và tăng RNA pre-S1 (do đó dẫn đến sự biểu hiện quá mức tương đối của protein bề mặt spL). Việc loại bỏ các vị trí cho cấu trúc liên kết kép và liên kết nucleocapsid trong biến thể spPS1 dẫn đến cấu trúc đồng nhất (e-pre-S) của các protein spL (Hình 1.9). Nghiên cứu *in vitro* cho thấy spPS1 (trước đây được đặt tên là dpS1) có một khiếm khuyết trong quá trình phiên mã RNA S và tiết ra các protein vỏ⁶⁹.



Hình 1.9: Cấu trúc e-pre-S trong biến thể mỗi nối spPS1

(Nguồn: Jia Feng Wu, 2015)⁸²

Phân tích Western blot cho thấy các protein spL nội bào biểu hiện kiểu hình không đồng nhất và có trọng lượng phân tử cao hơn. Phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang cho thấy các protein spL được tích lũy trong lưới nội bào và hiển thị kiểu nhuộm dạng hạt⁶⁹.

Ý nghĩa lâm sàng của đột biến spPS1 phần lớn vẫn còn chưa biết rõ và thường được tìm thấy trong huyết thanh của những người bị viêm gan mạn và xơ gan. Một nghiên cứu đã chứng minh tần suất spPS1 cao ở bệnh nhân CH (12,7%) và bệnh nhân LC (14,5%). Phân tích hồi quy logistic cho thấy các biến thể spPS1 có liên quan nhiều đến CH ($p=0,058$) và liên quan đáng kể đến LC ($p=0,04$). Do đó, các nghiên cứu lâm sàng này gợi ý rằng biến thể spPS1 có thể gây ra đợt cấp của viêm gan B mạn, suy gan và xơ hóa⁸³.

1.5.1.4. Đột biến vô nghĩa pre-S/S

Các đột biến vô nghĩa pre-S cũng được tìm thấy ở những bệnh nhân mắc bệnh gan tiến triển². Những đột biến vô nghĩa pre-S dẫn đến sự xuất hiện các codon dừng ở pre-S và sự tổng hợp MHBs và LHBs bị cắt cụt ở đầu C tận. Các nghiên cứu đã báo cáo rằng MHBs và LHBs hoạt động như một chất hoạt hóa phiên mã và làm tăng tỷ lệ tăng sinh tế bào gan⁸⁴. Kết quả từ các thí nghiệm được tiến hành trên chuột chuyển gen và nuôi cấy tế bào u gan đã tiết lộ rằng protein MHBs được giữ lại trong ER có thể kích hoạt sự hoạt hóa phụ thuộc PKC (protein kinase C) của dòng tín hiệu c-Raf-1/Erk (extracellular signal-regulated kinase), dẫn đến sự cảm ứng của AP-1 (activator protein-1) và các yếu tố phiên mã hạt nhân kappa B (NF- κ B: nuclear factor kappa B) cũng như tăng cường hoạt động tăng sinh của tế bào gan⁸⁵.

Các đột biến vô nghĩa S có thể phát sinh do các đột biến trong ORF của gen P thường gây ra do tiếp xúc với thuốc kháng vi rút, một hiện tượng thường được gọi là đột biến gen S liên quan đến thuốc kháng vi rút⁸⁶. Những đột biến này có thể gây ra sự xuất hiện đột biến codon dừng của gen S và tổng hợp các protein L, M và S tại đầu C tận. Nghiên cứu *in vivo* trên chuột chuyển gen sW172* đã phát hiện khả năng tiến triển bệnh thành HCC⁸⁷. Các đột biến vô nghĩa khác của S như sC69*, sL95*, sW182* và sL216* đã được xác định trong các khối u HCC. Các nghiên cứu chức năng của sL95*, sW182* và sL216* cũng chứng minh rằng chúng có các hoạt động tăng sinh tế bào và khả năng biến đổi cao hơn vùng gen S của vi rút hoang dã, đặc biệt là sW182*⁸⁶.

1.5.1.5. Đột biến điểm đầu C tận

Đầu C tận vùng S (aa 179-226) là đầu kỵ nước và được chèn vào màng ER. Vùng này có liên quan đến trung gian vận chuyển glycoprotein vỏ qua lưới nội chất. Các đột biến trong vùng này có thể dẫn đến một chuỗi ổn định và được glycosyl hóa nhưng không được phân hủy, do đó ảnh hưởng đến quá trình sinh và bài tiết của phần tử vi rút².

Hai đột biến đầu C tận vùng S đã được tìm thấy có mối liên quan có ý nghĩa thống kê với HCC, đột biến P203Q (17,4% ở người HCC so với 1% ở người không HCC, $p = 0,004$) và đột biến S210R (34,8% ở người HCC so với 3,8% ở người không HCC, $p < 0,001$). Ngoài ra, trong nghiên cứu chỉ có bệnh nhân HCC mới có cả 2 đột biến này chiếm tỷ lệ là 17,4%. Thí nghiệm *in vitro* cho thấy cả 3 loại đột biến làm giảm đáng kể tỷ lệ HBsAg tiết vào nội bào so với vi rút hoang dã với $p < 0,05$; 2 loại đột biến P203Q và P203Q + S210R làm tăng tỷ lệ tế bào trong pha S so với vi rút hoang dã (P203Q là 26%, P203Q + S210R là 29% và vi rút hoang dã là 18% với $p < 0,001$); đột biến S210R tăng tỷ lệ trong pha G2/ M (33% đối với S210R so với 26% đối với vi rút hoang dã, $p < 0,001$)⁸⁸.

1.5.2. Đột biến gen vùng C

Các đột biến trong vùng BCP (basal core promoter) và vùng PC (pre core) của vi rút viêm gan B dẫn đến sự điều hòa kháng nguyên e của vi rút (HBeAg). Những đột biến này có liên quan đến viêm gan mạn tính, xơ gan và HCC. Vùng C trong bộ gen của HBV mã hóa protein lõi (HBcAg) và HBeAg⁸⁹. Lớp vỏ lõi của HBV là thành phần kích thích sinh miễn dịch mạnh, tạo ra đáp ứng miễn dịch trung hòa mạnh mẽ với các kháng nguyên ngoại lai một khi chúng chèn vào vùng sinh miễn dịch. Các đột biến xảy ra trong vùng này của bộ gen HBV chủ yếu tập trung vào vùng BCP và PC⁹⁰.

Đột biến tại 2 vị trí T1762/A1764 của BCP là một trong những minh chứng rõ ràng nhất cho mối liên hệ giữa các đột biến của vi rút viêm gan B và sự phát triển của HCC, và mối liên quan này được chứng minh trong các nghiên cứu quy mô lớn⁹¹. Ngoài ra, đột biến ở các vị trí V1753, T1766, A1768 trong BCP và C1653T trong khung- α vùng tăng cường II cũng được ghi nhận là có liên quan đến

sự phát triển của HCC trong một số báo cáo. Một nghiên cứu trên 442 mẫu huyết thanh của 310 bệnh nhân không HCC và 132 bệnh nhân HCC đã phân tích 8 đột biến chính (G1613A, C1653T, V1753T, T1762A, A1764G, A1846T, G1896A và G1899A) nhằm xác nhận mối liên quan với khả năng phát triển HCC⁹². Park và cộng sự báo cáo rằng đột biến kết hợp trên BCP của ≥ 6 đột biến bao gồm G1613A + C1653T + A1846T + G1896A và ≤ 5 đột biến kèm theo giảm sản xuất HBeAg có thể làm tăng nguy cơ xuất hiện HCC so với các đột biến khác trên BCP. Một nghiên cứu khác cũng tìm thấy 5 đột biến tần số cao ($\geq 10\%$) trong vùng BCP và PC⁹³. Trong số 13 loại đa đột biến trong một đoạn được nghiên cứu, có 3 loại tổ hợp phổ biến hơn hẳn ($\geq 5\%$) là T1762A, A1764G (36%), T1762A, A1764G, G1896A (11%) và V1753A/C, T1762A, A1764G, G1896A (8%). Các đa đột biến trong bộ gen HBV (≥ 3) có thể dẫn đến nguy cơ cao bị xơ gan hoặc ung thư biểu mô tế bào gan. Đột biến G1896A có ảnh hưởng đến sự tiến triển của bệnh gan không phụ thuộc vào tuổi của bệnh nhân. Bên cạnh đó, số lượng đột biến càng nhiều (≥ 3) và loại đột biến G1776A đều làm tăng khả năng cho kết quả âm tính xét nghiệm HBeAg⁹³.

Sự tích tụ các đột biến, bao gồm V1753A/C và/hoặc A1768T bên cạnh T1762A/A1764G trong vùng BCP, có liên quan chặt chẽ với HCC ở những bệnh nhân bị nhiễm HBV kiểu gen C1, kết quả này được chỉ ra trong một nghiên cứu của Li và cộng sự năm 2013⁹⁴. Các đột biến BCP có ảnh hưởng đến các chức năng sinh học của HBx, làm tăng nguy cơ HCC. Đột biến C1653T trong khung- α của trình tự điều hòa ngược của lõi và đột biến V1753A/C của vùng BCP ở bệnh nhân nhiễm HBV cũng đã được báo cáo là làm tăng nguy cơ HCC^{94,95}. Tuy nhiên, cơ chế bệnh sinh chủ yếu giữa đột biến BCP và sự hình thành ung thư gan vẫn chưa được biết rõ. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng các đột biến của HBV, bao gồm C1653T, T1674C/G, V1753A/C, T1762A/A1764G và G1766A/A1768T trong vùng tăng cường II/ BCP và G1899A, C2002T, A2159G, A2189C và G2203A/ T trong vùng PC/C, có liên quan đáng kể đến việc tăng nguy cơ HCC⁹⁶.

1.5.3. Đột biến gen vùng P

Một trong những vùng nhạy cảm với đột biến ở ORF của HBV là vùng P, mã hóa cho enzym sao chép ngược (reverse transcriptase- rt). Gen S có sự trùng lặp hoàn toàn với gen sao chép ngược, do đó những thay đổi trong thông tin mã hóa của vi rút liên quan đến polymerase đều có thể tác động lên gen S, điều này thể hiện mối quan hệ chặt chẽ giữa các đột biến ở vùng S và P trên bộ gen của HBV⁹⁷. Các đột biến trong gen P của vi rút viêm gan B thường liên quan đến tình trạng kháng thuốc. Các đột biến ở vùng này thường không được cho là nguyên nhân gây ra ung thư biểu mô tế bào gan như các vùng khác, nhưng các đột biến này liên quan đến liệu pháp kháng vi rút cũng sẽ tác động đến diễn tiến của bệnh⁶⁴. Các loại thuốc kháng vi rút viêm gan B tác động đến enzym sao chép ngược của vi rút như lamivudine (LAM), telbivudine (LdT), entecavir (ETV) và các chất tương tự nucleotid mạch hở adefovir dipivoxil (ADV) và tenofovir disoproxil fumarate (TDF). Đột biến rtM204V/ I liên quan tới kháng LAM là thường xuyên nhất, nằm ở vùng YMDD (tyrosine-methionine-aspartate-aspartate). Đột biến rtL180M cũng thường xảy ra đồng thời, và đột biến rtA181T cũng được báo cáo nhiều ở những bệnh nhân kháng LAM. Các đột biến rtN236T và rtA181T/V thường gặp nhất ở những bệnh nhân kháng ADV. Kháng ETV hiếm gặp ở những bệnh nhân chưa điều trị thuốc kháng vi rút trước đó (1,5% vào năm thứ năm sau điều trị), nhưng nếu đột biến rtI169T, rtT184A/F/G/I/L/S, rtS202G/I hoặc rtM250V cùng tồn tại với đột biến rtM204I/V, thì kháng ETV có thể xảy ra. Đột biến kháng telbivudine mạnh nhất là rtM204I⁶⁴. Tenofovir có nguy cơ kháng thuốc thấp và hiện vẫn chưa ghi nhận trường hợp kháng thuốc.

Một nghiên cứu theo dõi 131 trường hợp bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn tính đã dùng liệu pháp kháng vi rút cho thấy tình trạng kháng thuốc không liên quan đến sự tiến triển của bệnh gan⁶⁴. Một khi kháng thuốc xảy ra, không có sự khác biệt về tình trạng bệnh viêm gan vi rút B mạn tính giữa hai nhóm bệnh nhân điều trị thành công và không thành công sau 6 năm. Đột biến I126T trong vùng S có thể liên quan đến tiên lượng xấu đối với bệnh nhân viêm gan B mạn. Đột biến

I269L ở vùng P và đột biến I68T ở vùng S có thể liên quan đến đáp ứng kém với thuốc điều trị kháng vi rút.

Trong nghiên cứu đoàn hệ về xơ gan liên quan đến vi rút viêm gan B, tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan tích lũy trong 2 năm ở bệnh nhân kháng thuốc (30,6%) cao hơn đáng kể so với bệnh nhân không bị kháng thuốc (4,3%)⁶⁴. Đặc biệt, trong số những bệnh nhân thất bại với điều trị kháng vi rút, tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan là rất cao 55,6%. Những đột biến này có thể là những đột biến kháng thuốc mới tiềm năng và cần có thêm nhiều nghiên cứu để đánh giá mối liên quan giữa những đột biến với sự phát triển ung thư biểu mô tế bào gan trên bệnh nhân viêm gan B mạn tính.

1.5.4 Đột biến gen vùng X

Vùng X chứa gen mã hóa protein không cấu trúc HBx. Chức năng của protein này vẫn chưa được hiểu biết một cách đầy đủ. Nhiều nghiên cứu cho thấy HBx rất cần thiết cho sự nhân lên của vi rút *in vitro* và trong cơ thể sống. Khả năng lây nhiễm của HBV và sự tiến triển HCC phụ thuộc nhiều vào gen mã hóa HBx, gen này cực kỳ dễ đột biến và gắn vào tế bào gan. Sự nhân lên của vi rút có thể chịu ảnh hưởng của các đột biến trong vùng X thông qua BCP và vùng tăng cường enhancer-II. Do vùng BCP chồng lấp với gen X trong khung đọc mở, K130M và V131I ở gen X đã bị thay đổi bởi đột biến promoter lõi (core) A1762T cộng với G1764A⁹⁶.

Tại Hồng Kông, Liu và cộng sự đã giải trình tự 101 mẫu gen của vi rút viêm gan B ở bệnh nhân HCC. Kết quả phân tích cho thấy đột biến kép K130M/ V131I đã tăng cường chức năng của HBx bằng cách thúc đẩy hoạt động phiên mã và tăng khả năng biểu hiện của yếu tố HIF 1 α ⁹⁸ (hypoxia- inducible factor). Wang và cộng sự phát hiện rằng trong quá trình lây nhiễm và nhân lên của HBV, HBx đột biến dễ thích nghi với tế bào gan và tăng sinh ung thư⁹⁹. HBx bị cắt ngắn ở đầu tận cùng COOH, cũng như những thay đổi về đặc tính kỵ nước/ ưa nước ở các vị trí axit amin cụ thể, có thể đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển HCC liên quan đến HBV.

Tuteja và cộng sự cũng báo cáo 222 trường hợp bệnh nhân dương tính với HBsAg và phát hiện đột biến T36A và G50R trong gen X có liên quan đến HCC¹⁰⁰. Trong 80%- 90% các trường hợp ung thư này, bộ gen của vi rút đã được tích hợp vào bộ gen của tế bào chủ. Sự tích hợp DNA của vi rút cũng có thể dẫn đến đột biến chèn và cắt bỏ đầu tận cùng 3' của HBx dẫn đến xóa 20- 40 axit amin ở vùng C promoter. Bằng chứng cho thấy rằng đột biến mất đoạn và đột biến điểm đều có thể thúc đẩy quá trình kích hoạt ung thư.

Các mô hình thực nghiệm phát hiện ra rằng các protein HBx bị cắt ngắn đầu C tận có thể thay đổi tính ổn định di truyền và tăng sinh các tế bào gan do tương tác với protein p53 đột biến p.R249S, các protein này biến đổi các dòng tế bào gan chưa biến đổi trở thành các dòng tế bào bất tử¹⁰¹. Bằng cách kích hoạt hoạt động của yếu tố hạt nhân kappa B, Lee và cộng sự đã phát hiện một đột biến HBx cụ thể có thể góp phần vào sự phát triển HCC ở bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn tính⁹⁶. Đột biến HBx 5 ở HBV kiểu gen C2 đã được chứng minh là làm tăng nguy cơ phát triển HCC⁶⁴.

Các nghiên cứu tại Việt Nam

Gần đây, với sự phát triển mạnh mẽ của sinh học phân tử, vai trò yếu tố gen đã được đề cập đến trong các nghiên cứu liên quan HCC tại Việt Nam. Các nghiên cứu tập trung vào việc khảo sát đột biến gen ở người liên quan HCC như nghiên cứu của Trịnh Quốc Đạt trên 280 bệnh nhân HCC tại BV Bạch Mai và trung tâm Ung Bướu Thanh Hóa từ tháng 11 năm 2013 đến tháng 3 năm 2015 cho thấy sự kết hợp của SNP R72P gen TP53 và SNP 309T>G gen MDM2 làm tăng khả năng mắc bệnh; kiểu gen P72P của TP53 kết hợp với kiểu gen GG của MDM2, OR = 6,01; 95%; CI (1,96 - 18,42); kiểu gen R72P của TP53 kết hợp với kiểu gen GG của MDM2, OR = 3,24; 95%; CI (1,25 - 8,39); các kiểu gen của SNP R72P gen TP53 và 309T>G của gen MDM2 làm tăng khả năng mắc HCC cho những người nhiễm HBV¹⁰². Nguyễn Văn Hương và cộng sự năm 2022 thấy rằng quá trình methyl hóa gen RASSF1A và p16 có mối liên hệ mật thiết đến bệnh nhân ung thư gan và tùy thuộc vào độ tuổi và giới tính¹⁰³. Một nghiên cứu khác tiến hành ở bệnh viện K (cơ sở Tân Triều) trên 84 bệnh nhân HCC xác định bằng giải phẫu bệnh

nhằm mục đích xác định tỷ lệ đột biến vùng promoter gen TERT trên mẫu mô ung thư biểu mô tế bào gan và mối liên quan giữa những đột biến này với một số yếu tố nguy cơ ung thư gan, kết quả phát hiện được 21 mẫu có đột biến -124C>T, chiếm tỷ lệ 25% và không phát hiện được đột biến tại vị trí -146C>T. Đồng thời, chưa thấy được mối liên quan giữa đột biến -124C>T và các yếu tố nguy cơ của ung thư gan¹⁰⁴.

Tại Thành phố Hồ Chí Minh, tác giả Nguyễn Thị Cẩm Hương khảo sát đột biến vùng PC và BCP của vi rút viêm gan B ở 515 bệnh nhân nhiễm HBV mạn đưa ra các kết luận: tỷ lệ 2 đột biến A1762T/G1764A trong toàn dân số nghiên cứu là 36,7%, thấp nhất ở nhóm dung nạp miễn dịch (11,1%) và nhóm mang HBV không hoạt tính (25,2%); cao hơn có ý nghĩa ở nhóm viêm gan B mạn HBeAg dương (41,2%), nhóm viêm gan B mạn HBeAg âm (50%), nhóm xơ gan (37,7%) và cao nhất ở nhóm HCC (64,7%). Tỷ lệ đột biến G1896A trong toàn dân số nghiên cứu là 38,6%, tỷ lệ G1896A thấp nhất ở nhóm dung nạp miễn dịch (9,7%); cao hơn có ý nghĩa ở nhóm viêm gan B mạn HBeAg dương (39,7%), nhóm viêm gan B mạn HBeAg âm (52,6%), nhóm mang HBV không hoạt tính (IC: inactive carrier) (42,3%), nhóm xơ gan (43,5%) và nhóm HCC (41,2%). Nhóm tuổi ≥ 40 (OR=2,6, KTC 95% 1,67-4,1) và kiểu gen C (OR= 8,3, KTC 95% 5,2-13,4) liên quan có ý nghĩa với đột biến A1762T/G1764A. HBeAg âm (OR=2,2, KTC 95% 1,7-3,8) và kiểu gen B (OR=4, KTC 95% 2,5-6,6) liên quan có ý nghĩa với đột biến G1896A. Đột biến bộ ba vùng BCP T1753V/A1762T/G1764A liên quan có ý nghĩa với HCC (OR=4,5, KTC 95% 1,9-11,1)¹⁰⁵.

Bảng 1.1: Bảng thống kê đột biến của vi rút viêm gan B liên quan đến HCC

Vùng gen	Loại đột biến
S	Đột biến điểm thay thế axit amin: C48G, I68T, V96A, M103I, L109I, T116N, T118K, P120S/E, I/T126A/N/S, Q129H/R, M133L, Y134H, K141E, S143L, D144A/E, S171F, L175S, G185E và V190A ⁷⁸ .
	Đột biến vô nghĩa (đột biến điểm tạo ra codon kết thúc): sC69*, sL95*, sW182* và sL216* ⁸⁶ .
	Đột biến điểm thay thế axit amin đầu C tận: P203Q và S210R ⁸⁸ .
pre-S1 ^{73,74}	Đột biến mất đoạn: mất một hoặc nhiều vị trí chức năng vùng đầu C tận từ aa 58 đến 119 (thường gặp ở vi rút viêm gan B kiểu gen D).
	Đột biến điểm thay thế axit amin: W4P/R, K7T/N, A81T, C2964A, A2962G và C3116T và các vị trí codon 27, 51, 54, 60, 62, 100, 125, 137, 166 và 167.
	Đột biến nối nối spPS1: xóa 183 nucleotid ở nửa đầu C tận tạo ra nối bất thường.
pre-S2 ^{66,74}	Đột biến mất đoạn: mất một hoặc nhiều vị trí chức năng vùng N tận từ aa 1 đến 23 (thường gặp ở vi rút viêm gan B kiểu gen C).
	Đột biến điểm thay thế axit amin: M1V/I/A, Q2K/R, T53C, C7A, C105T và F141L.
BCP/PC ^{93,96}	Đột biến điểm thay thế axit amin: T1653, V1753, T1762, A1764, T1766, và A1768.
	Đột biến điểm thay thế axit amin: G1613A, C1653T, T1674C/G, T1753V, A1762T, G1764A, C1766T, T1768A, G1776A, A1846T, G1896A, G1899A, C2002T, A2159G, A2189C và G2203A/T.

P (liên quan đến kháng thuốc)⁶⁴	Đột biến rtM204V/I, rtL180M, rtA181T có liên quan tới kháng thuốc LAM.
	Đột biến rtN236T và rtA181T/V có liên quan tới kháng thuốc ADV.
	Đột biến rtI169T, rtT184A/F/G/I/L/S, rtS202G/I, rtM250V, rtM204I/V có liên quan tới kháng thuốc ETV.
X¹⁰⁰	Đột biến điểm thay thế axit amin: T36A, G50R, T1762A/A1764G (K130M/ V131I).

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu cắt ngang phân tích.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Dân số mục tiêu

Người nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính.

2.2.2. Dân số nghiên cứu

Người đã được chẩn đoán nhiễm HBV mạn tính theo dõi và điều trị tại phòng khám Viêm gan Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.3. Tiêu chuẩn chọn bệnh và loại trừ

2.2.3.1. Tiêu chuẩn chọn vào

- Người nhiễm HBV mạn >18 tuổi.
- Chưa từng điều trị hoặc đã ngưng điều trị bằng các thuốc kháng HBV ít nhất 6 tháng.
- Khám và điều trị tại phòng khám Viêm gan Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh trong thời gian thực hiện nghiên cứu.
- Đồng ý tham gia nghiên cứu.
- Bệnh nhân có hồ sơ lưu trữ và có đầy đủ thông tin về hành chính, tiền căn, lâm sàng, cận lâm sàng theo bệnh án nghiên cứu (BANC) và mẫu huyết thanh được lưu trữ tại Trung tâm Y sinh học phân tử Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh từ nghiên cứu nghiên cứu “Khảo sát đột biến gen pre-S/S của siêu vi viêm gan B ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn”.
- Có HBV DNA > 10⁴ copies/mL (nhằm chọn bệnh nhân có thể phát hiện đột biến). Riêng nhóm bệnh nhân có xơ gan hay HCC cần có HBV DNA > 300 copies/mL cùng với kết quả giải trình tự tìm đột biến.

2.2.3.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Có bệnh lý gan do thuốc (tiền căn sử dụng thuốc thảo dược, tân dược hoặc thực phẩm chức năng ảnh hưởng đến chức năng gan trong thời gian dài).
- Đồng nhiễm HIV có xét nghiệm ELISA anti-HIV (+).
- Đồng nhiễm HCV mạn tính có xét nghiệm anti-HCV (+).

- Bệnh nhân đang mang thai vào thời điểm vào nghiên cứu.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu từ tháng 5/2019 đến tháng 6/2021.

Địa điểm nghiên cứu tại phòng khám Viêm gan, Khoa Khám bệnh Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2.4. Cỡ mẫu của nghiên cứu

Mục tiêu 1:

Công thức tính cỡ mẫu: Áp dụng công thức ước lượng một tỷ lệ của dân số

$$n = \frac{Z_{(1-\alpha/2)}^2 p(1-p)}{d^2}$$

Trong đó:

n: Cỡ mẫu tối thiểu cần thiết

α : sai lầm loại 1

Z: lấy giá trị từ phân phối chuẩn: $\alpha = 0,05 \rightarrow Z_{(1-\frac{\alpha}{2})} = 1,96$

d: sai số cho phép, chúng tôi chọn 0,05

p: tỷ lệ đột biến điểm K122R trên gen S ở bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn tính (Theo Hyon Suk Kim⁶⁸ và cộng sự là 22,4%)

Tính toán được cỡ mẫu tối thiểu là **268 bệnh nhân**.

Mục tiêu 2:

Công thức tính cỡ mẫu: Áp dụng công thức so sánh 2 tỷ lệ

$$p = \frac{p_1 \times r p_2}{1 + r}$$

$$n' = \frac{\left[Z_{1-\alpha/2} \sqrt{(r+1)p(1-p)} + Z_{1-\beta} \sqrt{r p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{r(p_2 - p_1)^2}$$

$$n = \frac{n'}{4} \left[1 + \sqrt{1 + \frac{2(r+1)}{(n'r|p_2 - p_1|)}} \right]^2$$

p1: tỷ lệ đột biến trên vùng gen S ở nhóm HCC

p2: tỷ lệ đột biến trên vùng gen S ở nhóm không HCC

r: tỷ số cỡ mẫu của 2 nhóm (nhóm 2 / nhóm 1); $r = 4$

a là xác suất sai lầm loại 1, $a = 0,05$

b là xác suất sai lầm loại 2, $b = 0,2$

Nghiên cứu của Romina Salpini năm 2017 trên người nhiễm HBV mạn tính⁸⁸, tỷ lệ đột biến gen P203Q là 17,4% ở nhóm HCC và 1% ở nhóm không HCC.

→ $p1 = 0,174$ và $p2 = 0,01$.

Như vậy cỡ mẫu tối thiểu của nghiên cứu là 22 ở nhóm HCC và 88 ở nhóm không HCC.

Phương pháp chọn mẫu

Trong thời gian thực hiện nghiên cứu từ 5/2019 đến 6/2021, chúng tôi tiến hành lấy mẫu tiến cứu và hồi cứu như sau:

Tiến cứu: Lấy mẫu thuận tiện tất cả bệnh nhân đến khám tại phòng khám Viêm gan, Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh trong thời gian thực hiện nghiên cứu thỏa các tiêu chí chọn mẫu.

Hồi cứu: Lấy mẫu thuận tiện bệnh nhân từ hồ sơ nghiên cứu của nghiên cứu “Khảo sát đột biến gen pre-S/S của siêu vi viêm gan B ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn” từ năm 2013 đến năm 2016 thỏa các tiêu chí chọn mẫu, cùng với mẫu huyết thanh còn lưu trữ tại Trung tâm Y sinh học phân tử Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh và đủ sử dụng để giải trình tự gen pre-S/S.

2.5. Xác định các biến số độc lập và phụ thuộc

2.5.1. Công cụ thu thập số liệu

Công cụ thu thập số liệu là BANC có cấu trúc bao gồm 5 phần:

Phần 1: Đặc điểm xã hội học

Phần 2: Đặc điểm tiền căn

Phần 3: Đặc điểm lâm sàng

Phần 4: Đặc điểm cận lâm sàng

Phần 5: Tình trạng đột biến

2.5.2. Biến số của nghiên cứu

Phần 1: Nhóm biến số đặc điểm xã hội học

Giới tính: được xác định là giới tính sinh học của bệnh nhân, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Nữ
- Nam

Tuổi: là tuổi của bệnh nhân tại thời điểm bắt đầu tham gia nghiên cứu, là biến định lượng liên tục, được tính bằng công thức: Tuổi = Năm tham gia nghiên cứu – Năm sinh.

Nhóm tuổi: là tuổi của bệnh nhân được chia làm 2 nhóm để so sánh, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- < 40 tuổi
- ≥ 40 tuổi

Nghề nghiệp: được xác định là nghề nghiệp hiện tại của bệnh nhân, biến danh định, gồm 3 giá trị:

- Công việc ổn định: là những người có công việc ổn định và có thu nhập ổn định hàng tháng
- Công việc không ổn định: là những người làm các công việc tạm thời và không có thu nhập ổn định hàng tháng
- Thất nghiệp: là những người không có việc làm và thu nhập

Hôn nhân: Là tình trạng hôn nhân của bệnh nhân tại thời điểm tham gia nghiên cứu, biến danh định, gồm 3 giá trị:

- Độc thân: là người hiện tại không có mối quan hệ hôn nhân
- Có gia đình: là người hiện tại đang có mối quan hệ hôn nhân
- Góa: là người hiện tại đang có mối quan hệ hôn nhân và chồng/vợ đã qua đời

Địa chỉ: Là nơi cư trú/ nơi hiện tại đang sinh sống của bệnh nhân, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Thành phố Hồ Chí Minh
- Tỉnh khác

Chỉ số BMI: là công cụ sử dụng để đo lượng mỡ trong cơ thể. Chỉ số BMI chuẩn được tính dựa trên chiều cao và cân nặng, áp dụng cho nam và nữ trưởng thành. Chỉ số khối cơ thể được tính theo công thức: cân nặng (kilôgam) / bình phương chiều cao (mét), biến danh định, gồm 4 giá trị

- Thấp gầy: BMI < 18,5
- Bình thường: BMI = 18,5-22,9
- Thừa cân: BMI = 23-24,9
- Béo phì: BMI ≥ 25

Phần 2: Nhóm biến số tiền sử

Hút thuốc lá: là bệnh nhân có hoặc đã từng có thói quen hút thuốc lá (>100 điều cho đến thời điểm tham gia nghiên cứu), biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Uống rượu bia: là bệnh nhân có hoặc đã từng có thói quen uống rượu bia (>14 đơn vị rượu 1 tuần), biến danh định, gồm 3 giá trị:

- Uống rượu bia nhiều (>14 đơn vị rượu/ 1 tuần, đối với nam >3 đơn vị/ngày và đối với nữ > 2 đơn vị/ngày)
- Uống rượu bia ít (≤14 đơn vị rượu/ 1 tuần, đối với nam ≤3 đơn vị/ngày và đối với nữ ≤2 đơn vị/ngày)
- Không uống rượu bia hoặc có sử dụng nhưng không đáng kể

Gia đình có người mắc bệnh lý gan: là trong gia đình của bệnh nhân có người mắc các bệnh lý về gan, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Thành viên trong gia đình mắc bệnh lý về gan: là thành viên nào trong gia đình của bệnh nhân mắc các bệnh lý về gan, biến danh định, gồm 4 giá trị:

- Anh/em
- Ba/mẹ
- Vợ/chồng
- Con

Bệnh lý gan trong tiền căn gia đình: là các bệnh lý gan của thành viên trong gia đình bệnh nhân, biến danh định, gồm 3 giá trị:

- Viêm gan B mạn tính
- Xơ gan
- Ung thư gan

Nguồn lây vi rút viêm gan B: là con đường nhiễm HBV của bệnh nhân, biến danh định, gồm 3 giá trị:

- Mẹ sang con: là bệnh nhân bị lây nhiễm HBV truyền từ mẹ sang con
- Tình dục: là bệnh nhân bị lây nhiễm HBV truyền qua đường tình dục
- Không rõ: là bệnh nhân không biết rõ con đường lây nhiễm HBV

Thời gian mắc bệnh VGB mạn tính: là thời gian mắc bệnh viêm gan vi rút B mạn tính của bệnh nhân, biến định lượng liên tục, được tính từ thời điểm chẩn đoán viêm gan vi rút B mạn tính cho đến thời điểm nghiên cứu.

Phần 3: Nhóm biến số đặc điểm lâm sàng

Sao mạch: là một u mạch nổi trên da với trung tâm là một tiểu động mạch và tỏa ra xung quanh là các mạch nhánh mạch máu nhỏ (đường kính <1cm), được xác định bằng khám lâm sàng, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Lòng bàn tay son: là da ở các vùng đầu ngón tay và gan bàn tay của bệnh nhân sẽ có màu đỏ nhưng lòng bàn tay lại trắng, được xác định bằng khám lâm sàng, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Phù chân: là hiện tượng chân phồng lên, tăng kích thước hơn bình thường gây cảm giác nặng nề, nhất là khi di chuyển, được xác định bằng khám lâm sàng, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Xuất huyết dưới da, bầm chỗ chích, chảy máu chân răng: là hiện tượng biểu hiện tình trạng xuất huyết của bệnh nhân, được xác định bằng khám lâm sàng, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Báng bụng: là một tình trạng bụng bệnh nhân phình to do chứa quá nhiều dịch trong khoang bụng, xác định bằng khám lâm sàng, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Lách to: sự tăng kích thước bất thường của lách, được xác định bằng khám lâm sàng, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Tuần hoàn bàng hệ: là một triệu chứng xảy ra do 1 nguyên nhân nào đó làm tắc nghẽn mạch máu chính, máu sẽ chảy qua các tĩnh mạch nông, làm các tĩnh mạch này giãn ra, nổi lên, nhìn rõ dưới da, được xác định bằng khám lâm sàng, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Vàng da: là tình trạng da và kết mạc mắt có màu vàng, do nồng độ bilirubin trong máu tăng cao, được xác định bằng khám lâm sàng, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Đợt bùng phát viêm gan B mạn: là tình trạng bệnh nhân có kết quả xét nghiệm AST > 200 U/L và ALT > 200 U/L tại thời điểm tham gia nghiên cứu, xác định dựa vào các tiêu chuẩn ở mục 2.6.2, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Xơ gan: là bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh xơ gan tại Bệnh viện Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, xác định dựa vào các tiêu chuẩn ở mục 2.6.2, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

HCC: là bệnh nhân được chẩn đoán mắc HCC tại Bệnh viện Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, xác định dựa vào các tiêu chuẩn ở mục 2.6.2, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Phần 4: Nhóm biến số đặc điểm cận lâm sàng

Các biến số xét nghiệm

Đặc điểm kiểu gen (genotype) của vi rút viêm gan B: là loại kiểu gen của vi rút viêm gan B ở bệnh nhân, biến danh định, gồm 3 giá trị:

- Kiểu gen B
- Kiểu gen C
- Không xác định

HBeAg: là xét nghiệm định tính nhằm xác định sự có mặt của kháng nguyên HBeAg, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Dương
- Âm

Đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs: là bệnh nhân có cùng lúc HBsAg (+) và anti-HBs (+) trong huyết thanh, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

HBsAg định lượng: là xét nghiệm xác định nồng độ HBsAg trong huyết thanh của bệnh nhân đang có kháng nguyên này, là biến định lượng liên tục hoặc 2 nhóm thứ tự < 3 và ≥ 3 (đơn vị log IU/mL, IU: International unit).

HBV DNA: là một xét nghiệm nhằm xác định số lượng hay nồng độ của vi rút trong máu của bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B, là biến định lượng liên tục hoặc 3 nhóm thứ tự: < 5 , $5-8$, > 8 (đơn vị log copies/mL).

AST, ALT, GGT: là các chỉ số enzym gan phản ánh tình trạng tổn thương gan hoặc ứ mật tại gan (GGT), là biến định lượng liên tục (đơn vị U/L).

Bilirubin toàn phần: là một sắc tố vàng da cam, sản phẩm của quá trình phá hủy các hồng cầu bình thường trong máu, sau đó đi qua gan. Bilirubin toàn phần trong huyết thanh bao gồm bilirubin gián tiếp (chiếm 80%) và bilirubin trực tiếp (chiếm 20%), là biến định lượng liên tục ($\mu\text{mol/L}$).

INR: là một xét nghiệm máu để đo thời gian đông máu, là biến định lượng liên tục.

AFP: là alpha- fetoprotein, protein đặc hiệu sử dụng như chất đánh dấu khối u, chủ yếu là ung thư gan, tinh hoàn và buồng trứng, là biến định lượng liên tục (ng/mL).

Tiểu cầu: là xét nghiệm đếm số lượng tiểu cầu trong một đơn vị thể tích máu, là biến định lượng liên tục (K/mm^3).

Albumin: là xét nghiệm xác định hàm lượng albumin trong máu để hỗ trợ trong chẩn đoán, theo dõi hoặc đánh giá tình trạng của bệnh nhân trong quá trình điều trị. Trong nghiên cứu này dùng để đánh giá chức năng gan, là biến định lượng liên tục (g/L).

Phần 5: Nhóm biến số đột biến

Đột biến điểm: là đột biến tại vị trí 1 cặp nucleotid, làm biến đổi axit amin tại vị trí đó thành 1 axit amin khác, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Đột biến vô nghĩa: là đột biến làm thay đổi bộ ba nucleotid bất kì thành các bộ ba kết thúc (UAA, UAG, UGA), biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Đột biến sai nghĩa: là đột biến làm thay đổi bộ ba nucleotid mã hóa cho axit amin này thành bộ ba nucleotid mã hóa cho axit amin khác, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Đột biến mất đoạn: là xảy ra khi nhiễm sắc thể bị đứt gãy và một phần vật liệu di truyền bị mất đi. Đoạn bị mất có thể lớn hoặc nhỏ và có thể xuất hiện tại bất kỳ vị trí nào dọc theo nhiễm sắc thể, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

Phần 6: Nhóm biến số kết cuộc

Xơ gan: là bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh xơ gan tại Bệnh viện Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, xác định dựa vào các tiêu chuẩn ở mục 2.6.2, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

HCC: là bệnh nhân được chẩn đoán mắc HCC tại Bệnh viện Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, xác định dựa vào các tiêu chuẩn ở mục 2.6.2, biến nhị giá, gồm 2 giá trị:

- Có
- Không

➤ **Biến số độc lập**

(i) Nhóm biến số đặc điểm dân số-xã hội: giới tính, tuổi, nghề nghiệp, hôn nhân, địa chỉ, chỉ số BMI.

(ii) Nhóm biến số tiền sử: hút thuốc lá, uống rượu bia, tiền căn gia đình có người mắc bệnh lý về gan, nguồn lây viêm gan B, thời gian mắc vi rút viêm gan B mạn tính.

(iii) Nhóm biến số đặc điểm lâm sàng: đợt bùng phát viêm gan B mạn HBeAg (+)/ (-), xơ gan, ung thư gan.

(iv) Nhóm biến số đặc điểm cận lâm sàng: đặc điểm kiểu gen của vi rút viêm gan B, các chỉ số xét nghiệm HBeAg, HBV DNA, AST, ALT, GGT, Bilirubin toàn phần, INR, AFP, tiểu cầu, Albumin.

(v) Nhóm biến số đột biến: đột biến mất đoạn pre-S1/pre-S2/S, đột biến điểm trên vùng pre-S1/pre-S2/S.

➤ **Biến số phụ thuộc:** Ung thư biểu mô tế bào gan (HCC).

2.6. Kỹ thuật đo lường và tiêu chuẩn chẩn đoán trong nghiên cứu

2.6.1. Các kỹ thuật đo lường

- **Các xét nghiệm công thức máu, chức năng gan** (AST, ALT, GGT, Bilirubin toàn phần, Albumin) được thực hiện trên máy huyết học và sinh hóa tự động tại khoa xét nghiệm Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.
- **HBeAg:** định tính, phương pháp miễn dịch điện hóa phát quang ECLIA (ElectroChemiluminescent Immunoassay), bộ thuốc thử Cobas (Roche) trên máy xét nghiệm miễn dịch Elecsys và Cobas-e, tại Khoa Xét nghiệm Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.
- **HBsAg định lượng:** bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang tại Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh dùng thuốc thử Elecsys HBsAgII Quant (Roche), đơn vị IU/mL, khoảng định lượng từ 0,05-52.000 IU/mL.
- **Ly trích HBV-DNA bằng bộ kit BOOM:** phương pháp này sử dụng tác nhân biến tính để tách chiết DNA từ huyết thanh, biến tính các phân tử

protein, hỗ trợ DNA gắn có chọn lọc lên hạt silica đi kèm bộ kit. Protease K được sử dụng để phân hủy các thành phần protein trong mẫu ngay cả khi có sự hiện diện của EDTA và chất tẩy mạnh. Các thành phần bị biến tính nhanh chóng được rửa trôi, chỉ còn DNA được giữ lại trên hạt silica. Mẫu DNA sau khi tách chiết được trữ tại -20°C và được sử dụng dùng làm khuôn mẫu cho PCR cho các phân tích.

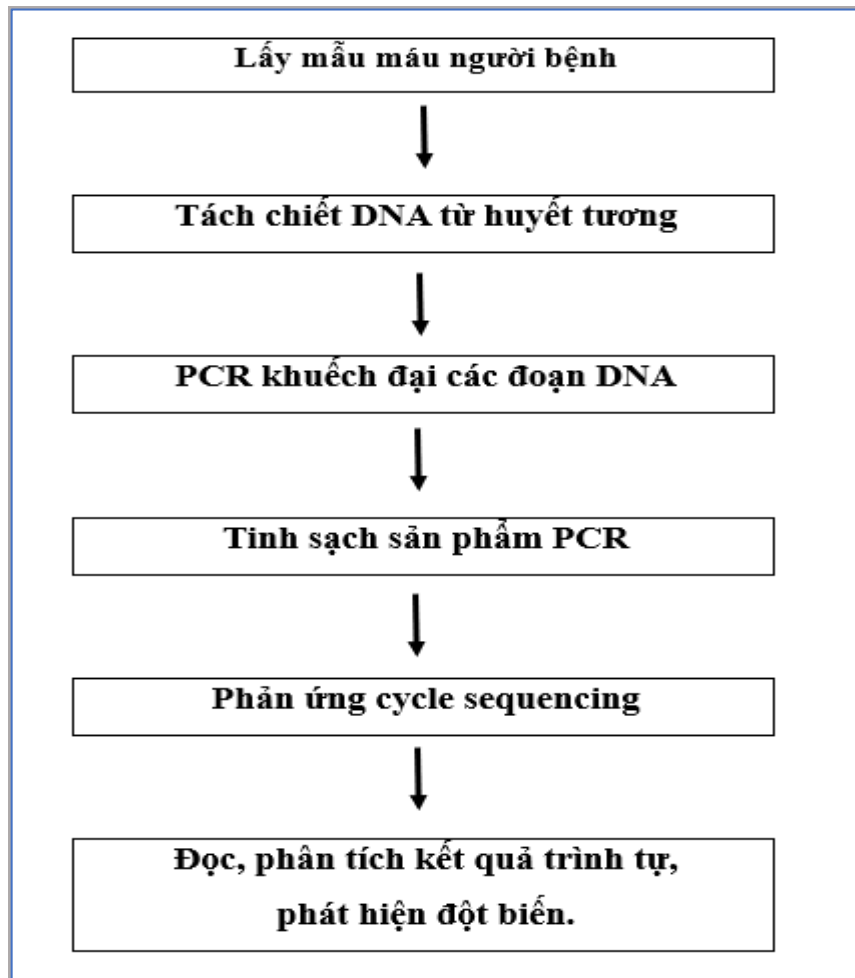
- **Định lượng HBV DNA:** bằng kỹ thuật PCR thời gian thực (qPCR), thực hiện tại khoa xét nghiệm Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Kỹ thuật định lượng HBV DNA có ngưỡng phát hiện 300 copies/mL, ly trích DNA với bộ hóa chất QIAamp DNA (Qiagen, Đức); thực hiện phản ứng PCR định lượng HBV DNA với bộ hóa chất AccuPid HBV quantification (KT- Biotech, Việt Nam). Hỗn hợp 25 μl phản ứng real time PCR chứa bộ cặp mồi và mẫu dò TaqMan được thiết kế bắt cặp đặc hiệu vào một đoạn gen S dài 118 bp trong bộ gen HBV để khuếch đại; sản phẩm khuếch đại DNA của HBV được phát hiện bằng tín hiệu huỳnh quang. Ngoài ra, hỗn hợp phản ứng còn chứa một cặp mồi và mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho một đoạn DNA nhân tạo có trình tự khác trình tự gene HBV gọi là chứng nội ngoại sinh (internal control) – được bổ sung và ly trích cùng với DNA trong mẫu nhằm phát hiện các chất ức chế có trong mẫu và kiểm soát hiệu quả của quá trình tách chiết DNA cũng như phản ứng PCR. Các mẫu chuẩn có nồng độ biết trước gồm 5×10^2 , 5×10^3 , 5×10^5 , 5×10^7 copies/mL được sử dụng để xây dựng đường chuẩn là cơ sở tính toán định lượng cho mẫu xét nghiệm. Mẫu chứng âm là mẫu đã được xác định là âm tính với HBV DNA.
- **Xác định kiểu gen (genotype) HBV, tìm đột biến vùng pre-S/S:** kiểu gen HBV, đột biến trên vùng pre-S/S được phân tích tại trung tâm Y sinh học phân tử của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2.6.2. Các tiêu chuẩn chẩn đoán

- **Nhiễm vi rút viêm gan B mạn:** người có HBsAg (+) > 6 tháng, ALT trong giới hạn bình thường.
- **Viêm gan vi rút B mạn:** bệnh nhân có HBsAg (+) > 6 tháng, có HBeAg (+)/ (-); ALT $\geq$ 2ULN.
- **Đợt bùng phát viêm gan vi rút B mạn HBeAg (+)/ (-):** bệnh nhân có HBsAg (+) > 6 tháng; HBV DNA $>10^5$ copies/mL, HBeAg (+) hoặc HBV DNA $>10^4$ copies/mL, HBeAg (-); ALT $\geq$ 5ULN (hay $\geq$ 200 U/L).
- **Bệnh nhân có HBV mạn kèm xơ gan:** bệnh nhân có HBsAg (+) > 6 tháng, HBV DNA $\geq$ 300 copies/mL có phân độ Child Pugh B hoặc C (hay ARFI $>F4$, hay APRI >2) và có bằng chứng suy tế bào gan cùng với tăng áp tĩnh mạch cửa (lồng bàn tay son, albumin/máu < 35 g/dl, taux de prothrombin $< 60\%$), tiểu cầu giảm $< 120.000/mm^3$; bóng bụng, giãn tĩnh mạch thực quản, lách to...).
- **Bệnh nhân có HBV mạn kèm ung thư biểu mô tế bào gan:** bệnh nhân có HBsAg (+) > 6 tháng, HBV DNA $\geq$ 300 copies/mL kèm theo: (i) AFP > 200 ng/mL, siêu âm bụng có sang thương có tính chất phù hợp với chẩn đoán ung thư gan kèm theo kết quả CT scan hoặc MRI bụng có sang thương ngấm thuốc có tăng quang thì động mạch và thải thuốc thì tĩnh mạch muộn hoặc (ii) AFP > 200 ng/mL, siêu âm bụng có sang thương có tính chất phù hợp với ung thư gan kèm thuyên tắc tĩnh mạch cửa.

2.7. Các quy trình trong nghiên cứu

2.7.1 Quy trình xét nghiệm phát hiện đột biến gen



Sơ đồ 3.1: Quy trình xác định đột biến gen trên vi rút viêm gan B

Bước 1: Tách chiết DNA từ huyết thanh bằng bộ kit BOOM

Phương pháp sử dụng tác nhân biến tính để tách chiết DNA từ huyết thanh, biến tính các phân tử protein, hỗ trợ DNA gắn có chọn lọc lên hạt silica đi kèm bộ kit. Protease K được sử dụng để phân hủy các thành phần protein trong mẫu ngay cả khi có sự hiện diện của EDTA và chất tẩy mạnh. Các thành phần bị biến tính nhanh chóng được rửa trôi, chỉ còn DNA được giữ lại trên hạt silica.

Bước 2: PCR khuếch đại vùng gen S của HBV

PCR là kỹ thuật *in vitro* dùng để khuếch đại một trình tự DNA, các DNA polymerase khi hoạt động tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn đều cần sự hiện diện của những môi chuyên biệt. Môi là những đoạn oligonucleotid có khả

năng bắt cặp bổ sung với đầu 3' của mạch khuôn. DNA polymerase sẽ nối dài mỗi đầu để hình thành mạch mới.

Hiện tượng trên chính là cơ sở của phương pháp PCR. Như vậy, nếu được cung cấp hai môi (môi xuôi và môi ngược) có khả năng bắt cặp chuyên biệt với hai đầu của một trình tự DNA và các thành phần bổ sung khác như: dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), dung dịch đệm thì phản ứng PCR sẽ nhân bản trình tự nằm giữa hai môi ấy. PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại nhiều lần, mỗi chu kỳ gồm 3 bước:

- (i) Biến tính: mục tiêu tách rời DNA mạch đôi thành mạch đơn bằng nhiệt độ (98°C)
- (ii) Bắt cặp: mục tiêu để mỗi bắt cặp với DNA bản mẫu, nhiệt độ lai phụ thuộc nhiệt độ nóng chảy của môi (T_m) sử dụng và thường trong khoảng 50-70°C.
- (iii) Kéo dài: dưới tác động của DNA polymerase, các nucleotid lần lượt được gắn vào môi theo nguyên tắc bổ sung với mạch khuôn. Mạch mới được tạo thành từ môi được nối dài.

Bảng 2.1: Cặp môi khuếch đại toàn bộ vùng gen S của HBV

Vùng gen	Ký hiệu	TRÌNH TỰ MÔI (5'=>3')	PCR length (bp)
pre-S1-pre-S2	FA2-L	TTG AGA GAA GTC CAC CAC GAG	1076
	FA2-R	GCG TCG CAG AAG ATC TCA AT	
pre-S2-S	FA3-L	CTG CTG GTG GCT CCA GTT	1059
	FA3-R	GCC TTG TAA GTT GGC GAG AA	

Phản ứng PCR khuếch đại toàn bộ vùng gen S bằng cặp môi FA2F/R và FA3F/R bảo đảm độ tin cậy, kích thước sản phẩm PCR điện di tương đồng với kích thước khi thiết kế môi. Kiểm tra kích thước sản phẩm PCR dựa trên gel agarose, các axit nucleic trong gel sau khi nhuộm với *ethidium bromide* sẽ phát

quang dưới ánh sáng của tia cực tím. Sản phẩm sau khi chạy PCR được chạy điện di trên gel agarose 1% với thang chuẩn 1Kp plus.

Bảng 2.2: Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng PCR

10X buffer PCR	1,5µl	98°C	3m	
dNTPs mixture	1,5 µl	98°C	10s	
Primer F (10µm)	0,75µl	58°C	15s	40 cycles
Primer R (10µm)	0,75µl	72°C	2m	
DNA template (~ 40 ng)	2µl	72°C	5m	
Taq HS	0,1 µl	16°C	Hold	
H ₂ O:	8,4µl			

Bước 3: Tinh sạch sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, 2µl sản phẩm PCR cần tinh sạch được trộn đều với 2µl enzyme ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup. Hỗn hợp được trộn đều vào ủ tại 37°C trong 15 phút nhằm phân cắt hoàn toàn các trình tự mồi còn dư sau phản ứng PCR. Sau đó, hỗn hợp được ủ tại 80°C trong 15 phút để bất hoạt hoạt tính enzyme.

Bước 4: Phản ứng cycle sequencing

- Sử dụng bộ kit BigDye terminator V3.1 được hãng Applied Biosystem sản xuất.

Bảng 2.3: Thành phần cho phản ứng cycle sequencing

BigDye	0,5µl
Sản phẩm PCR sau tinh sạch	1µl
Mồi (5µM)	0,6µl
5X Sequencing buffer	1,5µl
Nước	4,9 µl
Tổng thể tích	8,5µl

Bảng 2.4: Chương trình PCR cycle sequencing

96°C X 1 phút	
96°C X 10 giây	25 chu kỳ
50°C X 5 giây	
60°C X 4 phút	
4°C	

- Tủa sản phẩm sau giải trình tự:

DNA dễ dàng hòa tan trong các dung môi ưa nước vì có ái lực với các phân tử của dung môi. Khi tủa DNA với cồn có bổ sung muối, do cồn có ái lực với nước mạnh hơn DNA nên cồn kéo nước về phía mình, phá bỏ liên kết giữa DNA và nước. Kết quả là các phân tử DNA tập trung lại và bị kết tủa xuống đáy theo lực ly tâm.

Bước 5: Phân tích kết quả giải trình tự

Các trình tự của vùng gen S của HBV được đọc trên máy giải trình tự ABI3500 Genetic Analyzer, dùng POP-7 polymer, 8 capillary dài 50cm (Applied Biosystems, USA). Mỗi loại nucleotid được máy biểu hiện bằng 1 sóng, sóng giữa các nucleotid có màu khác nhau: Adenine (A): màu xanh lá, Cytosine (C): màu xanh da trời, Guanine (G): màu đen, Thymine (T): màu đỏ. Kết quả trình tự có được so sánh với trình tự tham khảo trên Genbank bằng phần mềm CLC Main Workbench v5.5 (QIAGEN, Đức). Trong đó, chúng tôi sử dụng trình tự tham chiếu (mã số truy cập Genbank: AB-073846) cho kiểu gen B và trình tự tham chiếu (mã số truy cập Genbank: X-04615) đối với kiểu gen C của HBV. Các biến đổi nucleotid tạo ra các đột biến sai nghĩa thay đổi mã bộ ba axit amin này thành axit amin khác và đột biến vô nghĩa làm xuất hiện bộ ba kết thúc sẽ được ghi nhận lại. Vị trí đột biến mất đoạn căn cứ theo vị trí nucleotid trên bộ gen HBV và đột biến mất đoạn sẽ dẫn đến lệch khung trình tự DNA. Như vậy, kết quả giải trình tự tại vị trí có đột biến mất đoạn sẽ xuất hiện tình trạng sóng đôi hoặc sóng trình tự không khớp với tình trạng sóng tham chiếu. Khoảng cách mất đoạn được tính từ vị trí nucleotid không khớp đến vị trí khớp của các trình tự này trên trình tự tham chiếu.

2.7.2. Quy trình thực hiện nghiên cứu

Bước 1: Chọn bệnh

Chọn bệnh tiến cứu: Bệnh nhân đến khám tại phòng khám Viêm gan Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã chẩn đoán nhiễm HBV mạn tính phù hợp với tiêu chuẩn chọn mẫu, được tư vấn, giải thích về nghiên cứu.

Chọn bệnh hồi cứu: Chọn bệnh nhân từ hồ sơ bệnh án (HSBA) và mẫu huyết thanh lưu trữ trong nghiên cứu “Khảo sát đột biến gen pre-S/S của siêu vi viêm gan B ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn” của Chủ nhiệm Nguyễn Thị Cẩm Hương, thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh số 119/ĐHYD-HĐĐĐ ngày 14 tháng 2 năm 2020, thỏa các tiêu chí chọn mẫu.

Bước 2: Thu thập thông tin

Tiến cứu: Sau khi bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu, bệnh nhân ký tên vào bản đồng thuận tham gia nghiên cứu, tiến hành thu thập các thông tin theo BANC từ HSBA hay khám lâm sàng trực tiếp.

Hồi cứu: Kiểm tra thông tin lưu trữ trong HSBA, mẫu huyết thanh, phiếu đồng thuận đã ký trong nghiên cứu trước đó và điền thông tin vào BANC.

Bước 3: Quy trình lấy mẫu máu và tách chiết DNA

Tiến cứu: Lấy máu bệnh nhân: Bệnh nhân được ngồi nghỉ 15-20 phút, giải thích cho bệnh nhân trước khi lấy máu để bệnh nhân hợp tác, lấy máu bằng đường tĩnh mạch, lấy khoảng 4 mL máu, cho vào ống nghiệm có chất chống đông EDTA, lắc đều nhẹ nhàng, sau đó mẫu máu được gửi ngay đến Trung tâm Y sinh học phân tử Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh để chiết tách DNA, lưu trữ mẫu DNA đã chiết tách và chuẩn bị cho phân tích giải trình tự gen tìm đột biến.

Hồi cứu: Các mẫu DNA được chiết tách từ nghiên cứu trước và lưu trữ tại nhiệt độ -80°C sẽ được lấy ra kiểm tra và chuẩn bị cho phân tích giải trình tự gen tìm đột biến.

Bước 4: Phân tích đột biến gen

Thực hiện phân tích các đột biến trên vùng gen pre-S/S bằng giải trình tự Sanger là tiêu chuẩn vàng được sử dụng trong phát hiện đột biến gen.

Bước 5: Nhập liệu

Nhập liệu từ BANC thu thập tiến cứu và hồi cứu vào phần mềm Excel 2010 và mã hóa số liệu chuẩn bị cho phân tích kết quả.

Bước 6: Phân tích số liệu theo mục tiêu nghiên cứu

Sau khi dữ liệu được nhập bằng phần mềm Excel 2010 sẽ tiến hành phân tích bằng phần mềm SPSS 25.

Mục tiêu 1: Xác định đột biến gen của pre-S/S.

Mục tiêu 2: Xác định liên quan giữa đột biến gen của pre-S/S với HCC.

2.8. Phương pháp phân tích số liệu

Nghiên cứu sử dụng phần mềm SPSS 25 để phân tích số liệu.

Đối với các biến số liên tục như tuổi, HBV DNA, lượng HBsAg,... được tính toán và biểu diễn bằng: (i) biểu diễn giá trị trung bình và độ lệch chuẩn nếu kết quả có phân phối chuẩn, sử dụng phép kiểm t-test để so sánh giữa 2 nhóm; (ii) biểu diễn bằng trung vị, khoảng tứ phân vị cho biến định lượng có phân phối không chuẩn, sử dụng phép kiểm Man-Whitney U (so sánh 2 nhóm) hay Kruskal Wallis (so sánh 3 nhóm trở lên) để so sánh giữa các nhóm.

Đối với các biến số phân nhóm như tuổi, giới, kiểu gen, đột biến vùng pre-S/S được trình bày bằng tỷ lệ %, phương pháp kiểm định là Chi bình phương hoặc Fisher. Mỗi liên quan giữa mỗi yếu tố nguy cơ và bệnh được phân tích bằng tỷ số odds (odds ratio, OR) và khoảng tin cậy 95%. Tỷ số odds được ước tính từ mô hình hồi quy logistic. Mức có ý nghĩa được xác nhận khi $p < 0,05$.

Phân tích hồi quy đa biến để xác định mức độ liên quan thật sự của các đột biến và các yếu tố ngoài đột biến với các biến số có $p < 0,2$. Mức có ý nghĩa được xác nhận khi $p < 0,05$.

2.9. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu đã thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

Bệnh nhân được giải thích thông tin về nghiên cứu (mục đích, lợi ích và bất lợi khi tham gia nghiên cứu) và ký đồng thuận tự nguyện tham gia nghiên cứu, bệnh nhân có thể đề nghị rút khỏi nghiên cứu mà không ảnh hưởng đến quy trình theo dõi và điều trị chung.

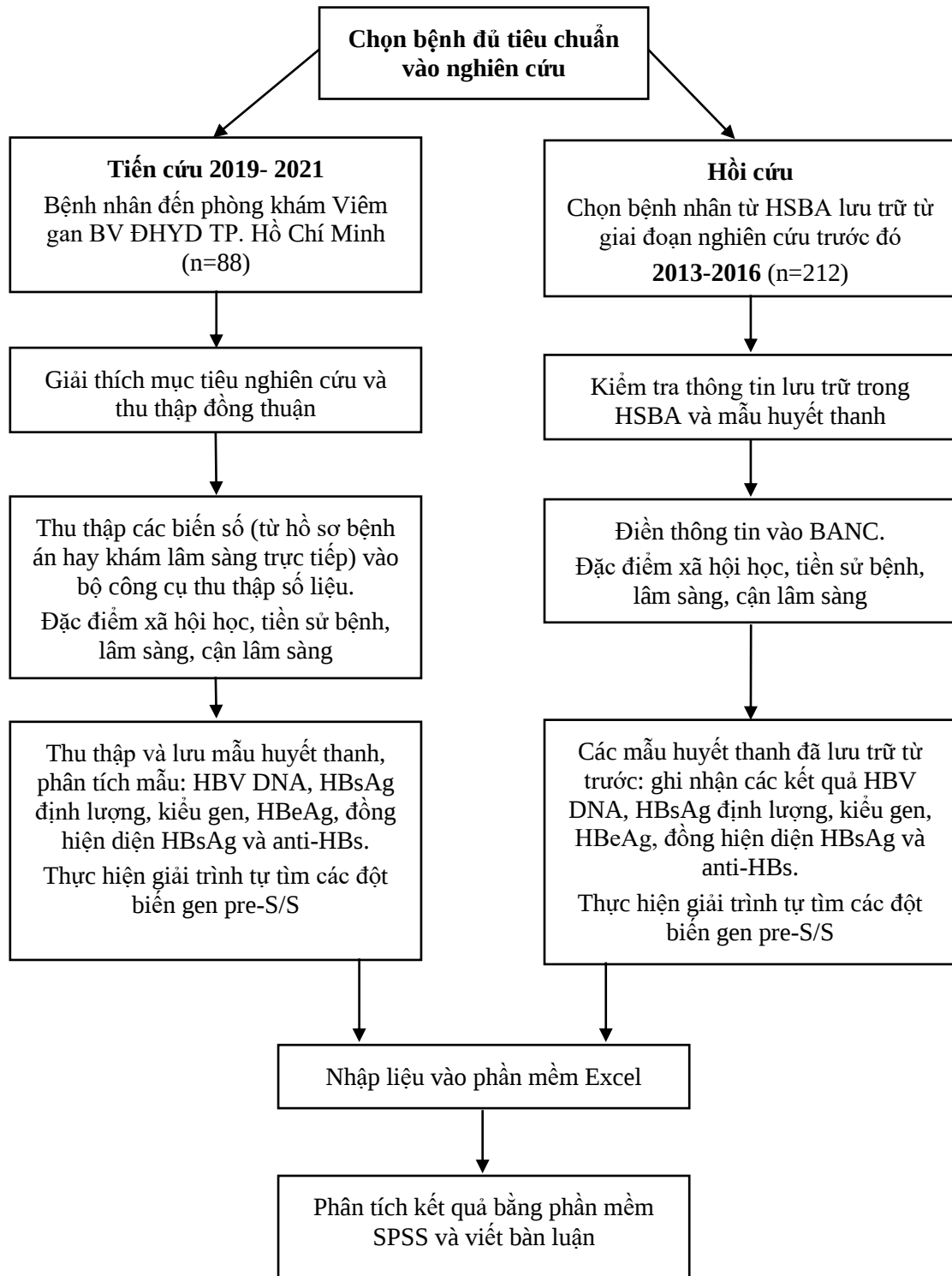
Những thông tin cá nhân như tên, năm sinh, số điện thoại liên lạc, địa chỉ....được bảo mật, không công khai, chỉ sử dụng khi cần liên lạc với bệnh nhân hoặc thân nhân để thu thập những thông tin liên quan đến nghiên cứu .

Việc nghiên cứu không làm ảnh hưởng đến tình hình bệnh của người tham gia vào nghiên cứu, không làm chậm trễ cho việc khám, chẩn đoán, điều trị và theo dõi bệnh nhân.

Chi phí xét nghiệm xác định kiểu gen và đột biến vùng pre-S/S, định lượng HBV DNA và HBsAg ở một số bệnh nhân thiếu dữ liệu do nghiên cứu chi trả từ nguồn Quỹ nghiên cứu khoa học của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

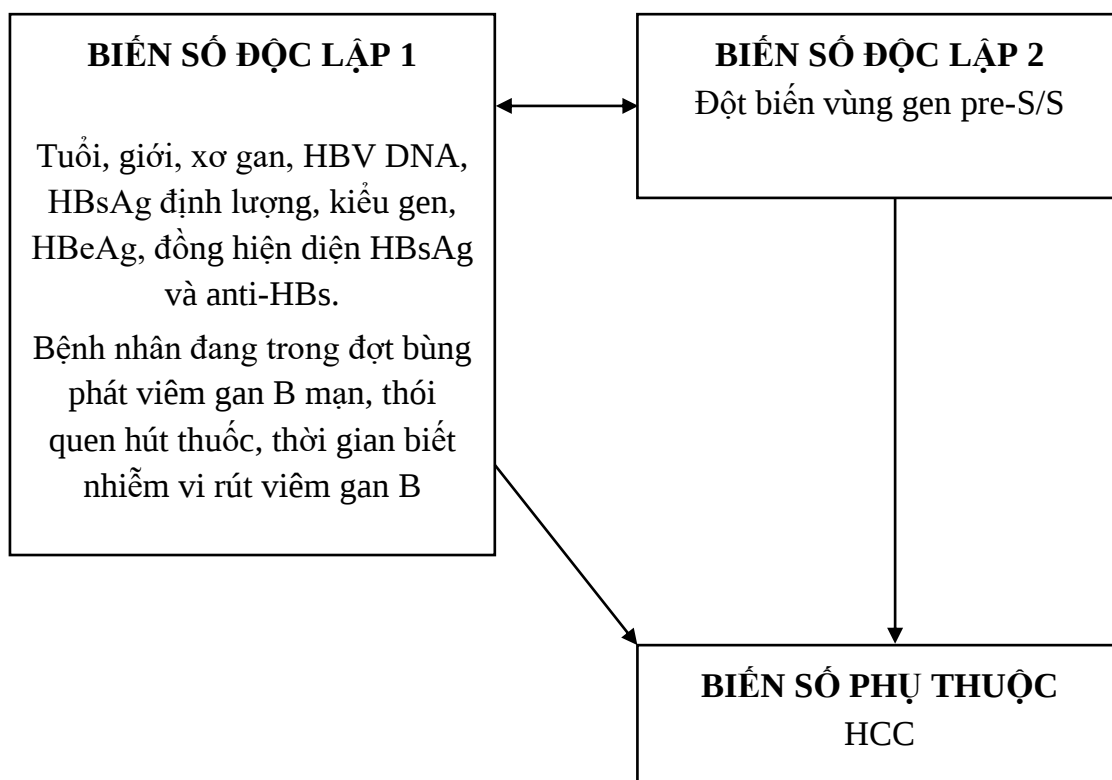
Nghiên cứu đã thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh số 326/ĐHYD-HĐĐĐ ngày 10 tháng 6 năm 2019.

Sơ đồ thực hiện nghiên cứu



Sơ đồ 3.2. Sơ đồ thực hiện nghiên cứu

Sơ đồ phân tích trong nghiên cứu



Sơ đồ 3.3. Sơ đồ phân tích trong nghiên cứu

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong thời gian từ tháng 5/2019 đến tháng 6/2021, có 300 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn được chọn vào nghiên cứu, trong đó hồi cứu là 212 mẫu và tiền cứu là 88 mẫu.

3.1. Đặc điểm chung của dân số nghiên cứu

3.1.1. Đặc điểm dân số xã hội

Bảng 3.1: Đặc điểm dân số xã hội (n=300)

Đặc điểm	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Giới tính		
Nam	210	70
Nữ	90	30
Nhóm tuổi		
<40	127	42,3
≥40	173	57,7
BMI		
Thấp gầy	29	9,7
Bình thường	166	55,3
Thừa cân	60	20
Béo phì	45	15
Hôn nhân		
Độc thân	39	13
Có gia đình	260	86,7
Góa	1	0,3
Nghề nghiệp		
Công việc ổn định	85	28,3
Công việc không ổn định	156	52
Thất nghiệp	59	19,7
Địa chỉ		
TP. Hồ Chí Minh	65	21,7
Tỉnh khác	235	78,3

Tuổi trung vị là 42 (32-53), nhóm ≥40 tuổi chiếm tỷ lệ cao hơn (57,7%) và nam chiếm 70%. Về BMI, có tới 35% bệnh nhân thừa cân, béo phì và 9,7% bệnh nhân thấp gầy. Có 86,7% bệnh nhân có gia đình, 52% công việc không ổn định và 78,3% bệnh nhân sống ở ngoài TP. Hồ Chí Minh.

3.1.2. Đặc điểm tiền căn

Bảng 3.2: Đặc điểm tiền căn về thói quen (n=300)

Đặc điểm	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Hút thuốc lá		
Có	53	17,7
Không	247	82,3
Uống rượu bia		
Nhiều	48	16
Ít	61	20,3
Không	191	63,7

Phần lớn bệnh nhân không hút thuốc lá chiếm tỷ lệ 82,3% và ít hoặc không uống rượu bia có tỷ lệ lần lượt là 20,3% và 63,7%.

Bảng 3.3: Đặc điểm tiền căn lây nhiễm và tiền căn gia đình (n=300)

Đặc điểm	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Nguồn lây viêm gan B		
Mẹ sang con	31	10,3
Tình dục	4	1,3
Không rõ	265	88,3
Bệnh nhân có tiền căn gia đình mắc các bệnh lý về gan		
Có	96	32
Không	204	68
Người trong gia đình mắc bệnh lý về gan		
Anh/em	31	10,3
Ba/mẹ	31	10,3
Vợ/chồng	6	2
Con	13	4,3
Anh/em và ba/mẹ	8	2,7
Bệnh lý gan trong gia đình gia đình		
Viêm gan B	66	22
Xơ gan	10	3,3
HCC	12	4
Viêm gan B và xơ gan	7	2,3
Viêm gan B và HCC	8	2,7
Thời gian biết nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính	Trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn	
	10,9 $\pm$ 3,67	

Hầu hết bệnh nhân đều không rõ nguồn lây của vi rút viêm gan B (88,3%), chỉ có 10,3% là từ mẹ sang con và 1,3% là do quan hệ tình dục. Về tiền căn bệnh lý gan ở người thân trong gia đình có 32% bệnh nhân được ghi nhận có người thân mắc bệnh. Trong số người thân mắc bệnh, chiếm đa số là ba/mẹ và anh/em với 10,3%. Tỷ lệ người thân có xơ gan và HCC thấp dưới 5%. Thời gian biết nhiễm vi rút viêm gan B mạn trung bình là $10,9 \pm 3,67$ năm.

3.1.3. Đặc điểm lâm sàng

Bảng 3.4: Đặc điểm lâm sàng (n=300)

Đặc điểm	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Đợt bùng phát viêm gan vi rút B		
Có	95	31,7
Không	205	68,3
HCC		
Có	62	20,7
Không	238	79,3
Xơ gan		
Có	69	23
Không	231	77

Có 31,7% bệnh nhân bùng phát viêm gan vi rút B. Có 20,7% bệnh nhân bị ung thư biểu mô tế bào gan và 23% bị xơ gan.

3.1.4. Đặc điểm cận lâm sàng

Bảng 3.5: Đặc điểm liên quan với vi rút viêm gan B (n=300)

Đặc điểm của HBV		Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
HBeAg	âm	139	46,3
	dương	161	53,7
HBV DNA (log copies/mL)	< 5	63	21
Trung vị (IQR)= 6,63 (5,17-7,81)	5-8	168	56
	> 8	69	23

Kiểu gen	B	169	56,3
	C	122	40,7
	B và C	9	3,0
Nồng độ HBsAg (log IU/mL) (n=261)	< 3	74	24,7
Trung vị (IQR): 3,39 (2,96-4,06)	≥ 3	187	62,3
Đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs (n=267)	Có	48	18
	Không	219	82

Có 53,7% bệnh nhân có HBeAg dương, kiểu gen B chiếm 56,3%, HBV DNA từ 5-8 log copies/mL chiếm đa số (56%). Trong 261 ca có thực hiện đo HBsAg định lượng, 62,4% bệnh nhân có HBsAg định lượng ≥ 3 log IU/mL. Với 267 trường hợp bệnh nhân có thực hiện đồng thời xét nghiệm HBsAg và anti-HBs, tỷ lệ đồng hiện HBsAg và anti-HBs là 18%.

Bảng 3.6: Các chỉ số xét nghiệm máu (n=300)

Đặc điểm	Trung vị	Khoảng 25% và 75%		Giá trị trung bình
AST (<40 U/L)	73	40,5	166	179 $\pm$ 330
ALT (<40 U/L)	83	35	176	201 $\pm$ 399
GGT (<40 U/L)	82	36	182,5	142 $\pm$ 152
Bilirubin toàn phần (μ mol/L)	209	126,5	323,5	225 $\pm$ 120
INR	1,11	1	1,24	1,17 $\pm$ 0,37
AFP (ng/mL)	34	20	64,5	150 $\pm$ 87
Tiểu cầu (K/mm ³)	159,5	122	211	169 $\pm$ 69,8
Albumin (g/L)	39	35	41	37,9 $\pm$ 5

Các chỉ số xét nghiệm chức năng gan đều cao hơn ngưỡng bình thường ngoại trừ chỉ số xét nghiệm albumin nằm trong giới hạn bình thường.

3.2. Mô tả các đặc điểm đột biến trên gen pre-S/S

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập được 300 người tham gia vào nghiên cứu (62 bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn có HCC và 238 nhiễm HBV mạn không có HCC). Khi chúng tôi phân tích giải trình tự gen vùng pre-S1 có 286 trường hợp thành công (58 bệnh nhân HCC và 228 người không HCC), 284 trường hợp giải trình tự gen vùng pre-S2 thành công (57 bệnh nhân HCC và 227 người không HCC) và 297 trường hợp giải trình tự gen vùng S thành công (59 bệnh nhân HCC và 238 người không HCC).

3.2.1. Đặc điểm đột biến trên vùng pre-S

Bảng 3.7: Đặc điểm phân bố đột biến vùng pre-S1 và pre-S2

<i>pre-S1 (aa 1-119)</i> (n= 286)	Tần số (%)	<i>pre-S2 (aa 120-174)</i> (n= 284)	Tần số (%)
Đột biến điểm			
G2R	1 (0,3)	M120V/I	30 (10,6)
W4P/R/Y	13 (4,5)	Q121R/K	15 (5,3)
S5L/T	7 (2,4)	W122R	3 (1,1)
S6A	3 (1,0)	N123T/K	3 (1,1)
K7N	1 (0,3)	S124T	10 (3,5)
P8T	1 (0,3)	T125S/N/P	82 (28,9)
Q10K/H/R	46 (16,1)	T126N/I/A	4 (1,4)
T14I	1 (0,3)	H128L	4 (1,4)
S17F/A	4 (1,4)	Q129K	1 (0,4)
P19S	1 (0,3)	A130T/N	12 (4,2)
F25L	1 (0,3)	L/Q132I/H	6 (2,1)
D27G/S	38 (13,3)	D133N	1 (0,4)
I31T	1 (0,3)	P134H/T	2 (0,7)
P32L	3 (1,0)	R135K	2 (0,7)
A33F/L	2 (0,7)	V136A	1 (0,4)
F34Y	1 (0,3)	R137K/Q	5 (1,8)

G35R/K	24 (8,4)	A138D	2 (0,7)
S38T	2 (0,7)	L139Q/P	2 (0,7)
N/E39K/G/D/A	12 (4,2)	Y140S/N/H/F/C	9 (3,2)
N40Y/T	2 (0,7)	F141V/L/I	33 (11,6)
P41Q	1 (0,3)	A143V	1 (0,4)
D42N	1 (0,3)	S146F	2 (0,7)
D44H/N	3 (1,0)	S147G	2 (0,7)
L45R/F	10 (3,5)	S148L	4 (1,4)
H48Y/N	39 (13,6)	G149E/K	10 (3,5)
D50N/E	2 (0,7)	I150T	124 (43,7)
N/H51Y/T/S/Q/P	83 (29,0)	V151A	5 (1,8)
E/D54A/N	68 (23,1)	S152N	1 (0,4)
A55S	1 (0,3)	P153L	1 (0,4)
I/N56H/W	71 (24,8)	Q155P/H	3 (1,1)
K57Q/K	69 (24,1)	N156T/I/S	8 (2,8)
G59A	1 (0,3)	T157S	2 (0,7)
A60V	70 (24,5)	V158A	97 (34,2)
D/A62S/T	69 (24,1)	A160T/P	5 (1,8)
P65T	2 (0,7)	I161T/L	4 (1,4)
F67V/L	2 (0,7)	T164I/D/S	18 (6,3)
V68T/S/I	132 (46,2)	F165S/L	19 (6,7)
P70S	2 (0,7)	S166A/L	6 (2,1)
G73S/N	65 (22,7)	K167T	14 (4,9)
L74M/V	7 (2,4)	T168I	4 (1,4)
L75V/M	5 (1,7)	V172A	3 (1,1)
W77R/G	5 (1,7)	P173Q/L	9 (3,2)
S78N	3 (1,0)	N174S/K	2 (0,7)
Q80L/H	3 (1,0)		
A81T	6 (2,1)		

Q82L	1 (0,3)		
I84V/M/L	24 (8,4)		
L85I/H/F	4 (1,4)		
T86A/S	8 (2,8)		
T/N87S/P	136 (47,6)		
V88I/M/L	6 (2,1)		
P89R	1 (0,3)		
A90T/S/G	6 (2,1)		
A91T/P	8 (2,8)		
P92L	1 (0,3)		
P94T/S	5 (1,7)		
V95A	67 (23,4)		
T97I/A	4 (1,4)		
N98T/K/I	4 (1,4)		
S101T/L	2 (0,7)		
G102R/K	3 (1,0)		
R103T	1 (0,3)		
Q104R/K	4 (1,4)		
L108V/I	5 (1,7)		
S109T	14 (4,9)		
R113T	1 (0,3)		
D114E	2 (0,7)		
T115S/C	7 (2,4)		
Q118L	1 (0,3)		
A119V	1 (0,3)		
Mất đoạn <i>pre-S1</i>	61 (21,3)	Mất đoạn <i>pre-S2</i>	43 (15,1)
Đột biến vùng chức năng (≥ 1 điểm đột biến)			
NTCP (aa2-48)	136 (47,6)		
Hsc70 (aa74-118)	201 (70,3)		

S promoter (aa 66-111)	205 (71,7)		
NBS (aa 103-127)	130 (45,5)		
T cell epitope (aa 21-30, 52-67)	90 (31,5)		
B cell epitope (aa12-47, 72-78, 94-117)	121 (42,3)		

Nghiên cứu phát hiện thành công đột biến ở 286 ca với vùng pre-S1 và 284 ca với vùng pre-S2. Trong đó, vùng pre-S1 có 70/119 vị trí axit amin có đột biến sai nghĩa (58,8% có thay thế axit amin khác), 2 vị trí axit amin có đột biến với tỷ lệ cao nhất (> 30%) là vị trí 68 và 87 (đột biến V68T/S/I 46,2%, đột biến T/N87S/P 47,6%). Và vùng pre-S2 có 43/55 vị trí axit amin bị thay thế (78,1%), vị trí 150 có tỷ lệ bị thay thế cao nhất (đột biến I150T 43,7%).

21,3% có đột biến mất đoạn vùng pre-S1, 15,1% có đột biến mất đoạn vùng pre-S2. Xét trên các đoạn gen thuộc các vùng chức năng của pre-S1, tỷ lệ có thay thế axit amin của các vùng này chiếm từ 30% đến 70%; thấp nhất là tỷ lệ có đột biến trên vùng T cell epitope (31,5%) và B cell epitope (42,3%). Đột biến vùng S promoter (71,7%) và HSP (70,3%) chiếm tỷ lệ cao nhất.

3.2.2. Đặc điểm đột biến trên vùng gen S

Bảng 3.8: Đặc điểm phân bố đột biến vùng gen S

S (aa 1-227) (n=297)	Tần số (%)		Tần số (%)
Đột biến điểm			
E2G	1 (0,3)	L109I/P/Q	6 (2,0)
N3S	1 (0,3)	I110L/Q	12 (4,0)
T4I	1 (0,3)	R112K	1 (0,3)
A5T/S	15 (5,1)	T113N	1 (0,3)
G7K	2 (0,7)	S114T/P/A	8 (2,7)
F8P	1 (0,3)	T115N	1 (0,3)

L9P	3 (1,0)	T116N	1 (0,3)
G10R	3 (1,0)	T118M	1 (0,3)
P11H	1 (0,3)	P120S/T	22 (7,4)
L12R	1 (0,3)	R122K	27 (9,1)
L13P/V	2 (0,7)	T123A/N	4 (1,3)
V14A/G/Q	28 (9,4)	I126T/N/S	60 (20,2)
L15S	4 (1,3)	P127T/A/S	15 (5,1)
Q16P	2 (0,7)	A128V	2 (0,7)
A17E	2 (0,7)	Q129R/N/L/H	5 (1,7)
G18R	2 (0,7)	G130R	1 (0,3)
F19S	1 (0,3)	T131N/S	12 (4,0)
F20S	7 (2,4)	S132P	2 (0,7)
L21S	86 (29,0)	M133T/S/L/I	23 (7,7)
L22W	1 (0,3)	F134Y/V/L/I	6 (2,0)
R24K	4 (1,3)	S136F	1 (0,3)
I25V/A	5 (1,7)	T140I	8 (2,7)
L26P	1 (0,3)	T143M	3 (1,0)
T27I	2 (0,7)	D144E/A	2 (0,7)
I28T	1 (0,3)	G145R/A	6 (2,0)
P29L	3 (1,0)	N147S	1 (0,3)
Q30R/K	6 (2,0)	I150T	2 (0,7)
S31R	1 (0,3)	P151H	1 (0,3)
L32P	1 (0,3)	W156L	3 (1,0)
D33G	2 (0,7)	A159V	11 (3,7)
S34L	1 (0,3)	R160K	7 (2,4)
W35STOP	1 (0,3)	Y161F/S	28 (9,4)
N40S/K	26 (8,8)	F162Y	1 (0,3)
F41S	3 (1,0)	Y163F	2 (0,7)
L42P/R	10 (3,4)	E164G	2 (0,7)

G43K	1 (0,3)	A166V/G	6 (2,0)
G44E/V	49 (16,5)	S167L	2 (0,7)
A45T/G/V	8 (2,7)	V168A	2 (0,7)
P46H/L	4 (1,3)	F170S	1 (0,3)
T47A/E/V/K	26 (8,8)	W172C	1 (0,3)
C48S	2 (0,7)	L173P	3 (1,0)
P/L49R/H	16 (5,4)	S174N	4 (1,3)
Q51L	2 (0,7)	L175S	1 (0,3)
S53L	100 (33,7)	V177L	2 (0,7)
Q56P	3 (1,0)	F179S	1 (0,3)
I57T	1 (0,3)	V180A	2 (0,7)
S59N	1 (0,3)	W182STOP	1 (0,3)
S61L	10 (3,4)	A184V/G	112 (37,7)
P62Q/L	25 (8,4)	L186H	2 (0,7)
C64Y	2 (0,7)	T189I	16 (5,4)
P67Q	7 (2,4)	V190A	4 (1,3)
I68T	11 (3,7)	S193L	5 (1,7)
Y72C	1 (0,3)	I195T	1 (0,3)
R73H	1 (0,3)	M198I	53 (17,8)
W74S/L	7 (2,4)	W199L/STOP	4 (1,3)
M75T	1 (0,3)	Y200F/W	19 (6,4)
C76Y/T/W	31 (10,9)	P203R	10 (3,5)
L77R	9 (3,0)	S204R/N	28 (9,8)
R79H	3 (1,0)	L205V	1 (0,4)
F80S	1 (0,3)	Y206H/F/C	6 (2,1)
F83S/C	3 (1,0)	N207S	3 (1,1)
C85Y/F	3 (1,0)	I208T/S	15 (5,3)
L88P	3 (1,0)	L209V/S/G	5 (1,8)
L89P	1 (0,3)	S210K/N/R	105 (35,4)

I92T	4 (1,3)	P211R	1 (0,4)
F93S/C	7 (2,4)	F212Y/L/C	5 (1,8)
L95W	7 (2,4)	L213I/M	21 (7,4)
V96G	2 (0,7)	L215P	1 (0,4)
L98V	4 (1,3)	L216STOP/Y	5 (1,8)
Y100C/F	13 (4,4)	P217S/L	2 (0,7)
Q101K/H/R	18 (6,1)	I218L	1 (0,4)
Q102R	1 (0,3)	F220Y/L/C	8 (2,8)
M103T	2 (0,7)	C221Y/R	14 (4,7)
L104W	1 (0,3)	L222P	1 (0,3)
P108H	1 (0,3)	V224A	30 (10,1)
Có đột biến vùng (≥ 1 điểm đột biến)			
MHR (aa 100-169)	184 (62,0)		
Pre a (aa100-119)	59 (19,9)		
Vùng a (aa 124-148)	112 (37,7)		
Post a (aa 149-169)	60 (20,2)		
HLA-I (aa 87-98, 186-197, 215-223)	50 (16,8)		
HLA-II (aa97-106, 171-179, 206-215)	148 (49,8)		

Giải trình tự thành công phát hiện đột biến ở 297 ca vùng gen S có 152/227 vị trí axit amin bị thay thế (66,9%). Phần lớn đột biến (126/152) chỉ hiện diện với tỷ lệ thấp <5%. Các điểm đột biến khá phổ biến với tỷ lệ > 30% gồm S53L (33,7%), A184V/G (37,7%), S210K/N/R (35,4%).

Tỷ lệ có đột biến ở các vùng chức năng của gen S thay đổi từ 16,8% (vùng HLA-I), xấp xỉ 20% (đột biến trên vùng pre a và Post a), đến 37,7% (trên vùng a), gần 50% (vùng HLA-II) và cao nhất là vùng MHR (62%).

3.3. Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo các đặc điểm bệnh nhân

Bảng 3.9: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo nhóm tuổi

Đột biến điểm	Nhóm tuổi, n (%)		p ^a
	<40	≥40	
Vùng pre-S1	n=120	n=166	
L74M/V	0	7 (4,2)	
V95A	36 (30,0)	31 (18,7)	0,032
Vùng pre-S2	n=119	n=165	
T125S/N/P	44 (36,9)	38 (23,0)	0,015
F141V/L/I	8 (6,7)	25 (15,1)	0,026
S148L	4 (3,4)	0	
Vùng S	n=125	n=172	
A5T/S	0	15 (8,7)	
L21S	25 (20)	61 (35,5)	0,003
R24K	4 (3,2)	0	
G44E/V	0	7 (4,1)	
C76Y/T/W	8 (6,4)	25 (14,5)	0,026
I110L/Q	1 (0,8)	11 (6,4)	0,015
R122K	5 (4)	22 (12,8)	0,009
Y161F/S	6 (4,8)	22 (12,8)	0,019
M198I	29 (23,2)	24 (13,9)	0,044
Y200F/W	2 (1,6)	17 (9,8)	0,004
P203R	1 (0,8)	11 (6,4)	0,015
I208T/S	3 (2,4)	14 (8,1)	0,034
L213I/M	5 (4)	18 (10,4)	0,037

Vùng chức năng (có đột biến)			
MHR	60 (48)	124 (72,1)	<0,001
Post a	18 (14,4)	42 (24,4)	0,031
HLA-I	12 (9,6)	38 (22,1)	0,004

Tỷ lệ % theo cột, ^a Chi bình phương test, ^b Fisher exact test

Đột biến L74M/V ở vùng pre-S1 có tỷ lệ cao hơn ở nhóm ≥ 40 tuổi so với nhóm <40 tuổi. Đột biến T125S/N/P, S148L ở vùng pre-S2 có tỷ lệ cao hơn ở nhóm <40 tuổi, F141V/L/I có tỷ lệ cao hơn ở nhóm ≥ 40 tuổi. Một số đột biến sai nghĩa ở gen S được ghi nhận có tỷ lệ cao hơn ở nhóm ≥ 40 tuổi, tuy nhiên R24K, M198I có tỷ lệ cao hơn ở nhóm <40 tuổi. Đột biến MHR, vùng Post a, HLA-I có tỷ lệ cao hơn ở nhóm ≥ 40 tuổi so với nhóm <40 tuổi ($p < 0,05$).

Bảng 3.10: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo giới

Đột biến điểm	Giới tính, n (%)		p^a
	nữ (n=90)	nam (n=210)	
Vùng pre-S1	n = 86	n = 200	
S17F/A	4 (4,7)	0	
Vùng pre-S2	n = 85	n = 199	
A130T/N	7 (8,2)	5 (2,5)	0,048 ^b
Vùng S	n = 89	n = 208	
R122K	3 (3,3)	24 (11,5)	0,025
I126T/N/S	2 (2,2)	56 (26,9)	<0,001
Y200F/W	1 (1,1)	18 (8,6)	0,015
N207S	3 (3,3)	0	

Tỷ lệ % theo cột, ^a Chi bình phương test, ^b Fisher exact test

Đột biến S17F/A vùng pre-S1, A130T/N vùng pre-S2 ở nữ có tỷ lệ cao hơn ở nam. Tỷ lệ đột biến R122K, I126T/N/S, Y200F/W, N207S vùng S ở nam cao hơn ở nữ ($p < 0,05$).

Bảng 3.11: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo tình trạng xơ gan

Đột biến điểm	Xơ gan, n (%)		p ^a
	không (n=231)	có (n=69)	
Vùng pre-S1	n=217	n=69	
L74M/V	7 (3,2)	0	
L108V/I	1 (0,5)	4 (5,8)	0,011 ^b
Vùng pre-S2	n=217	n=67	
F141V/L/I	19 (8,8)	14 (20,9)	0,005
Vùng S	n=229	n=68	
V14A/G/Q	13 (5,7)	15 (22,1)	<0,001
S53L	92 (40,2)	13 (19,1)	0,001
P120S/T	12 (5,2)	10 (14,7)	0,009
A159V	4 (1,7)	7 (10,3)	0,004 ^b
Y161F/S	15 (6,5)	13 (19,1)	0,002
S204R/N	17 (7,4)	12 (17,6)	0,013
V224A	18 (7,8)	12 (17,6)	0,02
Vùng chức năng (có đột biến)			
Post a	37 (16,1)	23 (33,8)	0,002
HLA-I	32 (14)	18 (26,5)	0,017

Tỷ lệ % theo cột, ^a Chi bình phương test, ^b Fisher exact test

Đa số đột biến tỷ lệ cao hơn có ý nghĩa ở nhóm bệnh nhân xơ gan so với nhóm không có xơ gan. Trong khi đột biến sai nghĩa ở vùng Post a và vùng HLA-I có tỷ lệ cao hơn ở nhóm xơ gan (p<0,05).

Bảng 3.12: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo tình trạng HBeAg

Đột biến điểm	HBeAg, n (%)		p ^a
	âm (n=139)	dương (n=161)	
Vùng pre-S1	n=131	n=155	
D27G/S	11 (8,4)	27 (17,4)	0,021
N/E39K/G/D/A	10 (7,6)	2 (1,3)	0,009
K57Q	22 (16,8)	45 (29)	0,028
V68T/S/I	73 (55,7)	59 (38,1)	0,006
G73S/N	22 (16,8)	43 (27,7)	0,023
L74M/V	7 (5,3)	0	
A81T	6 (4,6)	0	
T/N87S/P	76 (58)	60 (38,7)	0,003
L108V/I	5 (3,8)	0	
S109T	11 (8,4)	3 (1,9)	0,013
Vùng pre-S2	n=129	n=155	
T125S/N/P	25 (19,4)	57 (36,8)	0,001
T126N/I/A	4 (3,1)	0	
H128L	4 (3,1)	0	
I150T	66 (51,2)	58 (37,4)	0,044
V158A	30 (23,3)	67 (43,2)	<0,001
K167T	11 (8,5)	3 (1,9)	0,013
Vùng S	n=138	n=159	
V14A/G/Q	18 (13)	10 (6,2)	0,045
L21S	49 (35,5)	37 (23,3)	0,019
N40S/K	18 (13)	8 (5)	0,014
G44E/V	33 (23,9)	16 (10,1)	0,001

A45T/G/V	7 (5,1)	1 (0,6)	0,027
S53L	36 (26,1)	69 (43,4)	0,002
P62Q/L	6 (4,3)	19 (11,9)	0,019
Y100C/F	2 (1,4)	11 (6,8)	0,022
P120S/T	15 (10,9)	7 (4,3)	0,033
A184V/G	41 (29,7)	71 (44,6)	0,009
S193L	5 (3,6)	0	
S204R/N	19 (13,8)	10 (6,2)	0,029
S210K/N/R	40 (29)	68 (42,7)	0,015
Vùng chức năng (có đột biến)			
HLA-I	107 (77,5)	143 (89,9)	0,006

Tỷ lệ % theo cột, ^a Chi bình phương test, ^b Fisher exact test

Bảng 3.12 ghi nhận một số đột biến sai nghĩa vùng pre-S1, pre-S2, S, và vùng chức năng HLA-I có tỷ lệ khác nhau giữa 2 nhóm nhiễm vi rút viêm gan B mạn HBeAg dương và HBeAg âm ($p < 0,05$). Một số vị trí đột biến liên quan với HBeAg âm như N/E39, V68, T/N87 trên pre-S1, I/K167 trên pre-S2 và phần lớn đột biến trên vùng S (ngoại trừ P62, Y100, A184, S193, S210).

Bảng 3.13: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo kiểu gen của HBV

Đột biến điểm	Kiểu gen, n (%)		p^a
	B (n=169)	C (n=122)	
Vùng pre-S1	n=163	n=118	
D27G/S	2 (1,2)	36 (30,5)	<0,001
G35R/K	3 (1,8)	21 (17,8)	<0,001
N/E39K/G/D/A	11 (6,7)	0	
H48Y/N	33 (20,2)	4 (3,4)	<0,001
N/H51Y/T/S/Q/P	21 (12,8)	61 (51,2)	<0,001
E/D54A/N	9 (5,5)	58 (49,1)	<0,001
I/N56H/W	5 (3,1)	65 (55,1)	<0,001

A60V	4 (2,4)	65 (55,1)	<0,001
A/D62S/T	6 (3,6)	62 (52,5)	<0,001
V68T/S/I	122 (74,8)	8 (6,8)	<0,001
G73S/N	5 (3,1)	59 (50)	<0,001
T/N87S/P	122 (74,8)	12 (10,2)	<0,001
V95A	3 (1,8)	63 (53,4)	<0,001
Vùng pre-S2	n=164	n=115	
T125S/N/P	13 (7,9)	69 (60,0)	<0,001
T126N/I/A	3 (1,8)	0	
H128L	4 (2,4)	0	
A130T/N	2 (1,2)	9 (7,8)	0,009
I150T	111 (67,7)	11 (9,5)	<0,001
V158A	21 (12,8)	76 (66,1)	<0,001
K167T	12 (7,2)	1 (0,8)	<0,001
Vùng S	n=169	n=119	
A5T/S	14 (8,3)	1 (0,8)	0,015
V14A/G/Q	23 (13,6)	4 (3,3)	0,006
L21S	78 (46,2)	6 (5,0)	<0,001
R24K	0	3 (2,5)	
G44E/V	36 (21,3)	11 (9,2)	0,018
T47A/E/V/K	3 (1,8)	21 (17,6)	<0,001
Y100C/F	3 (1,8)	10 (8,4)	0,036
P120S/T	22 (13,0)	0	
I126T/N/S	4 (2,4)	55 (46,2)	<0,001
Y161F/S	26 (15,4)	1 (0,8)	<0,001
A184V/G	6 (3,6)	105 (88,2)	<0,001
M198I	49 (29,0)	3 (2,5)	<0,001

I208T/S	16 (9,5)	1 (0,8)	0,004
S210K/N/R	8 (4,7)	99 (83,2)	<0,001
V224A	25 (14,8)	5 (4,2)	0,007

Tỷ lệ % theo cột, ^a Chi bình phương test, ^b Fisher exact test

Bảng 3.13 ghi nhận một số đột biến sai nghĩa vùng pre-S1, pre-S2 và S có tỷ lệ khác nhau giữa 2 nhóm kiểu gen B và C. Các đột biến trên gen S tập trung ở kiểu gen B và ngược lại các đột biến trên gen pre-S1 và pre-S2 tập trung ở kiểu gen C ($p < 0,05$).

Bảng 3.14: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo tải lượng HBV DNA

Đột biến điểm	HBV DNA (log copies/mL), n (%)			p ^a
	<5	5-8	>8	
Vùng pre-S1	n=57	n=162	n=67	
H48Y/N	4 (7,0)	20 (12,3)	15 (22,4)	0,026
V68T/S/I	22 (38,6)	74 (45,7)	36 (53,7)	0,137
T/N87S/P	25 (43,8)	73 (45)	38 (56,7)	0,176
Vùng S	n=60	n=168	n=69	
A5T/S	0	14 (8,3)	1 (1,5)	
I126T/N/S	11 (18,3)	42 (25,0)	7 (10,1)	0,029

Tỷ lệ % theo cột, ^a Chi bình phương test, ^b Fisher exact test

Bảng 3.14 ghi nhận một số đột biến sai nghĩa vùng pre-S1 và S có tỷ lệ khác nhau. Đột biến H48Y/N vùng pre-S1 tăng khi tải lượng HBV DNA tăng và mối liên hệ này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,026$. Đột biến V68T/S/I và T/N87S/P cũng có kết quả tương tự, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Đột biến I126T/N/S tại vùng gen S có tỷ lệ khác nhau giữa 3 nhóm tải lượng HBV DNA và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,029$. Đột biến A5T/S vùng S chỉ ghi nhận ở những bệnh nhân có tải lượng HBV DNA từ 5 log copies/mL trở lên.

Bảng 3.15: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo HBsAg định lượng

Đột biến điểm	HBsAg định lượng (log IU/mL), n (%)		p ^a
	<3	≥3	
Vùng pre-S1	n=69	n=179	
S17F/A	0	3 (1,7)	
A81T	4 (5,8)	1 (0,6)	0,024
Vùng pre-S2	n=68	n=178	
H128L	3 (4,4)	1 (0,6)	0,07
Vùng S	n=73	n=186	
L21S	30 (41,1)	48 (25,8)	0,018
M133T/S/L/I	10 (13,7)	11 (5,9)	0,041
A159V	0	6 (3,2)	
Y161F/S	11 (15,1)	13 (7,0)	0,046
P203R	5 (6,8)	3 (1,6)	0,044
V224A	12 (16,4)	14 (7,5)	0,034

Tỷ lệ % theo cột, ^a Chi bình phương test, ^b Fisher exact test

Bảng 3.15 cho thấy các đột biến chủ yếu ở nhóm bệnh nhân có nồng độ HBsAg định lượng <3 log IU/mL (A81T của vùng pre-S1, H128L của vùng pre-S2, L21S, M133T/S/L/I, Y161F/S, P203R và V224A của vùng S).

Hai đột biến S17F/A của vùng pre-S1 và A159V của vùng S chỉ xuất hiện ở nhóm bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B mạn có nồng độ HBsAg định lượng ≥3 log IU/mL.

Bảng 3.16: Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo tình trạng đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs

Đột biến điểm	Đồng hiện diện, n (%)		p ^a
	không (n=219)	có (n=48)	
Vùng pre-S2			
L139Q/P	0	2 (4,2)	
Vùng S			
T47A/E/V/K	13 (5,9)	9 (18,8)	0,007 ^b
T131N/S	6 (2,7)	5 (10,4)	0,03 ^b
D144E/A	0	2 (4,2)	
V168A	0	2 (4,2)	
Vùng chức năng (có đột biến)			
Vùng a	76 (34,7)	25 (52,1)	0,025
HLA-I	33 (15,1)	14 (29,2)	0,02

Tỷ lệ % theo cột, ^a Chi bình phương test, ^b Fisher exact test

Đột biến L139Q/P vùng pre-S2, và 3 đột biến sai nghĩa vùng gen S gồm có T47A/E/V/K, T131N/S, D144E/A, V168A có tỷ lệ cao hơn ở nhóm có đồng hiện diện. Xét theo vùng chức năng của gen S, đột biến vùng a và vùng HLA-I có tỷ lệ cao hơn ở nhóm có đồng hiện diện.

3.4. Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo ung thư biểu mô tế bào gan

Bảng 3.17: Phân bố đột biến gen pre-S/S và HCC

Loại đột biến	HCC (n=62)	Không HCC (n=238)	p
	Tần số - Tỷ lệ	Tần số - Tỷ lệ	
Tỷ lệ xuất hiện đột biến vùng pre-S1 (n=286)			
Có	46 (79,3)	200 (87,7)	0,7
Không	12 (20,7)	28 (12,3)	

Tỷ lệ xuất hiện đột biến vùng pre-S2 (n=284)			
Có	39 (68,4)	173 (76,2)	0,67
Không	18 (31,6)	51 (23,8)	
Tỷ lệ xuất hiện đột biến vùng S (297)			
Có	51 (87,9)	171 (71,8)	0,61
Không	7 (12,1)	67 (28,2)	
Tỷ lệ xuất hiện đột biến mất đoạn (300)			
Có	10 (16,1)	51 (21,5)	0,36
Không	52 (83,9)	187 (78,5)	

Chi bình phương test

Đột biến xảy ra với tỷ lệ cao ở cả 3 vùng pre-S1, pre-S2 và S trong cả hai nhóm. Đột biến vùng S chiếm tỷ lệ cao hơn ở nhóm HCC là 86,4% so với nhóm không HCC là 71,8%. Đột biến vùng pre-S1 và pre-S2 có tỷ lệ thấp hơn ở nhóm HCC lần lượt là 79,3% và 68,4% so với nhóm không HCC là 87,7% và 76,2%. Sự khác biệt về tỷ lệ xuất hiện đột biến trên các vùng khác nhau của gen S giữa hai nhóm không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ đột biến mất đoạn trong nhóm HCC là 16,1%, thấp hơn so với nhóm không HCC là 21,5%. Chúng tôi không ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ xuất hiện đột biến điểm tại các vùng gen (pre-S1, pre-S2, S) và đột biến mất đoạn với HCC.

3.4.1. Đột biến gen vùng pre-S1 và ung thư biểu mô tế bào gan

Bảng 3.18: Liên quan giữa đột biến gen vùng pre-S1 và HCC

aa	Đột biến vùng pre-S1	HCC (n=58)	Không HCC (n=228)	p
		Tần số - Tỷ lệ	Tần số - Tỷ lệ	
4	W4P/R/V/Y	7 (12,1)	6 (2,6)	0,006
5	S5L/T	3 (5,2)	4 (1,7)	0,16
48	H48N/Y/K/R	3 (5,2)	36 (15,8)	0,03
62	A/D62S/T	18 (31,0)	51 (22,3)	0,2 ^a

68	V68I/S/T	18 (31,0)	114 (50,0)	0,008^a
87	N/T87P/S	20 (34,5)	116 (50,9)	0,026^a
90	A90S/G/T	3 (5,2)	3 (1,3)	0,12
104	Q104K/R	2 (3,4)	2 (0,8)	0,19
108	I108L/V	3 (5,2)	2 (0,9)	0,048

Kiểm định Fisher

^a: Kiểm định chi bình phương

Theo bảng 3.18, các đột biến xuất hiện với tỷ lệ cao ở cả hai nhóm là N/T87P/S (34,5% và 50,9%), V68I/S/T (31,0% và 50,0%), A/D62S/T (31,0% và 22,3%). Trong khi đó, các đột biến chiếm tỷ lệ thấp là W4P/R/V/Y 12,1%, H48N/Y/K/R và I108L/V là 5,2%. Đột biến W4P/R/V/Y và I108L/V có tỷ lệ cao hơn có ý nghĩa ở nhóm nhiễm vi rút viêm gan B mạn có HCC so với nhóm không HCC với p lần lượt là 0,006 và 0,048.

Bảng 3.19: Liên quan giữa đột biến gen tại vùng chức năng pre-S1 và HCC

Đột biến chức năng vùng pre-S1	HCC	Không HCC	p
	(n=58)	(n=228)	
	Tần số - Tỷ lệ	Tần số - Tỷ lệ	
S promoter (aa 66-111)	35 (60,3)	170 (74,6)	0,032
T cell epitope (aa 21-30, 52-67)	17 (29,3)	73 (32)	0,59
B cell epitope (aa12-47,72-78,94-117)	22 (37,9)	99 (43,4)	0,41

Kiểm định chi bình phương

Tỷ lệ đột biến theo các vùng chức năng của pre-S1 ở nhóm HCC thấp hơn so với nhóm không HCC. Hơn một nửa đột biến trên vùng pre-S1 ở nhóm HCC nằm trên vùng chức năng S promoter chiếm 60,3%, thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm không HCC là 74,6% với p=0,032. Đột biến trên hai vùng còn lại là T cell và B cell epitope có sự khác biệt không đáng kể giữa hai nhóm với p>0,05. Trong đó tỷ lệ này ở vùng T cell epitope lần lượt là 29,3% so với 32% và B cell epitope là 37,9% so với 43,4%.

3.4.2. Đột biến gen vùng pre-S2 và ung thư biểu mô tế bào gan

Bảng 3.20: Liên quan giữa đột biến gen vùng pre-S2 và HCC

aa	Đột biến vùng pre-S2	HCC (n=58)	Không HCC (n=226)	p
		Tần số - Tỷ lệ	Tần số - Tỷ lệ	
141	F141V/L/I	11 (19)	22 (9,7)	0,043 ^a
150	I150T	17 (29,3)	107 (47,1)	0,018 ^a

Kiểm định Fisher

*: Kiểm định chi bình phương

Ghi nhận được đột biến sai nghĩa F141V/L/I ở vùng pre-S2 có tỷ lệ cao hơn ở nhóm nhiễm HBV mạn có biến chứng HCC so với nhóm không có HCC tỷ lệ lần lượt là 19% và 9,7% với $p = 0,43$.

3.4.3. Đột biến gen vùng S và ung thư biểu mô tế bào gan

Bảng 3.21: Liên quan giữa đột biến gen vùng S và HCC (n=297)

aa	Đột biến vùng S	HCC (n=59)	Không HCC (n=238)	p
		Tần số - Tỷ lệ	Tần số - Tỷ lệ	
20	F20S	4 (6,7)	3 (1,3)	0,03
21	L21S/P/W	14 (23,7)	72 (30,3)	0,2 ^a
30	Q30K/R/STOP	3 (5,1)	3 (1,3)	0,1
44	G44V/E	14 (23,8)	35 (14,7)	0,14 ^a
47	T47A/E/K/V	10 (16,9)	16 (6,7)	0,019^a
53	S53L	26 (44,1)	79 (33,2)	0,2 ^a
85	C85F/Y	2 (3,4)	1 (0,4)	0,11
98	L98V	3 (5,1)	1 (0,4)	0,029
109	L109I/P/Q	3 (5,1)	3 (1,3)	0,1
120	P120S/T	8 (12,6)	14 (5,9)	0,059 ^a
126	I126N/T/S	16 (27,1)	44 (18,5)	0,2 ^a
145	G145A/K/R	3 (5,1)	3 (1,3)	0,1

aa	Đột biến vùng S	HCC (n=59)	Không HCC (n=238)	p
		Tần số - Tỷ lệ	Tần số - Tỷ lệ	
156	W156L	2 (3,4)	1 (0,4)	0,11
173	L173P	2 (3,4)	1 (0,4)	0,11
174	S174N	3 (5,1)	1 (0,4)	0,029
184	A184V/G	29 (49,1)	83 (34,9)	0,08 ^a
190	V190A	3 (5,1)	1 (0,4)	0,029
203	P203R	6 (10,2)	6 (2,5)	0,02
209	L209G/S/V	3 (5,1)	2 (0,8)	0,03
210	S210K/T/N/R	28 (47,5)	80 (33,6)	0,09 ^a
212	F212C/L/Y	4 (6,7)	1 (0,4)	0,007

Kiểm định Fisher

^a: Kiểm định chi bình phương

Các đột biến sai nghĩa vùng S làm thay thế axit amin phổ biến trên nhóm bệnh nhân có HCC là S53L (44,1%), A184V/G (49,1%), S210K/T/N/R (47,5%), G44V/E (23,8%), L21S/P/W (23,7%), T47A/E/K/V (16,9%), các đột biến còn lại chiếm tỷ lệ thấp <15%. Các đột biến có mối liên quan thống kê ($p < 0,05$) với HCC là F20S (6,7%); T47A/E/K/V (16,9%); S174N (5,1%); V190A (5,1%); P203R (10,2%); L209G/S/V (5,1%) và F212C/L/Y (6,7%). Trong đó T47A/E/K/V chiếm tỷ lệ cao nhất là 16,9%, tiếp theo là P203R 10,2%, các đột biến còn lại chiếm từ 5,1% đến 6,7%.

Bảng 3.22: Liên quan giữa đột biến tại vùng chức năng gen S và HCC (n=297)

Đột biến chức năng vùng S	HCC (n=59)	Không HCC (n=238)	p
	Tần số - Tỷ lệ	Tần số - Tỷ lệ	
MHR (aa 100-169)	47 (79,7%)	137 (57,6%)	0,002
Pre-a (aa100-119)	11 (18,6%)	48 (20,2%)	0,46
Vùng a (aa 124-148)	29 (49,1%)	83 (34,9%)	0,043

Post a (aa 149-169)	10 (16,9%)	50 (21,0%)	0,32
HLA-I (aa87-98,186-197,215-223)	12 (20,2%)	38 (16,0%)	0,57
HLA-II (aa97-106,171-179,206-215)	39 (66,1%)	109 (45,8%)	0,005

Kiểm định chi bình phương

Đa số đột biến gen vùng S thuộc vùng chức năng MHR (aa 100-169) chiếm tỷ lệ 79,7% ở nhóm có HCC, cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không HCC là 57,6% với $p=0,002$. Tương tự, gần hai phần ba (66,1%) bệnh nhân HCC có đột biến trên vùng chức năng HLA-II, tỷ lệ này ở nhóm không HCC là 45,8% và sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê với $p=0,005$. Tỷ lệ đột biến vùng HLA-I tương tự nhau ở hai nhóm là 20,2% và 16%. Gần một nửa (49,1%) số đột biến ở nhóm bệnh nhân có HCC thuộc vùng chức năng a (aa 124-148) trong vùng MHR, tỷ lệ này ở nhóm không HCC là 34,9% thấp hơn có ý nghĩa thống kê với $p=0,043$. Các phân vùng còn lại có tỷ lệ thấp hơn và tương tự giữa hai nhóm có và không có HCC lần lượt là Pre a: 18,6% và 20,2%; Post a: 16,9% và 21,0%.

3.4.4. Các đột biến liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan gan

Chúng tôi lựa chọn các đột biến có sự khác biệt đáng kể giữa 2 nhóm HCC và không HCC với giá trị $p<0,2$ và đồng thời những đột biến này có liên quan tới HCC theo y văn. Những biến số này có thể tác động lẫn nhau và sau khi thực hiện mô hình hồi quy đa biến, chúng tôi sẽ tránh được việc bỏ sót những đột biến thực sự có liên quan đến HCC.

Bảng 3.23: Phân tích đa biến các đột biến điểm gen pre-S/S liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan (n=284)

Đột biến điểm	OR (95%CI)	P
W4P/R/Y (pre-S1)	3,85 (1,06-13,93)	0,04
F20S (S)	9,64 (1,56-59,83)	0,015
T47A/E/V/K (S)	2,97 (1,09-8,13)	0,034
P120S/T (S)	3,95 (1,51-10,36)	0,005
S174N (S)	17,82 (1,74-182,83)	0,015
P203R (S)	6,53 (1,74-24,49)	0,005

Hồi quy logistic

Các đột biến có phân bố khác nhau giữa 2 nhóm bệnh nhân có và không có HCC với $p < 0,2$ được đưa vào phân tích đa biến ở 284 bệnh nhân giải trình tự gen thành công cả 3 vùng pre-S1, pre-S2, S. Có 6 điểm đột biến có liên quan đến HCC qua phân tích đa biến: W4P/R/Y vùng pre-S1 và F20S, T47A/E/V/K, P120S/T, S174N, P203R thuộc vùng S.

3.5. Phân tích các yếu tố liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan

Bảng 3.24: Liên quan giữa đặc điểm chung và HCC

Đặc điểm	HCC (n=62)		Không HCC (n=238)		P
	Tần số	Tỷ lệ	Tần số	Tỷ lệ	
Giới tính					
Nam	52	24,8	158	75,2	0,07*
Nữ	10	11,1	80	88,9	
Nhóm tuổi					
<40	15	12	110	88	<0,001*
≥40	47	26,9	128	73,1	

*: Kiểm định chi bình phương

Giới tính nam có tỷ lệ HCC là 24,8%, cao hơn so với giới tính nữ có tỷ lệ là 11,1% với $p = 0,07$.

Có sự khác biệt về phân bố tuổi giữa hai nhóm có HCC và không có HCC với $p < 0,001$. Những bệnh nhân ≥40 tuổi có tỷ lệ HCC cao hơn gấp 2,3 lần so với bệnh nhân <40 tuổi và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Bảng 3.25: Liên quan giữa đặc điểm tiền căn và HCC

Hút thuốc lá	HCC (n=62)		Không HCC (n=238)		P
	Tần số	Tỷ lệ	Tần số	Tỷ lệ	
Có	18	34	35	66	0,008*
Không	44	17,8	203	82,2	

*: Kiểm định chi bình phương

Ở nhóm HCC, tỷ lệ hút thuốc lá là 34% cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không hút thuốc lá là 17,8% với $p = 0,008$.

Tiền căn uống rượu nhiều hay ít không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn có HCC và người nhiễm HBV mạn không có HCC.

Bảng 3.26: Liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và HCC (n=300)

Đặc điểm	HCC (n=62)		Không HCC (n=238)		P
	Tần số	Tỷ lệ	Tần số	Tỷ lệ	
Xơ gan					
Có	23	33,3	46	66,7	0,003*
Không	39	16,9	192	83,1	
Bệnh nhân đang trong đợt bùng phát viêm gan B					
Có	4	4,2	91	95,8	<0,001*
Không	58	24,7	177	75,3	
Thời gian biết nhiễm viêm gan B					
Trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn	9,11 $\pm$ 3,29		11,36 $\pm$ 4,18		<0,001**

*: Kiểm định chi bình phương

** : Kiểm định hồi quy logistic

Nhóm bệnh nhân có xơ gan ghi nhận tỷ lệ HCC cao hơn là 33,3% so với 16,9% ở nhóm không xơ gan với $p=0,003$. Về tình trạng bùng phát viêm gan B, tỷ lệ có bùng phát viêm gan B ở nhóm HCC là 4,2% thấp hơn so với nhóm không bùng phát với 24,7% và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p<0,001$. Thời gian biết được chẩn đoán viêm gan B ở nhóm bệnh nhân mắc HCC là 9,11 $\pm$ 3,29 năm, thấp hơn so với nhóm không HCC là 11,36 $\pm$ 4,18 năm và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p<0,001$.

Bảng 3.27: Liên quan giữa các xét nghiệm máu và HCC (n=300)

Xét nghiệm	HCC	Không HCC	p
	(n=62)	(n=238)	
	Trung bình + Độ lệch chuẩn		
HBV DNA (copies/mL)	10 ⁵ ± 10 ^{1,75}	10 ^{6,82} ± 10 ^{1,58}	<0,001*
AST (<40 U/L)	126 ± 131,3	193,5 ± 363,2	0,1*
ALT (<40 U/L)	61,2 ± 45,7	237,5 ± 440,4	<0,001*
GGT (<40 U/L)	224,6 ± 199,1	121,1 ± 130,1	<0,001*
Tiểu cầu (<150K/mm ³)	142,4 ± 79,3	176,7 ± 65,5	<0,001*

Đặc điểm	HCC (n=62)		Không HCC (n=238)		P
	Tần số	Tỷ lệ	Tần số	Tỷ lệ	
Xét nghiệm HBeAg					
Dương	24	14,9	137	85,1	0,008**
Âm	38	27,3	101	72,7	

*: Kiểm định hồi quy logistic

** : Kiểm định chi bình phương

Các chỉ số enzym gan là AST và ALT ở nhóm HCC là $126 \pm 131,3$ U/L và $61,2 \pm 45,7$ U/L, thấp hơn nhóm không HCC là $193,5 \pm 363,2$ U/L và $237,5 \pm 440,4$ U/L tuy nhiên chỉ có ALT là thấp hơn có ý nghĩa với $p < 0,001$. Chỉ số GGT ở nhóm HCC là $224,6 \pm 199,1$ U/L cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không HCC là $121,1 \pm 130,1$ U/L.

Kết quả xét nghiệm định lượng HBV DNA cho thấy giá trị này ở nhóm HCC là $10^5 \pm 10^{1,75}$ thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm không HCC là $10^{6,82} \pm 10^{1,58}$ với $p < 0,001$. Số lượng tiểu cầu trung bình ở nhóm HCC là $142,4 \pm 79,3$ K/mm³, thấp hơn so với nhóm không HCC là $176,7 \pm 65,5$ K/mm³ với $p < 0,001$.

Tỷ lệ HCC ở nhóm có xét nghiệm HBeAg dương là 14,9%, thấp hơn nhóm HBeAg âm là 27,3% với $p = 0,008$.

Bảng 3.28: Phân tích đa biến các yếu tố liên quan đến HCC (n=284)

Đặc điểm	OR (95%CI)	P
Giới nam	3,68 (1,56-8,68)	0,003
Tuổi ≥ 40	6,97 (2,79-17,41)	<0,001
W4P/R/Y (pre-S1)	6,52 (1,49-18,65)	0,013
T47A/E/V/K (S)	3,02 (1,03-8,84)	0,044
P120S/T (S)	3,41 (1,19-9,80)	0,022
S174N (S)	20,60 (1,64-258,39)	0,019
P203R (S)	4,71 (1,08-20,55)	0,039

Hồi quy logistic

Để tránh bỏ sót những biến số thực sự có liên quan đến HCC, chúng tôi lựa chọn các biến số ngoài đột biến có sự khác biệt đáng kể giữa 2 nhóm HCC và không HCC với giá trị $p < 0,05$ và các đột biến có liên quan đến HCC trong mô hình hồi quy đa biến bảng 3.23 đưa vào mô hình hồi quy đa biến. Phân tích đa biến các yếu tố ngoài đột biến và đột biến gen pre-S/S liên quan đến HCC ghi nhận giới nam, nhóm tuổi ≥ 40 , đột biến tại axit amin W4P/R/Y vùng pre-S1, 4 đột biến vùng gen S gồm có T47A/E/V/K, P120S/T, S174N, P203R là những yếu tố có liên quan đến HCC.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm dân số xã hội, lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu

4.1.1. Về đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đây là một trong những nghiên cứu ban đầu mô tả về đột biến vùng pre-S/S của vi rút viêm gan B và tìm mối liên hệ giữa các đột biến này với biến chứng HCC ở bệnh nhân Việt Nam mắc viêm gan vi rút B mạn. Để tăng tỷ lệ tìm thấy đột biến pre-S/S, nghiên cứu đã chọn những bệnh nhân nhiễm HBV mạn có HBV DNA $>10^4$ copies/mL, do đó tỷ lệ tìm thấy đột biến pre-S/S cũng sẽ cao hơn so với dân số nhiễm HBV thực tế bao gồm cả những bệnh nhân có HBV DNA thấp và âm tính.

Kỹ thuật giải trình tự gen pre-S/S bằng giải trình tự Sanger được thực hiện tại Trung tâm Y Sinh học phân tử, cho thông tin đầy đủ về các đột biến điểm ở pre-S/S và đột biến mất đoạn pre-S1, pre-S2. Dựa vào trình tự gen S cũng cho phép xác định chính xác kiểu gen của HBV. Tuy nhiên phương pháp giải trình tự này có độ nhạy chưa đủ, có thể bỏ sót các đột biến có tỷ lệ thấp, nhất là các đột biến có liên quan với HCC.

4.1.2. Đặc điểm chung

Đặc điểm dân số-xã hội

Theo bảng 3.1, mẫu nghiên cứu có tuổi trung vị là 42 (32-53), nhiều nhất là nhóm ≥ 40 tuổi (57,7%), nam chiếm 70%, phù hợp với đặc điểm của dân số nhiễm HBV mạn ở Việt Nam. Bệnh nhân nam chiếm đa số (gần 75%) so với nữ cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của tác giả Phạm Văn Hùng, Đoàn Hữu Thiển trên bệnh nhân HCC đến khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội năm 2021¹⁰⁶, nghiên cứu của Lê Văn Quang và cộng sự (nam giới chiếm đến 89,9%)⁷.

Độ tuổi của bệnh nhân trong nghiên cứu hầu hết trên 40 tuổi, điều này phù hợp với đặc điểm của bệnh nhân được ghi nhận qua các nghiên cứu trước đây và tương tự với độ tuổi của dân số nhiễm HBV mạn tại Việt Nam^{7,106}. Các đặc điểm khác như tình trạng hôn nhân, nghề nghiệp, nơi sinh sống chưa tìm thấy những đặc điểm gì đặc biệt.

Thói quen

Đã có nhiều bằng chứng về tác động độc lập của hút thuốc lá với các bệnh lý về gan và nguy ung thư biểu mô tế bào gan. Nó dẫn đến việc sản xuất các chất gây độc tế bào, làm tăng xơ hóa và viêm hoại tử¹⁰⁷.

Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận tỷ lệ sử dụng rượu bia mức độ nhiều trên bệnh nhân HCC là 16% (bảng 3.2), cao hơn so với thống kê trong một nghiên cứu tại Việt Nam của tác giả Lê Văn Quang là 10,6%. Uống nhiều rượu bia đã được xác định là một yếu tố nguy cơ độc lập của các bệnh lý về gan¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

Tiền căn gia đình có người mắc bệnh lý gan

Về tiền căn bệnh lý gan của người thân trong gia đình, có 32% trường hợp được ghi nhận có người thân mắc bệnh. Trong số người thân mắc bệnh, chiếm đa số là ba/mẹ và anh/em với 10,3% (bảng 3.3). Điều này phù hợp với con đường lây nhiễm của vi rút viêm gan B tại nước ta, một quốc gia nằm trong vùng lưu hành cao của vi rút với phương thức lây chủ yếu là từ mẹ sang con.

Mặc dù có đến hơn 32% người thân của bệnh nhân tham gia nghiên cứu được ghi nhận mắc viêm gan vi rút B, nhưng có tới 88,3% bệnh nhân qua khảo sát ghi nhận không rõ nguồn lây nhiễm. Điều này có thể là do sai lệch trong việc thu thập thông tin do người được khảo sát không nhớ hoặc không muốn trả lời. Kết quả khảo sát này làm hạn chế khả năng đánh giá đúng mối liên quan giữa nguồn lây nhiễm viêm gan vi rút B với khả năng mắc HCC và do đó cần có các thiết kế nghiên cứu phù hợp hơn. Nguồn lây nhiễm vi rút có thể liên quan tới khả năng phát triển thành HCC do sự khác biệt về thời điểm mắc bệnh. Những người bị nhiễm do lây từ mẹ sang con có thể phát bệnh ở thời điểm sớm hơn và có nguy cơ cao hơn những người bị mắc bệnh ở độ tuổi trưởng thành¹¹¹. Thời gian nhiễm viêm gan vi rút B mạn tính trong nghiên cứu này là $10,9 \pm 3,67$ năm.

4.1.2. Đặc điểm lâm sàng

Theo bảng 3.4, tình trạng bùng phát viêm gan B, tỷ lệ này là 31,7%. Có 20,7% bệnh nhân bị ung thư biểu mô tế bào gan và 23% bị xơ gan. Nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính là nguyên nhân chính gây HCC trên toàn cầu. Những người mang HBeAg dương tính và những người bị xơ gan đặc biệt dễ hình thành khối

u¹¹². Ở những người trưởng thành, tỷ lệ thải trừ vi rút viêm gan B khi nhiễm cấp >90% và tỷ lệ chuyển sang mang HBV mạn tính chỉ có 5-10%.

4.1.3. Đặc điểm cận lâm sàng

Hiện diện HBeAg

Có 53,7% bệnh nhân nhiễm HBV mạn có HBeAg dương (bảng 3.5), các tác giả đều thừa nhận rằng hoạt tính sao chép của vi rút càng nhiều khi HBeAg dương và khi đặc điểm này của vi rút càng kéo dài một khi bệnh nhân lớn tuổi thì nguy cơ xảy ra biến chứng xơ gan và HCC càng cao hơn. Tuy vậy, các tác giả cũng thừa nhận rằng HBV DNA có liên quan với HCC và xơ gan nhiều hơn dấu ấn HBeAg do sự tích lũy dần của các đột biến theo thời gian¹¹³. Ngoài ra, không thể dựa vào sự hiện diện của HBeAg vì nó sẽ biến mất trong những trường hợp bệnh nhân nhiễm HBV có đột biến gen C.

Kiểu gen của HBV

Kiểu gen B chiếm ưu thế (56,3%) phù hợp với đặc điểm phân bố kiểu gen của HBV ở người Việt Nam (bảng 3.5). Trong khu vực Châu Á Thái Bình Dương, kiểu gen B và C là 2 nhóm kiểu gen lưu hành chủ yếu. Tỷ lệ kiểu gen B ưu thế trong nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Huy TT trên 76 bệnh nhân ở bệnh viện Bạch Mai và Chợ Rẫy năm 2004 cũng dùng kỹ thuật Nested PCR ghi nhận 51% là kiểu gen B (và 48,7% kiểu gen C)¹¹⁴. Nghiên cứu của chúng tôi chưa tương đồng với báo cáo phân bố kiểu gen của nhóm tác giả Dunford thực hiện ở bệnh nhân Việt nam. Nghiên cứu thực hiện trên 372 bệnh nhân nhiễm HBV qua đường máu và quan hệ tình dục dùng kỹ thuật Nested PCR cũng có kết quả kiểu gen B là 85% (kiểu gen B4 82,6%, B2 2,7%) và kiểu gen C gần 15% (C1 14,6%, C5 0,5%)¹¹⁵.

HBsAg định lượng

Các nghiên cứu thực hiện trước đây đã cho nhận xét giá trị HBsAg có phân bố khác nhau giữa các giai đoạn diễn tiến của nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính¹¹⁶. Nghiên cứu này có thể được xem là một trong những khảo sát tiên phong thực hiện ở Việt Nam về đột biến gen pre-S/S. Có 261 bệnh nhân thực hiện xét nghiệm đo lượng HBsAg định lượng, trong đó 62,3% có nồng độ HBsAg $\geq 3 \log \text{ IU/mL}$ và

trung vị của HBsAg là 3,39 (2,96-4,06) log IU/mL. Ngưỡng HBsAg định lượng < 3log IU/mL hay < 1000 IU/mL là giá trị được đề nghị bởi nhóm tác giả Brunetto MR, và nên sử dụng kết hợp với ngưỡng HBV DNA < 4 log copies/mL để nhận diện người mang HBV không hoạt tính¹¹⁷.

Đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs

Trong nghiên cứu của chúng tôi, với 267 trường hợp bệnh nhân được thực hiện đồng thời xét nghiệm HBsAg và anti-HBs, tỷ lệ đồng hiện HBsAg và anti-HBs ghi nhận là 18%. Trước đây, khi nhận được kết quả xét nghiệm này, hầu hết các bác sĩ lâm sàng đều nghĩ rằng điều này xảy ra là do sai sót về mặt kỹ thuật xét nghiệm. Nhưng sau khi kiểm tra lại cẩn thận và ghi nhận số trường hợp ca bệnh lần lượt xuất hiện trong quá trình theo dõi điều trị, người ta mới thật sự chấp nhận sự xuất hiện cùng lúc của 2 dấu ấn vi rút này. Sự tồn tại đồng thời của HBsAg và anti-HBs ở những người mang virút viêm gan B mạn tính đã được một số tác giả mô tả có tỷ lệ dao động từ 10%-25%^{118,119}. Cơ chế tạo nên sự hiện diện của cả HBsAg và anti-HBs vẫn chưa được biết một cách đầy đủ, nhưng một lý do có thể là do sự chọn lọc các biến thể trốn thoát miễn dịch HBsAg của HBV. Nguyên nhân là do thay đổi cấu trúc vùng a (aa122-148) của kháng nguyên làm giảm gắn kết với anti-HBs trong huyết thanh của người có miễn dịch do chủng ngừa. Liên quan đến đột biến ở vùng này phải kể đến đột biến cổ điển G145A/K/R được biết đến là đột biến trốn thoát miễn dịch.

4.2. Mô tả các đặc điểm đột biến trên gen pre-S/S

Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện thành công đột biến ở 286 ca với vùng pre-S có 70/119 vị trí axit amin có đột biến sai nghĩa (58,8% có thay thế axit amin khác), 2 vị trí axit amin có đột biến với tỷ lệ cao nhất > 30% là vị trí 68 và 87 (đột biến V68T/S/I 46,2%, đột biến T/N87S/P 47,6%). Các vị trí axit amin có tỷ lệ thay thế bằng axit amin khác >20% như N/H51, E/D54, I/N56, K57, A60 và V95. Hầu hết các vị trí axit amin còn lại có tỷ lệ thấp <5%. Và với 284 ca giải trình tự thành công vùng pre-S2 có 43/55 vị trí axit amin bị thay thế (78,1%), vị trí axit amin 150 có tỷ lệ bị thay thế cao nhất (I150T 43,7%), kể đến là vị trí V158 (34,2%), T125 (28,9%), còn lại hầu hết các vị trí axit amin có tỷ lệ thấp <5% (bảng 3.7).

Và kết quả nghiên cứu ghi nhận 21,3% có đột biến mất đoạn vùng pre-S1, 15,1% có đột biến mất đoạn vùng pre-S2. Xét trên các đoạn gen thuộc các vùng chức năng của pre-S1, tỷ lệ có thay thế axit amin của các vùng này chiếm từ 30% đến 70%; trong đó thấp nhất là tỷ lệ có đột biến trên vùng T cell epitope (31,5%) và B cell epitope (42,3%). Đột biến Hsc70 chiếm tỷ lệ là 70,3% và vùng S promoter cao nhất là 71,7%.

Theo nghiên cứu này, tỷ lệ có thay thế axit amin ở vùng gen S là 66,9% (bảng 3.8). Ngoài một số vị trí axit amin bị thay thế với mức độ phổ biến (>30% dân số) như S53L (35,4%), A184V/G (37,7%), S210K/N/R (36,8%), đa số vị trí còn lại (126/152 vị trí có đột biến) chỉ ghi nhận các thay thế lẻ tẻ (<5% dân số). Tuy vậy, có đến 4 điểm đột biến trong vùng này liên quan với HCC ở phân tích đa biến đều được phát hiện với tỷ lệ thấp <10% (tại các vị trí T47 8,8%, P120 7,4%, S174 1,3%, P203 3,5%).

Về chức năng gen S có 2 vùng chức năng chính là MHR và vùng quyết định kháng nguyên “a” (vùng a). Đột biến trên gen S thuộc vùng MHR, vùng a và đặc biệt đột biến G145R làm thay đổi cấu trúc vòng "a" của cấu trúc kháng nguyên làm cho chủng HBV giảm hay không còn khả năng biểu lộ HBsAg. Như vậy, sự đột biến vùng MHR của S của HBV gây ảnh hưởng đến bài tiết HBsAg, và từ đó làm cho các xét nghiệm phát hiện kháng nguyên HBsAg thông thường có kết quả âm tính giả, làm giảm giá trị và hiệu quả của xét nghiệm chẩn đoán nhiễm HBV.

Sự sụt giảm khả năng biểu lộ HBsAg có liên quan với tình trạng nhiễm HBV kín đáo và tình trạng bùng phát bệnh gan ở người mang anti-HBc đơn độc sau khởi phát hóa trị liệu ung thư hay sử dụng những thuốc ức chế miễn dịch như steroid liều cao. Tỷ lệ đột biến trốn thoát vắc xin G145R trên vùng quyết định kháng nguyên a được tìm thấy trong nghiên cứu của chúng tôi là 2%. Tuy vậy tỷ lệ có ít nhất 1 đột biến điểm được phát hiện trên vùng MHR và vùng a lần lượt là 62% và 37,7%. Riêng trên vùng MHR có đến 45/69 vị trí axit amin bị thay thế. Tác giả Sheldon J. (2006)¹²⁰ ghi nhận các đột biến thường gặp ở vùng MHR gồm P120T, M33I, S143L, D144E/A, G145R, E164D. Sayan M. và cộng sự (2010)¹²¹

cũng ghi nhận các đột biến trốn thoát vắc xin S143T, D144E, G145R, E164D, I195M.

Tỷ lệ có đột biến trên vùng a (62%) và G145R (2%) trong nghiên cứu này cao hơn rõ so với tỷ lệ công bố 8,1% và 0,7% của nhóm Bui TTT. (2017) tại TP. HCM trên 135 bệnh nhân (2,2% là P120S/T, 2,2% I/T126S/A, 3% M133L/T và 0,7% G145R)¹²². Nghiên cứu của Lazarevic I. (2019) ở 187 bệnh nhân nhiễm HBV cũng ghi nhận tỷ lệ đột biến của vùng a (31%), và cũng tìm thấy các đột biến được thừa nhận như "đột biến trốn thoát vắc xin" với số lượng lẻ tẻ như Y100C (6 ca), T118K (1 ca), P120L/Q/S/T (10 ca), T123A/N (2 ca), I126N/S (8 ca), P127S (2 ca), Q129R (2 ca), G130D/N/R (1 ca), T131I (4 ca), M133L/T (18 ca), G144E (1 ca) và G145A/R (4 ca). Và ngoài ra, còn ghi nhận 44 mẫu có đột biến ở vùng T cell epitope (N40S, L42P, G44D/E, A45T, P46H, T47A/E/K), vùng pre-S2 có đột biến điểm chiếm tỷ lệ thấp hơn là 5,5% ở codon khởi đầu, 5,3% có đột biến F22L¹²³.

Theo Carman WF, đột biến trốn thoát vắc xin của HBV được xác định lần đầu tiên vào đầu những năm 90 ở một đứa trẻ người Ý sinh ra từ mẹ dương tính với HBsAg/HBeAg¹²⁴. Đứa trẻ này bị nhiễm HBV mạn tính mặc dù đã được sử dụng kháng thể thụ động và cơ thể trẻ cũng đã tạo được anti-HBs sau tiêm vắc xin, lẽ ra về lý thuyết trẻ xem như đã được bảo vệ. Nhiều nghiên cứu tiếp theo từ các khu vực khác đã xác nhận tình trạng người nhiễm HBV mặc dù đã được tiêm vắc xin và có anti-HBs lưu hành trong máu¹²⁵⁻¹²⁸. Phần lớn các trường hợp trốn thoát vắc xin HBV có đột biến điểm gây ra sự thay thế axit amin ở vùng a và quan trọng phải kể đến thay thế arginine thành glycine ở vị trí aa 145^{129,130}. Người ta cũng đã công nhận thêm các đột biến khác và đặc biệt là việc chèn thêm từ 2 đến 8 aa giữa vị trí codon 121 và 124 ở đầu 5' vòng đầu tiên của vùng a, một phần chèn thêm làm thay đổi đáng kể hình dạng cấu trúc của vùng a¹³¹⁻¹³³.

Các biến thể trốn thoát vắc xin có thể xuất ở bệnh nhân nhiễm HBV sau ghép gan có điều trị HBIg đơn dòng hoặc đa dòng liều cao¹³⁴⁻¹³⁸. Gen P chồng lấp hoàn toàn lên gen S do đó các đột biến kháng thuốc xuất hiện ở gen P khi điều trị kháng vi rút NA (nucleoside analogue) cũng có thể ảnh hưởng gen S và làm thay

đổi tính kháng nguyên của nó^{97,139-145}. Mặc dù hầu hết các biến thể do đột biến HBsAg từ miễn dịch chủ động hay thụ động hoặc bằng thuốc kháng vi rút, chúng cũng có thể xuất hiện một cách tự nhiên ở những người chưa từng điều trị¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Tuy nhiên, không loại trừ tình huống bệnh nhân nhiễm vi rút đột biến HBsAg từ đối tượng đang điều trị rồi xuất hiện đột biến. Trên thực tế, có bằng chứng đáng kể cho thấy biến thể vùng a có thể tồn tại và gây bệnh và các biến thể này có thể lây nhiễm cho những người được tiêm chủng đầy đủ^{127,150-154}.

Hơn nữa, tránh bị trung hòa bởi anti-HBs sau tiêm vắc xin và HBIG thụ động, những biến thể HBV trốn thoát có thể là nguyên nhân gây ra các trường hợp nhiễm HBV tiềm ẩn. Mặc dù khi nhiễm tiềm ẩn, cơ chế đề kháng của ký chủ thường ngăn chặn sao chép và biểu hiện gen của vi rút, nhưng cũng có bằng chứng cho thấy vi rút tiếp tục nhân lên mặc dù các xét nghiệm HBsAg thương mại có sẵn không phát hiện được. Việc ghi nhận kết quả HBsAg âm tính từ bộ kit thương mại cực kỳ nguy cơ cho lây truyền HBV do không nhận biết được tình trạng nhiễm các biến thể có đột biến trốn thoát vắc xin của HBV ở người cho máu. Hiện nay, trong xét nghiệm nhằm đảm bảo vấn đề an toàn truyền máu, người ta buộc phải sử dụng xét nghiệm HBsAg Ultra để tầm soát nhiễm HBV ở mẫu máu của người cho. Quan trọng hơn các dòng đột biến HBsAg đã ghi nhận ở những trường hợp nhiễm HBV de novo, trẻ ghép gan được tiêm chủng đúng cách hoặc sinh ra từ mẹ có HBsAg dương tính đã được điều trị dự phòng hiệu quả bằng HBIG và vắc xin¹⁵⁵. Tất nhiên cần thiết theo dõi lâu dài những đứa trẻ này để đánh giá thêm về diễn tiến lâm sàng. Tình trạng trốn thoát vắc xin thật sự là điều đáng lo ngại trong chiến lược ngăn ngừa những ca mắc mới ở sơ sinh và trẻ nhỏ, nhất là những trẻ con của bà mẹ mang HBsAg. Với chương trình tiêm chủng mở rộng trong đó có vắc xin vi rút viêm gan B thực hiện từ nhiều năm nay, cùng với biện pháp dự phòng lây truyền mẹ con gần đây bằng cách cho thai phụ uống Tenofovir 3 vào tuần 25 của thai kỳ nếu có tải lượng HBV DNA $>10^6$ copies/mL nhằm để sinh ra những em bé khỏe mạnh không nhiễm HBV. Nhưng có lẽ cuộc chiến giữa các thầy thuốc và HBV sẽ còn tiếp tục, với những biến thể mới của vi rút là trốn thoát vắc xin.

4.3. Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo các đặc điểm của bệnh nhân

4.3.1. Phân bố theo tuổi

Các đột biến thường có tỷ lệ cao hơn ở nhóm ≥ 40 tuổi như L74M/V, V95A ở vùng pre-S1, F141V/L/I ở vùng pre-S2 (ngoại trừ T125S/N/P ở pre-S2) và gần toàn bộ các vị trí và đột biến trên vùng S. Nghiên cứu cũng ghi nhận các tỷ lệ có ít nhất một đột biến thuộc vùng MHR, vùng Post a, và vùng HLA-I đều cao hơn ở nhóm ≥ 40 tuổi cho thấy tính chất tích lũy các đột biến theo thời gian nhiễm HBV (bảng 3.9). Theo Choi (2007) đột biến pre-S xảy ra dần theo thời gian nhiễm HBV. Các tác giả cũng tìm thấy yếu tố tuổi lớn, có bệnh gan tiến triển và HBV DNA dương có liên quan đến đột biến pre-S¹⁵⁶.

4.3.2. Phân bố theo HBsAg định lượng, HBeAg

Bảng 3.15 cho thấy các đột biến chủ yếu ở nhóm bệnh nhân có nồng độ HBsAg định lượng $< 3 \log \text{ IU/mL}$ (A81T, H128L, L21S, M133T/S/L/I, Y161F/S, P203R và V224A). Hai đột biến S17F/A của vùng pre-S1 và A159V của vùng S chỉ xuất hiện ở nhóm bệnh nhân có nồng độ HBsAg định lượng $\geq 3 \log \text{ IU/mL}$. Tương tự tác giả Pollicino T. (2012) đã tìm thấy có sự tương quan nghịch giữa số lượng đột biến pre-S/S và nồng độ HBsAg tiết ($p=0,005$), tuy nhiên nồng độ cccDNA trong gan ở chúng có đột biến pre-S/S cao hơn ý nghĩa so với chúng hoang dại¹⁰.

Về liên quan giữa một số vị trí đột biến với HBeAg âm phản ánh việc tích lũy đột biến theo thời gian. Tuy vậy, một số đột biến có tỷ lệ cao hơn ở nhóm HBeAg dương nên được lý giải và chứng minh giả thuyết về sự hiện diện của đột biến có thể ngăn cản việc chuyển huyết thanh HBeAg bình thường làm kéo dài tình trạng HBeAg dương (bảng 3.12).

Mặt khác ở người mang chủng đột biến, hoạt tính sao chép tăng cao hơn cùng với phản ứng miễn dịch không hữu hiệu và tổn thương gan kéo dài làm cho bệnh gan mất ổn định; kèm theo các rối loạn do chủng đột biến gây ra khác như sự ứ trệ HBsAg bất thường trong hệ lưới nội mô, gây stress ER ... là những nguyên nhân trực tiếp và gián tiếp đưa đến HCC. Điều này cho thấy đã đến lúc và nhất là trên bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn với cơ địa có nguy cơ HCC, không thể dựa

đơn thuần trên số lượng HBV DNA để quản lý. Ở những đối tượng nguy cơ này, chất lượng di truyền của chủng HBV mang mạn tính cũng cần được quan tâm.

Theo tác giả Huang C.H. (2012), đột biến vùng MHR gây giảm HBsAg, đặc biệt 10 đột biến (G119R, C124Y, I126S, Q129R, S136P, C139R, T140I, K141E, D144A, và G145R) liên quan với giảm tiết virion và protein S *in vitro*¹⁵⁷.

4.3.3. Đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs

Đột biến L139Q/P vùng pre-S2 và 3 đột biến sai nghĩa vùng S (T47A/E/V/K, T131N/S, D144E/A/D, V168A) có tỷ lệ cao hơn ý nghĩa ở nhóm có đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs. Tỷ lệ có đột biến vùng a và vùng HLA-I cũng cao hơn ở nhóm có đồng hiện diện (bảng 3.16). Trong nghiên cứu của tác giả Yan B năm 2017, ghi nhận 9,01% bệnh nhân nhiễm HBV mạn có đột biến ở vùng a tại các vị trí G145R/A 25,93%, và I126S/N và T126A chiếm 29,63%¹⁵⁸.

Tương tự nghiên cứu của Lada (2006) cũng ghi nhận đột biến ở vùng a cao hơn ở nhóm có đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs (7,14% so với 2,01%; $p < 0,001$), riêng ở bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen C đột biến I126S/T/V ở nhóm có đồng hiện diện còn cao hơn rất nhiều (37,21% so với 6,98%)¹⁵⁹.

4.4. Phân bố đột biến gen pre-S1/pre-S2/S theo ung thư biểu mô tế bào gan

Nghiên cứu ghi nhận tỷ lệ cao xuất hiện đột biến đoạn gen S trên cả 3 vùng pre-S1, pre-S2, S ở cả hai nhóm HCC và không HCC. Ở nhóm bệnh nhân có HCC tỷ lệ đột biến cao nhất nằm ở vùng S là 86,4%, cao hơn so với nhóm không HCC có tỷ lệ là 7%. Ngược lại, đột biến ở vùng pre-S1 và pre-S2 xuất hiện với tỷ lệ cao hơn ở nhóm không HCC lần lượt chiếm 87,7% và 76,2% trong khi tỷ lệ này ở nhóm HCC là 79,3% và 68,4% (bảng 3.17). Kết quả cho thấy khả năng xảy ra đột biến trên gen S tương đối cao tương tự các nghiên cứu trước đây ghi nhận đây là vùng dễ xảy ra biến đổi về bộ gen của vi rút^{2,13}.

Tỷ lệ đột biến mất đoạn trong nghiên cứu này là 16,1% ở nhóm HCC so với nhóm không HCC là 21,5% nhưng không ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa xuất hiện đột biến mất đoạn với HCC với $p=0,36$ (bảng 3.17). Kết quả của chúng tôi thấp hơn một nghiên cứu khác tại Trung Quốc ghi nhận tỷ lệ đột

biến mất đoạn pre-S trên bệnh nhân HCC là 29,2% (28/96)¹⁶⁰. Theo các tác giả khác, có 6 loại đột biến mất đoạn xảy ra ở vùng preS/S:

Loại I: đột biến xóa đầu N tận pre-S1 gây xóa codon khởi đầu của protein L. Trên *in vitro* đột biến này dẫn đến mất protein L và làm tăng mRNA của vi rút nội bào và HBsAg ngoại bào¹⁶¹. Tích lũy mRNA nội bào có thể kích hoạt những thụ thể toll- like nội bào, dẫn đến sự hoạt hóa kế tiếp các con đường NF- κ B, viêm mạn tính và gây ung thư¹⁶¹.

Loại II: đột biến xóa nửa đầu C của pre-S1 có thể chia thành hai nhóm bởi S promoter: (II-a) các biến thể xóa S promoter và (II-b) các biến thể xóa không phải S promoter. II-a: các biến thể xóa S promoter không thể phiên mã RNA gen S một cách hiệu quả dẫn đến giảm hoặc không tổng hợp được các protein M và S. Vì tế bào không thể tiết ra protein L một cách hiệu quả, các protein S và M tạo thành các phần tử dưới vi rút hoặc các virion chưa trưởng thành, nảy chồi từ màng tiền Golgi sau ER trong tế bào và được phóng thích ra ngoài tế bào¹⁶². Nồng độ thấp hoặc không có protein M và S dẫn đến sự tích tụ protein L đột biến trong ER. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy tình trạng giữ lại protein L đột biến trong các tế bào bị đột biến xóa S promoter. II-b: các biến thể xóa không phải S promoter có thể phiên mã RNA gen S hiệu quả và tổng hợp các protein M và S, nhưng các protein L đột biến có thể xóa vị trí T để duy trì dạng e-pre-S hoặc xóa vị trí NBS, dẫn đến tạo nucleocapsid không đầy đủ, vi rút chưa trưởng thành và giữ lại nội bào mức độ nhẹ⁶⁹.

Loại III - các đột biến xóa đầu N của pre-S2 có thể chia hai nhóm bởi codon khởi đầu của protein M. III-a các biến thể xóa không phải codon khởi đầu M; III-b các biến thể xóa codon khởi đầu M. III-a: các biến thể không phải codon khởi đầu M, các protein M bị xóa nhưng protein L đột biến có thể mất đi vị trí NBS hoặc VS, dẫn đến vi rút chưa trưởng thành và giữ lại nội bào mức độ nhẹ^{69,163}. III-b các biến thể xóa codon khởi đầu M không có protein M thay đổi tỷ lệ các protein L, M và S đột biến và dẫn đến tích tụ protein L đột biến trong tế bào⁶⁹. Bởi vì codon khởi đầu M nằm ở vị trí NBS và VS, những biến thể này có thể tạo ra các

protein L đột biến như là biến thể nucleocapsid không thể tạo ra nucleocapsid hiệu quả, dẫn đến vi rút chưa trưởng thành và giữ lại HBsAg trong tế bào mức độ nhẹ⁶⁹.

Loại IV: các biến thể spPS1 được tạo ra thông qua nối tiền genome RNA của HBV. Sự kết nối này dẫn đến việc mất đi 183 nucleotid ở một nửa đầu C vùng pre-S1, xóa hoàn toàn hai vùng các vị trí chức năng (S promoter và các vị trí T), xóa một phần NBS và tạo spL. Việc xóa S promoter dẫn đến mất protein M và S và giữ lại protein spL nội bào nghiêm trọng⁶⁹. Xóa vị trí T dẫn đến định dạng lại cấu trúc của protein spL và sự mất đi dạng i-pre-S để bọc capsid, làm cho vi rút chưa trưởng thành và lưu giữ protein spL nội bào.

Loại V: các đột biến đầu tận C của gen S ảnh hưởng đến protein gấp nếp trong màng ER, vì thế làm suy giảm sự phóng thích HBsAg, dẫn đến sự tích tụ của nó trong các ngăn nội bào cụ thể và lần lượt góp phần vào tăng sinh tế bào⁸⁸. Một nghiên cứu *in vitro* cho thấy các đột biến ở đầu C của gen S cũng có thể kích hoạt kiểm soát tăng sinh⁸⁸.

Loại VI - đột biến vô nghĩa pre-S/S có thể chia thành hai nhóm: (VI-a) đột biến vô nghĩa pre-S và (VI-b) đột biến vô nghĩa S. VI-a: những đột biến vô nghĩa pre-S có thể tạo ra các protein M và L bị cắt cụt đầu C', dẫn đến sự tương tác giữa kiểm soát tăng sinh và gây ra các bệnh gan^{84,164,165}. VI-b: đột biến vô nghĩa S có thể tạo ra các protein S, M, L bị cắt cụt đầu C'. Nghiên cứu *in vitro* cho thấy codon dừng ở vùng kỵ nước đầu C của vùng S gây ra các protein vỏ bị cắt cụt ít bị glycosyl hóa và bị khiếm khuyết trong việc bài tiết các phần tử vi rút, gây ra sự lưu giữ nội bào của protein vỏ và các bệnh của gan¹⁶⁶. Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* cũng chứng minh rằng những đột biến codon dừng gen S có hoạt động tăng sinh tế bào cao hơn^{86,87}.

4.4.1. Đột biến vùng pre-S và vùng chức năng pre-S

Vùng pre-S của bộ gen HBV chứa phần lớn các trình tự đột biến, và tỷ lệ phổ biến của hàng loạt các đột biến pre-S có thể khác nhau tùy thuộc vào kiểu gen HBV. Đột biến mất đoạn vùng pre-S, đột biến điểm vùng pre-S, đột biến nối pre-S1, đột biến đầu C tận và đột biến vô nghĩa pre-S/S là 5 loại đột biến khác nhau

trong vùng S^{2,63}. Các đột biến T53C, mất đoạn pre-S1, đột biến codon bắt đầu pre-S2, C7A trong khu vực pre-S có liên quan đáng kể đến việc tăng nguy cơ HCC^{64,65}.

Vùng pre-S1 và pre-S2 chứa một số epitope cho tế bào T và B, do đó đóng một vai trò thiết yếu trong sự tương tác với các phản ứng miễn dịch của vật chủ⁷². Đột biến phổ biến nhất ở pre-S là mất đoạn, dẫn đến phản ứng miễn dịch kém hiệu quả. Các vùng chức năng được nhiều tác giả quan tâm như vùng chịu trách nhiệm kết dính vào tế bào NTCP, vùng kết nối với kháng thể trung hòa anti-HBs T cell epitope và B cell epitope, vùng có vai trò tổng hợp kháng nguyên HBsAg nhỏ và vùng S promoter.

Qua khảo sát tỷ lệ đột biến theo vùng chức năng trên vùng S promoter, T cell epitope và B cell epitope với HCC trong nghiên cứu này là 60,3%, 29,3% và 37,9% ở nhóm HCC thấp hơn so với nhóm không HCC là 74,6%, 32% và 43,4% (bảng 3.19). Nghiên cứu này ghi nhận tỷ lệ đột biến mất đoạn ở vùng S promoter thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm không HCC với $p=0,32$.

Các đột biến mất đoạn ở vùng pre-S của phần HBV DNA kết hợp trong tế bào gan làm giảm tiết HBsAg do làm giảm sự biểu hiện của các protein bề mặt, dẫn đến sự tích tụ trong tế bào của các protein vỏ HBV và các phần tử vi rút, hình thành tế bào gan dạng kính mờ, căng thẳng lưới nội chất và tổn thương DNA dạng oxy hóa⁷². Những thay đổi này cuối cùng dẫn đến sự hình thành ung thư gan. Đột biến mất đoạn ở pre-S có tỷ lệ phổ biến ở kiểu gen C cao hơn kiểu gen B, và được báo cáo là có liên quan chặt chẽ với nhiễm HBV âm thầm và khả năng phát triển HCC⁷³. Theo tác giả Jiang Y (2021) đột biến vùng pre-S gây ức chế các virion trong tế bào gan, dẫn đến tăng sinh và chuyển dạng tế bào bất thường¹⁶⁷. Trên bệnh nhân xơ gan hay HCC, đột biến gây rút ngắn gen S tạo nên các codon khởi đầu sớm, gây stress trên lưới nội bào tương, tổn thương DNA, mất ổn định trên bộ gen, thúc đẩy xuất hiện HCC¹⁶⁷.

Ngoài ra, nghiên cứu này không tìm thấy mối liên quan giữa đột biến mất đoạn với nguy cơ HCC được ghi nhận qua các công trình nghiên cứu trước đây^{2,160}. Cụ thể, nghiên cứu của Li-Shuai và cộng sự so sánh tỷ lệ đột biến trên vùng pre-S/S giữa hai nhóm VGB mạn có và không có HCC kết luận đột biến mất đoạn pre-

S là yếu tố nguy cơ độc lập của HCC với OR là 2,434 (KTC:1,063 – 5,573)¹⁶⁰. Sự khác biệt trong kết quả có thể là do nghiên cứu của tác giả trên chỉ lựa chọn đối tượng là nam giới và dùng thiết kế nghiên cứu là đoàn hệ tiến cứu trong khi chúng tôi thực hiện nghiên cứu cắt ngang và lựa chọn đối tượng nghiên cứu không phụ thuộc vào giới tính.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sự mất đoạn ở vùng pre-S có liên quan đến các bệnh gan tiến triển. Sự mất đoạn ở vùng pre-S thường được tìm thấy ở nửa đầu C tận (từ aa 58 đến 119) của pre-S1 và đầu N tận (từ aa 1 đến 23) của pre-S2⁶⁶. Việc lập bản đồ vùng pre-S cho thấy rằng tất cả các vùng gen bị mất đều bao gồm các epitope tế bào T và B, kèm theo mất một hoặc nhiều vị trí chức năng như S promoter, vị trí T, NBS, codon bắt đầu của M và vị trí VS⁶⁵. Hầu hết các báo cáo đều chỉ ra rằng mất đoạn ở vùng pre-S1/S2 có liên quan đến sự phát triển HCC ở người lớn^{65,66}. Một số nghiên cứu ở Đài Loan cho thấy đột biến mất đoạn pre-S2 có liên quan đến sự phát triển HCC và tỷ lệ lưu hành kiểu gen B của vi rút cao hơn kiểu gen C. Ngược lại, ở Hàn Quốc kiểu gen C lưu hành phổ biến hơn và đột biến mất đoạn N pre-S1 làm xóa bỏ codon bắt đầu của protein L làm gia tăng sự phát triển của HCC. Những kết quả này chỉ ra rằng xu hướng mất đoạn pre-S khác nhau tùy theo kiểu gen của HBV. Do đó, sự khác biệt về tỷ lệ lưu hành kiểu gen (hoặc kiểu phụ) ở các quốc gia khác nhau có thể ảnh hưởng đến mô hình mất đoạn pre-S liên quan đến HCC². Biswas và cộng sự đã nghiên cứu sự liên kết của các loại đột biến pre-S với kiểu gen HBV, kết quả cho thấy rằng sự mất đoạn ở pre-S1 là 55,56% và phổ biến ở HBV kiểu gen D; đột biến codon bắt đầu ở pre-S2 là 55,56% và phổ biến ở HBV kiểu gen A; đột biến mất đoạn ở pre-S2 là 42,85% và phổ biến ở HBV kiểu gen C⁶⁷.

Một số nghiên cứu khác ghi nhận việc mất đoạn ở nửa đầu C tận của vùng pre-S1 thường gặp ở bệnh nhân viêm gan mạn tính (CH) hoặc xơ gan (LC). Ngược lại ở những bệnh nhân HCC thì đột biến mất đoạn pre-S2 chiếm đa số⁶⁵⁻⁶⁷. Có sự khác nhau trong các đột biến mất đoạn pre-S giữa bệnh nhân CH và LC. Ngoài ra, sự mất đoạn ở S promoter và nửa đầu C tận của vùng pre-S1 thường xuyên được quan sát thấy ở cả hai kiểu gen. Ở bệnh nhân CH, tình trạng mất đoạn ở pS1-BT

và 4 vị trí chức năng (S promoter, Hsc70, CAD và NBS) nằm ở nửa đầu C tận của vùng pre-S1 gặp ở cả hai kiểu gen. Ngược lại, sự mất đoạn trong pHSA ở nhóm HBV kiểu gen B cao hơn so với nhóm HBV kiểu gen C (88,9% so với 36,4%, $p = 0,028$). Ở những bệnh nhân LC, không có sự khác biệt đáng kể nào được quan sát thấy giữa nhóm HBV kiểu gen B và C⁶⁷.

Theo bảng 3.18, kết quả khảo sát đột biến trên vùng pre-S1 ghi nhận một số đột biến gặp phải với tỷ lệ cao ở cả hai nhóm là T/N87S/P (34,5% và 50,9%), V68I (31,0% và 50,0%), A/D62S (31,0% và 22,3%). Các đột biến có liên quan tới HCC qua nghiên cứu của chúng tôi là W4P/R/V/Y, H48N/Y/K/R, V68I/S/T, N/T87P/S, I108L/V nằm trên vùng pre-S1; F141V/L/I, I150T nằm trên vùng pre-S2 (bảng 3.20). Trong số này, các đột biến chiếm tỷ lệ cao trong số bệnh nhân HCC là N/T87P/S 34,5% (20/58), V68I/S/T 31,0% (18/58), I150T 29,3% (17/58), các đột biến khác chiếm tỷ lệ thấp hơn là W4P/R/V/Y 12,1% (7/58), H48N/Y/K/R 5,2% (3/58) và I108L/V 5,2% (3/58).

Đột biến sai nghĩa W4P/R/V/Y vùng pre-S1 được tìm thấy có tỷ lệ cao hơn có ý nghĩa ở nhóm HCC là 12,1% so với 2,6% ở nhóm không HCC với $p=0,006$. Phân tích đa biến cho thấy số chênh mắc HCC ở nhóm có đột biến này là 6,52 (OR=6,52; KTC:1,49-18,65) với $p = 0,013$ và mối liên quan này không phụ thuộc vào giới tính, tuổi hay các đặc tính nền của đối tượng nghiên cứu. Mối liên quan giữa đột biến W4P/R/V/Y trong nghiên cứu này tương tự kết quả của tác giả Chen C.H. (2008) ghi nhận các đột biến mất đoạn pre-S và W4P/R, K7T/N, A81T ở vùng pre-S1 gặp phải với tỷ lệ cao hơn ở nhóm HCC¹⁶⁸. Một nghiên cứu khác năm 2015 của tác giả Zhang và cộng sự cũng ghi nhận tỷ lệ các đột biến ở vị trí aa số 4, 27, 51, 54, 60, 62, 100, 125, 137, 166, 167 và đột biến mất đoạn trên vùng pre-S cao hơn ở nhóm HCC¹⁶⁹. Bằng chứng cho thấy các đột biến điểm vùng pre-S gây mất cân bằng giữa sản xuất và tiết HBsAg, tăng tích tụ HBsAg trong lưới nội bào tương và tăng sinh u¹³. Các đột biến khác có mối liên quan với HCC là H48N/Y/K/R và I108L/V chiếm tỷ lệ rất thấp (5,2% tổng số bệnh nhân HCC) và chưa được ghi nhận là có liên quan tới HCC trong các nghiên cứu trước đây. Mối liên quan tìm thấy trong nghiên cứu này có thể là do đặc điểm phân bố kiểu gen của vi rút viêm gan B và

do đó cần thiết có thêm các nghiên cứu với sự tham gia của nhiều đơn vị điều trị viêm gan trong khu vực để có được dân số viêm gan vi rút B đại diện cho cộng đồng và đưa các đột biến này vào trong mô hình đa biến để hiệu chỉnh cho các biến số nền, đặc điểm của dân số nghiên cứu cũng như chủng vi rút được khảo sát.

4.4.2. Đột biến điểm vùng S và vùng chức năng của S

Nghiên cứu ghi nhận các đột biến điểm vùng S phổ biến trên nhóm bệnh nhân HCC là S53L (44,1%), A184V/G (49,1%), S210K/N/R/S (47,5%), G44V/E (23,8%), tại vị trí L21 (23,7%), T47A (16,9%), các loại đột biến còn lại chiếm tỷ lệ thấp hơn dưới 15%. Mặc dù nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận tỷ lệ các đột biến S53L, A184V/G và tại vị trí S210 cao hơn ở nhóm HCC, kết quả phân tích so sánh giữa hai nhóm HCC và không HCC không thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa các đột biến này với nguy cơ HCC với p lần lượt là 0,2; 0,08 và 0,09 (bảng 3.21).

Tỷ lệ đột biến này trong nghiên cứu của chúng tôi là 5,1% ở nhóm HCC và 2% (6/297) trên toàn bộ mẫu nghiên cứu (bảng 3.21). Kết quả này tương tự các nghiên cứu trước đây ghi nhận tỷ lệ đột biến này từ 2% đến 3,1%⁶⁸ tuy nhiên cao hơn so với nghiên cứu năm 2017 tại Thành phố Hồ Chí Minh với tỷ lệ là 0,7%¹²². Mặc dù tỷ lệ gặp phải đột biến này ở nhóm HCC cao hơn so với nhóm không HCC, chúng tôi không tìm thấy mối liên quan có ý nghĩa của đột biến này với khả năng mắc HCC. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây chỉ ghi nhận đột biến tại vị trí G145 có tác động lên khả năng mắc HBV trên đối tượng đã có miễn dịch⁶⁶.

Trong số các đột biến được ghi nhận có mối liên quan có ý nghĩa ($p < 0,05$) với nguy cơ HCC (bảng 3.21), đột biến T47A/E/K/V ghi nhận gặp phải với tỷ lệ cao chiếm 16,9%. Các đột biến khác ghi nhận tỷ lệ thấp hơn như F20S 6,7%; L98V 5,1%; S174N 5,1%; V190A 5,1%; P203R 10,2%; L209G/S/V 5,1%; F212C/L/Y 6,7%. Đây là các đột biến đã được ghi nhận có liên quan tới HCC ở các nghiên cứu trước đây dù chỉ chiếm tỷ lệ thấp^{2,74}.

Tỷ lệ đột biến P203R trong nghiên cứu của chúng tôi là 10,2% thấp hơn so với nghiên cứu của Salpini là 17,4%⁸⁸ nhưng đều ghi nhận mối liên quan giữa đột biến này với nguy cơ HCC. Cụ thể, tỷ lệ đột biến P203R là 17,4% (4/23) ở nhóm HCC so với 1,0% (1/105) ở nhóm không có HCC ($p = 0,004$) trong nghiên cứu của

Salpini⁸⁸. Đột biến P203R khi được đưa vào phân tích đa biến để hiệu chỉnh cho các yếu tố nền cũng như các đặc điểm về kiểu gen, các đột biến có liên quan thì kết quả sự xuất hiện đột biến P203R có liên quan tới tỷ lệ mắc HCC cao hơn trên bệnh nhân HCC với số chênh OR là 4,71 (KTC: 1,08-20,55) với $p=0,039$.

Đột biến S210R cũng là một đột biến trên vùng đầu tận C được cho là liên quan tới nguy cơ mắc HCC⁸⁸. Tỷ lệ cao đột biến S210K/T/N/R (47,5%) trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với tỷ lệ trong nghiên cứu của Salpini và cộng sự là 34,8%⁸⁸. Mặc dù tỷ lệ đột biến này ở nhóm HCC cao hơn so với nhóm không HCC là 33,6%, chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ đột biến S210R giữa hai nhóm như trong nghiên cứu của tác giả Salpini. Nguyên nhân có thể là do sự khác biệt về đặc điểm của chủng vi rút được khảo sát, khi mà chủng HBV ghi nhận qua nghiên cứu của tác giả trên chủ yếu là kiểu gen A và D⁸⁸ trong khi trong nghiên cứu này chỉ gồm kiểu gen B và C.

Salpini và cộng sự còn thực hiện các thí nghiệm *in vitro* và ghi nhận các đột biến trên làm giảm đáng kể tỷ lệ HBsAg được tiết ra nội bào so với nhóm không HCC tại mỗi thời điểm được phân tích ($p < 0,05$) và làm tăng tỷ lệ tế bào ở pha S (P203R: $26\% \pm 13\%$; P203R+S210R: $29\% \pm 14\%$; WT: $18\% \pm 9\%$, $P < 0,01$); ngoài ra đột biến S210R còn làm tăng tỷ lệ tế bào trong pha G2/M ($33\% \pm 6\%$ so với $26\% \pm 8\%$ đối với nhóm không HCC, $p < 0,001$)⁸⁸. Những kết quả này cho thấy rằng hai đột biến đầu C của gen S là P203R và S210R làm cản trở sự bài tiết HBsAg và có liên quan đến tăng sinh tế bào, hỗ trợ sự tham gia của chúng vào sự phát triển HCC.

Đột biến S174N chỉ chiếm tỷ lệ thấp trong nghiên cứu này là 5,1% ở nhóm HCC và 0,4% ở nhóm không HCC tuy nhiên lại có mối liên quan với nguy cơ HCC sau khi hiệu chỉnh với mô hình đa biến. Cụ thể, sau khi hiệu chỉnh với các biến số nền như giới tính, nhóm tuổi, đột biến S174N có liên quan tới tình trạng mắc HCC với số chênh OR= 20,60 (1,64-258,39), $p= 0,019$ (bảng 3.28).

Các đột biến khác ở vùng S có tỷ lệ cao hơn có ý nghĩa ở nhóm HCC như đột biến F20S, L98V, V190A, L209G/S/V, F212C/L/Y đều chiếm tỷ lệ thấp dưới 10% (bảng 3.21).

Trên vùng S chúng tôi ghi nhận tỷ lệ đột biến gen là 86,4% ở nhóm bệnh nhân HCC so với nhóm không HCC là 71,8%. Tỷ lệ đột biến thuộc vùng chức năng MHR ở nhóm HCC là 79,7% cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không HCC là 57,6% với $p=0,002$. Khi phân tích sâu hơn chúng tôi nhận thấy sự khác biệt giữa hai nhóm chủ yếu là do đột biến ở vùng a (aa 124-148). Cụ thể tỷ lệ đột biến trên vùng này là 49,1% ở nhóm HCC so với 34,9% ở nhóm không HCC ($p=0,043$). Kết quả này phù hợp với ghi nhận từ các nghiên cứu trước đây báo cáo đột biến trên vùng a có liên quan tới nguy cơ HCC^{2,167}. Tuy nhiên tỷ lệ này cao hơn so với tỷ lệ trong nghiên cứu của tác giả Bui TTT năm 2017 ghi nhận tỷ lệ đột biến trên vùng a chỉ là 8,1%¹²², và nghiên cứu của Lazarevic I. (2019) ở 187 bệnh nhân nhiễm HBV là 31,0%¹²³.

Ngoài ghi nhận tỷ lệ cao đột biến ở vùng chức năng a, chúng tôi còn ghi nhận tỷ lệ đột biến ở vùng chức năng HLA-II cao hơn có ý nghĩa ở nhóm HCC với tỷ lệ là 66,1% so với 45,8% ở nhóm không HCC. Đầu tận C của vùng S (aa 179-226) có đặc tính kỵ nước và được cho là chèn vào màng ER. Miền này liên quan đến việc làm trung gian vận chuyển glycoprotein vỏ qua mạng lưới nội chất. Các đột biến trong vùng này tạo ra một chuỗi ổn định, được glycosyl hóa nhưng không được bài tiết, do đó ảnh hưởng đến quá trình sinh học và bài tiết các virion².

4.5 Các yếu tố liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan

Có một số các yếu tố nguy cơ khác có thể đồng thời tồn tại ở những người nhiễm HBV mạn, một số được cho là có thể liên quan, hoặc thậm chí làm tăng nguy cơ phát triển HCC. Ví dụ như nhiễm HBV tại thời điểm mới sinh hoặc bệnh nhân bị nhiễm mạn tính lớn tuổi, giới tính nam, chủng tộc người Châu Á và Đảo Thái Bình Dương, có các yếu tố liên quan lối sống (uống rượu mức độ nhiều, sử dụng thuốc lá), tải lượng HBV DNA và xét nghiệm huyết thanh của vi rút viêm gan B như HBeAg dương tính, kiểu gen HBV và thời gian lây nhiễm đều được chứng minh là làm tăng nguy cơ¹¹¹.

Tuổi, giới

Độ tuổi có liên quan tới nguy cơ HCC trên bệnh nhân tham gia vào nghiên cứu. Tỷ lệ HCC cao hơn ở nhóm ≥ 40 tuổi với $p < 0,001$. Điều này phù hợp với bảng

chứng từ các nghiên cứu trước đây cho thấy tuổi là yếu tố nguy cơ của HCC trên bệnh nhân viêm gan B mạn^{7,170}. Nguyên nhân có thể là do HCC cần sự tích lũy qua thời gian dài các biến đổi về di truyền, mô học như các tổn thương gan, xơ hóa gan^{170,171}.

Khi khảo sát và so sánh sự phân bố giới tính giữa nhóm có HCC và nhóm không HCC, giới tính nam có tỷ lệ HCC cao hơn so với nhóm nữ và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p=0,07$. Điều này phù hợp với đặc điểm của bệnh lý về gan và yếu tố nguy cơ HCC cao hơn ở nam giới được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây^{7,106,172,173}. Một số bằng chứng cho thấy bệnh gan dễ phát triển hơn ở những bệnh nhân có nồng độ testosterone cao và nồng độ estrogen thấp¹⁷⁴. Ngoài ra, nam giới có chế độ ăn thiếu lành mạnh, xu hướng hút thuốc lá và sử dụng rượu bia nhiều hơn là nguy cơ tiến triển HCC (bảng 3.24).

Hút thuốc lá

Kết quả khảo sát cho thấy tỷ lệ người hút thuốc lá ở nhóm có HCC cao hơn so với nhóm không HCC (34% so với 17,8%) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,008$ (bảng 3.25). Điều này phù hợp với bằng chứng về tác động độc lập của hút thuốc lá với nguy ung thư biểu mô tế bào gan^{175,176}. Thuốc lá gây nên các tác động đối với gan một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Có thể kích thích sản xuất các chất gây độc tế bào, làm tăng xơ hóa và viêm hoại tử¹⁰⁷. Cơ chế tác động được cho là do các hóa chất độc hại trong thuốc lá có thể được chuyển hóa một phần tại gan và hoạt hóa một số chất sinh ung. Tác động này có thể kết hợp với tình trạng viêm gan mạn tính và làm tăng nguy cơ HCC ở những người bị nhiễm HBV có hút thuốc lá. Một nghiên cứu hồi cứu tại Trung Quốc ước tính nguy cơ tử vong trước 70 tuổi vì HCC ở người bị viêm gan vi rút B mạn là 33% đối với người hút thuốc lá so với 25% ở người không hút thuốc lá và nguy cơ ung thư sẽ tỷ lệ thuận với lượng thuốc hút¹⁷⁵.

Đặc điểm lâm sàng: xơ gan, đợt bùng phát viêm gan vi rút B

Tỷ lệ HCC trong nhóm bệnh nhân xơ gan cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không có xơ gan với $p=0,003$ (bảng 3.26). Điều này phù hợp với bằng chứng từ các nghiên cứu khác trên thế giới khẳng định rằng xơ gan là một trong những yếu

tổ nguy cơ phát triển ung thư gan và có đến 80%–90% người mắc HCC bị xơ gan¹⁷⁷. Cụ thể, một nghiên cứu đoàn hệ của Zhongxian Poh và cộng sự theo dõi 673 bệnh nhân viêm gan vi rút B trong trong 10 năm ghi nhận tỷ lệ phát triển HCC ở nhóm bệnh nhân có xơ gan là 29,7% trong suốt thời gian theo dõi (tương đương với 3,0% mỗi năm) so với tỷ lệ chung cho cả nhóm là 7,8%¹⁷⁸. Tương tự, một nghiên cứu gộp được thực hiện năm 2019 đã so sánh tỷ lệ mắc HCC mỗi năm giữa tình trạng có và không có xơ gan nhằm mục đích đánh giá nguy cơ HCC do xơ gan trên những nhóm có bệnh gan khác nhau. Kết quả cho thấy ở những bệnh nhân có tình trạng viêm gan B mạn, nguy cơ mắc HCC qua từng năm nếu có tình trạng xơ gan cao gấp 8,73 lần so với không có xơ gan (từ 0,37%/năm khi không xơ gan lên 3,23%)¹⁷⁹. Từ những bằng chứng trên, nhiều chuyên gia khuyến cáo việc sàng lọc bằng siêu âm gan 6 tháng một lần (giám sát HCC) ở những người có nguy cơ cao giúp xác định sớm HCC và tăng khả năng điều trị khỏi bệnh¹⁸⁰.

Nhóm bệnh nhân HCC có thời gian phát hiện viêm gan vi rút B trung bình là $9,11 \pm 3,29$ (năm) so với nhóm không có HCC là $11,36 \pm 4,18$ (năm), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Kết quả của chúng tôi cho thấy nhóm bệnh nhân HCC có thời gian mắc bệnh thấp hơn so với nhóm không có HCC. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây ghi nhận ung thư gan là nguyên nhân tử vong chính trên bệnh nhân nhiễm viêm gan B mạn^{181,182}. Tác giả Montuclard nhận thấy tỷ lệ tử vong ở nhóm có HBV cao gấp 1,7 lần tỷ lệ tử vong chung trong khi tỷ lệ này ở nhóm có HCC gấp 15,9 lần. Nghiên cứu của Tao Wang tại Đài Loan nhận thấy bệnh nhân mắc HCC có tỷ lệ tử vong theo tuổi cao hơn so với nhóm bệnh nhân không có HCC¹⁸³. Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện phương pháp cắt ngang do đó có thể bỏ sót bệnh nhân đã tử vong do HCC, việc thực hiện nghiên cứu đoàn hệ sẽ giúp xác định được mối liên quan nhân quả giữa thời gian từ lúc chẩn đoán viêm gan B mạn cho đến thời điểm phát hiện HCC.

Bùng phát viêm gan vi rút B là bệnh cảnh lâm sàng được các bác sĩ rất quan tâm, đây là tình huống nặng bệnh nhân có thể có triệu chứng, kể cả vàng da, và tăng AST, ALT, kéo dài thời gian INR, tăng AFP, thậm chí khiến bệnh nhân suy gan và tử vong. Nghiên cứu của chúng tôi cũng muốn tìm hiểu đột biến vùng pre-

S/S của HBV có liên quan đến bệnh cảnh bùng phát viêm gan vi rút B hay không, nhất là khi bệnh nhân nhiễm HBV mạn, tăng AFP cũng là những yếu tố gợi ý chẩn đoán người bệnh có biến chứng HCC. Vì cả hai bệnh cảnh bùng phát viêm gan vi rút B mạn hay HCC đều là những biến chứng nặng có tiên lượng rất xấu cần phải được trả lời ngay khi tiếp nhận người bệnh. Qua bảng 3.26, chúng tôi ghi nhận được tỷ lệ bệnh nhân bị bùng phát viêm gan vi rút B ít có HCC hơn những người không bùng phát với tỷ lệ lần lượt là 4,2% và 24,7%, và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Hay hiểu một cách khác, với kết quả này, bệnh nhân có biến chứng nặng là bùng phát viêm gan vi rút B ít khi xảy ra biến chứng nặng còn lại cùng một thời điểm.

Đặc điểm cận lâm sàng: tải lượng HBV DNA, ALT- AST- GGT, tiểu cầu, HBeAg

Tải lượng HBV DNA ở nhóm bệnh nhân HCC thấp hơn so với nhóm bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn tính và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Nhiều nghiên cứu trước đây đã ghi nhận nguy cơ HCC tăng tỷ lệ thuận với tải lượng HBV DNA^{184,185}. Chen và cộng sự báo cáo tỷ lệ mắc tích lũy tăng từ 1,3% lên 14,9% ở nhóm bệnh nhân có HBV DNA là 10^6 copies/mL so với nhóm dưới 300 copies/mL¹⁸⁴. Nghiên cứu của Xu và cộng sự¹⁸⁶ năm 2022 khảo sát tải lượng HBV DNA trên 6301 bệnh nhân HBV đã nhận thấy có mối liên quan có ý nghĩa giữa chỉ số này với nguy cơ HCC bất kể tình trạng điều trị. Cụ thể, nhóm có HBV DNA cao >2000 IU/mL tại thời điểm ban đầu và sau đó sụt giảm nhanh chóng trong thời gian theo dõi có nguy cơ gấp 2,62 lần so với nhóm có tải lượng HBV DNA dưới ngưỡng phát hiện. Tương tự, nhóm có HBV DNA dưới ngưỡng tại thời điểm ban đầu nhưng tăng tới hơn 20.000 IU/mL trong quá trình theo dõi thì nguy cơ HCC gấp 4,17 lần¹⁸⁶. Điều này cho thấy chỉ số HBV DNA tại một thời điểm có thể không đánh giá đầy đủ nguy cơ phát triển ung thư tế bào gan. Việc theo dõi chỉ số này trong quá trình điều trị HBV không những giúp đánh giá hiệu quả điều trị mà còn có thể dự báo được nguy cơ tiến triển HCC ở bệnh nhân.

Nghiên cứu này nhận thấy chỉ số ALT thấp hơn có ý nghĩa ở nhóm có HCC, điều này phù hợp với diễn tiến của bệnh lý gan. Quá trình tổn thương gan có thể

bắt đầu từ tình trạng viêm gan mạn tính hoặc cấp tính và do đó đi kèm với tăng các chỉ số ALT và AST. Qua thời gian dài, các tổn thương này không hồi phục và gây nên tình trạng xơ hóa cũng như sụt giảm chức năng gan, lúc này các chỉ số về chức năng gan như ALT, AST, tiểu cầu có thể giảm và bệnh nhân có nguy cơ tiến triển HCC cao hơn. Nghiên cứu đoàn hệ của Ishiguro tại Nhật Bản¹⁸⁷ theo dõi trên số lượng lớn người cao tuổi nhằm ghi nhận tỷ lệ mắc mới HCC trong thời gian nghiên cứu đã nhận thấy nguy cơ ung thư gan cao hơn ở những người có chỉ số ALT tăng bất kể tình trạng có nhiễm viêm gan B hay không. Cụ thể, so với những người không có tình trạng nhiễm vi rút và có mức ALT dưới 30 U/L, nguy cơ mắc ung thư biểu mô tế bào gan tăng gấp 9,4 lần (KTC:3,9-22,3) ở những người âm tính với vi rút có mức ALT lớn hơn 30 U/L. Tỷ lệ này cũng cao hơn và có xu hướng tăng lên theo chỉ số ALT ở những người có tình trạng nhiễm vi rút với hệ số nguy cơ lần lượt là 15,2 (6,1-37,6), 180,5 (89,4-364,2), 454,2 (221,5-931,2) ở nhóm có ALT dưới 30 U/L, 30-69 U/L, và ≥ 70 U/L (p xu hướng $<0,001$)¹⁸⁷.

El-Serag và cộng sự khi thực hiện nghiên cứu trên bệnh nhân mắc viêm gan vi rút C đã có tình trạng xơ gan nhận thấy nguy cơ ung thư gan lại cao hơn ở những bệnh nhân có chỉ số ALT và số lượng tiểu cầu thấp¹⁸⁸. Nghiên cứu được thực hiện trên 11.721 bệnh nhân trong đó 35.494 xét nghiệm AFP được thực hiện và 987 bệnh nhân tiến triển HCC. Tác giả đã sử dụng chỉ số AFP và các chỉ số xét nghiệm khác để xây dựng mô hình tiên đoán tình trạng tiến triển HCC. Kết quả cho thấy tất cả các ngưỡng giá trị AFP, số lượng tiểu cầu thấp, ALT thấp và tuổi già có liên quan đến tăng nguy cơ mắc ung thư biểu mô tế bào gan. Ngược lại, ALT cao và số lượng tiểu cầu bình thường/cao có liên quan đến nguy cơ mắc ung thư biểu mô tế bào gan thấp. Tuy nhiên tác giả cũng nhận thấy độ chính xác của mô hình trên bị giảm đi đáng kể khi áp dụng cho nhóm đối tượng không có tình trạng xơ gan.

Kết quả ghi nhận từ nghiên cứu cho thấy chỉ số GGT ở nhóm HCC là $224,6 \pm 199,1$ U/L cao hơn có ý nghĩa so với nhóm không HCC là $121,1 \pm 130,1$ U/L. Chỉ số GGT thường được dùng để tiên lượng sống còn cho bệnh nhân HCC và có mối liên quan thuận với kích thước khối u và giai đoạn bệnh¹⁸⁹. Một số nghiên cứu ghi nhận GGT có liên quan tới nguy cơ HCC. Hann và cộng sự¹⁹⁰ thực hiện một

nghiên cứu đoàn hệ trên 588 bệnh nhân nhận thấy tỷ lệ mắc HCC cao hơn ở nhóm có tăng một trong các chỉ số ALT, AST, ALP và GGT so với thời điểm bắt đầu nghiên cứu. Và tỷ lệ này cao nhất ở nhóm có tăng GGT với tỷ số nguy cơ (HR) là 2,60 (KTC: 1,41 – 4,77). Điều này gợi ý việc ứng dụng xét nghiệm GGT và các chỉ dấu sinh học khác để đánh giá nguy cơ HCC tiến triển trên bệnh nhân HBV.

Số lượng tiểu cầu trung bình ở bệnh nhân HCC trong nghiên cứu này là $142,4 \pm 79,3$ K/mm³ thấp hơn so mức bình thường là 150 K/mm³. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Đinh Ngọc Hưng năm 2019 ghi nhận giá trị trung bình tại thời điểm phát hiện HCC là $133,7 \pm 88,2$ K/mm³ ¹⁹¹. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa số lượng tiểu cầu ở nhóm có và không có HCC. Theo tác giả Papatheodoridis và cộng sự¹⁷², tuổi cao hơn và số lượng tiểu cầu thấp hơn là những yếu tố dự báo HCC độc lập mạnh mẽ không phụ thuộc vào tình trạng xơ gan. Cụ thể, tỷ lệ mắc HCC tích lũy sau 1, 3, và 5 năm điều trị viêm gan vi rút B là 0,8%, 2,3% và 7,0% đối với bệnh nhân có tiểu cầu $\geq 100\ 000/\text{mm}^3$ và 6,5%, 15,6%, 30,2% đối với những bệnh nhân có tiểu cầu $< 100.000/\text{mm}^3$. Tuy nhiên, nghiên cứu này có sự khác biệt với nghiên cứu của Đinh Ngọc Hưng không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa về số lượng tiểu cầu lúc phát hiện HCC so với khi bắt đầu điều trị viêm gan vi rút B. Điều này có thể là do khác biệt trong thiết kế nghiên cứu khi mà tác giả Đinh Ngọc Hưng hồi cứu hồ sơ của bệnh nhân mắc HCC trong quá trình điều trị trong khi nghiên cứu này khảo sát cắt ngang ở những người nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính¹⁹¹.

Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ HBeAg âm nhiều hơn ở nhóm có HCC (27,3% so với 14,9% với $p=0,008$). Kết quả này có sự khác biệt với các nghiên cứu trước đây đã chứng minh những người mang HBeAg dương tính và những người bị xơ gan đặc biệt dễ hình thành khối u và HBeAg dương tính có liên quan đến tăng nguy cơ ung thư biểu mô tế bào gan¹⁹². Nghiên cứu trên 107 bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan vi rút B được chẩn đoán HCC tại BV Chợ Rẫy năm 2019 cho thấy các trường hợp HCC có HBeAg dương tính có tỷ lệ xơ gan (87,1%) cao hơn so với nhóm HBeAg âm tính (55,3%), có mối liên quan giữa mức độ xơ gan với dấu ấn miễn dịch HBeAg ($p=0,002$) ¹⁹³. Nghiên cứu của Yang và cộng sự sử dụng phân

tích đa biến để khảo sát mối liên quan giữa HBsAg và HBeAg với nguy cơ HCC. Kết quả cho thấy sau khi điều chỉnh theo độ tuổi, giới tính, sự hiện diện hay vắng mặt của kháng thể chống lại vi rút viêm gan C, tình trạng hút thuốc lá và sử dụng hoặc không sử dụng rượu, nguy cơ tương đối (RR) của ung thư biểu mô tế bào gan là 9,6 (KTC 95%: 6,0 - 15,2) ở người dương tính với HBsAg và 60,2 (35,5 - 102,1) ở người dương tính với cả HBsAg và HBeAg, so với bệnh nhân âm tính cả hai xét nghiệm trên¹⁹². Do đó, nghiên cứu cần xét thêm mối liên quan giữa mức độ xơ hóa gan với HBeAg. Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu cắt ngang nên không thể khảo sát mối liên quan nhân quả giữa HBeAg với nguy cơ HCC. Tỷ lệ HBeAg âm chiếm đa số ở bệnh nhân HCC có thể là do đáp ứng của điều trị hoặc do giai đoạn của bệnh¹⁸⁵.

Kết quả phân tích đa biến cho thấy các yếu tố nền như giới tính nam, nhóm tuổi ≥ 40 và sự hiện diện các đột biến xảy ra ở axit amin W4P/R/Y vùng pre-S1, T47A/E/V/K, P120S/T, S174N, P203R vùng S là những yếu tố nguy cơ độc lập của HCC. Điều này cho thấy việc tầm soát các đột biến gen trên vùng pre-S và S cũng như các đột biến khác có liên quan tới khả năng phát triển HCC có thể giúp ích trong việc quản lý bệnh nhân nhiễm HBV mạn, đặc biệt là nhóm bệnh nhân có tuổi cao, là nam giới. Tuy nhiên một số đột biến qua phân tích có khoảng OR tương đối rộng và do đó việc có thêm các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn tại nhiều trung tâm điều trị viêm gan vi rút B mạn ở đối tượng dân số Việt Nam là cần thiết để có thêm bằng chứng giúp xây dựng các thang điểm đánh giá nguy cơ HCC có độ tin cậy cao.

Hạn chế của đề tài

Nghiên cứu chỉ mới tiến hành thực hiện tại 1 địa điểm là phòng khám Viêm gan Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Do vậy, tỷ lệ đột biến chung của dân số nghiên cứu không đại diện cho toàn dân số nhiễm HBV mạn tính trong cộng đồng. Ngoài ra, nghiên cứu chỉ chọn người có tải lượng HBV DNA $> 10^4$ copies/mL và bỏ qua bệnh nhân có HBV DNA $< 10^4$ copies/mL, điều này làm cho kết quả không đại diện được hết cho dân số bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính.

Bên cạnh đó, với kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp, chỉ phát hiện được đột biến khi tỷ lệ chủng đột biến chiếm ít nhất 20% trong quần thể vi rút. Tỷ lệ thực hiện kiểu gen và giải trình tự tìm đột biến thất bại đến 5,3% chưa xác định được là do thất bại về kỹ thuật hay khách quan do mẫu xét nghiệm có HBV DNA thấp (giải trình tự gen trực tiếp chỉ phát hiện được đột biến khi tải lượng HBV DNA từ 300 copies/mL trở lên).

Thiết kế nghiên cứu cắt ngang, mặc dù có tiến hành phân tích theo thuật toán thống kê nhưng chưa thể đưa ra được kết luận mối quan hệ nhân quả giữa đột biến gen vùng pre-S/S với ung thư biểu mô tế bào gan.

KẾT LUẬN

Qua khảo sát đột biến gen pre-S/S của HBV ở 238 người nhiễm HBV mạn tính và 62 bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính có biến chứng HCC tại Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, nghiên cứu rút ra một số kết luận sau đây.

1. Đặc điểm đột biến gen pre-S/S của vi rút viêm gan B

Tỷ lệ đột biến điểm xảy ra trên vùng pre-S1 là 58,8%, vùng pre-S2 là 78,1% và vùng S là 66,9%. Các vị trí axit amin bị đột biến nhiều nhất của pre-S1 là V68 và T87, chiếm hơn 45%. Các vị trí axit amin bị thay thế nhiều nhất của pre-S2 là T125 chiếm 43,7% và I150 chiếm 28,9%.

Đột biến xóa đoạn vùng pre-S1 chiếm 21,3% và vùng pre-S2 chiếm 15,1%.

Xét theo các vùng chức năng: đột biến pre-S1 và pre-S2 tập trung nhiều nhất ở vùng S promoter (71,7%) và HSP70 (70,3%), sau đó NTCP (47,6%), NBS (45,5%), epitope tế bào B (42,3%) và epitope tế bào T (31,5%).

Các vị trí axit amin bị thay thế trong vùng S tập trung nhiều nhất tại vùng MHR (62%), tiếp đến là vùng HLA-II (49,8%) và vùng HLA-I (16,8%). Các vị trí axit amin thường bị thay thế trong vùng gen S gồm A184 (37,7%), S210 (35,4%) và S53 (33,7%).

Nhiều đột biến pre-S/S của HBV có sự phân bố tần suất khác biệt theo độ tuổi trước hoặc sau 40 tuổi, giới tính, tình trạng xơ gan, HBeAg, kiểu gen HBV, tải lượng HBV DNA, HBsAg định lượng, đồng hiện diện HBsAg và anti-HBs.

2. Liên quan giữa đột biến gen pre-S/S của vi rút viêm gan B và ung thư biểu mô tế bào gan

Đột biến tại hai vị trí W4 và I108 của vùng pre-S1 có tỷ lệ cao hơn có ý nghĩa ở nhóm bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn có HCC so với nhiễm HBV mạn không HCC ($p < 0,05$).

Các đột biến tại vị trí axit amin F20, T47, L98, S174, V190, P203, L209 và F212 của vùng chức năng MHR và HLA-II trên gen S có tỷ lệ cao hơn có ý nghĩa ở nhóm bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn có HCC so với nhiễm HBV mạn không HCC ($p < 0,05$).

Phân tích đa biến xác nhận có 7 yếu tố liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan gồm: giới nam, tuổi ≥ 40 , đột biến tại axit amin W4P/R/Y trên vùng pre-S1 và 4 đột biến tại các axit amin T47A/E/V/K, P120S/T, S174N và P203R trên vùng gen S của HBV.

KIẾN NGHỊ

- Cần thực hiện nghiên cứu với kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới, có độ nhạy cao khả năng phát hiện đột biến tới 0,1%, điều này nhằm giúp phát hiện được các đột biến có tỷ lệ thấp như W4P/R/Y (pre-S1), S174N (S) nhưng có liên quan đến HCC. Và kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới cũng đồng thời giải quyết được việc phát hiện đột biến ở những trường hợp bệnh nhân có tải lượng HBV DNA thấp hơn 300 copies/mL.

- Mở rộng nghiên cứu tại nhiều trung tâm điều trị viêm gan tại thành phố Hồ Chí Minh hay khu vực để kết quả nghiên cứu thu được mang tính đại diện cho dân số nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính trong cộng đồng.

- Ngoài ra, phân tích thêm ảnh hưởng qua lại hay phối hợp của các đột biến trên vùng pre-S/S với các đột biến trên gen PC/BCP, gen X của vi rút viêm gan B với HCC ở bệnh nhân Việt Nam, do đặc tính bộ gen vi rút xếp chồng lấp lên nhau và bản tính khiếm khuyết khả năng sửa lỗi của nó trong quá trình sao chép.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN

1. Nguyễn Thị Cẩm Hương, Lương Bắc An, Nguyễn Quang Trung, Hoàng Anh Vũ, Phạm Thị Lệ Hoa (2021), “Đặc điểm đột biến gen PreS/ S ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn”, *Tạp chí Y Học Thành phố Hồ Chí Minh*, phụ bản tập 25, số 1-2021: 109- 114.

2. Nguyễn Thị Cẩm Hương, Nguyễn Quang Trung, Lương Bắc An, Dương Bích Trâm, Hoàng Anh Vũ, Bùi Hữu Hoàng, Phạm Thị Lệ Hoa (2022), “Mutations in the HBV PreS/S gene related to hepatocellular carcinoma in Vietnamese chronic HBV- infected patients”, *PLOS One*, 7 April 2022.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization. Updated 24 June 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
2. Chen BF. Hepatitis B virus pre-S/S variants in liver diseases. *World J Gastroenterol*. Apr 14 2018;24(14):1507-1520. doi:10.3748/wjg.v24.i14.1507
3. Tan A, Koh S, Bertolotti A. Immune Response in Hepatitis B Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Jul 1 2015;5(8):a021428. doi:10.1101/cshperspect.a021428
4. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *The Lancet*. 2015;386(10003):1546-1555.
5. World Health Organization. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Hepatitis B Media Center of WHO*. 2016;
6. Song-Huy N-D, Albert D, Doan PTN, Y DD, Nhu NT, S CJM. High burden of hepatocellular carcinoma and viral hepatitis in Southern and Central Vietnam: Experience of a large tertiary referral center, 2010 to 2016. *World journal of hepatology*. Jan 27 2018;10(1):p.116-123. doi:10.4254/wjh.v10.i1.116
7. Le VQ, Nguyen VH, et al. Epidemiological Characteristics of Advanced Hepatocellular Carcinoma in the Northern Region of Vietnam. *Cancer Control*. Jan-Dec 2019;26(1):1073274819862793. doi:10.1177/1073274819862793
8. Rao H-L, Chen J-W, Li M, et al. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PloS one*. 2012;7(1):e30806. doi:10.1371/journal.pone.0030806
9. Mikael G, Kirsten H, Peter G, et al. Ultra-deep sequencing reveals high prevalence and broad structural diversity of hepatitis B surface antigen mutations in a global population. *PloS one*. 2017;12(5):e0172101. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172101>

10. Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. *Journal of Hepatology*. 2014/08/01/ 2014;61(2):408-417. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.041>
11. Brunetto MR. Chance and necessity of simultaneous HBsAg and anti-HBs detection in the serum of chronic HBsAg carriers. *Journal of Hepatology*. Mar 2014;60(3):473-475. doi:10.1016/j.jhep.2013.12.001
12. Hudu SA, Malik YA, Niazlin MT, Harmal NS, Sekawi Z. An Overview of Hepatitis B Virus Surface Antigen Mutant in the Asia Pacific. *Curr Issues Mol Biol*. 2014;16:69-78.
13. Zhang AY, Lai CL, Huang FY, et al. Deep sequencing analysis of quasispecies in the HBV pre-S region and its association with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. Sep 2017;52(9):1064-1074. doi:10.1007/s00535-017-1334-1
14. Organization WH. Hepatitis B. Fact sheet N°204. 2015;
15. Hwang EW, Cheung R. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. *North American Journal of Medicine and Science*. 2011;4(2):7-13.
16. Viet L, Lan NT, Ty PX, et al. Prevalence of hepatitis B & hepatitis C virus infections in potential blood donors in rural Vietnam. *Indian J Med Res*. Jul 2012;136(1):74-81.
17. Linda D, J CM, Jonathan D, et al. A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne virus coinfections in Viet Nam. *PloS one*. 2012;7(6):e39027.
18. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*. Jan 7 2007;13(1):14-21. doi:10.3748/wjg.v13.i1.14
19. Chu CJ, Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*. May 2002;35(5):1274-6. doi:10.1053/jhep.2002.33161
20. Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*. Jun 2008;82(11):5657-63. doi:10.1128/jvi.02556-07

21. Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol*. Aug 2008;82(16):8241-2. doi:10.1128/jvi.00793-08
22. Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis*. Nov 2008;14(11):1777-80. doi:10.3201/eid1411.080437
23. Yu H, Yuan Q, Ge SX, et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*. Feb 19 2010;5(2):e9297. doi:10.1371/journal.pone.0009297
24. Fletcher GJ, Eapen CE, Abraham P. Hepatitis B genotyping: The utility for the clinicians. *Indian Journal of Gastroenterology*. 2020/08/01 2020;39(4):315-320. doi:10.1007/s12664-019-00995-y
25. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. May 14 2014;20(18):5427-34. doi:10.3748/wjg.v20.i18.5427
26. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. May 2021;71(3):209-249. doi:<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
27. The Global Cancer Observatory. Viet Nam fact sheets. *The Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/704-viet-nam-fact-sheets.pdf>.
28. Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy - eighth report of the International Committee on the taxonomy of viruses. *The Viruses*. 07/01 2005;83:988-992.
29. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. Mar 2000;64(1):51-68. doi:10.1128/mmbr.64.1.51-68.2000
30. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*. Apr 1999;12(2):351-66. doi:10.1128/cmr.12.2.351

31. CM H, JM M, MI A, LD C. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology*. 2000;31(5):1037-44.
32. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. Mar 11 2004;350(11):1118-29. doi:10.1056/NEJMra031087
33. Stefan S, Jelena H, K SA, Ralf B. The hepatitis B virus envelope proteins: Molecular gymnastics throughout the viral life cycle. *Annual review of virology*. 2020;7:p.263-288.
34. J LS, P C, I C, C G-G, P G. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *Journal of virology*. 1998;72(7):p.5573-5578.
35. Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology*. Apr 1999;29(4):p.1236-1247. doi:10.1002/hep.510290426
36. Dirk S, Irina S, Juris J, al e. Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. *Journal of General Virology*. 2000;81(2):p.369-378.
37. Jung-hyun P, Eun-wie C, Yun-jung L, Yub SS, Lyong KK. Determination of the protective effects of neutralizing anti-hepatitis B virus (HBV) immunoglobulins by epitope mapping with recombinant HBV surface-antigen proteins. *Microbiology and immunology*. 2000;44(8):p.703-710.
38. Tsurng-Juhn H, Cheng-Chan L, Jui-Chen T, al e. Novel autoregulatory function of hepatitis B virus M protein on surface gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. Jul 29 2005;280(30):p.27742-27754. doi:10.1074/jbc.M502209200
39. Carsten L, Reinhild P. Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for

- translocational regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Apr 29 2003;100(9):p.5199-5204. doi:10.1073/pnas.0930813100
40. Volker B. Hepatitis B virus morphogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*. Jan 7 2007;13(1):p.65-73. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.65]
 41. Ueda K. Hepatitis B Virus: Its Life Cycle and the Therapeutic Targets. *MDPI Journals Awarded Impact Factor*. 2021;
 42. F K, JR K, S M, al e. Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. Dec 2018;155(6):1828-1837.e2. doi:10.1053/j.gastro.2018.08.024
 43. Tu T, Bühler S, Bartenschlager R. Chronic viral hepatitis and its association with liver cancer. *Biological chemistry*. Jul 26 2017;398(8):817-837. doi:10.1515/hsz-2017-0118
 44. Marc R, A MJ, Ulrike P. Viral hepatitis and liver cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Oct 19 2017;372(1732):20160274. doi:<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0274>
 45. Simmone Ds, CK LK, Carla C, Trushar P. Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*. Oct 14 2020;26(38):p.5759-83. doi:10.3748/wjg.v26.i38.5759
 46. Soudeh G-F, Honarmand TK, Mahmud HB, Mohammad T. MicroRNA signature in liver cancer. *Pathology-Research and Practice*. Mar 2021;219:153369. doi:10.1016/j.prp.2021.153369
 47. K CV, Anshuman S, K DS, F HH, James J, MP S. Molecular mechanistic insight of hepatitis B virus mediated hepatocellular carcinoma. *Microbial pathogenesis*. Mar 2019;128:p.184-194. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.004>
 48. Yuheng Z, Jun L, Shuai W, al e. HBx-associated long non-coding RNA activated by TGF- β promotes cell invasion and migration by inducing autophagy in primary liver cancer. *International Journal of Oncology*. Jan 2020;56(1):p.337-347. doi:<https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4908>

49. Katie H, Anna P, J SM, al e. Chronic viral liver diseases: approaching the liver using T cell receptor-mediated gene technologies. *Cells*. Jun 16 2020;9(6):1471. doi:<https://doi.org/10.3390/cells9061471>
50. Xiaojuan C, Hui Q, Shaogui W, Sam F, Wen-Xing D. Autophagy and liver cancer. *Clinical and molecular hepatology*. Oct 2020;26(4):606-617. doi:10.3350/cmh.2020.0169
51. Matti S, Anna P. Liver, tumor and viral hepatitis: key players in the complex balance between tolerance and immune activation. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:552. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00552>
52. Yuen G, Jinyan F, Guang Y, al e. Hepatitis B virus X protein–elevated MSL2 modulates hepatitis B virus covalently closed circular DNA by inducing degradation of APOBEC3B to enhance hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. Nov 2017;66(5):p.1413-1429. doi:10.1002/hep.29316
53. Yanchao Z, Yulin W, Zi-Wei Y, al e. How Hepatitis B virus causes cirrhosis and liver cancer. *Medical Hypotheses*. Oct 2017;108:p.52-53. doi:doi:10.1016/j.mehy.2017.08.005
54. Chaoqun H, Wei L, Xiaochuan Z, Libin Z, Fuxiang W. Downregulation of HBx restrains proliferation, migration, and invasion of HepG2 cells. *Analytical Cellular Pathology*. 2021;2021:p.1-11. doi:10.1155/2021/6615979
55. Wei-Ling L, Jui-Hsiang H, Wenya H. Association of the hepatitis B virus large surface protein with viral infectivity and endoplasmic reticulum stress-mediated liver carcinogenesis. *Cells*. Sep 8 2020;9(9):2052. doi:<https://doi.org/10.3390/cells9092052>
56. Xin L, Pierluigi R, Dominik P, al e. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer. *Nature Reviews Cancer*. Sep 2021;21(9):p.541-557. doi:10.1038/s41568-021-00383-9
57. Gao S, Jiang X, Wang L, et al. The pathogenesis of liver cancer and the therapeutic potential of bioactive substances. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1029601. doi:10.3389/fphar.2022.1029601

58. Gang Y, Bin C, Yina M, al e. Role of the CXCR3-mediated TLRs/MyD88 signaling pathway in promoting the development of hepatitis B into cirrhosis and liver cancer. *Molecular Medicine Reports*. Oct 2021;24(4):p.1-9. doi:10.3892/mmr.2021.12378
59. Mahdieh N, Rabbani B. An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iran J Pediatr*. Aug 2013;23(4):375-88.
60. Vân PH, Phúc NĐ. Giải trình tự gen thể hệ mới: cuộc cách mạng trong chẩn đoán và nghiên cứu y sinh học. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2012;16(2):tr.21-27.
61. Dorak MT. *Real-time PCR*. 1st ed. Taylor & Francis; 2006.
62. Chuang Y-C, Tsai K-N, Ou J-HJ. Pathogenicity and virulence of Hepatitis B virus. *Virulence*. 2022/12/31 2022;13(1):258-296. doi:10.1080/21505594.2022.2028483
63. Yano Y, Azuma T, Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J Hepatol*. Mar 27 2015;7(3):583-92. doi:10.4254/wjh.v7.i3.583
64. Zhang X, Ding HG. Key role of hepatitis B virus mutation in chronic hepatitis B development to hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. May 28 2015;7(9):1282-6. doi:10.4254/wjh.v7.i9.1282
65. Zhang A-Y, Lai C-L, Huang F-Y, et al. Evolutionary Changes of Hepatitis B Virus Pre-S Mutations Prior to Development of Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE*. 2015;10(9):e0139478. doi:10.1371/journal.pone.0139478
66. Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *Journal of hepatology*. Aug 2014;61(2):408-17. doi:10.1016/j.jhep.2014.04.041
67. Chen BF. Different pre-S deletion patterns and their association with hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*. Sep 21 2016;22(35):8041-9. doi:10.3748/wjg.v22.i35.8041
68. Kim HS, Chen X, Xu M, et al. Frequency of hepatitis B surface antigen variants (HBsAg) in hepatitis B virus genotype B and C infected East- and

Southeast Asian patients: Detection by the Elecsys® HBsAg II assay. *Journal of Clinical Virology*. 2018/06/01/ 2018;103:48-56.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.04.005>

69. Lin C-M, Wang G-M, Jow G-M, Chen B-F. Functional analysis of hepatitis B virus pre-s deletion variants associated with hepatocellular carcinoma. *Journal of Biomedical Science*. 2012/02/07 2012;19(1):17. doi:10.1186/1423-0127-19-17
70. Biswas A, Panigrahi R, Banerjee A, et al. Differential pattern of pre-S mutations/deletions and its association with hepatitis B virus genotypes in Eastern India. *Infect Genet Evol*. Mar 2012;12(2):384-91. doi:10.1016/j.meegid.2012.01.007
71. Liu CJ, Kao JH. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin Liver Dis*. May 2013;33(2):97-102. doi:10.1055/s-0033-1345716
72. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res*. Aug 2007;127(2):164-76. doi:10.1016/j.virusres.2007.02.021
73. Zhang Q, Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma: HBV properties and hepatocarcinogenesis. *Hepat Mon*. Feb 2011;11(2):86-91.
74. Chen C-H, Changchien C-S, Lee C-M, et al. Combined Mutations in Pre-S/Surface and Core Promoter/Precore Regions of Hepatitis B Virus Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Case-Control Study. *The Journal of Infectious Diseases*. Dec 1 2008;198(11):1634-1642. doi:10.1086/592990 %J The Journal of Infectious Diseases
75. Mun HS, Lee SA, Kim H, Hwang ES, Kook YH, Kim BJ. Novel F141L pre-S2 mutation in hepatitis B virus increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic genotype C infections. *J Virol*. Jan 2011;85(1):123-32. doi:10.1128/jvi.01524-10
76. Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. *World J Gastroenterol*. Jan 7 2016;22(1):145-54. doi:10.3748/wjg.v22.i1.145

77. Lazarevic I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances. *World J Gastroenterol*. Jun 28 2014;20(24):7653-64. doi:10.3748/wjg.v20.i24.7653
78. Salpini R, Colagrossi L, Bellocchi MC, et al. Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression. *Hepatology*. Mar 2015;61(3):823-33. doi:10.1002/hep.27604
79. Bayliss J, Lim L, Thompson AJ, et al. Hepatitis B virus splicing is enhanced prior to development of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. Nov 2013;59(5):1022-8. doi:10.1016/j.jhep.2013.06.018
80. Abraham TM, Lewellyn EB, Haines KM, Loeb DD. Characterization of the contribution of spliced RNAs of hepatitis B virus to DNA synthesis in transfected cultures of Huh7 and HepG2 cells. *Virology*. Sep 15 2008;379(1):30-7. doi:10.1016/j.virol.2008.06.021
81. Soussan P, Tuveri R, Nalpas B, et al. The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *J Hepatol*. Mar 2003;38(3):343-8. doi:10.1016/s0168-8278(02)00422-1
82. Wu JF, Chang MH. Natural history of chronic hepatitis B virus infection from infancy to adult life -the mechanism of inflammation triggering and long-term impacts. *Journal of Biomedical Science*. 2015;
83. Lin YM, Chen BF. A putative hepatitis B virus splice variant associated with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Virology*. Oct 2017;510:224-233. doi:10.1016/j.virol.2017.07.025
84. Kim HS, Ryu CJ, Hong HJ. Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *J Gen Virol*. May 1997;78 (Pt 5):1083-6. doi:10.1099/0022-1317-78-5-1083
85. Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol*. Jan 7 2007;13(1):74-81. doi:10.3748/wjg.v13.i1.74

86. Huang S-F, Chen Y-T, Lee W-C, et al. Identification of Transforming Hepatitis B Virus S Gene Nonsense Mutations Derived from Freely Replicative Viruses in Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE*. 2014;9(2):e89753. doi:10.1371/journal.pone.0089753
87. Lai MW, Liang KH, Lin WR, et al. Hepatocarcinogenesis in transgenic mice carrying hepatitis B virus pre-S/S gene with the sW172* mutation. *Oncogenesis*. 2016/12/01 2016;5(12):e273-e273. doi:10.1038/oncsis.2016.77
88. Salpini R, Surdo M, Warner N, et al. Novel HBsAg mutations correlate with hepatocellular carcinoma, hamper HBsAg secretion and promote cell proliferation in vitro. *Oncotarget*. Feb 28 2017;8(9):15704-15715. doi:10.18632/oncotarget.14944
89. Nguyen DH, Ludgate L, Hu J. Hepatitis B virus-cell interactions and pathogenesis. *J Cell Physiol*. Aug 2008;216(2):289-94. doi:10.1002/jcp.21416
90. Roseman AM, Borschukova O, Berriman JA, Wynne SA, Pumpens P, Crowther RA. Structures of hepatitis B virus cores presenting a model epitope and their complexes with antibodies. *J Mol Biol*. Oct 12 2012;423(1):63-78. doi:10.1016/j.jmb.2012.06.032
91. Lin C-L, Kao J-H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06541.x>. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2011/01/01 2011;26(s1):123-130. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06541.x>
92. Park YM, Jang JW, Yoo SH, et al. Combinations of eight key mutations in the X/preC region and genomic activity of hepatitis B virus are associated with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*. Mar 2014;21(3):171-7. doi:10.1111/jvh.12134
93. Zhang D, Ma S, Zhang X, Zhao H, Ding H, Zeng C. Prevalent HBV point mutations and mutation combinations at BCP/preC region and their association with liver disease progression. *BMC Infectious Diseases*. 2010/09/16 2010;10(1):271. doi:10.1186/1471-2334-10-271

94. Li W, Chen G, Yu X, Shi Y, Peng M, Wei J. Accumulation of the mutations in basal core promoter of hepatitis B virus subgenotype C1 increase the risk of hepatocellular carcinoma in Southern China. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(6):1076-85.
95. Yuen MF, Tanaka Y, Shinkai N, et al. Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/C, specific mutations of enhancer II/core promoter/precore regions and HBV DNA levels. *Gut*. Jan 2008;57(1):98-102. doi:10.1136/gut.2007.119859
96. Lee JH, Han KH, Lee JM, Park JH, Kim HS. Impact of hepatitis B virus (HBV) x gene mutations on hepatocellular carcinoma development in chronic HBV infection. *Clin Vaccine Immunol*. Jun 2011;18(6):914-21. doi:10.1128/cvi.00474-10
97. Sheldon J, Soriano V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *J Antimicrob Chemother*. Apr 2008;61(4):766-8. doi:10.1093/jac/dkn014
98. Liu LP, Hu BG, Ye C, Ho RL, Chen GG, Lai PB. HBx mutants differentially affect the activation of hypoxia-inducible factor-1 α in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. Feb 18 2014;110(4):1066-73. doi:10.1038/bjc.2013.787
99. Wang D, Cai H, Yu WB, Yu L. Identification of hepatitis B virus X gene variants between hepatocellular carcinoma tissues and pericarcinoma liver tissues in Eastern China. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):5988-96.
100. Tuteja A, Siddiqui AB, Madan K, et al. Mutation profiling of the hepatitis B virus strains circulating in North Indian population. *PLoS One*. 2014;9(3):e91150. doi:10.1371/journal.pone.0091150
101. Gouas DA, Villar S, Ortiz-Cuaran S, et al. TP53 R249S mutation, genetic variations in HBX and risk of hepatocellular carcinoma in The Gambia. *Carcinogenesis*. Jun 2012;33(6):1219-24. doi:10.1093/carcin/bgs068
102. Đạt TQ. Nghiên cứu kiểu gen TP53 và MDM2 trong ung thư tế bào gan nguyên phát. Luận án tiến sĩ y học. Trường đại học y Hà Nội; 2017.

103. Hương NV, Tiên TT, Ngân HTK, et al. Ảnh hưởng của gen p16 và RASSF1A đến bệnh nhân ung thư gan. *Tạp chí Y dược lâm sàng* 108. 2022;17(Số đặc biệt 7/2022):68-76. doi:<https://doi.org/10.52389/ydls.v17iDB.1267>
104. Thu LV, Tú HC, Linh NQ, al e. Tỷ lệ đột biến vùng promotor gen TERT trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan. *Tạp chí khoa học và công nghệ Việt Nam*. 2021;64(2):21-28.
105. Hường NTC, Hoa PTL. Liên quan giữa đột biến Basal Core Promoter và biến chứng xơ gan, ung thư gan ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2016;Phụ bản tập 20, số 1:267-272.
106. Hùng PV, Thiển ĐH. Đặc điểm ung thư biểu mô tế bào gan của bệnh nhân đến khám tại bệnh viện Đại học Y Hà Nội. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 06/21 2022;514(2):254-259. doi:10.51298/vmj.v514i2.2642
107. Jain D, Chaudhary P, Varshney N, et al. Tobacco Smoking and Liver Cancer Risk: Potential Avenues for Carcinogenesis. *J Oncol*. 2021;2021:5905357. doi:10.1155/2021/5905357
108. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. <https://doi.org/10.1002/hep.31288>. *Hepatology*. 2021/01/01 2021;73(S1):4-13. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.31288>
109. Baecker A, Liu X, La Vecchia C, Zhang ZF. Worldwide incidence of hepatocellular carcinoma cases attributable to major risk factors. *Eur J Cancer Prev*. May 2018;27(3):205-212. doi:10.1097/cej.0000000000000428
110. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. Feb 3 2015;112(3):580-93. doi:10.1038/bjc.2014.579
111. Massarweh NN, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control*. Jul-Sep 2017;24(3):1073274817729245. doi:10.1177/1073274817729245
112. Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol*. Apr 2001;82(2):77-100. doi:10.1111/j.1365-2613.2001.iep0082-0077-x

113. Chen C-J, Yang H-I, Su J, al e. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *Jama*. Jan 4 2006;295(1):65-73. doi:10.1001/jama.295.1.65
114. Huy TT, Ushijima H, Quang VX, et al. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol*. Oct 2004;74(2):228-36. doi:10.1002/jmv.20175
115. Dunford L, Carr MJ, Dean J, al e. A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne virus coinfections in Viet Nam. *PloS one*. 2012;7(6):e39027. doi:10.1371/journal.pone.0039027
116. Cornberg M, Wong VW-S, Locarnini S, Brunetto M, Janssen HL, Chan HL-Y. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. *Journal of hepatology*. Feb 2017;66(2):398-411. doi:10.1016/j.jhep.2016.08.009
117. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, al e. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology*. Aug 2010;139(2):483-490. doi:10.1053/j.gastro.2010.04.052
118. Hiroki K, Taisuke I, Fumio T, Hiroaki O, Yoshihiro A. Mutations in the envelope gene of hepatitis B virus variants co-occurring with antibody to surface antigen in sera from patients with chronic hepatitis B. *Journal of general virology*. 1996;77(8):p.1825-1831.
119. Larry M. Hepatitis B virus escape mutants:“pushing the envelope” of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 1995;21(3):p.884-887.
120. Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *Journal of viral hepatitis*. Jul 2006;13(7):427-434. doi:10.1111/j.1365-2893.2005.00713.x
121. Sayan M, Şentürk Ö, Akhan S, Hülügü S, Cekmen M. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos (t) ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *International Journal of Infectious Diseases*. Sep 2010;14:136-141. doi:10.1016/j.ijid.2009.11.039

122. Bui TTT, Tran TT, Nghiem MN, et al. Molecular characterization of hepatitis B virus in Vietnam. *BMC Infectious Diseases*. 2017/08/31 2017;17(1):601. doi:10.1186/s12879-017-2697-x
123. Lazarevic I, Banko A, Miljanovic D, Cupic M. Immune-Escape Hepatitis B Virus Mutations Associated with Viral Reactivation upon Immunosuppression. *Viruses*. Aug 24 2019;11(9)doi:10.3390/v11090778
124. Carman WF, Karayiannis P, Waters J, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *The Lancet*. 1990/08/11/ 1990;336(8711):325-329. doi:[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91874-A](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91874-A)
125. Hsu H, Chang M, Ni Y, Lin H, Wang S, Chen D. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology*. 1997/09/01/ 1997;26(3):786-791. doi:<https://doi.org/10.1053/jhep.1997.v26.pm0009303514>
126. Chiou H-L, Lee T-S, Kuo J, Mau Y-C, Ho M-S. Altered antigenicity of 'a' determinant variants of hepatitis B virus. *J Gen Virol*. Oct 1997;78(10):2639-2645. doi:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2639>
127. François G, Kew M, Van Damme P, Mphahlele MJ, Meheus A. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine*. 2001/07/16/ 2001;19(28):3799-3815. doi:[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00108-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00108-6)
128. Clements CJ, Coghlan B, Creati M, Locarnini S, Tedder RS, Torresi J. Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization? *Bull World Health Organ*. Jan 2010;88(1):66-73. doi:10.2471/blt.08.065722
129. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *Journal of Clinical Virology*. 2005/02/01/ 2005;32(2):102-112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
130. Pawlotsky J-M. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *Journal of Clinical Virology*. 2005/12/01/ 2005;34:S125-S129. doi:[https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(05\)80021-6](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(05)80021-6)

131. Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, et al. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *Journal of Virology*. Apr 1994;68(4):2671-2676. doi:10.1128/jvi.68.4.2671-2676.1994
132. Hou J, Karayiannis P, Waters J, Luo K, Liang C, Thomas HC. A unique insertion in the S gene of surface antigen—Negative hepatitis B virus chinese carriers. *Hepatology*. 1995/02/01/ 1995;21(2):273-278. doi:[https://doi.org/10.1016/0270-9139\(95\)90080-2](https://doi.org/10.1016/0270-9139(95)90080-2)
133. Kato J, Hasegawa K, Torii N, Yamauchi K, Hayashi N. A molecular analysis of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*. 1996/03/01/ 1996;23(3):389-395. doi:<https://doi.org/10.1053/jhep.1996.v23.pm0008617416>
134. Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, et al. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27(1)
135. Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, et al. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology*. 1998/01/01 1998;27(1):213-222. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.510270133>
136. McMahon G, Ehrlich PH, Moustafa ZA, et al. Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody—treated liver transplant patients. *Hepatology*. 1992/05/01 1992;15(5):757-766. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.1840150503>
137. Carman WF, Trautwein C, van Deursen J, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology*. 1996/09/01/ 1996;24(3):489-493. doi:<https://doi.org/10.1053/jhep.1996.v24.pm0008781312>
138. Hawkins AE, Gilson RJC, Gilbert N, et al. Hepatitis B virus surface mutations associated with infection after liver transplantation. *Journal of*

Hepatology. 1996/01/01/ 1996;24(1):8-14. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(96\)80179-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(96)80179-6)

139. Locarnini S, Zoulim F. Molecular Genetics of HBV Infection. *Antiviral Therapy*. 2010/04/01 2010;15(3_suppl):3-14. doi:10.3851/IMP1619

140. Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology*. 2002/08/01/ 2002;25(2):97-106. doi:[https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(02\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(02)00049-5)

141. Torresi J. Article Commentary: Hepatitis B Antiviral Resistance and Vaccine Escape: Two Sides of the Same Coin. *Antiviral Therapy*. 2008/04/01 2008;13(3):337-340. doi:10.1177/135965350801300314

142. Yeh CT. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther*. 2010;15(3 Pt B):471-5. doi:10.3851/imp1552

143. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. *Gastroenterology*. 2009/11/01/ 2009;137(5):1593-1608.e2. doi:<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.063>

144. Chang MH. Breakthrough HBV infection in vaccinated children in Taiwan: surveillance for HBV mutants. *Antivir Ther*. 2010;15(3 Pt B):463-9. doi:10.3851/imp1555

145. Hsu C-W, Yeh C-T, Chang M-L, Liaw Y-F. Identification of a Hepatitis B Virus S Gene Mutant in Lamivudine-Treated Patients Experiencing HBsAg Seroclearance. *Gastroenterology*. 2007/02/01/ 2007;132(2):543-550. doi:<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.001>

146. Liu CJ, Kao JH, Shau WY, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Naturally occurring hepatitis B surface gene variants in chronic hepatitis B virus infection: correlation with viral serotypes and clinical stages of liver disease. *J Med Virol*. Sep 2002;68(1):50-9. doi:10.1002/jmv.10169

147. Pollicino T, Isgrò G, Di Stefano R, et al. Variability of reverse transcriptase and overlapping S gene in hepatitis B virus isolates from untreated and lamivudine-

- resistant chronic hepatitis B patients. *Antiviral Therapy*. 2009/07/01 2008;14(5):649-654. doi:10.1177/135965350901400504
148. Hou J, Wang Z, Cheng J, et al. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in nonimmunized surface antigen–negative Chinese carriers. *Hepatology*. 2001/11/01/ 2001;34(5):1027-1034. doi:<https://doi.org/10.1053/jhep.2001.28708>
149. De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology*. 2007/08/15/ 2007;365(1):113-124. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.015>
150. Harrison TJ, Zuckerman AJ. Variants of Hepatitis B Virus. *Vox Sanguinis*. 2017;63(3):161-167. doi:10.1159/000462255
151. Locarnini SA. Hepatitis B virus surface antigen and polymerase gene variants: potential virological and clinical significance. *Hepatology*. Jan 1998;27(1):294-7. doi:10.1002/hep.510270144
152. Gao S, Duan ZP, Coffin CS. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J Hepatol*. May 18 2015;7(8):1086-96. doi:10.4254/wjh.v7.i8.1086
153. Kajiwarra E, Tanaka Y, Ohashi T, et al. Hepatitis B caused by a hepatitis B surface antigen escape mutant. *J Gastroenterol*. 2008;43(3):243-7. doi:10.1007/s00535-007-2150-9
154. Thakur V, Kazim SN, Guptan RC, et al. Transmission of G145R mutant of HBV to an unrelated contact. *J Med Virol*. May 2005;76(1):40-6. doi:10.1002/jmv.20321
155. Shahmoradi S, Yahyapour Y, Mahmoodi M, Alavian SM, Fazeli Z, Jazayeri SM. High prevalence of occult hepatitis B virus infection in children born to HBsAg-positive mothers despite prophylaxis with hepatitis B vaccination and HBIG. *J Hepatol*. Sep 2012;57(3):515-21. doi:10.1016/j.jhep.2012.04.021
156. Choi Y-M, Lee S-Y, Kim B-J. Naturally occurring hepatitis B virus mutations leading to endoplasmic reticulum stress and their contribution to the progression of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):597-604.

157. Huang C-H, Yuan Q, Chen P-J, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *Journal of hepatology*. Oct 2012;57(4):720-729. doi:10.1016/j.jhep.2012.05.009
158. Bingyu Y, Jingjing L, Yi F, et al. Temporal trend of hepatitis B surface mutations in the post-immunization period: 9 years of surveillance (2005–2013) in eastern China. *Scientific reports*. 2017;7(1):p.66-69.
159. Olivier L, Yves B, Thierry P, Vincent T. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of “a” determinant variants. *Journal of virology*. 2006;80(6):p.2968-2975.
160. Qu LS, Liu JX, Liu TT, et al. Association of hepatitis B virus pre-S deletions with the development of hepatocellular carcinoma in Qidong, China. *PLoS One*. 2014;9(5):e98257. doi:10.1371/journal.pone.0098257
161. Kim BK, Choi SH, Ahn SH, et al. Pre-S mutations of hepatitis B virus affect genome replication and expression of surface antigens. *J Gastroenterol Hepatol*. Apr 2014;29(4):843-50. doi:10.1111/jgh.12415
162. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol*. Jan 7 2007;13(1):65-73. doi:10.3748/wjg.v13.i1.65
163. Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology*. Jan 5 2002;292(1):44-58. doi:10.1006/viro.2001.1239
164. Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology*. Nov 1 1996;225(1):235-9. doi:10.1006/viro.1996.0594
165. Hildt E, Urban S, Hofschneider PH. Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene*. Nov 16 1995;11(10):2055-66.

166. Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. *Hepatology*. Jul 2008;48(1):88-98. doi:10.1002/hep.22295
167. Jiang Y, Han Q, Zhao H, Zhang J. The Mechanisms of HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*. 2021;8:435-450. doi:10.2147/jhc.S307962
168. Chen CH, Changchien CS, Lee CM, et al. Combined mutations in pre-s/surface and core promoter/precore regions of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study. *J Infect Dis*. Dec 1 2008;198(11):1634-42. doi:10.1086/592990
169. Zhang AY, Lai CL, Huang FY, et al. Evolutionary Changes of Hepatitis B Virus Pre-S Mutations Prior to Development of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139478. doi:10.1371/journal.pone.0139478
170. Hường NTC. *Khảo sát đột biến Precore và Basal core promoter ở bệnh nhân Viêm gan siêu vi B mạn*. Luận án Tiến sỹ Y học. Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh; 2019.
171. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog*. 2017;16:1. doi:10.4103/jcar.JCar_9_16
172. Papatheodoridis GV, Dalekos GN, Yurdaydin C, et al. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in Caucasian chronic hepatitis B patients receiving entecavir or tenofovir. *J Hepatol*. Feb 2015;62(2):363-70. doi:10.1016/j.jhep.2014.08.045
173. Walter SR, Thein H-H, Gidding HF, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in a cohort infected with hepatitis B or C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2011/12/01 2011;26(12):1757-1764. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06785.x>
174. Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, et al. Hepatitis B and C viruses in the etiology of hepatocellular carcinoma; a study in Greece using third-generation

assays. *Cancer Causes & Control*. Feb 2000;11(2):171-175. doi:10.1023/a:1008951901148

175. Chen ZM, Liu BQ, Boreham J, Wu YP, Chen JS, Peto R. Smoking and liver cancer in China: case-control comparison of 36,000 liver cancer deaths vs. 17,000 cirrhosis deaths. *Int J Cancer*. Oct 20 2003;107(1):106-12. doi:10.1002/ijc.11342

176. International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2004;83:1-1438.

177. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. Nov 2004;127(5 Suppl 1):S35-50. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.014

178. Poh Z, Goh BB, Chang PE, Tan CK. Rates of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and the role of surveillance: a 10-year follow-up of 673 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Jun 2015;27(6):638-43. doi:10.1097/meg.0000000000000341

179. Tarao K, Nozaki A, Ikeda T, et al. Real impact of liver cirrhosis on the development of hepatocellular carcinoma in various liver diseases-meta-analytic assessment. *Cancer Med*. Mar 2019;8(3):1054-1065. doi:10.1002/cam4.1998

180. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. Jan 2018;67(1):358-380. doi:10.1002/hep.29086

181. Szpakowski JL, Tucker LY. Causes of death in patients with hepatitis B: a natural history cohort study in the United States. *Hepatology*. Jul 2013;58(1):21-30. doi:10.1002/hep.26110

182. Montuclard C, Hamza S, Rollot F, et al. Causes of death in people with chronic HBV infection: A population-based cohort study. *J Hepatol*. Jun 2015;62(6):1265-71. doi:10.1016/j.jhep.2015.01.020

183. Wang T. Model of life expectancy of chronic hepatitis B carriers in an endemic region. *J Epidemiol*. 2009;19(6):311-8. doi:10.2188/jea.je20090039

184. Chen C-J, Yang H-I, Su J, et al. Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. *JAMA*. Jan 4 2006;295(1):65-73. doi:10.1001/jama.295.1.65 %J JAMA
185. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst*. Feb 16 2005;97(4):265-72. doi:10.1093/jnci/dji043
186. Xu X, Jiang J, Song C, et al. Association of dynamic changes in serum levels of HBV DNA and risk of hepatocellular carcinoma. *Current Medicine*. 2022/05/26 2022;1(1):5. doi:10.1007/s44194-022-00008-9
187. Ishiguro S, Inoue M, Tanaka Y, Mizokami M, Iwasaki M, Tsugane S. Serum aminotransferase level and the risk of hepatocellular carcinoma: a population-based cohort study in Japan. *Eur J Cancer Prev*. Feb 2009;18(1):26-32. doi:10.1097/CEJ.0b013e3282fa9edd
188. El-Serag HB, Kanwal F, Davila JA, Kramer J, Richardson P. A new laboratory-based algorithm to predict development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C and cirrhosis. *Gastroenterology*. May 2014;146(5):1249-55.e1. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.045
189. Zhang L-x, Lv Y, Xu AM, Wang H-z. The prognostic significance of serum gamma-glutamyltransferase levels and AST/ALT in primary hepatic carcinoma. *BMC Cancer*. 2019/08/27 2019;19(1):841. doi:10.1186/s12885-019-6011-8
190. Hann H-W, Wan S, Myers RE, et al. Comprehensive Analysis of Common Serum Liver Enzymes as Prospective Predictors of Hepatocellular Carcinoma in HBV Patients. *PLOS ONE*. 2012;7(10):e47687. doi:10.1371/journal.pone.0047687
191. Hưng ĐN, Huyền NN, Thạch PN. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn tính tiến triển thành ung thư gan nguyên phát tại bệnh viện Nhiệt Đới Trung Ương. *Truyền nhiễm Việt Nam*. 2021;Số 1 (33):12-16.
192. Yang H-I, Lu S-N, Liaw Y-F, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*. Jul 18 2002;347(3):168-174. doi:10.1056/NEJMoa013215

193. Hồ TP, Nguyễn ĐD, Hoàng VT, Nguyễn ĐSH, Phạm HV, Nguyễn TT. Mối liên quan giữa mức độ xơ hoá gan với kiểu gen HBV ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 03/17 2023;524(1A):211-216. doi:10.51298/vmj.v524i1A.4654

PHỤ LỤC
PHIẾU THU THẬP THÔNG TIN NGHIÊN CỨU

**LIÊN QUAN GIỮA ĐỘT BIẾN GEN S CỦA HBV VÀ UNG THƯ BIỂU
MÔ TẾ BÀO GAN**

Mã số (ID):

I. HÀNH CHÁNH

BS THỰC HIỆN:

Tên bệnh nhân: Năm sinh:

Giới: (1) Nam ☐ (2) Nữ ☐

Nghề nghiệp:.....

Tỉnh/ thành phố:.....

Ngày vào nghiên cứu: / /..... Mã số HS BV:

Tình trạng hôn nhân:

- ☐ Độc thân
- ☐ Có gia đình
- ☐ Góa

Cân nặng:kg. Chiều cao: cm

II. TIỀN SỬ:

CÁ NHÂN:

Uống rượu Nhiều ☐ Ít ☐ Không ☐

Hút thuốc Có ☐ Không ☐

Đột biến Basal core promoter: Có ☐ Không ☐

Loại đột biến:

TIỀN SỬ GIA ĐÌNH:

Gia đình có người mắc bệnh lý về gan Có ☐ Không ☐

Ba/mẹ ☐ Anh/chị/em ☐ Người khác:

Viêm gan B mạn tính ☐ Xơ gan ☐ Ung thư gan ☐

III. ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG

Nguồn lây viêm gan B

- ☐ Mẹ sang con
- ☐ Tình dục
- ☐ Không rõ

Thời gian mắc bệnh viêm gan vi rút B mạn tính.....

HBV genotype: Kiểu gen B ☐ -- Kiểu gen C ☐

Chẩn đoán xơ gan: ☐ năm:

Các triệu chứng lâm sàng: Báng bụng ☐ Phù chân: ☐

Lách to ☐ Lòng bàn tay son ☐

Xuất huyết: ☐ Tuần hoàn bàng hệ ☐

Vàng da: ☐ Sao mạch: ☐

IV. ĐẶC ĐIỂM CẬN LÂM SÀNG

HBeAg: Dương ☐ Âm ☐ .

Xét nghiệm	Đơn vị	Xét nghiệm	Đơn vị
INR		Bilirubin toàn phần	
AST		Albumin	
ALT		Tiểu cầu	
GGT		HBVDNA	
AFP		HBsAg định lượng	

Siêu âm bụng:

ARFI:.....

CT scan bụng:.....

V. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐỘT BIẾN GEN PreS/S CỦA HBV

Đột biến mất đoạn: Có ☐ Không ☐

Đột biến vùng S: Có ☐ Không ☐

Loại đột biến:

Đột biến vùng PreS1: Có ☐ Không ☐

Loại đột biến:

Đột biến vùng PreS2: Có ☐ Không ☐

Loại đột biến:

KẾT THÚC

GIẤY CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC

BỘ Y TẾ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP HỒ CHÍ MINH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NCYSH

Số: 526/ĐHYD-HĐĐĐ

V/v chấp thuận các vấn đề đạo đức NCYSH TP Hồ Chí Minh, ngày 10 tháng 6 năm 2019

CHẤP THUẬN (CHO PHÉP) CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP HỒ CHÍ MINH

Căn cứ quyết định số 1863/QĐ-BYT ngày 27 tháng 5 năm 2009 của Bộ Y tế về việc ban hành Quy chế Tổ chức và hoạt động của Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh;

Căn cứ quyết định số 5129/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2002 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành Quy chế về tổ chức và hoạt động của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học;

Căn cứ Quyết định số 1238/QĐ-ĐHYD-TC ngày 18 tháng 5 năm 2016 của Hiệu trưởng Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh về việc thành lập Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học;

Trên cơ sở xem xét của thường trực Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Đại học Y Dược ngày 6/6/2019;

Nay Hội đồng đạo đức **chấp thuận (cho phép)** về các khía cạnh đạo đức trong nghiên cứu đối với đề tài:

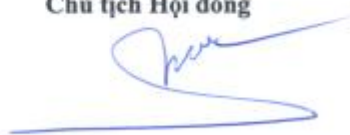
- Tên đề tài: *Mối liên quan giữa đột biến gen S của HBV và nguy cơ ung thư biểu mô tế bào gan.*
- Mã số: 19304 - ĐHYD
- Chủ nhiệm đề tài: *Nguyễn Quang Trung - Nghiên cứu sinh*
- Đơn vị chủ trì: *Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh*
- Địa điểm triển khai nghiên cứu: *Bệnh viện Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh*
- Thời gian tiến hành nghiên cứu: *từ tháng 5/2019 đến tháng 6/2021.*
- Phương thức xét duyệt: *Quy trình đầy đủ.*

Ngày chấp thuận (cho phép): Ngày 10/6/2019.

Lưu ý: HĐĐĐ có thể kiểm tra ngẫu nhiên trong thời gian tiến hành nghiên cứu

KT. HIỆU TRƯỞNG
Phó Hiệu trưởng

PGS.TS. Trần Hùng

TM. HỘI ĐỒNG
Chủ tịch Hội đồng

GS.TS. Nguyễn Sào Trung

GIẤY CHẤP THUẬN ĐỒNG Ý CHIA SẺ THÔNG TIN NGHIÊN CỨU

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Ngày 26 tháng 07 năm 2023

GIẤY ĐỒNG Ý

Cho phép sử dụng số liệu nghiên cứu

Tôi tên là: NGUYỄN THỊ CẨM HƯỜNG, giảng viên bộ môn Nhiễm, Đại học Y Dược TP. HCM.

Chủ nhiệm đề tài: "Khảo sát đột biến gen PreS/S của siêu vi viêm gan B ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn"

Tôi đồng ý cho nghiên cứu sinh NGUYỄN QUANG TRUNG, niên khóa 2018, Đại học Y Dược TP. HCM, được sử dụng số liệu từ đề tài nêu trên vào mục đích nghiên cứu, viết và báo cáo luận án tiến sĩ.

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI



Nguyễn Thị Cẩm Hường

GIẤY CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC

BỘ Y TẾ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP. HỒ CHÍ MINH
HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NCYSH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Số: 119 /HĐĐĐ

V/v chấp thuận các vấn đề đạo đức NCYSH TP. Hồ Chí Minh, ngày 14 tháng 02 năm 2020

CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP. HỒ CHÍ MINH

Căn cứ Quyết định số 1238/QĐ-BYT ngày 3/4/2019 của Bộ Y tế về việc ban hành Quy chế Tổ chức và hoạt động Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh;

Căn cứ Quyết định số 2626/QĐ-BYT ngày 22/7/2008 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành Quy chế về tổ chức và hoạt động của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học;

Căn cứ Quyết định số 3870/QĐ-ĐHYD ngày 6/10/2016 của Hiệu trưởng Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học;

Căn cứ Quyết định số 1238/QĐ-ĐHYD-TC ngày 18/5/2016 của Hiệu trưởng Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh về việc thành lập Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, nhiệm kỳ 2016 - 2021;

Tên cơ sở xem xét của thường trực Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh ngày 14/02/2020;

Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học chấp thuận về các khía cạnh đạo đức trong nghiên cứu đối với đề tài:

- Tên đề tài: *Khảo sát đột biến gen PreS/S của siêu vi viêm gan B ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn.*
- Chủ nhiệm đề tài: *TS. Nguyễn Thị Cẩm Hương – Giảng viên Đại học Y Dược TP.HCM*
- Đơn vị chủ trì: *Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh*
- Địa điểm triển khai nghiên cứu: *Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM.*
- Thời gian tiến hành nghiên cứu: *từ tháng 02/2020 đến tháng 12/2020*
- Phương thức xét duyệt: *Quy trình rút gọn*

Ngày chấp thuận: 14/02/2020

Lưu ý: HĐĐĐ có thể kiểm tra ngẫu nhiên trong thời gian tiến hành nghiên cứu

KT. HIỆU TRƯỞNG
PHÓ HIỆU TRƯỞNG
ĐẠI HỌC
Y DƯỢC
TP. HỒ CHÍ MINH
PGS.TS. Nguyễn Hoàng Bắc

TM. HỘI ĐỒNG
CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS.TS. Nguyễn Sào Trung

**BẢN THÔNG TIN DÀNH CHO ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU
VÀ CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU (A)**

Tên nghiên cứu: **Mối liên quan giữa đột biến gen S của HBV và ung thư biểu mô tế bào gan.**

Nhà tài trợ: Bộ môn Nhiễm, Đại học Y Dược TP. HCM

Nghiên cứu viên chính: NCS NGUYỄN QUANG TRUNG

Đơn vị chủ trì: Bộ môn Nhiễm, Đại học Y Dược TP. HCM

I. THÔNG TIN VỀ NGHIÊN CỨU

Mục đích và tiến hành nghiên cứu

Nghiên cứu khảo sát mối liên quan giữa đột biến gen S của HBV và ung thư biểu mô tế bào gan ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn tại BV Đại học Y Dược TP.HCM.

Thiết kế nghiên cứu: bệnh chứng, hồi cứu và tiền cứu.

Thời gian nghiên cứu: 26 tháng (05/2019- 07/2021)

Cách tiến hành:

Xin ông/bà/anh/chị dành ít thời gian để nhóm nghiên cứu giải thích về mục tiêu nghiên cứu, nghe và trả lời một số câu hỏi liên quan đến nghiên cứu. Nghiên cứu tiến hành khi ông/bà/anh/chị bị HCC liên quan với nhiễm HBV mạn tự nguyện đồng ý tham gia. Nhóm nghiên cứu xin ông/bà/anh/chị cho xin 5 mL máu ngoại biên lưu giữ để thực hiện các xét nghiệm, việc lấy máu cùng lúc với việc lấy máu xét nghiệm để điều trị tại phòng xét nghiệm của bệnh viện ĐHYD TP.HCM.

Xét nghiệm giải trình tự gen S của HBV (khi tải lượng siêu vi >300 copies/mL) được thực hiện miễn phí với chi phí 1.000.000 đồng/ mẫu. Kết quả xét nghiệm sẵn sàng cung cấp cho ông/bà/anh/chị khi có yêu cầu thiết thực liên quan đến việc điều trị. nghiên cứu không làm ảnh hưởng hay can thiệp đến diễn tiến tự nhiên và điều trị của ông/bà/anh/chị.

Công cụ thu thập số liệu: ghi nhận thông tin vào bảng thu thập số liệu.

Người liên hệ:

Nguyễn Quang Trung, SĐT: 0918341690, email: bsquangtrung@gmail.com

Sự tự nguyện tham gia

Người tham gia được quyền tự quyết định, không hề bị ép buộc tham gia.

Người tham gia có thể rút lui ở bất kỳ thời điểm nào mà không bị ảnh hưởng gì đến việc điều trị/chăm sóc mà họ đáng được hưởng.

Tính bảo mật

Thông tin của bệnh nhân được ghi nhận vào phiếu thu thập mã hóa số nghiên cứu, và đảm bảo tính bảo mật của các bản ghi liên quan đến người tham gia.

II. CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tôi đã đọc và hiểu thông tin trên đây, đã có cơ hội xem xét và đặt câu hỏi về thông tin liên quan đến nội dung trong nghiên cứu này. Tôi đã nói chuyện trực tiếp với nghiên cứu viên và được trả lời thỏa đáng tất cả các câu hỏi. Tôi nhận một bản sao của Bản Thông tin cho đối tượng nghiên cứu và chấp thuận tham gia nghiên cứu này. Tôi tự nguyện đồng ý tham gia.

☐ ĐỒNG Ý ☐ KHÔNG ĐỒNG Ý tham gia nghiên cứu

Chữ ký của người tham gia:

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

Chữ ký của người đại diện hợp pháp (nếu áp dụng):

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

Chữ ký của Nghiên cứu viên/người lấy chấp thuận:

Tôi, người ký tên dưới đây, xác nhận rằng bệnh nhân/người tình nguyện tham gia nghiên cứu ký bản chấp thuận đã đọc toàn bộ bản thông tin trên đây, các thông tin này đã được giải thích cặn kẽ cho Ông/Bà và Ông/Bà đã hiểu rõ bản chất, các nguy cơ và lợi ích của việc Ông/Bà tham gia vào nghiên cứu này.

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

**BẢN THÔNG TIN DÀNH CHO ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU
VÀ CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU (B)**

Tên nghiên cứu: **Mối liên quan giữa đột biến gen S của HBV và ung thư biểu mô tế bào gan.**

Nhà tài trợ: Bộ môn Nhiễm, Đại học Y Dược TP. HCM

Nghiên cứu viên chính: NCS NGUYỄN QUANG TRUNG

Đơn vị chủ trì: Bộ môn Nhiễm, Đại học Y Dược TP. HCM

I. THÔNG TIN VỀ NGHIÊN CỨU

Mục đích và tiến hành nghiên cứu

Nghiên cứu khảo sát mối liên quan giữa đột biến gen S của HBV và ung thư biểu mô tế bào gan ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn tại BV Đại học Y Dược TP.HCM.

Thiết kế nghiên cứu: bệnh chứng, hồi cứu và tiền cứu.

Thời gian nghiên cứu: 26 tháng (05/2019- 07/2021)

Cách tiến hành:

Xin ông/bà/anh/chị dành ít thời gian để nhóm nghiên cứu giải thích về mục tiêu nghiên cứu, nghe và trả lời một số câu hỏi liên quan đến nghiên cứu. Nghiên cứu tiến hành khi ông/bà/anh/chị nhiễm HBV mạn tự nguyện đồng ý tham gia.

Nhóm nghiên cứu xin ông/bà/anh/chị cho xin 5 mL máu ngoại biên lưu giữ để thực hiện các xét nghiệm, việc lấy máu cùng lúc với việc lấy máu xét nghiệm để điều trị tại phòng xét nghiệm của bệnh viện ĐHYD TP.HCM.

Xét nghiệm giải trình tự gen S của HBV (khi tải lượng siêu vi $>10^4$ copies/mL) được thực hiện miễn phí với chi phí 1.000.000 đồng/ mẫu.

Kết quả xét nghiệm sẵn sàng cung cấp cho ông/bà/anh/chị khi có yêu cầu thiết thực liên quan đến việc điều trị. Nghiên cứu không làm ảnh hưởng hay can thiệp đến diễn tiến tự nhiên và điều trị của ông/bà/anh/chị.

Công cụ thu thập số liệu: ghi nhận thông tin vào bảng thu thập số liệu.

Người liên hệ:

Nguyễn Quang Trung, SĐT: 0918341690, email: bsquangtrung@gmail.com

Sự tự nguyện tham gia

Người tham gia được quyền tự quyết định, không hề bị ép buộc tham gia.

Người tham gia có thể rút lui ở bất kỳ thời điểm nào mà không bị ảnh hưởng gì đến việc điều trị/chăm sóc mà họ đáng được hưởng.

Tính bảo mật

Thông tin của bệnh nhân được ghi nhận vào phiếu thu thập mã hóa số nghiên cứu, và đảm bảo tính bảo mật của các bản ghi liên quan đến người tham gia.

II. CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tôi đã đọc và hiểu thông tin trên đây, đã có cơ hội xem xét và đặt câu hỏi về thông tin liên quan đến nội dung trong nghiên cứu này. Tôi đã nói chuyện trực tiếp với nghiên cứu viên và được trả lời thỏa đáng tất cả các câu hỏi. Tôi nhận một bản sao của Bản Thông tin cho đối tượng nghiên cứu và chấp thuận tham gia nghiên cứu này. Tôi tự nguyện đồng ý tham gia.

☐ ĐỒNG Ý ☐ KHÔNG ĐỒNG Ý tham gia nghiên cứu

Chữ ký của người tham gia:

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

Chữ ký của người đại diện hợp pháp (nếu áp dụng):

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____

Chữ ký của Nghiên cứu viên/người lấy chấp thuận:

Tôi, người ký tên dưới đây, xác nhận rằng bệnh nhân/người tình nguyện tham gia nghiên cứu ký bản chấp thuận đã đọc toàn bộ bản thông tin trên đây, các thông tin này đã được giải thích cặn kẽ cho Ông/Bà và Ông/Bà đã hiểu rõ bản chất, các nguy cơ và lợi ích của việc Ông/Bà tham gia vào nghiên cứu này.

Họ tên _____ Chữ ký _____

Ngày tháng năm _____