

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ

NINH VĂN QUYẾT

**PHÁT HIỆN GIÁN TIẾP ĐỘT BIẾN GEN EGFR
TRONG UNG THƯ BIỂU MÔ TUYẾN CỦA PHỔI
BẰNG KỸ THUẬT HÓA MÔ MIỄN DỊCH**

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ NANO SINH HỌC

HÀ NỘI - 2017

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ

NINH VĂN QUYẾT

**PHÁT HIỆN GIÁN TIẾP ĐỘT BIẾN GEN EGFR
TRONG UNG THƯ BIỂU MÔ TUYẾN CỦA PHỔI
BẰNG KỸ THUẬT HÓA MÔ MIỄN DỊCH**

Chuyên ngành: Công nghệ Nano Sinh học

Mã số: Chuyên ngành đào tạo thí điểm

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ NANO SINH HỌC

Cán bộ hướng dẫn: 1. TS. Trần Đăng Khoa

2. PGS.TS. Nguyễn Văn Hưng

HÀ NỘI - 2017

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, trên toàn thế giới, bệnh ung thư đã vượt qua bệnh tim mạch để trở thành căn nguyên gây tử vong hàng đầu với tỷ lệ mắc bệnh cao và độ tuổi mắc bệnh ngày càng giảm [1]. Với tốc độ phát triển dân số và sự gia tăng tuổi thọ như hiện nay thì ước tính đến năm 2050, thế giới sẽ có thêm khoảng 27 triệu trường hợp ung thư mới mắc và khoảng 17,5 triệu bệnh nhân tử vong mỗi năm [1]; trong đó phải kể đến ung thư phổi (UTP), căn nguyên gây tỷ lệ mắc và tử vong hàng đầu với thể ung thư biểu mô tuyến của phổi chiếm đến 40% các trường hợp.

Việc phân tích tình trạng các gen đóng vai trò chủ chốt trong quá trình phát sinh khối u giúp các bác sĩ lựa chọn pháp đồ điều trị phù hợp nhất để nâng cao hiệu quả điều trị đích cho người bệnh. Qua nhiều công trình nghiên cứu cũng như sự kiểm duyệt khắt khe của các Tổ chức quản lý y dược uy tín trên thế giới (FDA-Hoa Kỳ, EMA-Liên Minh Châu Âu), liệu pháp điều trị trúng đích (LPĐTTĐ) đã chứng tỏ hiệu quả rất tốt trong việc điều trị cho các bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến của phổi giai đoạn cuối: kích thước các khối u giảm đáng kể, thời gian sống kéo dài hơn, chất lượng cuộc sống được cải thiện, ... Tuy nhiên, mức độ đáp ứng với thuốc điều trị đích ở mỗi bệnh nhân phụ thuộc phần lớn vào tình trạng một số gen, mà quan trọng nhất là gen EGFR. Việc xác định đột biến gen hay sự tương tác protein bị đột biến có ý nghĩa rất lớn giúp bác sĩ lựa chọn được phác đồ điều trị thích hợp để nâng cao hiệu quả điều trị đích

cho bệnh nhân. Tháng 6/2009, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chính thức đưa ra khuyến cáo: bệnh nhân trước khi được chỉ định dùng thuốc ức chế EGFR cần phải được làm xét nghiệm tình trạng gen.

Tại Việt Nam, số lượng bệnh nhân bệnh ung thư ngày càng nhiều, nhu cầu sử dụng LPĐTTĐ ngày càng tăng, trên thị trường đã có một số dược phẩm điều trị đích đang được lưu hành; tuy nhiên bệnh nhân muốn sử dụng LPĐTTĐ cần phải được làm xét nghiệm đột biến gen. Xuất phát từ thực tiễn đó, đề tài nghiên cứu **“Phát hiện gián tiếp đột biến gen EGFR trong ung thư biểu mô tuyến của phổi bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch”** được thực hiện với các mục tiêu sau:

1. *Khảo sát kỹ thuật hóa mô miễn dịch xác định đột biến gen EGFR.*
2. *Xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR trong ung thư biểu mô tuyến của phổi.*

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Sơ lược về dịch tế học ung thư phổi và các yếu tố nguy cơ

1.1.1. Dịch tế học

➤ Thế giới

Kể từ năm 1985, UTP đã đứng đầu trong các bệnh lý ung thư cả về tỉ lệ mắc và tử vong trên toàn cầu [10]. Tính tại thời điểm năm 2012, cả thế giới có khoảng 1,8 triệu ca UTP mới mắc (chiếm 12,9% tổng số ca ung thư mới mắc), 1,59 triệu ca tử vong (chiếm 19,4% tổng số ca tử vong do ung thư) [11]. Tại Hoa Kỳ, theo số liệu năm 2016 của American Cancer Society, số ca mắc mới UTP là 224390 ca (chiếm khoảng 13% tổng số ca ung thư mới mắc), số ca tử vong do UTP là 158080 ca. Cũng theo đó, tổng số ca tử vong do ung thư đại tràng (49190 ca), vú (40890 ca), tiền liệt tuyến (26120 ca) chỉ chiếm xấp xỉ gần 3/4 tổng số ca tử vong của UTP [1].

➤ Việt Nam

Ở Việt Nam, theo thống kê của Bộ Y tế, UTP đứng hàng thứ hai về tỉ lệ tử vong của các loại ung thư hằng năm ở cả hai giới nam và nữ. Mỗi năm cả nước có hơn 20000 bệnh nhân UTP mới được phát hiện và có tới 17000 trường hợp tử vong. Riêng tại Bệnh viện Phổi Trung ương, theo Lê Trung Thọ, tính đến năm 2012, số người mắc bệnh này đến khám và điều trị đã lên tới 16677 người [13]. Theo số liệu ghi nhận ung thư tại Hà Nội giai đoạn 2001 – 2004, ước tính hằng năm có 17073 trường hợp mắc mới UTP, trong đó có 12958 nam và

4115 nữ và là ung thư đứng đầu ở nam giới [2]. Theo Phạm Duy Hiền và cộng sự, nghiên cứu trên 1151 trường hợp UTP tại thành phố Hồ Chí Minh, UTBMT chiếm tỉ lệ rất cao, lên tới 48,54% [14]. Theo Phạm Nguyên Cường (2015), trong tổng số 258 trường hợp UTP có 67,1% là tít UTBMT, tít UTBM vảy chỉ chiếm 11,4%, các tít chiếm tỉ lệ rất nhỏ [15].

1.2. Một số đặc điểm lâm sàng – cận lâm sàng của ung thư phổi và ung thư biểu mô tuyến của phổi

1.2.1. Lâm sàng

- **Biểu hiện hô hấp**
 - **Biểu hiện toàn thân**
 - **Biểu hiện di căn**
- hoàng đả, đau xương...

1.2.2. Một số đặc điểm cận lâm sàng khác

1.2.2.1. Xquang thường quy (thẳng, nghiêng)

1.2.2.2. Chụp cắt lớp vi tính

1.2.2.3. Nội soi phế quản

1.3. Đặc điểm mô bệnh học ung thư biểu mô tuyến của phổi [3], [24]

1.3.1. Ung thư biểu mô tuyến xâm nhập thông thường

- Dạng phát triển Lepidic (Lepidic growth pattern)
 - Dạng phát triển chùm nang (Acinar growth pattern)
- Dạng phát triển nhú (Papillary growth pattern)
 - Dạng phát triển vi nhú (Micropapillary growth pattern)
- Dạng phát triển đặc (Solid growth pattern)

1.3.2. Các biến thể đặc biệt của ung thư biểu mô tuyến xâm nhập

- Ung thư biểu mô tuyến nhày xâm nhập (Invasive mucinous adenocarcinoma)
Ung thư biểu mô tuyến dạng keo (Colloid adenocarcinoma)
- Ung thư biểu mô tuyến tụy ruột (Enteric adenocarcinoma)
- Ung thư biểu mô tuyến bào thai (Fetal adenocarcinoma)

1.3.3. Ung thư biểu mô tuyến tại chỗ (Adenocarcinoma in situ - AIS)

1.3.4. Ung thư biểu mô tuyến xâm nhập tối thiểu (Minimally invasive adenocarcinoma - MIA)

1.4. Đột biến gen EGFR trên bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến của phổi

1.4.1. Đặc điểm phân tử EGFR

EGFR hay thụ thể yếu tố phát triển biểu bì, là một thành viên thuộc nhóm thụ thể xuyên màng có hoạt tính tyrosine kinase gồm 4 loại: ERBB1/Her1/EGFR, ERBB/Her2, ERBB/Her3 và ERBB/Her4 [28]. EGFR là glycoprotein có trọng lượng phân tử khoảng 170 kDa, xuất hiện ở một số mô có nguồn gốc biểu mô, trung mô và mô thần kinh [29].

EGFR có cấu trúc gồm 3 phần: phần ngoại màng có khả năng gắn đặc hiệu với ligand (EGF, TGF α ...), phần xuyên màng và phần nội màng. Phần nội màng bao gồm một vùng ngăn cạnh màng dài 38 axit amin và vùng tyrosine kinase chiếm khoảng 50% chiều dài vùng nội màng và đuôi carboxyl tận cùng [30].

1.4.2. Đột biến gen EGFR trong ung thư biểu mô tuyến của phổi

Đột biến gen EGFR chủ yếu xảy ra ở người Đông Á, không hút thuốc, phụ nữ [37]. Trong các tủy MBH của UTP thì UTBMT có tần suất mắc đột biến gen EGFR cao nhất. Các loại đột biến gen

EGFR chủ yếu gây ra sự phosphoryl hóa không phụ thuộc ligand của phân tử EGFR, dẫn đến sự kích hoạt liên tục các trục tín hiệu RAS/RAF, PI3K/AKT, STAT...Hậu quả là sự tăng sinh tế bào, ức chế quá trình chết theo chương trình, tăng sinh mạch máu, thoát khỏi kiểm soát miễn dịch của cơ thể đối với tế bào u.

1.5. Hóa mô miễn dịch

1.5.1. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch

Hóa mô miễn dịch (HMMD) là sự kết hợp giữa mô học và miễn dịch học nhằm xác định sự biểu hiện của một kháng nguyên riêng biệt của một mô và tình trạng kháng nguyên khác nhau của các tế bào trong cùng một mô, dựa vào tính chất đặc hiệu cao của các kháng thể để xác định các kháng nguyên riêng biệt. Từ đó nhận dạng đặc hiệu dòng các quần thể tế bào, xác định được các đặc tính sinh học và chức năng các tế bào trong cùng một dòng.

1.5.2. Các nguyên lý của phương pháp hóa mô miễn dịch

HMMD là một kỹ thuật nhuộm đặc biệt, sử dụng kháng thể (KT) đặc hiệu để xác định sự hiện diện của các kháng nguyên (KN) tương ứng trên các lát cắt mô học hoặc trên các loại tế bào có trong mô. Nguyên tắc là cho KT đặc hiệu lên mô, nếu trong mô có KN sẽ có phản ứng kết hợp KN – KT. Khi phản ứng xảy ra sẽ cho kết hợp với chất hiện màu và có thể nhìn thấy trên kính hiển vi quang học.

1.5.3. Yêu cầu kỹ thuật

Một chất được định vị trong mô trên HMMD phải có các tiêu chuẩn sau:

- Chất đó đã được tinh chế sẵn dưới dạng kháng nguyên tương đối thuần khiết (để sản xuất kháng thể đặc hiệu)
- Sự bảo toàn (ít nhất một phần) của chất kháng nguyên muốn

định vị trong quá trình thao tác kỹ thuật mô học và HMMD.

Khi cả hai điều trên được tôn trọng, kỹ thuật HMMD có thể được thực hiện hiệu quả.

1.5.4. Phương pháp

- Vật liệu kháng nguyên (KN) có mặt trong một mô và đặc biệt hơn trong một lát cắt mô phản ứng đặc hiệu với một kháng thể (KT) chống lại nó. Phản ứng miễn dịch này gây một lắng đọng của một KT đặc hiệu trên vùng mô có KN. Kháng thể này được gắn với một enzym, ban đầu người ta gắn với phosphatase acid, nhưng sự kết hợp này khó và không ổn định. Hiện nay người ta gắn với Peroxydase ổn định hơn và có thể bảo quản lâu hơn ở 4 độ C.

Các bước tiến hành

- Chuẩn bị tiêu bản
- Chuẩn bị dung dịch Tris – Buffer – Saline (TBS)
- Phục hồi nhóm quyết định kháng nguyên (Epitop Retrieval Techniques)
- Khử hoạt động men nội sinh
- Pha loãng kháng thể
- Nhuộm tiêu bản

Phương pháp nhuộm HMMD được thực hiện theo các bước:

1. Tiêu bản sau khi tẩy paraffin được nhúng nước cất 2 lần x 5 phút
2. Khử peroxydase nội sinh bằng dung dịch H₂O₂ x 20 phút
3. Rửa tiêu bản bằng nước cất 2 lần x 2 phút
4. Bộc lộ kháng nguyên bằng protein K hoặc nồi áp suất, lò vi sóng
5. Rửa nước cất 2 lần x 2 phút

6. Rửa tiêu bản bằng dung dịch TBS 2 lần x 2 phút
7. Phủ KT thứ nhất x 30 phút
8. Rửa tiêu bản TBS 2 lần x 5 phút
9. Phủ KT thứ hai x 30 phút
10. Rửa tiêu bản TBS 2 lần x 5 phút
11. Phủ dung dịch Diaminno Benzidine (DAB) x 1 phút
12. Rửa nước chảy x 5 phút
13. Nhuộm nhân bằng hematoxyline 1 phút
14. Khử nước, làm sạch tiêu bản rồi đọc kết quả trên kính hiển vi quang học

Điều kiện đọc kết quả:

- Sử dụng kháng thể EGFR clone DAK – H1- WT là kháng thể đơn dòng pha sẵn của hãng Dako

- Phải có chứng dương và âm trên tiêu bản

Đánh giá kết quả nhuộm EGFR trong UTBMT của Phổi theo Dako:

- 0(Âm tính): Không bắt màu trên màng bào tương hoặc bắt màu trong bào tương

- 1+: Màng bào tương bắt màu nhạt <10% tế bào u, bắt màu một phần màng bào tương

- 2+: Màng bào tương bắt màu trung bình >10% tế bào u, bắt màu hoàn toàn hoặc một phần màng bào tương

- 3+: Màng bào tương bắt màu đậm >10% tế bào u, bắt màu hoàn toàn màng bào tương tạo hình ảnh mạng lưới.

1.6. Một số phương pháp khác phát hiện đột biến gen EGFR

- **PCR – RFLP**
- **Giải trình tự gen**
- **Kỹ thuật Scorpion ARMS**

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng

Bao gồm khoảng 120 bệnh nhân được chẩn đoán trên sinh thiết là UTBMT nguyên phát của phổi, và được thực hiện xét nghiệm hóa mô miễn dịch tìm đột biến gen EGFR, tại Trung tâm Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Bạch Mai, trong thời gian từ tháng 01/2015 đến tháng 06/2017, thỏa mãn các tiêu chuẩn nghiên cứu.

2.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Thỏa mãn tiêu chuẩn chẩn đoán UTBMT phổi nguyên phát hoặc hướng tới UTBMT trên sinh thiết theo tiêu chuẩn và hướng dẫn chẩn đoán của WHO năm 2014, không phân biệt tuổi, giới.
- Được làm xét nghiệm tìm đột biến gen EGFR trên bệnh phẩm sinh thiết.
- Các trường hợp hồi cứu còn đủ tiêu bản nhuộm HE, PAS, block còn đủ bệnh phẩm đảm bảo cắt nhuộm, nhuộm thêm hóa mô miễn dịch nếu cần.

2.1.3. Tiêu chuẩn loại trừ

- Mọi trường hợp không thỏa mãn bất kì một tiêu chuẩn lựa chọn nào kể trên.
- Người bệnh có 2 ung thư.
- Người bệnh đã điều trị UTP ở nơi khác chuyển đến (hóa trị, xạ trị, điều trị đích hoặc phổi hợp).
- Vùng mô u trên sinh thiết quá ít hoặc hoại tử quá nhiều.

2.1.4. Địa điểm nghiên cứu

- Trung tâm Giải phẫu bệnh và Đơn vị Gen trị liệu Bệnh viện Bạch Mai

2.1.5. Thời gian nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện trong khoảng thời gian từ tháng 01/2015 đến tháng 06/2017.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang

2.2.2. Cỡ mẫu và chọn mẫu:

- Chọn mẫu không xác suất, loại mẫu mục đích dự kiến gồm 120 bệnh nhân hồi cứu, thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn trong thời gian nghiên cứu.

2.2.3. Biến số nghiên cứu

- Đặc điểm đối tượng nghiên cứu
- Thời gian phủ chất hiện màu DAB
- Đột biến gen EGFR
- Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện đột biến gen EGFR trên hóa mô miễn dịch và phương pháp PCR

2.2.4. Các bước tiến hành nghiên cứu

- Thu thập số liệu về tuổi, giới theo hồ sơ bệnh án.
- Thu thập các tiêu bản (nhuộm HE, PAS), block nén, tiến hành định tủy UTBMT và cắt nhuộm hóa mô miễn dịch xét nghiệm tìm đột biến EGFR.
- Lấy 20 block dương tính cắt 20 tiêu bản, nhuộm hóa mô miễn dịch với quy trình như trên, thay đổi thời gian phủ DAB ở 1 phút và 3 phút. Mỗi khoảng thời gian ta nhuộm 10 tiêu

bản và đánh giá chất lượng tiêu bản.

- Lấy 30 block bệnh phẩm (EGFR dương tính 1+, 2+, 3+; mỗi loại chọn ngẫu nhiên 10 block), khoanh vùng có nhiều tế bào ung thư gửi đơn vị Gen trị liệu Bệnh viện Bạch Mai để làm xét nghiệm tìm đột biến gen EGFR.

2.2.5. Xử lý số liệu

Các số liệu và kết quả thu thập được lưu trữ và xử lý trên máy vi tính, sử dụng phần mềm excel để thống kê.

2.2.6. Khía cạnh đạo đức nghiên cứu

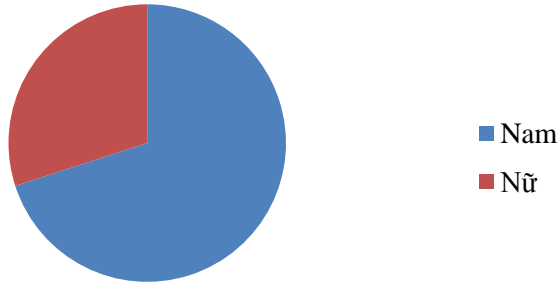
- Đề cương nghiên cứu đã được Hội đồng chấm đề cương luận văn thạc sỹ trường Đại học Công Nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua.
- Tất cả thông tin khai thác trên bệnh nhân và hồ sơ bệnh án đều được giữ bí mật.
- Tất cả biến số, chỉ số đều được thu thập, tính toán trung thực và khoa học.
- Nghiên cứu chỉ nhằm mục đích nâng cao chất lượng chẩn đoán, điều trị, đánh giá tiên lượng bệnh, phục vụ công tác chăm sóc sức khỏe nhân dân và nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

120 bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến của phổi được nghiên cứu và thực hiện xét nghiệm phát hiện đột biến gen EGFR với các kết quả như sau

3.1. Phân bố bệnh theo tuổi và giới



Biểu đồ 3.1: Phân bố bệnh theo giới

Bảng 3.1: Phân bố bệnh theo nhóm tuổi và giới

Giới \ Nhóm tuổi	Nam		Nữ	
	n	%	n	%
< 30 tuổi	0	0.00	0	0.00
30 – 39 tuổi	3	3.57	2	5.56
40 – 49 tuổi	10	11.90	5	13.89
50 – 59 tuổi	27	32.14	11	30.56
60 – 69 tuổi	26	30.95	14	38.89
> 70 tuổi	18	21.43	4	11.11
Tổng	84	100	36	100

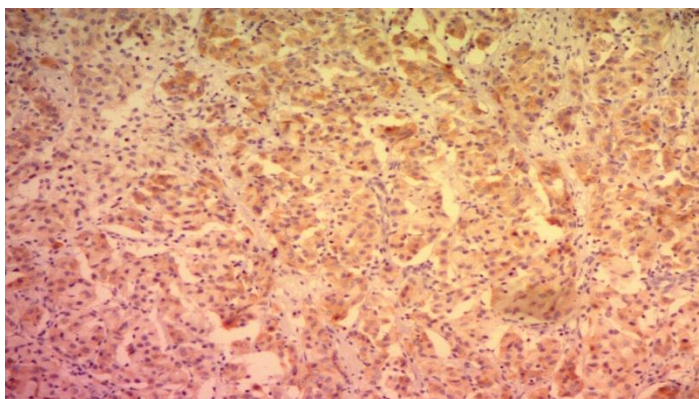
Nhận xét: Nhóm tuổi 50 – chiếm tỉ lệ cao nhất (32,14%), đứng thứ hai là nhóm 60 – 69 với tỉ lệ 30,95%. Như vậy, hai nhóm tuổi này chiếm tới 63,05%.

3.2. Chất lượng tiêu bản được phủ chất hiện màu ở thời gian 1 phút và 3 phút

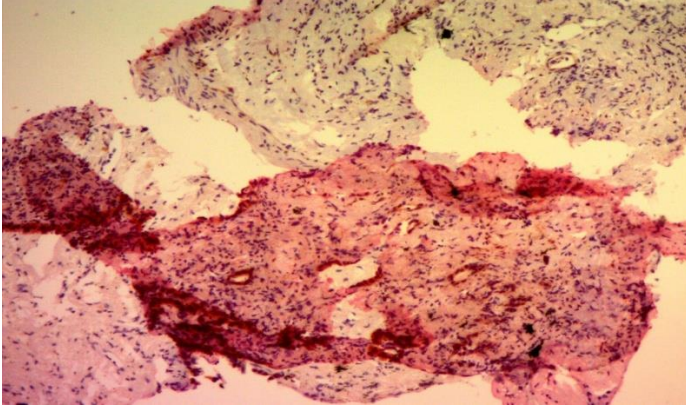
Bảng 3.2: Chất lượng tiêu bản được nhuộm HMMD và phủ DaB ở thời gian 1 phút và 3 phút

Thời gian phủ DAB Chất lượng tiêu bản	Phủ DAB 1 phút		Phủ DAB 3 phút	
	Số ca	Tỷ lệ %	Số ca	Tỷ lệ %
Tiêu bản đạt	10	100	08	80
Tiêu bản không đạt	0	0	2	20

Nhận xét: Trong 10 tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch có thời gian phủ DAB là 1 phút cho kết quả 100% số tiêu bản đạt chất lượng. Còn với thời gian phủ DAB 3 phút thì có 20% số tiêu bản không đạt chất lượng, tiêu bản bị nền và gấp bệnh phẩm.



Hình 3.1: Tiêu bản nhuộm lồi, phủ DAB lâu bị nền



Hình 3.2: Tiêu bản nhuộm HMMD bị lỗi, tiêu bản bị gấp xức

3.3. Hóa mô miễn dịch đột biến gen EGFR

3.3.1. Bộc lộ dấu ấn EGFR

Bảng 3.3: Bộc lộ dấu ấn EGFR

Dấu ấn EGFR	Số ca	Tỉ lệ (%)
Dương tính	100	83.33
Âm tính	20	16.67
Tổng	120	100

Nhận xét: 100/120 trường hợp bộc lộ dấu ấn EGFR dương tính, chiếm 83,33%; 20 trường hợp âm tính với EGFR (16,67%)

3.3.2. Bộ lậ dấu ấn EGFR đấnh giá theo mức độ biểu hiện trên HMMD

Bảng 3.4: Bộ lậ dấu ấn EGFR đấnh giá theo mức độ biểu hiện trên HMMD

Số ca Cường độ biểu hiện	0+	1+	2+	3+
	Nam giới	15	27	34
Nữ giới	5	15	11	5
Tổng	20	42	45	13

Nhận xét: có 87/120 trường hợp dương tính 1+ và 2+ với dấu ấn EGFR(72,50%); chỉ có 20 trường hợp âm tính với EGFR chiếm 24%.

3.4. Một số mối liên quan

3.4.1. Bộ lậ dấu ấn EGFR theo tuổi

Bảng 3.5: Bộ lậ dấu ấn EGFR theo tuổi

Tuổi EGFR	Dương tính		Âm tính	
	Số ca	Tỷ lệ %	Số ca	Tỷ lệ %
<60 tuổi	51	87.93	7	12.06
≥60 tuổi	49	79.03	13	20.96
Tỷ lệ chung	100	83.33	20	16.67

Nhận xét: Trong số những bệnh nhân <60 tuổi có 51/58 trường hợp EGFR dương tính (87,93%) và 7/58 trường hợp âm tính (12,06%). Với bệnh nhân ≥60 thì có 49/62 trường hợp dương tính (79,03%) và 13/62 trường hợp âm tính (20,96%).

3.4.2. Bộc lộ dấu ấn EGFR theo giới

Bảng 3.6: Bộc lộ dấu ấn EGFR theo giới

Giới \ EGFR	Dương tính		Âm tính	
	Số ca	Tỷ lệ %	Số ca	Tỷ lệ %
Nam	69	82.14	15	17.86
Nữ	31	86.11	5	13.39
Tỷ lệ chung	100	83.33	20	16.67

Nhận xét: Trong 84 trường hợp nam có 69/84 có EGFR dương tính (82,14%) và 15/84 trường hợp âm tính (17,85%). Với nữ giới là 31/36 trường hợp dương tính (86,11%) và 5/36 trường hợp âm tính (13,89%).

3.5. Đối chiếu kết quả giữa hóa mô miễn dịch và phương pháp PCR phát hiện đột biến gen EGFR trong UTBMT phổi

Bảng 3.7: kết quả giữa phương pháp HMMD và phương pháp PCR trong phát hiện đột biến gen EGFR

PCR \ HMMD	1+		2+		3+	
	Số ca	Tỷ lệ %	Số ca	Tỷ lệ %	Số ca	Tỷ lệ %
Dương tính	2	20	9	90	10	100
Âm tính	8	80	1	10	0	0

Nhận xét: Với mẫu bộc lộ dương tính 2+ và 3+ trên hóa mô miễn dịch thì cũng phát hiện đột biến gen EGFR bằng phương pháp PCR với tỷ lệ tương ứng là 90% và 100%.

Chương 4

BÀN LUẬN

Qua nghiên cứu 120 bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến phổi đến xét nghiệm tại Trung tâm Giải phẫu bệnh – Tế bào học Bệnh viện Bạch Mai, chúng tôi nhận thấy:

4.1. Một số đặc điểm về giới và tuổi

Kết quả của chúng tôi cho thấy có 84/120 trường hợp bệnh nhân là nam (70%), có 36/120 bệnh nhân nữ (30%). Tỷ lệ UTBMT của nam so với nữ là 2,33/1. Về kết quả nghiên cứu của chúng tôi và các tác giả khác đều nhận thấy nam giới có tỷ lệ mắc bệnh nhiều hơn nữ giới. Khi so sánh kết quả này với các tác giả khác thì tỷ lệ nam/nữ của chúng tôi khá tương đồng: Theo Burns D.M 1994 tỷ lệ nam/nữ là 3,2/1. Greenlee R.T, Murray T, Bolden và cộng sự 2000 tỷ lệ nam/nữ là 2,53/1. Theo Nguyễn Tiến Tuân 2004 tỷ lệ nam/nữ là 2,75/1. Lê Trung Thọ 2007 tỷ lệ nam/nữ 2,87/1. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với xu hướng phụ nữ mắc UTBMT phổi ngày càng cao trên thế giới.

Nghiên cứu đặc điểm tuổi của 120 bệnh nhân, chúng tôi thấy tuổi mắc thấp nhất là 32 tuổi, tuổi mắc cao nhất là 80 tuổi, tuổi mắc trung bình là 60 tuổi; nhóm tuổi có nhiều bệnh nhân UTBMT phổi nhất là nhóm tuổi 60-69 (có 40 trường hợp, chiếm 33,33%), tiếp đến là nhóm tuổi 50 -59 (có 38 trường hợp, chiếm 31,67%). Nhóm tuổi <30 không có bệnh nhân nào. Tính chung nhóm tuổi trung niên và tuổi già (trên 40 tuổi), tỷ lệ UTBMT phổi chiếm 95,94%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác, như:

Nguyễn Tiến Tuân (2004) nghiên cứu 60 bệnh nhân UTBMT phổi thấy độ tuổi có tỷ lệ mắc cao nhất là 51 -60 (chiếm 30,5%), lứa tuổi >41 chiếm 91,66%

Theo Hoàng Đình Chân (1996), tỷ lệ UTBMT phổi phân bố theo các nhóm như sau: 20 -40 tuổi chiếm 10,3%, nhóm tuổi 40 -60 chiếm 75,9%, lứa tuổi trên 60 chiếm 13,8%.

Nghiên cứu của Phùng Thị Phương Anh (1999) thì lứa tuổi <40 chiếm 7,75%, 40 -60 tuổi chiếm 59,68% và lứa tuổi >60 chiếm 32,56%.

Theo Lê Trung Thọ (2002), phân bố UTBMT phổi như sau: nhóm bệnh nhân <30 tuổi chiếm 0,35%, từ 30 - 40 tuổi chiếm 25,4%, nhóm tuổi 41 -50 chiếm 25,8%, nhóm tuổi 51 -60 chiếm 24,82%, từ 61 - 70 tuổi chiếm 31,56% và nhóm tuổi >70 chiếm 8,86%

Đa số các tác giả đều ghi nhận UTBMT phổi mắc nhiều nhất ở nhóm tuổi trung niên và người cao tuổi.

4.2. Thời gian phủ chất hiện màu ảnh hưởng đến chất lượng tiêu bản

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tiến hành thử nghiệm với 02 mốc thời gian phủ chất hiện màu DAB là 01 phút và 03 phút, nhận thấy tất cả các tiêu bản được phủ ở 1 phút đều đạt chất lượng, tiêu bản không bị nền, bắt màu lan tỏa. Còn ở khoảng thời gian là 03 phút thì chỉ có 80% tiêu bản đạt chất lượng và có thể đánh giá được. Từ đó chúng tôi xây dựng được quy trình tối ưu cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch phát hiện đột biến gen EGFR với thời gian phủ chất hiện màu khoảng 01 phút.

4.3. Bộc lộ EGFR

Ung thư phổi là một bệnh lý phổ biến có thể gây tử vong và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các ca tử vong do bệnh ung thư trên toàn thế giới. Ở những bệnh nhân có bệnh khu trú và chưa di căn qua hạch, phẫu thuật có thể mang lại tỷ lệ thời gian sống trong khoảng thời gian 5 năm là 40%

Kể từ khi ghi nhận có sự biểu hiện và hoạt động quá mức EGFR ở các khối u ở người và có liên quan đến hậu quả xấu trên lâm sàng; các thuốc ức chế EGFR – Tyrosine Kinase (EGFR – TKI) đã được phát triển và chứng minh hiệu quả điều trị ở những bệnh nhân UTBM tế bào không nhỏ đã thất bại với hóa trị trước đó. Điều trị đích phân tử tập trung chủ yếu vào các dấu ấn, con đường sinh học của tế bào có liên quan đến bệnh sinh gây ung thư. Trong hầu hết các trường hợp, bao gồm cả những bất thường phân tử liên quan đến chuyển dạng ác tính, các thụ thể trên bề mặt tế bào, các protein hoặc enzyme truyền tín hiệu, những enzyme liên quan đến phân bào, chết theo chương trình, di cú, xâm nhập hoặc biến đổi DNA. Những điều trị đích can thiệp vào những bước cụ thể liên quan đến sự hình thành và duy trì bệnh lý ác tính. Với các cơ chế tác động đặc hiệu, điều trị đích nhìn chung cải thiện được tình trạng dung nạp điều trị so với các điều trị hóa chất hiện tại. Tiến bộ trong sinh học ung thư phổi dẫn đến việc xác định các thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) tín hiệu dương như là một mục tiêu điều trị hàng đầu cho EGFR – TKI bao gồm erlotinib và gefitinib. Đáp ứng EGFR – TKI được Fukuoka M, Kris MG và CS báo cáo ở 10 -27% bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ sau thất bại với hóa trị liệu. Theo một số nghiên cứu trên

thế giới, tỷ lệ đáp ứng EGFR – TKI là 70 – 80% cho các khối u có đột biến EGFR và 10% cho các khối u không có đột biến. Các nhóm thuốc điều trị đích hiện nay được nghiên cứu hầu như đều có mục đích chính là ngăn chặn dòng thác tín hiệu đường truyền vào trong tế bào của EGFR. Hai nhóm thuốc chính hiện nay là: Kháng thể đơn dòng ức chế EGFR ở phần ngoài màng tế bào, chất ức chế tiêu phân tử tyrosine kinase EGFR. Việc nghiên cứu EGFR là để tiên lượng và tìm ra phương pháp điều trị hiệu quả cho bệnh nhân.

Qua nghiên cứu 120 bệnh nhân UTBMT phổi, tỷ lệ dương tính của EGFR là 83,33%, tỷ lệ âm tính của EGFR là 16,67%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ dương tính EGFR tương đồng với một số tác giả:

Nghiên cứu của Trịnh Tuấn Dũng và CS (2011) trên 62 trường hợp UTPKTBN được xét nghiệm bằng hóa mô miễn dịch, thấy tỷ lệ EGFR dương tính là 79,35%. Nghiên cứu của Hsu KH và CS có tỷ lệ EGFR dương tính là 74,2%

Tuy nhiên kết quả nghiên cứu của chúng tôi cao hơn kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả khác:

- Kết quả nghiên cứu của Allan R. Li và cs (2008) cho thấy tỷ lệ EGFR dương tính là 48%.

- Nghiên cứu của Ferenc Pinter (2008), tỷ lệ dương tính của EGFR là 59%

- Lynette M. Sholl, Beow Y. Yeap, A.John Iafrate và cs (2009), nghiên cứu trên 65 bệnh nhân UTBMt cho thấy tỷ lệ EGFR dương tính là 29,2%.

- Nghiên cứu của Ferenc Pinter (2008), tỷ lệ dương tính của EGFR là 59%

- Lynette M.Sholl, Beow Y. Yeap, A. John Iafrate và cs (2009), nghiên cứu trên 65 bệnh nhân UTBMT cho thấy tỷ lệ EGFR dương tính 29,2%

Có sự khác biệt về kết quả hóa mô miễn dịch với dấu ấn EGFR ở một số nghiên cứu trong và ngoài nước so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi vì mấy lý do sau:

- Khác về sử dụng kháng thể kháng protein EGFR đột biến: hiện trên thị trường có rất nhiều hàng sản xuất kháng thể này, do vậy độ nhạy của chúng không giống nhau.

- Mẫu mô làm xét nghiệm có trong tình trạng tốt hay không: có được vùi ngay trong dung dịch cố định formol trung tính 10% không.

- Trong cùng một khối u phổi không phải ở mọi vùng mô u các tế bào u cũng có đột biến giống nhau. Có nghĩa là có vùng tế bào u có đột biến EGFR, có vùng lại không có đột biến này.

4.4 Liên quan giữa bậc độ EGFR với các yếu tố

4.4.1. Liên quan giữa bậc độ EGFR với tuổi

Theo nghiên cứu của chúng tôi thì nhóm bệnh nhân <60 tuổi có 51/58 trường hợp EGFR dương tính (87,93%) và 7/58 trường hợp âm tính (12,06%). Với bệnh nhân ≥ 60 thì có 49/62 trường hợp dương tính (79,03%) và 13/62 trường hợp âm tính (20,96%).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu của Zhiyoung Liang và Cs (2010), tỷ lệ EGFR ở nhóm bệnh nhân <60 tuổi là 68.3% và nhóm bệnh nhân ≥ 60 là 68.5%.

Nghiên cứu của IPASS ở châu Á cho thấy tỷ lệ đột biến EGFR trong số bệnh nhân <65 tuổi là 56% và ≥65 tuổi là 68%

4.4.2. Liên quan giữa bậc độ EGFR với giới

Nghiên cứu của chúng tôi thấy trong 84 trường hợp nam có 69/84 có EGFR dương tính (82,14%) và 15/84 trường hợp âm tính (17,85%). Với nữ giới là 31/36 trường hợp dương tính (86,11%) và 5/36 trường hợp âm tính (13,89%).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu của Zhiyong Liang và CS (2010) nghiên cứu 133 trường hợp UTBMT phổi cho thấy tỷ lệ dương tính EGFR ở nam và nữ lần lượt là 66.1% và 70.4%.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khác với nghiên cứu của Marius I Ilie và cs (2010), tỷ lệ dương tính ở nữ là 54,5% và ở nam là 31.2%.

4.5. Đối chiếu kết quả giữa hóa mô miễn dịch và phương pháp PCR phát hiện đột biến gen EGFR trong UTBMT phổi

Nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy với mẫu bậc độ dương tính 2+ và 3+ trên hóa mô miễn dịch thì cũng phát hiện đột biến gen EGFR bằng phương pháp PCR với tỷ lệ tương ứng là 90% và 100%.

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch gen EGFR đặc hiệu E746 – A750 và L858R là khá cao và chỉ có hai loại này của đột biến EGFR (hai loại chính chiếm hơn 90%) được đánh giá bởi hóa mô miễn dịch còn các loại đột biến khác với tần số thấp hơn có thể không được kiểm tra bằng hóa mô miễn dịch vì chưa có kháng thể đột biến đặc hiệu (chưa sản xuất). Vì vậy nếu ung thư

phối với đột biến EGFR qua kiểm tra âm tính nên tiếp tục làm thêm phương pháp PCR. Tuy nhiên hóa mô miễn dịch là một phương pháp sang lọc hữu ích đầu tay cho việc phát hiện EGFR đột biến có chứa EGFR đột biến của E746 – A750 hoặc L858R có ý nghĩa cho việc điều trị nhắm đích.

Thử nghiệm hóa mô miễn dịch có một số ưu điểm hơn so với kỹ thuật phân tích DNA, chẳng hạn như có thể nghiên cứu mối liên quan giữa đặc điểm hình thái tế bào u với hiện tượng đột biến gen, trong khi đó không thể sử dụng kỹ thuật phân tích DNA cho toàn bộ mô u.

Tính không đồng nhất về đột biến EGFR trong mô u đã giải thích hiện tượng tế bào u tránh được liệu pháp điều trị trúng đích EGFR tyrosine kinase (TKI). Như vậy, một số tế bào u không bị đột biến EGFR sẽ vẫn sống sót sau điều trị nên u tiếp tục phát triển trở lại.

Phương pháp hóa mô miễn dịch có thể thực hiện được ngay cả khi mẫu mô rất nhỏ, thậm chí chỉ có vài tế bào u trong mảnh mô nhỏ đó. Điều này không thể thực hiện được bằng kỹ thuật phân tích DNA. Yêu cầu mẫu mô tối thiểu cho phân tích DNA theo kỹ thuật thông dụng hiện nay là số lượng tế bào u so với tế bào lành có trong mẫu sinh thiết cần đạt từ 30 – 50%. Nếu không đảm bảo điều này, kết quả phân tích DNA dễ bị âm tính giả.

Hiện nay, kỹ thuật pyrosequencing được công nhận là kỹ thuật phân tích DNA có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhất cũng cần số lượng tế bào u từ 5 – 10%. Tuy nhiên, đây là kỹ thuật phức tạp, trang thiết bị rất tốn kém nên thế giới mới chỉ có ít cơ sở có khả năng làm được xét nghiệm này.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 120 bệnh nhân UTBMT phổi được thực hiện xét nghiệm đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch tại trung tâm Giải phẫu bệnh – Tế bào học Bệnh viện Bạch Mai, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Phân bố bệnh theo tuổi: nhóm tuổi từ 50 – 69 có tỷ lệ mắc bệnh ung thư biểu mô tuyến của phổi cao nhất.
2. Tỷ lệ đột biến gen EGFR trong ung thư biểu mô tuyến của phổi chiếm 83,335