

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

TRẦN HẢI YẾN

NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG METHYL HOÁ
GEN *SEPTIN9* TRONG HUYẾT TƯƠNG
VÀ MẪU MÔ UNG THƯ Ở BỆNH NHÂN
UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2025

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

TRẦN HẢI YẾN

**NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG METHYL HOÁ
GEN *SEPTIN9* TRONG HUYẾT TƯƠNG
VÀ MẪU MÔ UNG THƯ Ở BỆNH NHÂN
UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN**

Ngành: Nội khoa (Nội tiêu hoá)

Mã số: 9 72 01 07

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Hướng dẫn khoa học:

1. TS. Hồ Hữu Thọ
2. TS. Dương Quang Huy

HÀ NỘI - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của tập thể cán bộ hướng dẫn. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực, không sao chép và chưa từng được công bố trong bất cứ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày.... tháng 12 năm 2025

Tác giả luận án

Trần Hải Yến

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban giám đốc Học viện Quân y, Đảng ủy, Ban giám đốc Bệnh viện Quân y 103, Phòng Sau đại học, Bộ môn Nội tiêu hóa, Phòng Công nghệ gen và Di truyền tế bào, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự - Học viện Quân y đã tạo điều kiện hết sức thuận lợi cho tôi được học tập - nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới các Thầy trong Hội đồng chấm luận án các cấp, các Thầy trong Bộ môn - Khoa Nội tiêu hóa, Học viện Quân y đã đóng góp những ý kiến quý báu cho tôi hoàn thiện luận án.

Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin chân thành cảm ơn TS. Hồ Hữu Thọ và TS. Dương Quang Huy là hai người thầy đã tận tâm trực tiếp hướng dẫn tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ nhân viên Bộ môn - Khoa Nội tiêu hóa, Bệnh viện Quân y 103. Tôi cũng gửi lời cảm ơn đến tập thể phòng Công nghệ gen và Di truyền, Viện Nghiên cứu sinh Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y đã hỗ trợ tôi trong thời gian theo học, làm thí nghiệm.

Tôi xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè đồng nghiệp, đã tạo điều kiện, động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin chân thành cảm ơn tất cả người bệnh đã tin tưởng, hợp tác giúp tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Tác giả luận án

Trần Hải Yên

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

DANH MỤC SƠ ĐỒ

DANH MỤC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đặc điểm chung ung thư biểu mô tế bào gan	3
1.1.1. Một số đặc điểm dịch tễ học	3
1.1.2. Các yếu tố nguy cơ	4
1.1.3. Cơ chế bệnh sinh.....	5
1.2. Đặc điểm lâm sàng và phương pháp chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan. 7	
1.2.1. Đặc điểm lâm sàng.....	7
1.2.2. Chẩn đoán hình ảnh	8
1.2.3. Chẩn đoán mô bệnh học.....	10
1.2.4. Dấu ấn sinh học truyền thống	12
1.2.5. Dấu ấn sinh học tiềm năng đang nghiên cứu.....	14
1.2.6. Hướng dẫn chẩn đoán	16
1.2.7. Chẩn đoán giai đoạn	18
1.3. Methyl hóa gen <i>SEPTIN9</i> và ứng dụng trong ung thư biểu mô tế bào gan. 19	
1.3.1. Cấu trúc và chức năng gen <i>SEPTIN9</i>	19
1.3.2. Methyl hóa gen <i>SEPTIN9</i> và cơ chế sinh ung thư.....	21
1.3.3. Vai trò của m <i>SEPT9</i> trong ung thư biểu mô tế bào gan.....	24

1.4. Các nghiên cứu methyl hóa gen <i>SEPTIN9</i> ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan trên thế giới và Việt Nam	29
1.4.1. Trên thế giới.....	29
1.4.2. Tại Việt Nam	33
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
2.1. Đối tượng nghiên cứu	36
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn.....	36
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	38
2.2. Phương pháp nghiên cứu	39
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.	39
2.2.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu	39
2.2.3. Thời gian, địa điểm nghiên cứu.....	41
2.2.4. Trang thiết bị, hóa chất dùng trong nghiên cứu.....	41
2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu.....	44
2.3.1. Khám và đánh giá lâm sàng - cận lâm sàng	44
2.3.2. Thu thập và bảo quản mẫu sinh học	46
2.3.3. Đánh giá mức độ methyl hóa gen <i>SEPTIN9</i>	49
2.4. Chỉ tiêu nghiên cứu và tiêu chuẩn đi kèm	55
2.4.1. Chỉ tiêu lâm sàng	56
2.4.2. Chỉ tiêu cận lâm sàng.....	57
2.4.3. Chỉ tiêu đặc điểm khối u gan trên chẩn đoán hình ảnh	57
2.4.4. Chỉ tiêu mô bệnh học	58
2.4.5. Chỉ tiêu chức năng gan và giai đoạn bệnh.....	58
2.4.6. Chỉ tiêu mức độ methyl hóa gen <i>SEPTIN9</i>	60
2.5. Phân tích và xử lý số liệu.....	60
2.6. Đạo đức nghiên cứu	62
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	64
3.1. Đặc điểm nhóm nghiên cứu.....	64

3.1.1. Đặc điểm tuổi, giới	64
3.1.2. Đặc điểm yếu tố nguy cơ	66
3.1.3. Đặc điểm lâm sàng nhóm bệnh nhân UTBMTBG	66
3.1.4. Đặc điểm cận lâm sàng	68
3.1.5. Đặc điểm khối u gan và mô bệnh học	71
3.1.6. Đặc điểm chức năng gan và giai đoạn bệnh	73
3.2. Mức độ methyl hóa gen <i>SEPTIN9</i> trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư và mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở BN ung thư biểu mô tế bào gan	74
3.2.1. Mức độ methyl hóa gen <i>SEPTIN9</i> trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư ở BN ung thư biểu mô tế bào gan.....	75
3.2.2. Mối liên quan giữa mức độ mSEPT9 huyết tương với lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân UTBMTBG.....	80
3.3. Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan.....	89
3.3.1. Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan.....	89
3.2.2. Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan có AFP < 20ng/mL	92
3.3.3. Giá trị của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan giai đoạn rất sớm và sớm.....	95
3.3.4. Giá trị của phối hợp mSEPT9 huyết tương với nồng độ AFP huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG.....	98
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....	103
4.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu	103
4.1.1. Đặc điểm tuổi, giới tính và yếu tố nguy cơ	103
4.1.2. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu..	105
4.1.3. Đặc điểm chức năng gan và giai đoạn UTBMTBG	113

4.2. Mức độ methyl hoá gen <i>SEPTIN9</i> trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư và mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan	115
4.2.1. Mức độ methyl hóa gen <i>SEPTIN9</i> trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ở bệnh nhân UTBMTBG	115
4.2.2. Mối liên quan giữa mức độ methyl hoá gen <i>SEPTIN9</i> huyết tương với lâm sàng, cận lâm sàng ở BN UTBMTBG.....	120
4.3. Giá trị của mức độ m <i>SEPT9</i> huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan	126
4.3.1. Giá trị chẩn đoán UTBMTBG so với các nhóm tham chiếu	126
4.3.2. Giá trị chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL	131
4.3.3. Giá trị chẩn đoán UTBMTBG ở giai đoạn rất sớm và sớm	132
4.3.4. Giá trị chẩn đoán UTBMTBG của mức độ m <i>SEPT9</i> kết hợp với AFP huyết tương	133
HẠN CHẾ CỦA ĐỀ TÀI	135
KẾT LUẬN	136
KIẾN NGHỊ	138
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ	
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
1	AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases (Hội nghiên cứu bệnh gan Hoa Kỳ)
2	AFP	Alpha-fetoprotein
3	AFP-L3	Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein
4	ALT	Alanine aminotransferase
5	APASL	Asian Pacific Association for the Study of the Liver (Hội nghiên cứu bệnh gan Châu Á Thái Bình Dương)
6	AST	Aspartate aminotransferase
7	AUC	Area under the curve (Diện tích dưới đường cong)
8	BCLC	Barcelona clinic liver cancer (Ung thư gan lâm sàng Barcelona)
9	BGMT	Bệnh gan mạn tính
10	BN	Bệnh nhân
11	CHT	Cộng hưởng từ
12	circRNA	Circle RNA (RNA vòng)
13	CLVT	Cắt lớp vi tính
14	CS	Cộng sự
15	Ct	Cycle threshold (Chu kỳ ngưỡng)
16	CTC	Circulating tumor cells (Tế bào u lưu hành)
17	CtDNA	Circulating tumor DNA (DNA khối u lưu hành)
18	DCP	Des - gamma - carboxyprothrombin
19	ddPCR	Droplet digital PCR (PCR kỹ thuật số vi giọt)
20	DNA	Deoxyribonucleic acid
21	EASL	European Association for the Study of the Liver (Hội nghiên cứu bệnh gan Châu Âu)

STT	Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
22	ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group (Nhóm hợp tác ung thư phương Đông)
23	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzyme)
24	ES	Hệ thống Edmondson - Steiner
25	ESMO	European Society for Medical Oncology (Hội Ung thư Nội khoa châu Âu)
26	ExBP	Extendable blocking probe (Mẫu dò khóa kéo dài)
27	GTPase	Guanosine triphosphatase
28	HBV	Hepatitis B virus (<i>Virus viêm gan B</i>)
29	HBsAg	Hepatitis B surface antigen (Kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B)
30	HCV	Hepatitis C virus (<i>Virus viêm gan C</i>)
31	HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1 (Yếu tố cảm ứng giảm oxy)
32	HSC	Hepatic stellate cell (<i>Tế bào hình sao ở gan</i>)
33	JNK	Jun N-terminal kinase
34	IARC	International Agency for Research on Cancer (Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế)
35	LI-RADS	The Liver Imaging Reporting and Data System (Hệ thống dữ liệu và báo cáo hình ảnh gan)
36	LncRNA	long non-coding RNA (RNA dài không mã hóa)
37	miRNA	microRNA (RNA nhỏ không mã hóa)

STT	Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
38	mRNA	Messenger RNA (<i>RNA thông tin</i>)
39	mSEPT9	methyly hóa gen <i>SEPTIN9</i>
40	NASH	Non-alcoholic steatohepatitis (<i>Viêm gan nhiễm mỡ không do rượu</i>)
41	NAFLD	Nonalcoholic Fatty Liver Disease) (<i>Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu</i>)
42	NGS	Next generation sequencing (<i>Giải trình tự gen thế hệ mới</i>)
43	NKM	Người khỏe mạnh
44	PET-scan	Positron Emission Tomography - scan (<i>Chụp cắt lớp phát xạ positron</i>)
45	qMSP	Quantitative Methylation-Specific PCR (<i>PCR định lượng đặc hiệu methyly hóa</i>)
46	RNA	Ribonucleic acid
47	<i>SEPTIN9</i>	Gen <i>SEPTIN9</i>
48	SUE	Septin unique element (<i>Vùng đặc hiệu Septin</i>)
49	TALTC	Tăng áp lực tĩnh mạch cửa
50	TERT	Telemerase reverse transcriptase
51	TMC	Tĩnh mạch cửa
52	UTBMTBG	Ung thư biểu mô tế bào gan
53	VEGF	Vascular endothelial growth factor (<i>Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu</i>)
54	WHO	The World Health Organization (<i>Tổ chức y tế thế giới</i>)

DANH MỤC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
1.1.	Đánh giá độ biệt hóa của UTBMTBG theo WHO 2019	11
2.1.	Trình tự của các mồi cho semi-nested realtime PCR.....	43
2.2.	Thành phần phản ứng PCR vòng 1	51
2.3.	Thành phần phản ứng PCR vòng 2 đặc hiệu cho mSEPT9	52
2.4.	Thành phần phản ứng PCR vòng 2 xác định SEPTIN9 tổng số	53
2.5.	Các thông số cận lâm sàng.....	57
2.6.	Đánh giá chức năng gan theo Child-Pugh	58
2.7.	Đánh giá chức năng gan theo điểm ALBI	59
2.8.	Phân loại giai đoạn UTBMTBG theo BCLC.....	59
2.9.	Điểm tổng trạng theo ECOG.....	59
3.1.	Đặc điểm tuổi của các nhóm nghiên cứu	64
3.2.	Đặc điểm giới tính của các nhóm nghiên cứu.....	65
3.3.	Đặc điểm các yếu tố nguy cơ nhóm UTBMTBG và BGMT.....	66
3.4.	Đặc điểm lý do phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan	66
3.5.	Đặc điểm chỉ số huyết học nhóm UTBMTBG và BGMT.....	68
3.6.	Đặc điểm một số chỉ số chức năng gan và enzyme gan nhóm UTBMTBG và BGMT	69
3.7.	Đặc điểm nồng độ AFP huyết tương ở các nhóm nghiên cứu.....	70
3.8.	Đặc điểm khối u gan ở nhóm BN UTBMTBG	71
3.9.	Đặc điểm mô bệnh học khối u gan	72
3.10.	Mức độ suy gan theo thang điểm Child-Pugh và ALBI ở BN UTBMTBG	73
3.11.	Mối tương quan giữa mSEPT9 trong mẫu huyết tương và mẫu mô ung thư theo yếu tố nguy cơ	77

Bảng	Tên bảng	Trang
3.12.	Mối tương quan giữa mSEPT9 trong huyết tương và mẫu mô ung thư theo phân nhóm AFP, gánh nặng khối u và giai đoạn bệnh	78
3.13.	Mối tương quan giữa mSEPT9 trong huyết tương và mẫu mô ung thư theo phân nhóm mô bệnh học	79
3.14.	Mối liên quan giữa mSEPT9 huyết tương với tuổi, giới và yếu tố nguy cơ	80
3.15.	Mối liên quan giữa mSEPT9 huyết tương với một số triệu chứng lâm sàng	81
3.16.	Mối liên quan giữa mSEPT9 trong huyết tương với một số chỉ số xét nghiệm máu	82
3.17.	Mối liên quan giữa mSEPT9 với nồng độ AFP huyết tương	83
3.18.	Tương quan giữa giá trị ΔCt của mSEPT9 huyết tương với một số chỉ số xét nghiệm và thang điểm đánh giá chức năng gan.....	84
3.19.	Mối liên quan giữa mSEPT9 trong huyết tương với gánh nặng khối u	85
3.20.	Mối liên quan giữa mSEPT9 trong huyết tương với độ biệt hóa tế bào u trên mô bệnh học	86
3.21.	So sánh mức độ mSEPT9 huyết tương ở các đối tượng nghiên cứu	89
3.22.	Giá trị của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG.....	90
3.23.	mSEPT9 huyết tương ở nhóm UTBMTBG có AFP < 20ng/mL so với nhóm BGMT và NKM.....	92
3.24.	Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL so với các nhóm tham chiếu	93
3.25.	So sánh mức độ mSEPT9 huyết tương ở nhóm UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm so với nhóm BGMT và NKM.....	95
3.26.	Giá trị mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm so với các nhóm tham chiếu	96

Bảng	Tên bảng	Trang
3.27.	Giá trị của phối hợp mSEPT9 với AFP huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG	98
3.28.	So sánh giá trị phối hợp mSETP9 và AFP huyết tương với mSEPT9, AFP đơn thuần trong chẩn đoán UTBMTBG	99
3.29.	Giá trị của phối hợp mSEPT9 với AFP huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm	100
3.30.	So sánh giá trị phối hợp mSETP9 và AFP huyết tương với mSEPT9, AFP đơn thuần trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn sớm và rất sớm ...	100
3.31.	Phân tích hồi quy logistic đánh giá giá trị của một số yếu tố trong chẩn đoán UTBMTBG	102
4.1.	Tỷ lệ các yếu tố nguy cơ của UTBMTBG ở một số nghiên cứu	104
4.2.	So sánh giá trị AFP huyết tương giữa các nghiên cứu	109
4.3.	So sánh tỷ lệ suy chức năng gan theo Child - Pugh giữa các nghiên cứu	113
4.4.	So sánh giá trị AUC, độ nhạy và độ đặc hiệu của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm tham chiếu	128

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ	Tên biểu đồ	Trang
3.1.	Phân bố đối tượng nghiên cứu theo nhóm tuổi.....	65
3.2.	Một số triệu chứng lâm sàng ở nhóm ung thư biểu mô tế bào gan	67
3.3.	Đánh giá giai đoạn UTBMTBG theo BCLC	74
3.4.	So sánh giá trị ΔCt của <i>mSEPT9</i> trong huyết tương giữa nhóm UTBMTBG và nhóm tham chiếu	75
3.5.	So sánh giá trị ΔCt của <i>mSEPT9</i> giữa mẫu huyết tương và mẫu mô ung thư	76
3.6.	Mối tương quan giữa giá trị ΔCt của <i>mSEPT9</i> huyết tương và ΔCt của <i>mSEPT9</i> trong mô ung thư	77
3.7.	Mối liên quan giữa mức độ <i>mSEPT9</i> huyết tương với chức năng gan theo phân loại Child-Pugh	87
3.8.	Giá trị ΔCt <i>mSEPT9</i> trong huyết tương theo chức năng gan theo điểm ALBI	87
3.9.	Giá trị ΔCt <i>mSEPT9</i> trong huyết tương theo giai đoạn bệnh BCLC 2018	88
3.10.	Đường cong ROC của <i>mSEPT9</i> huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm không ung thư	91
3.11.	Đường cong ROC của <i>mSEPT9</i> huyết tương chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm BGMT (a) và NKM (b)	91
3.12.	Đường cong ROC của <i>mSEPT9</i> trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL so với nhóm không ung thư (BGMT+NKM).....	94
3.13.	Đường cong ROC của <i>mSEPT9</i> trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL so với nhóm BGMT (a) và NKM (b).....	94
3.14.	Đường cong ROC của <i>mSEPT9</i> trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm so với nhóm không ung thư.....	97

Biểu đồ	Tên biểu đồ	Trang
3.15.	Đường cong ROC của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm so với nhóm BGMT (a) và NKM (b).....	97
3.16.	So sánh AUC của phối hợp mSEPT9 và AFP huyết tương với mSEPT9, AFP đơn thuần trong chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm BGMT	99
3.17.	So sánh AUC của phối hợp mSEPT9 và AFP huyết tương với mSEPT9, AFP đơn thuần trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm	101

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ	Tên sơ đồ	Trang
1.1.	Sơ đồ chẩn đoán UTBMTBG theo Bộ Y tế Việt Nam (2020)	17
1.2.	Phân loại giai đoạn UTBMTBG và phương pháp điều trị tương ứng theo BCLC (2018).....	19

DANH MỤC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1.	Các yếu tố nguy cơ của UTBMTBG	5
1.2.	Phân loại chẩn đoán UTBMTBG theo LI-RADS.....	9
1.3.	Đặc điểm cấu trúc và chức năng sinh học của <i>SEPTIN9</i>	21
1.4.	Mô hình về quá trình methyl hóa DNA như dấu ấn sinh học trong bệnh ung thư	24
1.5.	Sơ đồ phát triển từ gan bình thường tới viêm gan mạn, xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan	25
1.6.	Chức năng của <i>SEPTIN9</i> trong quá trình xơ hóa gan.....	26
2.1.	Sơ đồ xét nghiệm semi-nested realtime PCR định lượng m <i>SEPT9</i>	54

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) chiếm hơn 90% ung thư gan nguyên phát, thường gặp thứ 6 trong các loại ung thư phổ biến, với tỉ lệ tử vong đứng hàng thứ 3 trong số các loại ung thư trên phạm vi toàn cầu, chỉ sau ung thư phổi và ung thư đại trực tràng [1].

Tại Việt Nam, UTBMTBG nằm trong nhóm 5 loại ung thư phổ biến nhất, đặc biệt ở nam giới với tỷ lệ tử vong cao nhất chiếm đến 19,4% số ca tử vong hàng năm do ung thư [1]. Đa phần khi được chẩn đoán UTBMTBG đã ở giai đoạn tiến triển, khối u lớn nên không còn cơ hội điều trị phẫu thuật cũng như áp dụng các phương pháp trị liệu tích cực khác [2]. Vì vậy, việc phát hiện UTBMTBG ở giai đoạn sớm là yếu tố then chốt nhằm cải thiện kết quả điều trị và tiên lượng bệnh.

Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán UTBMTBG chủ yếu dựa trên chẩn đoán hình ảnh và xét nghiệm máu phát hiện các dấu ấn sinh học của khối u, trong đó Alpha fetoprotein (AFP) là dấu ấn được công nhận sử dụng rộng rãi trong các khuyến cáo sàng lọc bệnh và chẩn đoán hiện nay [3]. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu ghi nhận có khoảng 30 - 40% bệnh nhân (BN) UTBMTBG có mức AFP âm tính ($< 20\text{ng/mL}$) [3], thêm vào đó theo hướng dẫn của Hội nghiên cứu bệnh gan Hoa Kỳ (AASLD) năm 2023, AFP không đủ độ nhạy và độ đặc hiệu để sử dụng trong xét nghiệm sàng lọc [4].

Trong bối cảnh đó, nhu cầu tìm kiếm các dấu ấn sinh học mới, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn, đồng thời có khả năng phát hiện sớm UTBMTBG bằng các phương pháp không xâm lấn là rất cấp thiết. Một trong những hướng nghiên cứu tiềm năng hiện nay là nghiên cứu biến đổi di truyền biểu sinh - đặc biệt là hiện tượng methyl hóa bất thường tại vùng khởi đầu phiên mã (promoter) các gen kìm hãm khối u (tumor suppressor gene) - trong đó có methyl hóa gen *SEPTIN9* (mSEPT9) [5]. Gen *SEPTIN9* là chất điều hòa chính của quá trình

phân chia tế bào và kìm hãm khối u, khi quá trình methyl hóa gen tăng sẽ thúc đẩy tăng sinh tế bào, trong đó có tế bào gan [5], [6], [7]. Biểu hiện gen *SEPTIN9* phổ biến ở mô lành nhưng bị giảm hoặc bất hoạt bởi quá trình tăng methyl hóa bất thường ở BN UTBMTBG [8]. Gần đây, một số nghiên cứu ghi nhận có thể phát hiện được m*SEPT9* trong huyết tương của BN UTBMTBG, phản ánh biến đổi di truyền biểu sinh đặc hiệu từ khối u gan. Việc phân tích song song tình trạng m*SEPT9* cả mẫu huyết tương và mẫu mô trong UTBMTBG không chỉ giúp xác định mối liên hệ giữa biến đổi di truyền tại khối u và sự hiện diện của cell free DNA lưu hành trong máu, mà còn góp phần làm rõ độ chính xác và giá trị sinh học của m*SEPT9*, từ đó ứng dụng m*SEPT9* huyết tương để chẩn đoán, tiên lượng và đánh giá hiệu quả điều trị UTBMTBG [9], [10], [11]. Một trong những tiền đề quan trọng cho nghiên cứu này là quy trình định lượng m*SEPT9* với độ nhạy cao đã được nhóm tác giả thiết lập thành công tại phòng thí nghiệm trong nước [12], từ đó hướng tới chủ động bộ sinh phẩm chẩn đoán, giảm giá thành so với kit thương mại phát hiện định tính m*SEPT9* hiện nay, và phù hợp để ứng dụng thường quy trong điều kiện y tế Việt Nam. Do đó, việc nghiên cứu sâu hơn vai trò của m*SEPT9*, đặc biệt là mối tương quan giữa mẫu huyết tương và mẫu mô cũng như giá trị chẩn đoán UTBMTBG là rất cần thiết, nhằm tối ưu hóa ứng dụng của dấu ấn này trong thực hành lâm sàng.

Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài ***“Nghiên cứu tình trạng methyl hoá gen SEPTIN9 trong huyết tương và mẫu mô ung thư ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan”*** nhằm 2 mục tiêu:

- 1. Đánh giá mức độ methyl hoá gen SEPTIN9 trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư và mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan.***
- 2. Đánh giá giá trị của mức độ methyl hóa gen SEPTIN9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan.***

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đặc điểm chung ung thư biểu mô tế bào gan

1.1.1. Một số đặc điểm dịch tễ học

1.1.1.1. Trên thế giới

Năm 2022, trên toàn cầu ghi nhận 866.136 ca mắc mới UTBMTBG (chiếm 4,3% tổng số ca ung thư), trong đó châu Á, đặc biệt Đông và Đông Nam Á có tỷ lệ mắc cao nhất (11,7/100.000 dân), còn châu Âu và châu Đại Dương có tỷ lệ mắc thấp hơn nhiều chỉ khoảng 3,0 - 4,8/100.000 dân. Trung Quốc, Mông Cổ và Việt Nam nằm trong nhóm có tỷ lệ mắc cao nhất [1]. Cùng năm, có 758.725 ca tử vong do UTBMTBG (chiếm 7,8% tổng số ca tử vong do ung thư), xếp thứ ba sau ung thư phổi và ung thư đại trực tràng; châu Á cũng là nơi ghi nhận tỷ lệ tử vong cao nhất, nhất là ở các nước có tỷ lệ nhiễm virus viêm gan B (Hepatitis B virus - HBV) cao. UTBMTBG có tiên lượng sống kém, với thời gian sống < 1 năm ở giai đoạn tiến triển, trong khi BN giai đoạn sớm được điều trị triệt căn có thể đạt tỷ lệ sống 5 năm gần 70%, nhấn mạnh tầm quan trọng của chẩn đoán sớm [13].

1.1.1.2. Tại Việt Nam

Theo GLOBOCAN 2022, UTBMTBG là loại ung thư phổ biến thứ hai về tỉ lệ mắc mới và đứng đầu về tỉ lệ tử vong tại Việt Nam, với khoảng 24.500 ca mắc mới và 23.300 ca tử vong, tương ứng tỉ lệ mắc chuẩn hóa độ tuổi khoảng 150,8/100.000 dân và tỉ lệ tử vong là 132,6/100.000 dân. Tỷ lệ mắc bệnh ở nam giới cao gấp 3 - 4 lần nữ giới [1]. Tuy nhiên, số liệu trên chưa đầy đủ vì ở Việt Nam chưa có thống kê toàn diện về tỷ lệ mắc ung thư gan trên phạm vi cả nước mà chủ yếu dựa trên đánh giá của một số bệnh viện ở ba miền Bắc, Trung, Nam. Theo thống kê của tác giả Nguyễn Đình Song Huy và cộng sự (CS) ở miền Nam và miền Trung Việt Nam từ năm 2010 đến năm 2016 khi phân tích dữ liệu 24.091 BN UTBMTBG cho thấy tỷ lệ nam giới chiếm đa số (81,8%) và 8,5%

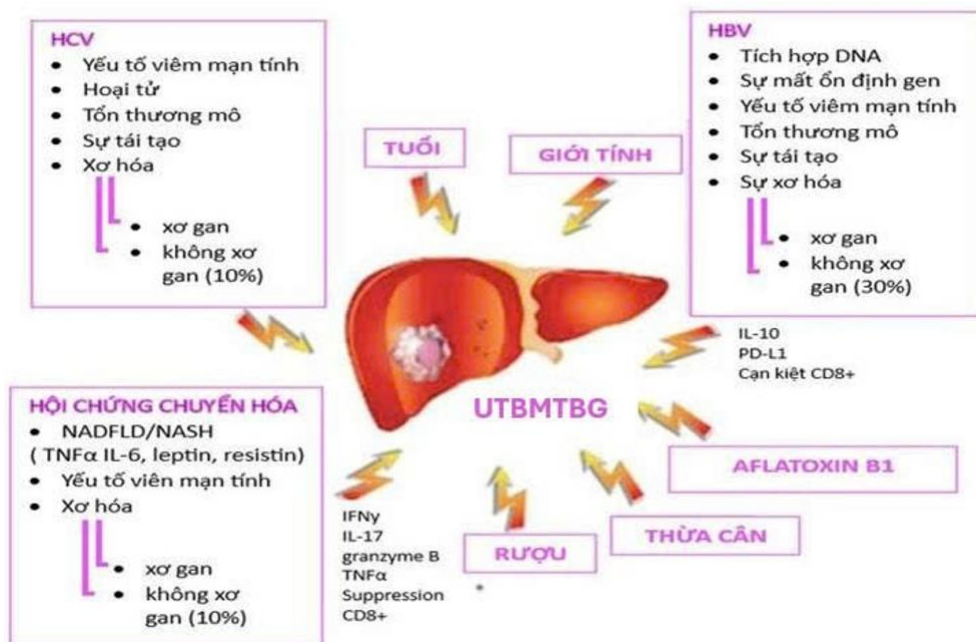
BN phát hiện bệnh dưới 40 tuổi [14]. Nhiễm HBV được tìm thấy ở 62,3% trường hợp và 26% nhiễm virus viêm gan C (Hepatitis C virus - HCV). Xơ gan được xác định trong khoảng 30% đến 40% trường hợp, và khoảng 9% BN không bị bệnh lý gan mạn tính [14]. Tại miền Bắc, nghiên cứu tại Bệnh viện Bạch Mai (2018 - 2019) trên 224 BN ghi nhận tuổi trung bình là 59,4 tuổi, nam giới chiếm ưu thế với tỷ lệ nam/nữ là 5:1, tỷ lệ nhiễm HBV lên tới 75,5% [15]. Tác giả Phạm Văn Hùng và CS nghiên cứu tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội (2019 - 2021) cho thấy với tỷ lệ nam/nữ khoảng 2:1, chủ yếu ở độ tuổi trên 60, HBV là yếu tố nguy cơ phổ biến nhất, chiếm gần 70% số ca, trong khi khoảng 71% BN có tiền sử sử dụng rượu, tỷ lệ phát hiện ở giai đoạn rất sớm (BCLC 0) chỉ 2%, trong khi BCLC C chiếm 37% [16].

1.1.2. Các yếu tố nguy cơ

Tỷ lệ các yếu tố nguy cơ chính gây UTBMTBG có sự khác biệt đáng kể giữa các khu vực trên thế giới. Ở khu vực châu Á, đặc biệt là khu vực Đông Á và Đông Nam Á (ngoại trừ Nhật Bản), nhiễm HBV vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây UTBMTBG chiếm hơn 60% tổng số trường hợp. Tại Việt Nam, nhiễm HBV cũng là gánh nặng chính gây nên UTBMTBG tương tự như các quốc gia trong khu vực [17]. HBV là virus DNA vòng sợi kép, có khả năng tích hợp vào hệ gen của vật chủ, làm bất hoạt gen kìm hãm khối u, đồng thời kích hoạt các con đường truyền tín hiệu thúc đẩy sinh ung thư, điển hình là con đường β -catenin [18]. Nguy cơ phát triển UTBMTBG ở những người nhiễm HBV dao động từ 0,9 - 5,4% mỗi năm ở BN đã tiến triển đến xơ gan và từ 0,01 - 1,4% mỗi năm ở BN chưa xơ gan [17]. Bệnh cạnh HBV, nhiễm HCV cũng là yếu tố nguy cơ quan trọng. Nhiễm HCV chiếm tỷ lệ cao nhất tại Bắc Phi và Trung Đông (39,6%), tiếp theo là châu Âu (21,6%) và châu Mỹ (20,6%), trong khi ở Đông Á tỷ lệ này chỉ khoảng 9,8% [19]. Theo thời gian, nguy cơ tích lũy UTBMTBG sau 30 năm thông qua cơ chế gián tiếp gây viêm gan mạn, xơ hóa gan và xơ gan có thể lên tới 1% đến 4% [20].

Bệnh gan do rượu là yếu tố nguy cơ của UTBMTBG ưu thế tại châu Âu (34,5%) và châu Mỹ (29,4%), nhưng ít gặp hơn ở Đông Á (9,8%) [19]. Trong đó, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) đang nổi lên như một yếu tố nguy cơ ngày càng quan trọng, với tỷ lệ cao tại châu Mỹ (13,5%) và châu Âu (11,1%), trong khi ở Đông Á chỉ ở mức 4,7%. Ngoài ra, Aflatoxin cũng được xác nhận là yếu tố nguy cơ gây UTBMTBG, có tác dụng hiệp đồng với HBV, làm tăng đáng kể khả năng hình thành và phát triển UTBMTBG [21].

Xơ gan được chứng minh là yếu tố nguy cơ mạnh nhất của UTBMTBG. Tỷ lệ mắc UTBMTBG tăng lên ở BN xơ gan tùy thuộc vào nguyên nhân gây xơ gan. Cơ chế liên quan chủ yếu xuất phát từ tình trạng viêm mạn tính, xơ hóa lan tỏa và sự tái tạo lặp lại của tế bào gan, dẫn đến tích lũy tổn thương DNA và các biến đổi biểu sinh thuận lợi cho quá trình sinh ung thư [22].



Hình 1.1. Các yếu tố nguy cơ của UTBMTBG

* Nguồn: theo Refolo M.G. và CS (2020) [23]

1.1.3. Cơ chế bệnh sinh

Cơ chế bệnh sinh của UTBMTBG là tổng hợp nhiều yếu tố bao gồm sự rối loạn điều hòa các con đường di truyền, các biến đổi biểu sinh và sự tương

tác giữa biến đổi của vi môi trường tế bào và miễn dịch [24]. Cơ chế phân tử của UTBMTBG được tổng hợp thành 4 con đường chính trong đó các biến đổi di truyền và biểu sinh đóng vai trò then chốt.

Thứ nhất, đột biến gen điều khiển là nền tảng sinh UTBMTBG, nổi bật là vai trò của *TP53* (chiếm khoảng 30% trường hợp) gây mất chức năng kiểm soát chu kỳ tế bào và apoptosis, tiếp đó là đột biến vùng khởi động *TERT* (khoảng > 60%) tái hoạt hóa telomerase, dẫn đến tế bào gan tổn thương duy trì phân chia vô hạn. Ngoài ra, các gen sửa chữa DNA và điều hòa tín hiệu khi rối loạn sẽ làm bộ gen mất ổn định, tạo điều kiện tích lũy thêm đột biến [24], [25].

Thứ hai, biến đổi biểu sinh trong UTBMTBG là thay đổi trong điều hòa biểu hiện gen mà không làm biến đổi trình tự nucleotid, bao gồm các quá trình như methyl hóa DNA, chỉnh sửa histone, tái tổ chức cấu trúc chromatin, điều biến hoạt động phiên mã và sự tham gia của RNA không mã hóa. Trong đó, quá trình thúc đẩy tiến triển và tái phát sớm - yếu tố trung gian giữa môi trường và gen - đóng vai trò trọng tâm: methyl hóa quá mức vùng promoter của các gen kìm hãm khối u như *RASSF1A*, *SOCS*, *SEPTIN9* dẫn tới ngừng biểu hiện; sửa đổi histone mất cân bằng làm thay đổi cấu trúc chromatin và phiên mã gen; rối loạn RNA không mã hóa như giảm miR-122, miR-199a (mất ức chế tăng sinh) hay tăng lncRNA HOTAIR (thúc đẩy chuyển dạng biểu mô - trung mô, xâm lấn, di căn). Các biến đổi này thường do viêm mạn, stress oxy hóa, rối loạn chuyển hóa và có tính khả hồi, là cầu nối quan trọng từ yếu tố nguy cơ tới biến đổi gen và hình thành ung thư [24], [25].

Các phân tích toàn hệ gen trong UTBMTBG đã chỉ ra *HIC1*, *GSTP1*, *SOCS1*, *RASSF1*, *CDKN2A*, *APC*, *RUNX3* và *PRDM2* là những gen thường xuyên tăng methyl hóa, và sự thay đổi này liên quan tới nguy cơ xuất hiện ung thư sớm hơn và tiên lượng kém hơn [26]. Tuy nhiên, không phải biến đổi biểu sinh nào trong mô u cũng có thể được phát hiện trong tuần hoàn. Trong số các dấu ấn methyl hóa, m*SEPT9* có ý nghĩa đặc biệt do DNA của gen này có thể

được giải phóng ra máu dưới dạng ctDNA, tạo điều kiện phân tích định lượng không xâm lấn và có giá trị trong phát hiện sớm UTBMTBG [10].

Thứ ba, rối loạn con đường truyền tín hiệu góp phần duy trì kiểu hình ác tính, bao gồm Wnt/ β -catenin (liên quan kiểu hình “immune-cold” và kháng miễn dịch nguyên phát), TGF- β (ban đầu ức chế tăng sinh nhưng về sau thúc đẩy quá trình chuyển đổi biểu mô sang trung mô, xơ hóa, ức chế miễn dịch) và MAPK/PI3K-AKT/mTOR (tăng sống sót và kháng apoptosis) [24], [25].

Cuối cùng, tương tác với rối loạn miễn dịch và vi môi trường khối u cho phép tế bào UTBMTBG giảm trình diện kháng nguyên (giảm phức hợp hòa hợp miễn dịch), tăng biểu hiện trong quá trình kiểm soát miễn dịch bị ức chế (PD-1/PD-L1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT) và tái lập trình vi môi trường (tăng các tế bào T điều hòa, các tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy xương, và các đại thực bào liên quan đến khối u). Sự phối hợp của các biến đổi này gây ra hội chứng rối loạn miễn dịch trong quá trình hình thành xơ gan và thoái hóa các tế bào miễn dịch, làm suy yếu kiểm soát miễn dịch, tạo môi trường vi mô dung nạp, thuận lợi cho sự khởi phát và tiến triển của UTBMTBG [25].

1.2. Đặc điểm lâm sàng và phương pháp chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan

1.2.1. Đặc điểm lâm sàng

Biểu hiện lâm sàng của UTBMTBG rất thay đổi, tùy thuộc vào giai đoạn bệnh. Ở giai đoạn sớm, BN gần như không có triệu chứng, thường được phát hiện tình cờ qua chương trình tầm soát định kỳ ở những đối tượng có nguy cơ cao như bệnh gan mạn hoặc xơ gan [27].

Đa số UTBMTBG phát triển trên nền xơ gan hoặc viêm gan mạn, do đó triệu chứng thường liên quan đến suy giảm chức năng gan như vàng da, phù, rối loạn đông máu... và tăng áp lực tĩnh mạch cửa (cổ trướng, chảy máu tiêu hóa do giãn tĩnh mạch thực quản...) [28]. Các triệu chứng liên quan trực tiếp đến khối u bao gồm đau tức hạ sườn phải hoặc sờ thấy khối vùng gan khi u lớn [27]. Một số trường hợp có hội chứng cận u như tăng canxi máu, hạ

đường huyết hoặc đa hồng cầu. Di căn ngoài gan gồm phổi, hạch bạch huyết và xương; trong khi tuyến thượng thận, phúc mạc, cơ và não ít gặp hơn [28].

1.2.2. Chẩn đoán hình ảnh

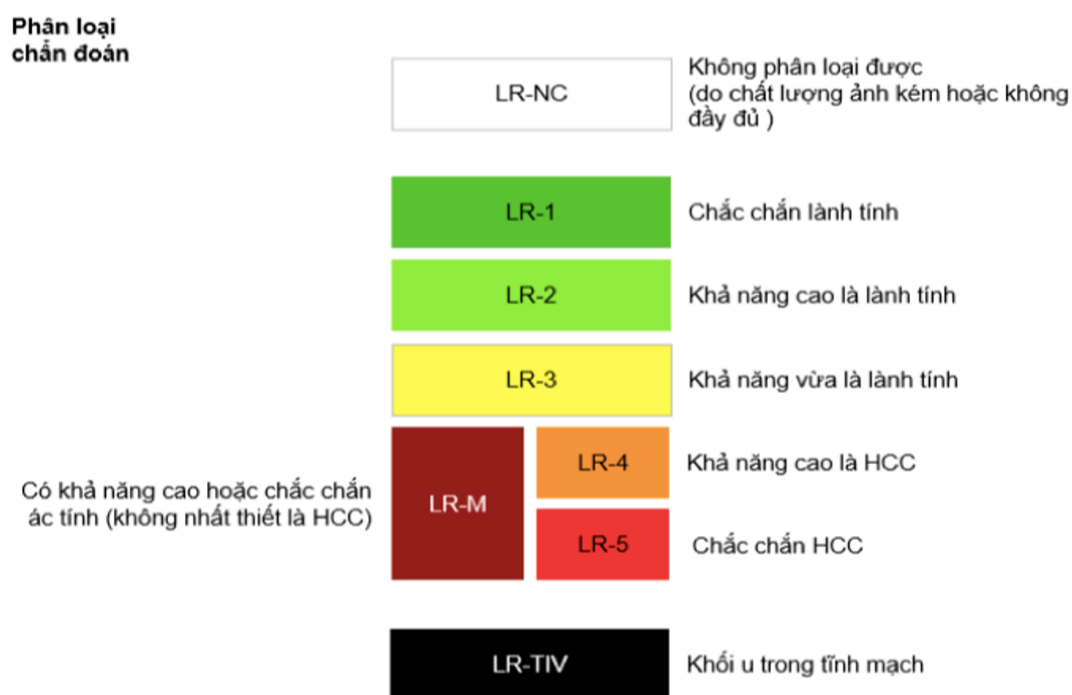
1.2.2.1. Siêu âm

Siêu âm là phương tiện sàng lọc đầu tay trong phát hiện UTBMTBG đã được khuyến nghị bởi hầu hết các Hiệp hội gan mật lớn. Độ nhạy và độ đặc hiệu thay đổi tùy thuộc vào kích thước và giai đoạn khối u. Một phân tích gộp năm 2018 cho thấy siêu âm có độ nhạy chung đối với UTBMTBG là 84%, nhưng ở giai đoạn sớm chỉ đạt 53% và độ đặc hiệu là 91%. Nhược điểm của siêu âm là không phát hiện được một tỷ lệ đáng kể UTBMTBG ở giai đoạn sớm (20% đến 30%). Thêm vào đó, nhiều yếu tố ảnh hưởng đến kết quả của siêu âm như tình trạng gan xơ khó phân biệt u gan với nốt tái tạo lành tính, béo phì làm hạn chế quá trình thu nhận hình ảnh và 25% siêu âm có dương tính giả [29].

1.2.2.2. Cắt lớp vi tính

Chụp cắt lớp vi tính (CLVT) có can quang đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán UTBMTBG, mà không cần xác nhận mô bệnh học khi có đủ các tiêu chuẩn trên chẩn đoán hình ảnh. Hiện nay, các tổn thương chẩn đoán UTBMTBG đánh giá trên hình ảnh CLVT theo tiêu chuẩn LI-RADS năm 2018. Trong đó, kỹ thuật chụp CLVT có can quang với độ dày lát cắt ≤ 5 mm, sử dụng thuốc can quang nồng độ iốt trung bình cao (≥ 350 mgI/mL), tiêm tĩnh mạch với liều lượng điều chỉnh theo chỉ số kích thước cơ thể, tốc độ tiêm cao (> 3 mL/s) và nghiên cứu động học nhiều pha của gan bao gồm giai đoạn động mạch gan muộn đầu tiên (25 - 30 giây sau tiêm), giai đoạn tĩnh mạch cửa (TMC) (60 - 80 giây sau tiêm) và pha cân bằng (2 - 5 phút) sau tiêm chất can quang. LI-RADS được áp dụng ở BN có nguy cơ mắc UTBMTBG cao, bao gồm BN xơ gan, nhiễm HBV, HCV mạn tính và giúp theo dõi UTBMTBG. Mục tiêu của LI-RADS năm 2018 nhằm xác định các chẩn đoán không phải UTBMTBG như LR-1, LR-2, LR-TIV, LR-M (khối u ác tính không phải UTBMTBG) hoặc

LR-NC (khối u chưa phân loại được), LR5 chẩn đoán xác định UTBMTBG, còn LR-3, LR4 thì chưa xác định được UTBMTBG cần thăm dò thêm. Việc phân loại từ LR-1 đến LR-5 nhằm mục đích tính xác suất chẩn đoán UTBMTBG, trong đó LR-1 và LR-2 tương ứng là “chắc chắn lành tính” và “có thể lành tính” [30].



Hình 1.2. Phân loại chẩn đoán UTBMTBG theo LI-RADS

* Nguồn: theo Chernyak V. và CS (2018) [30]

1.2.2.3. Cộng hưởng từ

Chụp cộng hưởng từ (CHT) được coi là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trong chẩn đoán UTBMTBG, nhất là có một số ưu điểm vượt trội hơn CLVT khi đánh giá các tổn thương gan kích thước nhỏ < 2 cm. CHT tăng cường thuốc tương phản, đặc biệt với chất đối quang gan - mật như gadoxetic acid, cho phép phát hiện sớm và đặc hiệu các tổn thương, nhất là khối u < 2 cm, với độ nhạy và đặc hiệu lần lượt khoảng 70% và 94% nhưng tương đương CLVT với khối ≥ 2 cm. Phân tích các chuỗi xung T1-W và T2-W cung cấp thông tin về cấu trúc khối u, thành phần mô đệm, cũng như sự hiện diện của các chất nội bào như lipid, glycogen và các ion kim loại. Đa số các trường hợp UTBMTBG

có tín hiệu giảm trên hình ảnh T1-W và tăng trên hình ảnh T2-W trước khi sử dụng chất đối quang từ [31]. Sau khi tiêm gadolinium, kiểu tăng sinh mạch điển hình của UTBMTBG thể hiện bằng tăng quang mạnh ở thì động mạch so với nhu mô gan xung quanh, sau đó thải thuốc nhanh ở thì TMC và thì muộn, khiến tổn thương trở nên giảm tín hiệu so với nhu mô xung quanh [31].

1.2.2.4. PET/CT

Mặc dù chẩn đoán UTBMTBG chủ yếu dựa trên các đặc điểm điển hình của tăng cường độ tương phản và rửa trôi trên CLVT và CHT, một số đặc điểm sinh học của UTBMTBG chỉ có thể được đánh giá đầy đủ bằng chụp cắt lớp phát xạ positron 18F-fluorodeoxyglucose (FDG-PET)/CT. PET/CT có độ nhạy hạn chế trong chẩn đoán UTBMTBG do mức bắt FDG thay đổi theo độ biệt hoá của u. U biệt hoá kém thường bắt FDG mạnh, trong khi u biệt hoá cao bắt kém. PET/CT cũng có giá trị trong phát hiện di căn ngoài gan, phân giai đoạn, theo dõi đáp ứng điều trị và cung cấp thông tin tiên lượng về nguy cơ tái phát UTBMTBG sau phẫu thuật hoặc điều trị can thiệp [31].

1.2.3. Chẩn đoán mô bệnh học

Sinh thiết gan dưới hướng dẫn siêu âm cho độ chính xác cao trong chẩn đoán UTBMTBG, đặc biệt với các khối u < 2 cm (85%) [32]. Kết quả sinh thiết dương tính xác định chẩn đoán, còn âm tính cần theo dõi định kỳ mỗi 3 tháng trong 1 - 2 năm bằng hình ảnh và/hoặc AFP [33].

Về mô bệnh học, UTBMTBG gồm nhiều thể cấu trúc: thể bè (thường gặp nhất), thể giả tuyến (dễ nhầm với ung thư biểu mô đường mật), thể đảo, thể nhú và thể không điển hình. Sự phân loại mô học dựa theo tiêu chuẩn WHO 2019 với tỷ lệ gặp các thể mô học gồm: bè (78,2%), rắn (12,45%), giả tuyến (7,25%) và xơ (2,15%) [34].

Độ biệt hóa của UTBMTBG phản ánh mức độ mà tế bào ung thư giống với tế bào gan bình thường về cấu trúc và chức năng. Hệ thống Edmondson - Steiner (ES) kinh điển (1954) phân chia độ biệt hóa UTBMTBG thành 4 mức

(độ I đến IV). Cụ thể, độ I tương ứng với u biệt hóa cao (hình thái tế bào gần như không khác biệt nhiều so với tế bào gan lành), độ II là biệt hóa vừa (tế bào u vẫn còn nhiều đặc điểm của tế bào gan nhưng đã có nhân to và tăng sắc nhẹ), độ III là kém biệt hóa (tế bào u dị dạng rõ, nhân tăng sắc mạnh, cấu trúc bề gan bị rối loạn) và độ IV là không biệt hóa (tế bào u mất gần hết đặc trưng của tế bào gan bình thường) [35].

Trong khi đó, WHO 2019 đề xuất hệ thống 3 bậc đơn giản hơn: biệt hóa cao, biệt hóa vừa và biệt hóa kém [34]. Theo tiêu chuẩn mới, ES độ I và II được gộp thành nhóm biệt hóa cao, còn các u biệt hóa mức độ vừa tương ứng ES độ III và biệt hóa kém tương ứng với mức độ ác tính cao hơn ES độ IV. Tiêu chuẩn độ biệt hóa theo WHO 2019 đơn giản dễ áp dụng nhưng trong các nghiên cứu thì phân độ theo ES đánh giá chi tiết và phân tích cụ thể hơn.

Bảng 1.1. Đánh giá độ biệt hóa của UTBMTBG theo WHO 2019

Độ mô học	Đặc điểm chung	Tiêu chuẩn
Độ 1: Biệt hóa cao	Các tế bào u tương tự như tế bào gan trưởng thành với biến đổi rất ít tế bào không điển hình mức độ nhẹ. U tuyến tế bào gan hoặc nốt loạn sản cần phải phân biệt.	Bào tương: Bào tương rộng và ưa toan vừa và ưa kiềm. Nhân: Ít nhân không điển hình mức độ nhẹ.
Độ 2: Biệt hóa vừa	Hình ảnh ác tính rõ trên HE và biệt hoá tế bào gan.	Tế bào chất: Thường ưa eosin vừa phải và ưa bazơ. Bào tương: Bào tương rộng và ưa toan mức độ vừa, ưa kiềm
Độ 3: Biệt hóa kém	Các tế bào được đặc trưng bởi nhân không đều, đa hình thái tế bào và tế bào khổng lồ với nhân rất không điển hình.	Tế bào chất: thường ưa acid. Nhân: Nhân đa hình thái rõ, có thể có tế bào khổng lồ giảm biệt hoá.

* Nguồn: theo Nagtegaal I.D. và CS (2020) [34]

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh mối tương quan giữa độ biệt hóa kém (u kém biệt hóa) với tiên lượng của UTBMTBG. Cụ thể, UTBMTBG có độ biệt hóa kém có nguy cơ tử vong cao hơn 1,31 lần, nguy cơ tái phát sớm cao hơn 1,31 lần và nguy cơ tái phát sớm ngoài gan cao hơn 1,81 lần so với nhóm có độ biệt hóa cao hơn. Khi phân tích thêm mối liên quan giữa mức độ biệt hóa và kích thước khối u, kết quả cho thấy ảnh hưởng tiêu cực của biệt hóa kém càng rõ rệt khi khối u lớn hơn, đặc biệt ở nhóm có khối u ≥ 5 cm, nguy cơ tử vong tăng 1,58 lần. Tương tự, nguy cơ tái phát sớm ở BN biệt hóa kém cũng tăng theo kích thước khối u, cao nhất ở nhóm ≥ 5 cm [36]. Như vậy, sự khác biệt về độ biệt hóa phản ánh rõ rệt mức độ ác tính sinh học của UTBMTBG và dự báo nguy cơ tái phát, di căn cũng như khả năng sống còn của BN.

1.2.4. Dấu ấn sinh học truyền thống

1.2.4.1. Alpha - Fetoprotein

Nghiên cứu đầu tiên về alpha-fetoprotein (AFP) ở BN UTBMTBG năm 1963, cho đến nay hơn 60 năm AFP vẫn được sử dụng rộng rãi nhất trong sàng lọc và chẩn đoán UTBMTBG [37]. AFP là một glycoprotein, được tổng hợp chủ yếu bởi gan của thai nhi trong quá trình phát triển phôi thai, rồi trở về mức bình thường (< 10 ng/mL) từ 8 - 12 tháng sau sinh. Trong UTBMTBG, tế bào gan tổng hợp AFP cao hơn mức bình thường từ 50% - 80% số trường hợp, độ nhạy của xét nghiệm này chỉ khoảng 40 - 60% và độ đặc hiệu khoảng 80 - 90% (tùy ngưỡng AFP được lựa chọn) [38]. Ngưỡng AFP 20 ng/mL có độ nhạy khoảng 60% cho phát hiện UTBMTBG giai đoạn sớm, với giá trị dự báo âm tính cao nhưng giá trị dự báo dương chỉ khoảng 25% [37]. Việc tăng ngưỡng AFP lên 200 ng/mL sẽ nâng độ đặc hiệu lên $> 90\%$ nhưng giảm độ nhạy đáng kể [37]. BN có AFP cao (≥ 400 ng/mL) thường có khối u lớn hoặc xâm lấn mạch, tiên lượng sống kém hơn [37]. Do đó, AFP chủ yếu hỗ trợ chẩn đoán, ít hiệu quả trong sàng lọc đơn độc, và không phát hiện được khoảng 30 - 40% trường hợp UTBMTBG [38].

1.2.4.2. Alpha - Fetoprotein - L3

Alpha - Fetoprotein - L3 (AFP-L3) là một trong ba đồng phân của AFP, là tỷ lệ phần trăm của glycoprotein có ái lực với lectin trong tổng số glycoprotein của AFP, nên AFP-L3 rất đặc hiệu cho UTBMTBG hơn AFP. Tỷ lệ AFP-L3% > 10 - 15% có thể phát hiện UTBMTBG ngay cả khi AFP tổng ở mức thấp. Nghiên cứu cho thấy AFP-L3% > 15% có độ nhạy khoảng 38%, đặc hiệu 89 - 94%, đặc biệt hữu ích trong khoảng AFP 20 - 200 ng/mL. Ở mức AFP < 10 hoặc > 400 ng/mL, AFP-L3% ít giá trị [39]. Kết hợp AFP > 5 ng/mL và AFP-L3% > 4% cho giá trị chẩn đoán UTBMTBG (AUC = 0,83). Trên lâm sàng, AFP-L3 nên được sử dụng bổ sung khi AFP không rõ ràng. Giảm AFP-L3 sau điều trị liên quan đến tiên lượng tốt hơn [32].

1.2.4.3. Des-gamma-Carboxyprothrombin

Des-gamma-Carboxyprothrombin (DCP) là dạng prothrombin bất thường do tế bào ung thư gan tiết ra do rối loạn quá trình carboxyl hóa. Nhiều nghiên cứu, đặc biệt ở châu Á, ghi nhận độ đặc hiệu cao của DCP ở ngưỡng 40 mAU/mL, DCP đạt độ chính xác 88,5%, vượt trội hơn AFP (76,2%) trong một nghiên cứu đa trung tâm ở BN viêm gan B mạn [37]. Một nghiên cứu khác cho thấy DCP có độ nhạy 89% và đặc hiệu 95%, so với AFP chỉ đạt 77% và 73% [39]. Kết hợp DCP với AFP giúp tăng độ nhạy chẩn đoán thêm khoảng 8 - 13%. Đặc biệt, DCP có giá trị chẩn đoán cao trong UTBMTBG có AFP âm tính với AUC khoảng 0,86 [37]. Một số trường hợp nồng độ DCP có thể tăng ở BN thiếu vitamin K, dùng thuốc chống đông (warfarin) hoặc suy dinh dưỡng nặng dẫn tới dương tính giả làm giảm tính đặc hiệu của DCP trong chẩn đoán UTBMTBG [37].

Nhiều protein huyết thanh mới được đề xuất hỗ trợ chẩn đoán UTBMTBG như Golgi protein-73, Glypican-3 và Osteopontin. Golgi protein-73 có độ nhạy và đặc hiệu cao, đặc biệt hữu ích ở các trường hợp AFP âm tính và khi kết hợp với AFP giúp tăng độ chính xác chẩn đoán [40]. Glypican-3 hầu

như không xuất hiện ở gan bình thường nhưng tăng mạnh trong UTBMTBG, có giá trị phân biệt với tổn thương lành tính [41]. Osteopontin liên quan đến quá trình tiến triển u, di căn và tiên lượng xấu, góp phần nâng cao khả năng phát hiện sớm khi kết hợp với các dấu ấn khác. Ngoài ra, nhiều dấu ấn khác cũng đang được nghiên cứu, mặc dù mang lại kỳ vọng nâng cao độ chính xác chẩn đoán UTBMTBG, tuy nhiên với nhược điểm về độ đặc hiệu không cao, khả năng phát hiện sớm còn hạn chế và chưa được chuẩn hóa trong quy trình xét nghiệm là những rào cản lớn khi triển khai những dấu ấn này trong thực hành lâm sàng.

1.2.5. Dấu ấn sinh học tiềm năng đang nghiên cứu

1.2.5.1. Dấu ấn có bản chất acid nucleic

Trong số các dấu ấn sinh học tiềm năng cho UTBMTBG, các RNA huyết thanh như mRNA, RNA vòng (circRNA), long non-coding RNA (lncRNA) và đặc biệt là microRNA (miRNA) đang được nghiên cứu nhằm phục vụ chẩn đoán sớm và tiên lượng bệnh.

miRNA là các RNA không mã hóa ngắn (khoảng 22 nucleotide), điều hòa biểu hiện gen và thường hiện diện trong huyết tương dưới dạng tự do hoặc nằm trong exosome. Nhiều nghiên cứu gần đây phát hiện một số miRNA lưu hành thay đổi đặc hiệu ở BN UTBMTBG, như tác giả Zhang và CS (2020) đã xác định 4 miRNA (miR-16-2-3p, miR-92a-3p, miR-107, miR-3126-5p) tăng cao ở UTBMTBG, trong đó 3 miRNA (miR-92a-3p, miR-107, miR-3126-5p) đạt AUC = 0,969, vượt trội so với AFP (AUC = 0,816). Đặc biệt, kết hợp các dấu ấn này với AFP nâng AUC lên đến 0,994, gần như hoàn hảo trong phát hiện UTBMTBG giai đoạn sớm [42].

Ngoài miRNA, các loại RNA không mã hóa khác như: circRNA, lncRNA có chiều dài > 200 nucleotide, cũng đang được nghiên cứu như biomarker phân tử mới trong UTBMTBG, dù hiện vẫn chưa được ứng dụng lâm sàng phổ biến. Các RNA (đặc biệt miRNA) có tiềm năng cao trong phát

hiện và theo dõi UTBMTBG, nhưng do các yếu tố như độ ổn định thấp, rất dễ phân hủy trong máu và mô, biến thiên sinh học cao, thêm nữa các phương pháp phân tích khó khăn nên chưa có quy trình chuẩn, do đó chưa được ứng dụng trong lâm sàng [39].

1.2.5.2. DNA ngoại bào lưu hành

DNA khối u lưu hành (circulating tumor DNA - ctDNA) là các đoạn DNA nhỏ được giải phóng từ tế bào ung thư vào máu thông qua quá trình bài tiết, chết theo chương trình hoặc hoại tử. ctDNA mang các đặc điểm di truyền hoặc biểu sinh đặc hiệu của khối u như methyl hóa DNA, đột biến điểm (*TP53*, *TERT*...), thay đổi số lượng bản sao hoặc tái sắp xếp nhiễm sắc thể. Do vậy, ctDNA là một dấu ấn sinh học đầy triển vọng trong chẩn đoán và theo dõi UTBMTBG [43].

Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh hiệu quả cao của ctDNA trong việc phát hiện bất thường methyl hóa DNA. Một nghiên cứu gồm 4 gen methyl hóa (*RGS10*, *ST8SIA6*, *RUNX2*, *VIM*) đạt độ nhạy 94% và đặc hiệu 89% [39]. Ngoài ra, các gen như *GSTP1*, *p15*, *p16* cũng được ghi nhận methyl hóa bất thường cả trong mô và ctDNA của BN UTBMTBG [44], [45].

Ngoài methyl hóa, ctDNA còn phản ánh gánh nặng khối u: một nghiên cứu cho thấy 70,4% BN UTBMTBG có ctDNA dương tính trước mổ (so với AFP chỉ 56,8%) [39]. Sự hiện diện của ctDNA tương quan với u lớn, đa ổ, xâm nhập mạch và tiên lượng sống ngắn hơn. Ngược lại, sự “âm tính” ctDNA sau điều trị gợi ý đáp ứng tốt và kéo dài thời gian sống. Điều này khiến ctDNA trở thành công cụ tiềm năng trong giám sát sau phẫu thuật triệt căn khối u và đánh giá hiệu quả điều trị toàn thân [39].

1.2.5.3. Tế bào u lưu hành

Tế bào ung thư lưu hành (circulating tumor cells - CTC) cũng là một dấu ấn quan trọng, đại diện cho “hạt giống” di căn từ khối u chính vào máu. CTC xuất hiện ở mọi giai đoạn tiến triển khối u và có thể cung cấp thông tin về di

căn, tiên lượng và đáp ứng điều trị [46]. Dù còn nhiều thách thức trong phân lập và định danh, CTC đang được xem là bổ sung tiềm năng cho ctDNA, hướng tới chiến lược “sinh thiết lỏng” toàn diện trong quản lý UTBMTBG.

1.2.6. Hướng dẫn chẩn đoán

Hiện nay, nhiều Hiệp hội chuyên ngành như Hội nghiên cứu gan Hoa Kỳ (AASLD), Hội nghiên cứu gan Châu Âu (EASL) đã ban hành hướng dẫn chuẩn hóa chẩn đoán UTBMTBG.

Hướng dẫn chẩn đoán UTBMTBG của AASLD [28]:

Các bệnh nhân nguy cơ cao (xơ gan, nhiễm HBV, HCV), chẩn đoán xác định UTBMTBG có thể thực hiện thông qua CLVT hoặc CHT có thuốc cản quang mà không cần sinh thiết nếu tổn thương > 1 cm và có đặc điểm tăng sinh ở thì động mạch kèm rửa trôi ở thì tĩnh mạch muộn. Nếu không có các đặc điểm ác tính của UTBMTBG trên hình ảnh thì sinh thiết để chẩn đoán.

Các bệnh nhân nguy cơ thấp, sinh thiết là cần thiết để xác định chẩn đoán, ngay cả khi hình ảnh điển hình trên CLVT/CHT.

Các dấu ấn mô học như GPC3, HSP70 và GS có thể hỗ trợ phân biệt UTBMTBG với tổn thương loạn sản mức độ cao trong các trường hợp khó chẩn đoán trên mô học thông thường.

Hướng dẫn chẩn đoán UTBMTBG của EASL năm 2018 [27]:

Chẩn đoán UTBMTBG ở bệnh nhân xơ gan có thể dựa vào tiêu chí không xâm lấn hoặc giải phẫu bệnh. Ngược lại, ở bệnh nhân không xơ gan, chẩn đoán cần được xác nhận bằng mô bệnh học. Tiêu chuẩn chẩn đoán không xâm lấn chỉ áp dụng cho bệnh nhân xơ gan với tổn thương ≥ 1 cm, dựa trên hình ảnh đặc trưng qua CLVT đa pha, CHT động hoặc siêu âm tương phản. PET/CT không được khuyến cáo để chẩn đoán sớm do tỷ lệ âm tính giả cao.

Hướng dẫn chẩn đoán xác định UTBMTBG theo Bộ Y tế Việt Nam

Theo Bộ Y tế ban hành Quyết định số 3129/QĐ-BYT ngày 17 tháng 07 năm 2020 [47]:

Khi tổn thương ở gan có một trong ba tiêu chuẩn sau:

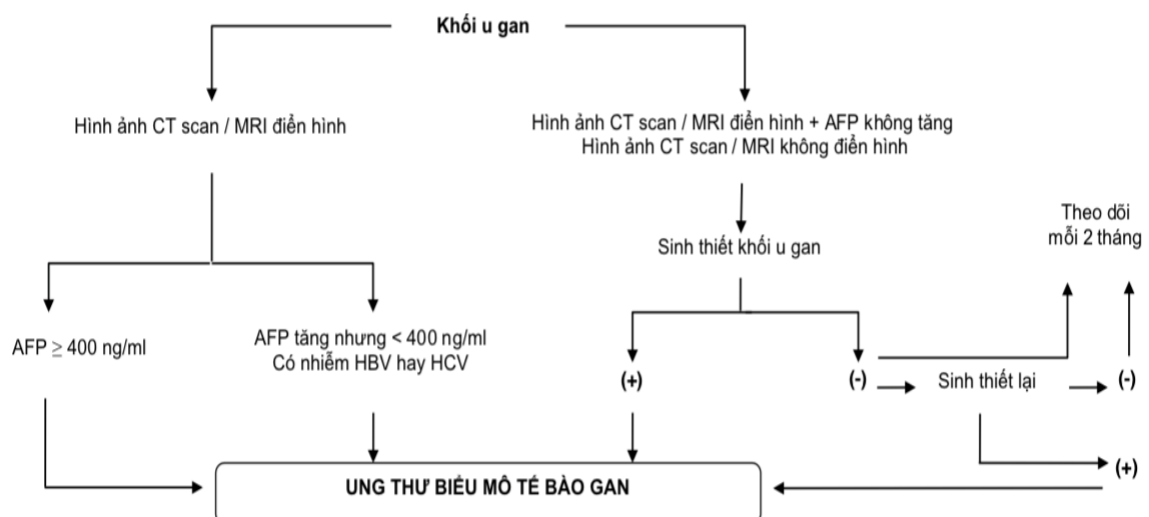
- Hình ảnh điển hình của UTBMTBG trên CLVT bụng có cản quang hoặc CHT bụng có tương phản từ + AFP ≥ 400 ng/mL.

- Hình ảnh điển hình của UTBMTBG trên CLVT bụng có cản quang hoặc CHT bụng có tương phản từ + AFP tăng cao hơn bình thường (nhưng chưa đến 400 ng/mL) + nhiễm HBV và/hoặc HCV. Có thể làm sinh thiết gan để chẩn đoán xác định nếu bác sĩ lâm sàng thấy cần thiết.

Các trường hợp không đủ các tiêu chuẩn nói trên đều phải làm sinh thiết khối u gan (có thể phải làm nhiều lần) để chẩn đoán xác định. Nếu sinh thiết lại vẫn âm tính thì có thể theo dõi và làm lại các xét nghiệm hình ảnh học, chỉ dấu sinh học mỗi 2 tháng.

- Có bằng chứng giải phẫu bệnh lý là UTBMTBG.

Hình ảnh điển hình trên CLVT bụng có cản quang hoặc CHT bụng có tương phản từ: (các) khối u bắt thuốc trên thì động mạch gan và thải thuốc (wash-out) trên thì tĩnh mạch cửa hay thì chậm. Nên chụp CHT với chất tương phản từ gan - mật (Gd-EOB-DTPA - gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid) để tăng khả năng chẩn đoán UTBMTBG.



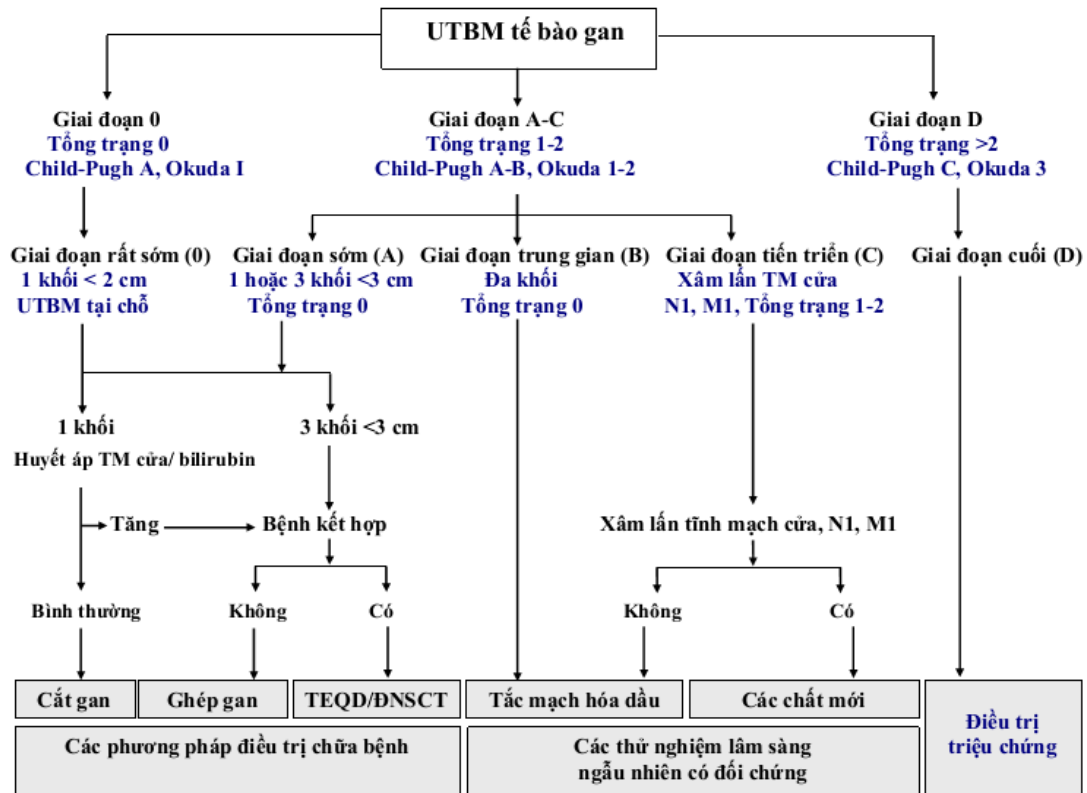
Sơ đồ 1.1. Sơ đồ chẩn đoán UTBMTBG theo Bộ Y tế Việt Nam (2020)

* Nguồn: theo Bộ Y tế Việt Nam (2020) [47]

1.2.7. Chẩn đoán giai đoạn

Các hướng dẫn điều trị của Nhóm ung thư gan lâm sàng Barcelona (BCLC), Hội nghiên cứu bệnh gan châu Âu (EASL), Hội ung thư Nội khoa châu Âu (ESMO) và Hội nghiên cứu bệnh gan Hoa Kỳ (AASLD) phân chia UTBMTBG thành 5 giai đoạn bệnh: 0 (rất sớm), A (sớm), B (trung gian), C (tiền triển), D (cuối), để đề ra cách điều trị phù hợp. Trong khi đó, Hiệp hội nghiên cứu bệnh gan châu Á Thái Bình Dương (APASL) không phân chia giai đoạn bệnh, mà dựa trên 6 yếu tố: di căn ngoài gan, chức năng gan (đánh giá bằng hệ thống Child-Pugh), khả năng cắt gan được, xâm nhập mạch máu lớn, số lượng u, kích thước u, để chọn lựa các phương pháp điều trị phù hợp.

Trong số các hệ thống phân giai đoạn UTBMTBG thì phân loại BCLC đánh giá toàn diện nhờ khả năng tích hợp các yếu tố lâm sàng quan trọng như đặc điểm tổn thương u, mức độ suy chức năng gan (Child-Pugh), tình trạng thể lực BN (ECOG), cùng với khuyến nghị điều trị rõ ràng cho từng mức độ tiến triển bệnh. Ưu điểm lớn của BCLC là tính ứng dụng cao trong thực hành, giúp định hướng điều trị cá nhân hóa và phân tầng tiên lượng chính xác. Nhờ vào tính cập nhật liên tục theo tiến bộ y học, hệ thống này được áp dụng rộng rãi trong các hướng dẫn của EASL và AASLD, phản ánh tính đồng thuận và hiệu quả trong kiểm soát UTBMTBG trên phạm vi toàn cầu [48]. Hướng dẫn BCLC phiên bản cập nhật mới nhất năm 2022 có nhiều điểm mới đáng chú ý trong hướng dẫn điều trị, đặc biệt ở giai đoạn BCLC B cũng như đưa thêm một số phương pháp điều trị vào khuyến cáo như tắc mạch xạ trị hay liệu pháp miễn dịch với kháng thể đơn dòng [49].



Sơ đồ 1.2. Phân loại giai đoạn UTBMTBG và phương pháp điều trị tương ứng theo BCLC (2018)

* Nguồn: theo Marrero J.A. và CS (2018) [28]

1.3. Methyl hóa gen *SEPTIN9* và ứng dụng trong ung thư biểu mô tế bào gan

1.3.1. Cấu trúc và chức năng gen *SEPTIN9*

1.3.1.1. Cấu trúc

Gen *SEPTIN9* nằm trên cánh dài của nhiễm sắc thể số 17, tại vị trí 17q25.3, và có cấu trúc kéo dài khoảng 240 kilobase. Nghiên cứu của Kalikin L.M. và CS (2000), ước tính rằng gen *SEPTIN9* kéo dài 266 kb và chứa ít nhất 15 exon, bao gồm 4 exon thay thế đầu tiên [50]. Trong báo cáo của Mcilhatton A.M. và CS (2001), ghi nhận gen *SEPTIN9* có 17 exon phân bố trên 240 kb [51]. Gen này thông qua quá trình nối mRNA thay thế (alternative splicing) tạo ra nhiều phiên bản phiên mã khác nhau. Sự đa dạng này dẫn đến việc hình thành nhiều isoform của protein septin-9, mỗi dạng có vùng đầu N-terminal riêng biệt,

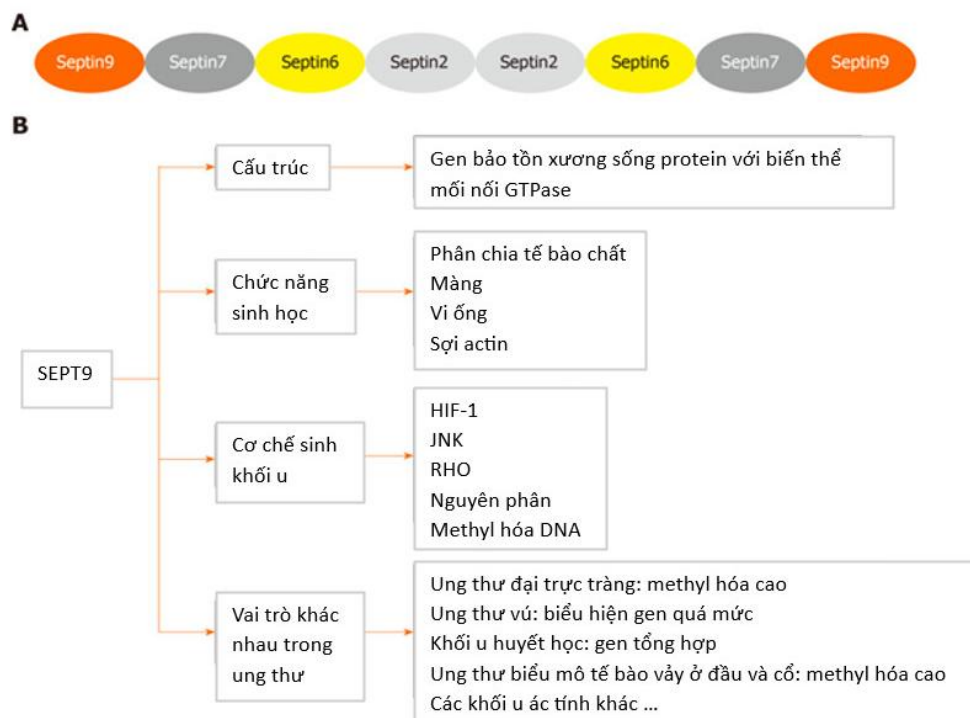
nhưng đều giữ nguyên vùng trung tâm có khả năng gắn GTP (GTPase) [51]. Về mặt cấu trúc, protein septin-9 gồm bốn miền chức năng:

- Miền N-terminal giàu proline, giúp gắn kết với màng sinh học và điều phối tương tác nội bào.
- Vùng GTPase trung tâm cho phép liên kết và thủy phân phân tử GTP, điều khiển cấu hình hoạt động của protein.
- Vùng đặc hiệu septin (SUE) nằm giữa GTPase và đuôi protein, đóng vai trò hỗ trợ kết hợp giữa các phân tử septin.
- Miền C-terminal dạng xoắn cuộn (coiled-coil), có chức năng hỗ trợ liên kết với các protein septin khác để tạo thành các phức hợp đa phân tử. Trong tế bào động vật có vú, *SEPTIN9* có khả năng kết hợp với các septin khác để tạo thành các phức hợp ba, sáu hoặc tám phân tử, ví dụ điển hình như tổ hợp bát phân *SEPTIN9*–SEPT7–SEPT6–SEPT2–SEPT2–SEPT6–SEPT7–*SEPTIN9*. Đáng chú ý, hiện tượng methyl hóa bất thường tại vùng promoter của *SEPTIN9* có thể làm giảm biểu hiện gen, từ đó góp phần vào sự phát triển và tiến triển của ung thư [52].

1.3.1.2. Chức năng

Gen *SEPTIN9* mã hóa cho một loại protein gọi là septin-9, một thành viên của nhóm protein septin. Protein septin-9 là một phần quan trọng trong mạng lưới điều phối cấu trúc và vận hành tế bào, với vai trò thiết yếu trong nhiều quá trình như phân chia tế bào, hình thành cực tính, vận động tế bào và ổn định bộ khung nội bào. Trong quá trình phân bào, septin-9 hỗ trợ sự hình thành vòng co thắt tại vị trí phân chia, đảm bảo quá trình tách đôi tế bào diễn ra hiệu quả. Ngoài ra, thông qua khả năng tương tác với vi ống và sợi actin, protein này giúp duy trì hình dạng tế bào và định hướng di chuyển trong mô. Một số nghiên cứu cho thấy *SEPTIN9* còn tham gia vào các cơ chế như đáp ứng với stress, điều hòa apoptosis (chết tế bào theo chương trình) và kiểm soát tăng trưởng tế bào [53].

Đáng chú ý, bất thường methyl hóa tại vùng khởi đầu phiên mã (promoter) của gen *SEPTIN9* có thể làm giảm biểu hiện của protein này, từ đó ảnh hưởng đến chức năng điều hòa tăng sinh tế bào. Sự thay đổi này được cho là có liên quan đến quá trình hình thành và tiến triển ung thư, đặc biệt thông qua thúc đẩy tăng sinh tế bào, di căn, và tân tạo mạch máu nhằm nuôi dưỡng khối u. Do đó, methyl hóa *SEPTIN9* trong máu ngoại vi hiện đang được khai thác như một dấu ấn sinh học hứa hẹn trong chẩn đoán sớm ung thư [54].



Hình 1.3. Đặc điểm cấu trúc và chức năng sinh học của *SEPTIN9*

* Nguồn: theo Sun J. và CS (2020) [52]

1.3.2. Methyl hóa gen *SEPTIN9* và cơ chế sinh ung thư

1.3.2.1. Khái niệm methyl hóa DNA

Methyl hóa DNA là sửa đổi di truyền ngoại gen được biết đến nhiều nhất. Methyl hoá DNA là hiện tượng gắn thêm gốc methyl ($-CH_3$) vào vị trí thứ 5 của vòng pyrimidine của các cytosine trong trình tự dinucleotide CpG. 5-methylcytosine (5mC) chiếm khoảng 1% tổng số bazơ, thay đổi một chút ở các loại mô khác nhau và phần lớn (60 - 80%) dinucleotide CpG trong bộ gen của động vật có vú bị methyl hóa [55].

1.3.2.2. Methyl hóa gen *SEPTIN 9* và cơ chế sinh ung thư

Methyl hóa gen *SEPTIN9* là một quá trình biến đổi biểu sinh, trong đó các nhóm methyl được gắn được thêm vào Cytosine chính là các đảo CpG nằm ở vùng khởi động của *SEPTIN9*. Trong điều kiện sinh lý bình thường, vùng khởi động này không bị methyl hóa, cho phép enzyme RNA polymerase bám vào để khởi động quá trình phiên mã, từ đó tổng hợp protein septin9 - một phân tử thiết yếu tham gia vào điều hòa phân chia, ổn định bộ khung tế bào và duy trì cân bằng tăng trưởng tế bào [56].

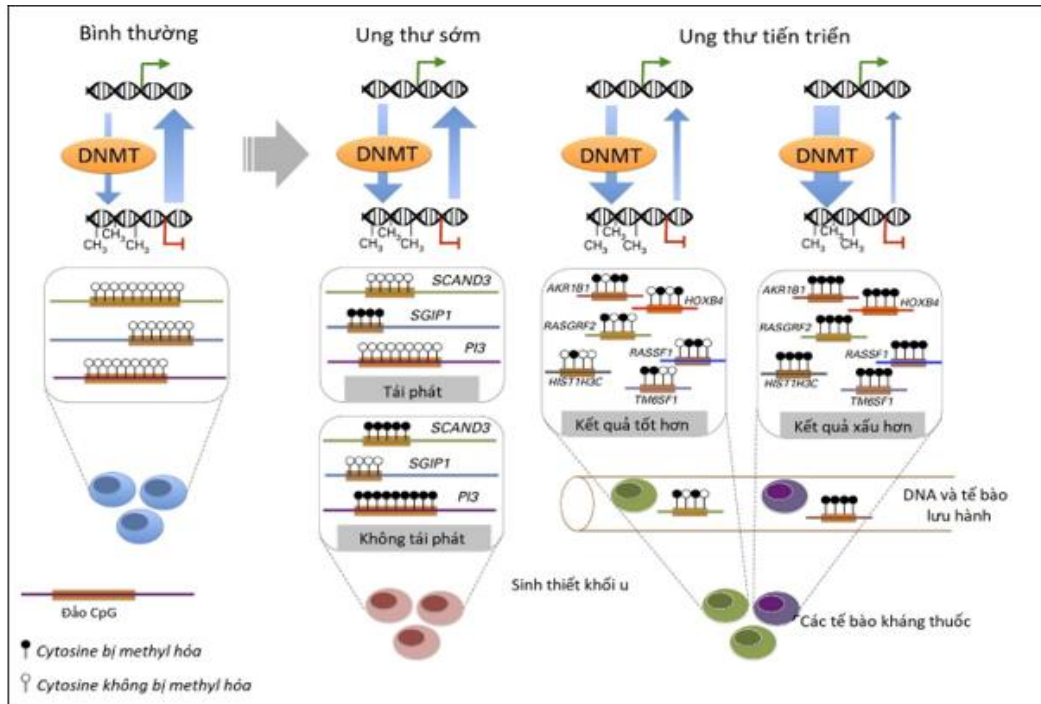
Methyl hóa bất thường tại vùng khởi động của gen *SEPTIN9* là một trong những thay đổi biểu sinh thường gặp và có ý nghĩa sinh bệnh học trong nhiều loại ung thư. Trong điều kiện bình thường, vùng khởi động của gen *SEPTIN9* không bị methyl hóa, cho phép phiên mã bình thường và đảm bảo sự biểu hiện đầy đủ của protein septin9 là một yếu tố quan trọng trong kiểm soát phân bào, ổn định bộ khung tế bào và điều hòa chết tế bào theo chương trình. Tuy nhiên, khi đảo CpG trong vùng khởi động bị methyl hóa quá mức, quá trình phiên mã gen bị ức chế, dẫn đến giảm hoặc mất biểu hiện *SEPTIN9* [56]. Với sự hiện diện của quá trình methyl hóa, gen không được điều hòa phiên mã (*tức là im lặng*). Sự im lặng của gen kìm hãm khối u có thể là kết quả của quá trình methyl hóa liên quan đến cả hai bản sao của gen ức chế khối u, hoặc sự kết hợp mất một alen thông qua việc xóa hoặc đột biến kết hợp với im lặng của alen khác thông qua quá trình methyl hóa [57].

Sự tích tụ các nhóm methyl tại đây làm cản trở sự gắn kết của yếu tố phiên mã, dẫn đến ức chế hoặc ngừng hoàn toàn quá trình phiên mã gen, khiến nồng độ protein septin9 bị suy giảm nghiêm trọng. Hậu quả là tế bào mất khả năng kiểm soát chu kỳ phân bào, tăng sinh bất thường và dễ tiến triển thành tế bào ung thư. Do tính đặc hiệu cao của hiện tượng này, methyl hóa *SEPTIN9* đã trở thành một dấu ấn sinh học có giá trị trong chẩn đoán ung thư [58].

Một trong những cơ chế quan trọng liên quan đến yếu tố cảm ứng giảm oxy (HIF-1) - yếu tố phiên mã gồm hai tiểu đơn vị HIF-1 α và HIF-1 β , điều hòa đáp ứng của tế bào ung thư trong điều kiện thiếu oxy. Nghiên cứu của Amir S. và CS chỉ ra rằng protein *SEPTIN9* (MSF-A) có thể tương tác trực tiếp với HIF-1 α , ngăn cản sự thoái hóa của HIF-1 α , từ đó kéo dài thời gian tồn tại và tăng hoạt tính phiên mã của HIF-1. Kết quả là tăng biểu hiện các gen đích như VEGF (yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu), thúc đẩy tân tạo mạch trong mô u, tạo điều kiện cho khối u tăng sinh, xâm lấn và di căn hiệu quả hơn [59].

Ngoài ra, isoform *SEPTIN9_v1* còn có khả năng duy trì hoạt động của con đường tín hiệu Jun N-terminal kinase (JNK) bằng cách ức chế thoái hóa JNK, từ đó hỗ trợ sự tăng sinh tế bào và ức chế apoptosis. JNK là một kinase quan trọng trong điều hòa phân bào, biệt hóa và đáp ứng tế bào với stress, do đó việc hoạt hóa kéo dài bởi *SEPTIN9* có thể góp phần vào sự bất tử tế bào ung thư nói chung trong đó có tế bào ung thư gan [60].

Ở mức độ cấu trúc tế bào, *SEPTIN9* cũng tương tác với con đường Rho GTPase, đặc biệt là RhoA, một phân tử chủ chốt trong việc điều hòa khung xương tế bào, kết dính tế bào và sự di chuyển của tế bào ung thư. *SEPTIN9* đóng vai trò ức chế ngược hoạt động của RhoA, qua đó ảnh hưởng đến sự hình thành cấu trúc nội bào và khả năng xâm lấn [61]. Cuối cùng, *SEPTIN9* có vai trò thiết yếu trong quá trình nguyên phân, trong các pha đầu của phân bào, các sợi protein *SEPTIN9* polymer hóa để hỗ trợ cấu trúc thoi phân bào và hình thành rãnh phân cắt. Tuy nhiên, khi *SEPTIN9* được biểu hiện quá mức, nó có thể làm rối loạn quá trình gắn trục quay và tách nhiễm sắc thể, dẫn đến mất ổn định di truyền, dị bội và đa bội, là những đặc điểm điển hình trong các khối u ác tính tiến triển.



Hình 1.4. Mô hình về quá trình methyl hóa DNA

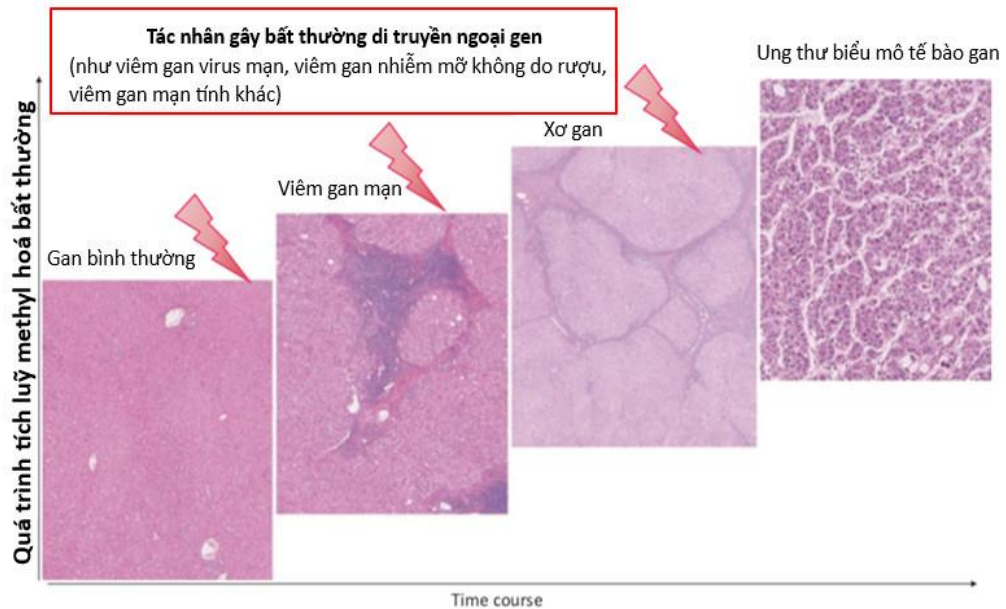
như dấu ấn sinh học trong bệnh ung thư

* Nguồn: theo Cerchietti L. và CS (2017) [62]

1.3.3. Vai trò của *mSEPT9* trong ung thư biểu mô tế bào gan

Cơ chế bệnh sinh của UTBMTBG bao gồm phối hợp nhiều rối loạn ở cấp độ phân tử và tế bào. Trước hết, tổn thương gan kéo dài gây viêm mạn tính và stress oxy hóa, dẫn đến tổn thương DNA, kích hoạt các cơ chế tái tạo bất thường và làm tích lũy đột biến gen [63]. Đồng thời, các con đường tín hiệu nội bào quan trọng như Wnt/ β -catenin, PI3K/Akt/mTOR và MAPK/ERK bị kích hoạt bất thường, làm tăng sinh tế bào, chống lại quá trình apoptosis và thúc đẩy tiến triển khối u. Ngoài ra, sự bất hoạt các gen ức chế khối u như *TP53*, *RBI* hoặc hoạt hóa các oncogene như *c-Myc* càng làm mất kiểm soát chu kỳ tế bào. Cơ chế thông qua di truyền biểu sinh cũng đóng vai trò then chốt thông qua methyl hóa bất thường DNA tại vùng promoter của các gen điều hòa, thay đổi acetyl hóa histone và rối loạn biểu hiện microRNA, dẫn đến thay đổi biểu hiện gen mà không thay đổi trình tự DNA [26]. Những rối loạn này góp phần tạo ra môi trường vi mô khối u thuận lợi, thúc đẩy tăng sinh, xâm lấn, di căn và đề kháng miễn dịch [64]. Do đó,

UTBMTBG là kết quả của sự tương tác phức tạp giữa các yếu tố di truyền, biểu sinh và môi trường vi mô trong gan bị tổn thương mạn tính.



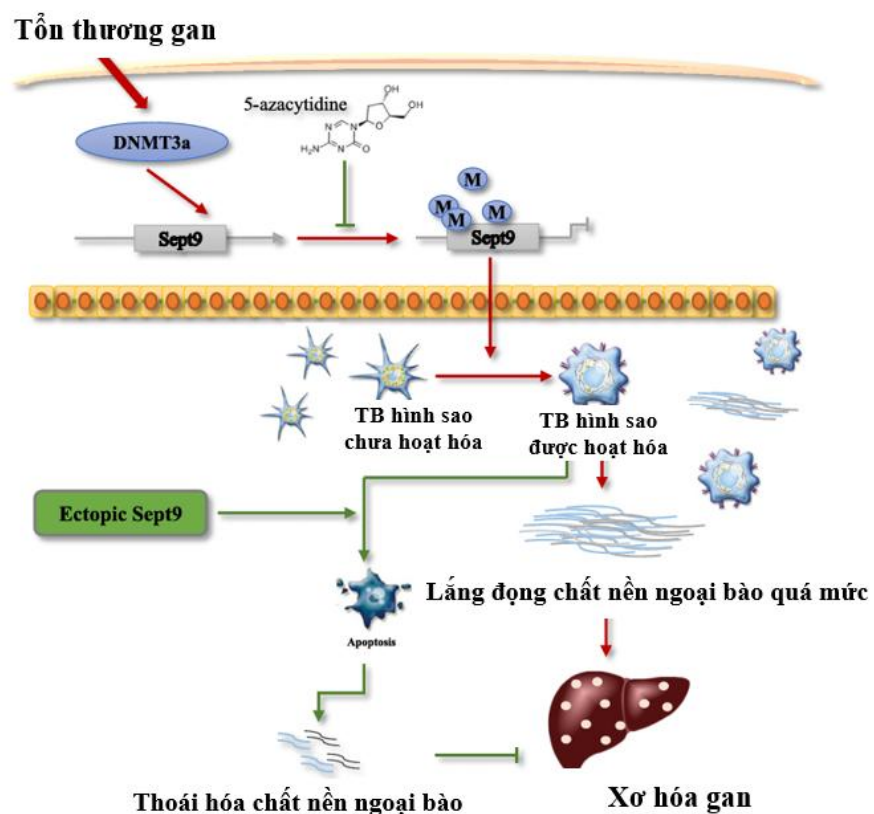
Hình 1.5. Sơ đồ phát triển từ gan bình thường tới viêm gan mạn, xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan

* Nguồn: theo Kanai Y. và CS (2010) [65]

Phần lớn UTBMTBG phát triển trên nền gan bệnh lý như viêm gan mạn, xơ gan đặc biệt do các tác nhân như HBV hoặc HCV. Các tổn thương tế bào gan như viêm gan mạn tính và xơ gan, được coi là tình trạng tiền ung thư [66]. UTBMTBG phát triển do sự tăng sinh tế bào và tăng sinh mạch máu dẫn tới phát triển khối u. Khi nghiên cứu các mẫu mô gan người ở các giai đoạn của ung thư gan đều chứng minh có liên quan với sự thay đổi quá trình methyl hoá DNA. Nhiều nghiên cứu đã cung cấp bằng chứng cho thấy những sửa đổi biểu sinh đặc biệt là quá trình methyl hóa DNA có thể góp phần kích hoạt các tế bào hình sao ở gan (Hepatic stellate cell - HSC), loại tế bào then chốt chịu trách nhiệm trong quá trình sinh ra các nodule xơ ở gan.

Gen *SEPTIN9* bị methyl hóa trong quá trình xơ hóa gan, làm mất biểu hiện *SEPTIN9* in vivo và in vitro. Ngoài ra, mức độ biểu hiện protein và mRNA của *SEPTIN9* có mối tương quan chặt chẽ với tiến trình kích hoạt tế bào hình

sao và gia tăng các dấu hiệu xơ hóa như α -SMA và Colla1. Các tổn thương gan gây ra biểu hiện của enzyme DNA methyltransferase, DNMT3a và tác động của DNMT3a thúc đẩy quá trình methyl hóa gen *SEPTIN9*. Tăng cường methyl hóa gen *SEPTIN9* dẫn đến ức chế biểu hiện protein *SEPTIN9*. Sự giảm biểu hiện gen *SEPTIN9* kích hoạt các tế bào hình sao ở trạng thái không hoạt động chuyển sang trạng thái hoạt động dẫn đến sự lắng đọng chất nền ngoại bào quá mức và tiến triển xơ hóa. Tuy nhiên, hiện tượng ectopic expression (biểu hiện lệch - sự thể hiện gen không bình thường trong một kiểu tế bào nào đó, hoặc trong một giai đoạn phát triển nào đó, mà gen này không thể hiện được trong điều kiện thông thường) của gen *SEPTIN9* gây ra quá trình chết theo chương trình của các tế bào hình sao được kích hoạt và phân giải collagen, dẫn đến thuyên giảm xơ hóa [67].



Hình 1.6. Chức năng của *SEPTIN9* trong quá trình xơ hóa gan

* Nguồn: theo Wu Y. và CS (2017) [67]

Gen *SEPTIN9*, một thành viên của họ septin, hoạt động như một gen kìm hãm khối u trong quá trình sinh ung thư và bị làm im lặng hoặc giảm đi bởi quá trình methyl hóa bởi chất kích thích bất thường, nhưng có thể được kích hoạt lại bằng cách điều trị với azacytidine, cung cấp bằng chứng về cơ chế di truyền ngoại gen của gen này trong quá trình sinh ung thư [68], [69]. Một số nghiên cứu đã gợi ý rằng *SEPTIN9* hoạt động như một gen ức chế khối u và đóng một vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự phân chia tế bào do quá trình tăng cường methyl hóa của nó trong quá trình sinh ung thư gan [5], [70].

Một đặc điểm nổi bật của *SEPTIN9* trong ung thư gan là bị methyl hóa vùng khởi động gen *SEPTIN9* được chứng minh là cơ chế quan trọng trong bất hoạt gen ức chế u. Nghiên cứu của Villanueva A. và CS (2015) [5] cho thấy *SEPTIN9* là một trong những “epidrivers” - những gen điều khiển epigenetic, có biểu hiện methyl hóa cao trong UTBMTBG, khi phân tích trên 331 mẫu UTBMTBG được phẫu thuật cắt gan, sử dụng phương pháp Pyrosequencing xác định methyl hóa gen sau khi DNA đã được xử lý bằng bộ đổi bisulfite. Nghiên cứu sử dụng bộ mảng Illumina HumanMethylation450 BeadChip, khảo sát hơn 485.000 điểm CpG, bao phủ 96% các đảo CpG đã biết, kết quả xác định 36 điểm CpG có giá trị trên 33 gen. Kết quả cho thấy có 61% mẫu UTBMTBG có hiện tượng methyl hóa tại vùng promoter của gen *SEPTIN9*, cụ thể là tại các đảo CpG nằm gần vùng khởi đầu phiên mã (TSS) của gen *SEPTIN9*. Trong khi đó, không có trường hợp nào trong 10 mẫu gan bình thường ghi nhận methyl hóa tại các vị trí này, cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa mô ung thư và mô lành. Sự methyl hóa promoter này có liên quan đến giảm biểu hiện của *SEPTIN9*, củng cố giả thuyết rằng đây là một gen ức chế khối u bị bất hoạt thông qua cơ chế biểu sinh. So sánh với các gen khác trong cùng nhóm, như *EFNB2* (53%), *CDKL2* (59%), *DRD4* (57%) hay *FOXE3* (57%), *SEPTIN9* thể hiện mức độ methyl hóa vượt trội và ổn định hơn giữa các tập dữ liệu. Một số gen khác mặc dù cũng có tỷ lệ methyl hóa cao, nhưng không đạt được độ biệt lập rõ ràng giữa

mô ung thư và mô lành như *SEPTIN9* [5]. Theo nghiên cứu của Kmeid M. và CS (2023), biểu hiện *SEPTIN9* tăng dần theo độ ác tính của tổn thương gan: hiện diện trong 32% UTBMTBG, nhưng rất thấp trong adenoma (3%) và hoàn toàn âm tính trong nốt loạn sản [71].

Nghiên cứu khác đã xác định *SEPTIN9* là yếu tố then chốt trong sự hình thành các giọt lipid nội bào - cấu trúc quan trọng trong điều hòa chức năng và tương tác giữa các bào quan. Sự tích tụ bất thường của các giọt lipid này đóng vai trò nền tảng trong sinh bệnh học của viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) và xơ gan do virus [72]. Bên cạnh đó, *SEPTIN9* còn tham gia duy trì tính toàn vẹn chức năng tế bào và điều phối các tín hiệu nội bào giữa các bào quan. Đặc biệt, quá trình m*SEPT9* không chỉ làm suy giảm cơ chế chết tế bào có kiểm soát mà còn góp phần thúc đẩy hoạt hóa tế bào hình sao gan - một mắt xích quan trọng trong tiến trình xơ hóa và dẫn đến hình thành ung thư gan [73].

Hơn nữa, khi nghiên cứu điều hòa vi môi trường miễn dịch của khối u gan ở BN UTBMTBG, tác giả Park E. và CS (2025) đã nhận thấy *SEPTIN9* tương tác với PAI-1 là một protein pro-tumorigenic, tạo ra môi trường miễn dịch đặc hiệu trong UTBMTBG cùng thúc đẩy biểu hiện của các tế bào miễn dịch như CXCR2⁺, CD15⁺, CD3⁺, CD68⁺, CD163⁺ trong vi môi trường u. Tiếp đó, *SEPTIN9* (+) trong UTBMTBG có mật độ tế bào miễn dịch cao hơn và liên quan đến độ mô học cao hơn, tiên lượng sống kém hơn, dù không là yếu tố tiên lượng độc lập. Biểu hiện *SEPTIN9* tăng giúp xác định nhóm UTBMTBG có vi môi trường miễn dịch đặc hiệu, có thể ảnh hưởng đến kết quả của liệu pháp miễn dịch [74].

Tóm lại, m*SEPT9* giữ vai trò trung tâm trong quá trình hình thành và tiến triển của UTBMTBG. Thông qua cơ chế biểu sinh, m*SEPT9* làm mất chức năng điều hòa của *SEPTIN9*, từ đó thúc đẩy rối loạn chức năng tế bào gan, ức chế apoptosis và kích hoạt các tiến trình sinh ung như xơ hóa gan, tích tụ lipid bất thường và biến đổi vi môi trường miễn dịch. Do đó, m*SEPT9* không chỉ là chỉ

điểm phân tử tiềm năng cho chẩn đoán sớm và phân tầng nguy cơ UTBMTBG, mà còn là mục tiêu hứa hẹn trong các chiến lược điều trị cá thể hóa.

1.4. Các nghiên cứu methyl hóa gen *SEPTIN9* ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan trên thế giới và Việt Nam

1.4.1. Trên thế giới

1.4.1.1. Giá trị methyl hóa gen *SEPTIN9* trong chẩn đoán

Trong chẩn đoán UTBMTBG, m*SEPT9* huyết tương cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu đáng kể để phát hiện BN UTBMTBG, ngay cả ở giai đoạn đầu từ một người khỏe mạnh có nguy cơ mắc bệnh và những người mắc bệnh. Kết hợp với AFP huyết thanh, m*SEPT9* huyết tương cho thấy độ nhạy cao hơn đáng kể so với AFP đơn thuần trong việc phân biệt BN UTBMTBG với các BN bệnh gan mạn tính và người khỏe mạnh. m*SEPT9* huyết tương có thể được sử dụng để hỗ trợ chẩn đoán BN UTBMTBG âm tính với AFP và BN UTBMTBG giới hạn AFP với hiệu suất phân biệt rõ rệt. Hơn nữa, những thay đổi động về mức độ m*SEPT9* trong huyết tương ở BN UTBMTBG có thể được sử dụng để theo dõi hiệu quả điều trị. Những phát hiện này cho thấy m*SEPT9* huyết tương có thể được sử dụng như một dấu ấn sinh học chẩn đoán không xâm lấn cho BN UTBMTBG [75].

Năm 2018, nghiên cứu đầu tiên về tình trạng methyl hóa gen *SEPTIN9* trong máu ngoại vi ở BN UTBMTBG được thực hiện Bệnh viện đại học Nancy, Pháp [10]. Gen *SEPTIN9* là gen điều hòa chính của quá trình phân chia tế bào và ức chế khối u, và tăng cường methyl hóa có liên quan đến quá trình sinh ung thư gan. Mục đích chính của nghiên cứu này là đánh giá độ chính xác chẩn đoán của xét nghiệm dựa trên PCR phân tích methyl hóa promoter *SEPTIN9* trong DNA ngoại bào huyết tương (m*SEPT9*) để chẩn đoán UTBMTBG ở BN xơ gan. Nghiên cứu ban đầu được thực hiện tại Pháp trên 186 BN xơ gan (trong đó có 51 BN UTBMTBG) và sau đó một nghiên cứu lặp lại với thiết kế hoàn toàn tương tự tại Đức trên 103 BN xơ gan (trong đó có 47 BN UTBMTBG),

tổng cả 2 nghiên cứu là 289 BN xơ gan với 98 BN UTBMTBG. Các thành viên tham gia nghiên cứu không biết trước kết quả của BN liên quan đến xét nghiệm mSEPT9. Kết quả ghi nhận thử nghiệm mSEPT9 có độ chính xác cao trong chẩn đoán UTBMTBG, với diện tích dưới đường cong (AUC) là 0,944 (95%CI: 0,900 - 0,970, $p < 0,0001$) trong nghiên cứu ban đầu; 0,930 (95%CI: 0,862 - 0,971, $p < 0,0001$) trong nghiên cứu lặp lại và khi phân tích gộp cả 2 nghiên cứu cho kết quả AUC = 0,940 (95%CI: 0,910 - 0,970, $p < 0,0001$). Trong phân tích hồi quy logistic đa biến, số bộ ba mSEPT9 dương là biến độc lập duy nhất có liên quan ý nghĩa với chẩn đoán UTBMTBG (nghiên cứu ban đầu: OR = 6,30 (2,92 - 13,61), $p < 0,0001$; nghiên cứu lặp lại: OR = 6,07 (3,25 - 11,35), $p < 0,0001$ và tổng hợp 2 nghiên cứu: OR = 6,15 (2,93 - 9,38), $p < 0,0001$). Như vậy, trong số BN xơ gan, xét nghiệm mSEPT9 là một dấu ấn sinh học di truyền ngoại gen rất tiềm năng để phát hiện UTBMTBG.

Tiếp đó là nghiên cứu của Kotoh Y. và CS tại Nhật Bản phân tích methyl hóa *SEPTIN9* như một xét nghiệm sinh thiết lỏng để chẩn đoán UTBMTBG được công bố trên tạp chí Hepatology Communications vào tháng 3 năm 2020 [67]. Đối tượng nghiên cứu gồm 80 tình nguyện viên khỏe mạnh, 45 BN BGMT không có UTBMTBG và 136 BN UTBMTBG (giai đoạn 0: 12 BN; giai đoạn A: 50 BN; giai đoạn B: 31 BN; giai đoạn C: 41 BN; và giai đoạn D: 2 BN, theo BCLC. Trong thử nghiệm phát hiện mSEPT9, DNA được xử lý bằng enzym giới hạn nhạy cảm với methyl hóa theo hai bước, theo sau là phản ứng chuỗi polymerase kỹ thuật số. Số bản sao trung bình của *SEPTIN9* bị methyl hóa lần lượt là 0,0, 2,0 và 6,4 ở nhóm tham chiếu khỏe mạnh, BGMT và UTBMTBG, với sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm (UTBMTBG so với nhóm tham chiếu khỏe mạnh, $p < 0,001$; UTBMTBG so với BGMT, $p = 0,002$; BGMT so với nhóm tham chiếu khỏe mạnh, $p = 0,008$). Độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm lần lượt là 63,2% và 90,0% (giá trị ngưỡng 4,6 bản sao) trong việc phát hiện UTBMTBG khi so sánh với đối tượng khỏe mạnh. Tỷ lệ dương tính của

SEPTIN9 bị methyl hóa tăng lên theo sự tiến triển UTBMTBG (giai đoạn 0, 41,7%; giai đoạn A, 58,0%; giai đoạn B, 61,3%; giai đoạn C, 75,6%; và giai đoạn D, 100%).

Một nghiên cứu khác tại Trung Quốc năm 2020 của He N. và CS đánh giá khả năng chẩn đoán UTBMTBG của *mSEPT9* trên 64 BN UTBMTBG, 44 BN xơ gan và 298 người không có bằng chứng về bệnh. Độ nhạy phát hiện tổng thể của *mSEPT9* đối với UTBMTBG và xơ gan lần lượt là 76,7% và 34,1%, với độ đặc hiệu 95,9% (UTBMTBG so với người không có bệnh). Độ nhạy của *mSEPT9* đối với UTBMTBG cao hơn đáng kể so với AFP (χ^2 test; 56,7%; $p < 0,05$). AUC của *mSEPT9* để phát hiện UTBMTBG so với người không bệnh, xơ gan so với người không bệnh và UTBMTBG so với xơ gan lần lượt là 0,85, 0,77 và 0,66, trong khi AUC của AFP đối với cùng nhóm lần lượt là 0,80, 0,55 và 0,77 [76].

Nghiên cứu Li B. và CS tại Trung Quốc năm 2020 đánh giá xét nghiệm *mSEPT9* huyết tương như một dấu ấn sinh học tiềm năng không xâm lấn để chẩn đoán bệnh UTBMTBG. Nghiên cứu được thực hiện trên 373 đối tượng bao gồm 104 BN UTBMTBG, 95 người có yếu tố nguy cơ mắc bệnh và 174 đối chứng khỏe mạnh. Mức độ *mSEPT9* huyết tương được xác định bằng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang đặc hiệu methyl hóa. Kết quả cho thấy *mSEPT9* huyết tương có thể được sử dụng để phát hiện và phân biệt UTBMTBG với AUC là 0,961; độ nhạy 82,7% và độ đặc hiệu 96,0% đối với nhóm khỏe mạnh. Những kết quả này cho thấy *mSEPT9* huyết tương có hiệu suất chẩn đoán tốt hơn so với AFP (AUC 0,881, độ nhạy 57,7% và độ đặc hiệu 98,3%). Khi kết hợp với AFP huyết thanh, độ nhạy tăng lên lần lượt là 91,3% và 87,7% đối với việc phát hiện UTBMTBG nói chung và UTBMTBG giai đoạn sớm nói riêng. Đáng chú ý hơn, mức độ *mSEPT9* trong huyết tương giảm đáng kể sau phẫu thuật ($p = 0,001$) [75].

Tóm lại, kết quả các nghiên cứu trên thế giới đều khẳng định tình trạng methyl hóa gen *SEPTIN9* (định tính hoặc định lượng) là dấu ấn giúp nhận diện UTBMTBG trong số BN BGMT (xơ gan hoặc viêm gan mạn) với AUC có thể đạt ở mức tốt ($> 0,8$), thậm trí rất tốt ($> 0,9$), cao hơn đáng kể khi so sánh với marker truyền thống là AFP. Rõ ràng, đây sẽ là một dấu ấn sinh học di truyền ngoại gen đầy tiềm năng sẽ được ứng dụng trong tương lai để chẩn đoán UTBMTBG khi quy trình xét nghiệm được chuẩn hóa và chi phí hợp lý.

1.4.1.2. Giá trị methyl hóa gen SEPTIN9 trong tiên lượng

mSEPT9 không chỉ có vai trò trong sự hình thành UTBMTBG mà còn liên quan đến sự phát triển của UTBMTBG. Một số nghiên cứu đã chứng minh được mSEPT9 huyết tương là một thông số để dự đoán, tiên lượng tiến triển và tái phát ở BN UTBMTBG.

Biến đổi biểu sinh đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh cấu trúc chất nhiễm sắc và biểu hiện gen, cho nên liên quan mật thiết đến sự phát sinh ung thư, cũng như xâm lấn và di căn. Trong đó, tăng methyl hóa đảo CpG trên các chất kích thích gen sẽ gây ra ức chế biểu hiện gen. Tình trạng methyl hóa DNA được giải phóng vào dòng máu thông qua chết các tế bào ung thư (chết theo chương trình hoặc hoại tử u), từ đó có thể phát hiện được trong DNA khối u lưu hành trong huyết tương. Quá trình methyl hóa gen *SEPTIN9* dẫn đến mất chức năng chết tế bào theo chương trình và kích hoạt các tế bào hình sao ở gan. Việc kích hoạt các tế bào hình sao ở gan thúc đẩy sự hình thành tăng sinh mạch máu của khối u.

Nghiên cứu của Huang F. và CS (2022) tại Trung Quốc phân tích hồi cứu dữ liệu từ 205 đối tượng, bao gồm 111 BN UTBMTBG, 53 BN mắc bệnh gan có nguy cơ bao gồm viêm gan mạn, xơ gan, nốt tăng sản khu trú và 41 người khỏe mạnh [77]. Kết quả của nghiên cứu cho thấy tăng biểu hiện mSEPT9 huyết tương trong UTBMTBG khi so sánh với BN có ARD và người khỏe mạnh (UTBMTBG so với đối tượng cơ nguy cơ, $p = 1,1 \times 10^{-5}$ và

UTBMTBG so với người khỏe mạnh, $p = 3,7 \times 10^{-10}$). mSEPT9 huyết tương trước điều trị có tương quan đáng kể về số lượng khối u ($p = 0,004$), kích thước khối u ($p = 4,6 \times 10^{-5}$), các yếu tố liên quan đến xâm lấn vi mạch (MVI) ($p = 0,002$) và giai đoạn ung thư gan theo BCLC ($p = 0,012$). Mức mSEPT9 huyết tương tương quan đáng kể với biểu hiện Ki67 trong khối u ($r = 0,356$, $p = 1,3 \times 10^{-4}$). Các phân tích đơn biến và đa biến cho thấy mSEPT9 huyết tương và PIVKA-II là những yếu tố dự báo độc lập cho sự xâm lấn mạch máu. Sự kết hợp của 2 dấu ấn sinh học này cho thấy diện tích dưới đường cong lớn hơn ($AUC = 0,72$) so với mSEPT9 hoặc PIVKA đơn lẻ ($AUC = 0,67$ và $0,65$, theo thứ tự), đặc biệt ở UTBMTBG giai đoạn đầu.

Nghiên cứu của Saeki I. và CS năm 2023 sử dụng methyl hoá gen *SEPTIN9* trong đánh giá kết quả điều trị sử dụng thuốc nhắm đích sorafenib hoặc lenvatinib ở BN UTBMTBG. Nghiên cứu tiến hành trên 157 BN UTBMTBG điều trị bằng sorafenib hoặc Lenvatinib, với số lượng BN lần lượt là 85 và 72 cho mỗi nhóm. Kết quả thu được $AFP \geq 400$ ng/mL ($p < 0,001$) và $mSEPT9 \geq 205$ copies/mL ($p = 0,018$) là yếu tố dự báo có ý nghĩa về khả năng sống không tiến triển bệnh ở BN UTBMTBG. BN có $mSEPT9 < 205$ bản sao/mL ($n = 31$) cho thấy thời gian sống không tiến triển bệnh dài hơn đáng kể so với những BN có $mSEPT9 \geq 205$ bản sao/mL ($n = 54$) (22,4 tháng so với 11,1 tháng, theo thứ tự, $p = 0,022$), cũng như thời gian sống còn toàn bộ trung bình (12,7 tháng so với 5,7 tháng, theo thứ tự, $p = 0,024$). Như vậy, xét nghiệm mSEPT9 trong huyết tương có thể là một dấu ấn sinh học tiềm năng trong tiên lượng BN UTBMTBG được điều trị đích (sorafenib hoặc lenvatinib) [11].

1.4.2. Tại Việt Nam

Trong những năm gần đây, tại Việt Nam đã có một số nghiên cứu quan trọng tập trung vào vai trò của methyl hóa DNA trong chẩn đoán và theo dõi BN UTBMTBG.

Một trong những nghiên cứu tiêu biểu là của Phan Thanh Hải và CS (2023), được thực hiện tại các trung tâm ung bướu lớn ở Thành phố Hồ Chí Minh và Hà Nội. Nhóm nghiên cứu sử dụng mẫu huyết tương của 58 BN UTBMTBG không di căn và 121 người có nguy cơ cao UTBMTBG (viêm gan mạn, xơ gan) để phân tích các vùng DNA có methyl hóa khác biệt (differentially methylated regions – DMRs). Bằng cách kết hợp kỹ thuật giải trình tự với các thuật toán tin sinh, nhóm nghiên cứu đã xây dựng mô hình dự đoán UTBMTBG có hiệu năng cao. Mô hình này đạt AUC 0,84 khi chỉ sử dụng dữ liệu methyl hóa DNA khối u lưu hành (ctDNA), và tăng lên AUC 0,87 khi kết hợp với ba dấu ấn huyết thanh truyền thống là AFP, AFP-L3 và DCP. Độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt đạt 68,8% và 95,8%, cho thấy sự vượt trội rõ rệt so với việc chỉ dựa vào AFP đơn độc - vốn có nhiều hạn chế trong giai đoạn sớm của bệnh [78].

Nghiên cứu khác tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 khảo sát tình trạng methyl hóa hai gen ức chế khối u là *p16* và *RASSF1A* trên mô ung thư và mô cận u của BN UTBMTBG. Kết quả cho thấy tỷ lệ methyl hóa *p16* ở nhóm UTBMTBGC là 63,6%, cao hơn đáng kể so với nhóm tham chiếu (36,4%), trong khi *RASSF1A* methyl hóa ở 60,3% mẫu UTBMTBG so với 39,7% mô lành [79]. Bên cạnh đó, Viện Di truyền Y học - Gene Solutions tại thành phố Hồ Chí Minh đã triển khai nghiên cứu trên DNA ngoại bào huyết tương của BN UTBMTBG nhằm phân tích các dấu hiệu methyl hóa đặc trưng. Kết quả bước đầu được trình bày tại Hội nghị Di truyền học châu Á - Thái Bình Dương (APSHG) cho thấy việc kết hợp các tín hiệu methyl hóa ctDNA với dấu ấn AFP giúp nâng cao độ chính xác trong phát hiện UTBMTBG, nhất là UTBMTBG giai đoạn sớm [78]. Các nghiên cứu này không chỉ giúp làm rõ vai trò của rối loạn methyl hóa DNA trong sinh bệnh học UTBMTBG mà còn đóng góp quan trọng vào việc phát triển các kỹ thuật xét nghiệm tiên tiến, phù hợp với điều kiện triển khai tại Việt Nam.

Chúng tôi chưa ghi nhận nghiên cứu nào công bố về methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương cũng như mẫu mô ở BN UTBMTBG tại Việt Nam, đặc biệt là sử dụng phương pháp xác định mức độ m*SEPT9* mới được nhóm nghiên cứu phát triển. Nghiên cứu của chúng tôi hi vọng sẽ xác định được vai trò và giá trị của m*SEPT9* ở BN UTBMTBG góp phần chẩn đoán và tiên lượng bệnh, nhằm cải thiện chất lượng chẩn đoán BN UTBMTBG đặc biệt ở giai đoạn sớm, cũng như theo dõi và sàng lọc những BN có yếu tố nguy cơ cao như viêm gan mạn tính, xơ gan ở Việt Nam.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 244 đối tượng, chia thành ba nhóm:

- Nhóm nghiên cứu: 133 BN được chẩn đoán xác định UTBMTBG điều trị nội trú tại Bệnh viện Quân y 103.

- Nhóm tham chiếu: 111 đối tượng, bao gồm:

+ Nhóm BN bệnh gan mạn tính (BGMT): 70 BN viêm gan B/C mạn tính và xơ gan điều trị tại Bệnh viện Quân y 103.

- Nhóm khỏe mạnh không có bệnh gan (NKM): 41 đối tượng khám sức khỏe định kỳ tại Bệnh viện Quân y 103 không có bệnh lý gan.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

2.1.1.1. Nhóm nghiên cứu (BN UTBMTBG)

Người bệnh UTBMTBG được đưa vào nghiên cứu khi đáp ứng tất cả các tiêu chí sau:

- Chẩn đoán xác định UTBMTBG theo hướng dẫn tại Quyết định số 3129/QĐ-BYT ngày 17/07/2020 của Bộ Y tế Việt Nam [47]. Cụ thể, có một trong các tiêu chuẩn sau:

1. Hình ảnh điển hình của UTBMTBG trên CLVT ổ bụng có cản quang kèm theo AFP ≥ 400 ng/mL.
2. Hình ảnh điển hình của UTBMTBG trên CLVT ổ bụng có cản quang + AFP tăng cao hơn bình thường (nhưng chưa đến 400 ng/mL) kèm theo nhiễm HBV và/hoặc HCV.
3. Có bằng chứng giải phẫu bệnh lý là UTBMTBG.

Hình ảnh điển hình trên CLVT ổ bụng có cản quang hoặc CHT bụng có tương phản từ: (các) khối u bắt thuốc trên thì động mạch gan và thải thuốc (wash-out) trên thì TMC và thì chậm.

- Tuổi ≥ 18 và đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.1.2. Nhóm tham chiếu BGMT

- 70 BN BGMT bao gồm viêm gan virus B/C mạn tính, xơ gan đến khám và điều trị tại Bệnh viện Quân y 103.

a) Viêm gan mạn tính

* BN được chẩn đoán viêm gan virus B mạn tính theo Hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam năm 2019 (Quyết định 3310/QĐ-BYT ngày 29 tháng 07 năm 2019) [80].

+ HBsAg (+) $\geq$ 6 tháng hoặc HBsAg (+) và Anti HBc-IgG (+).

+ BN sử dụng rượu < 20 g/ngày và anti HCV (-).

* BN được chẩn đoán viêm gan virus C mạn tính theo Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh viêm gan virus C (Quyết định 2065/QĐ-BYT ngày 29 tháng 04 năm 2021 [81].

- Thời gian nhiễm HCV > 6 tháng.

- Anti- HCV dương tính và HCV RNA dương tính hoặc HCV core-Ag dương tính.

+ BN sử dụng rượu < 20 g/ngày và HBsAg (-).

b) Xơ gan

Chẩn đoán theo tiêu chuẩn lâm sàng khi có đủ 3 hội chứng [1], [2], [49]:

- Hội chứng suy chức năng gan: xác định khi có các dấu hiệu trên lâm sàng như mệt mỏi thường xuyên, rối loạn tiêu hóa, phù mềm hai chi dưới, vàng da, xuất huyết dưới da...và cận lâm sàng như albumin máu giảm < 35g/L, Bilirubin toàn phần máu tăng > 17 μ mol/L, tỉ lệ Prothrombine giảm < 70%.

- Hội chứng TALTMC: xác định khi lâm sàng có các dấu hiệu lách to, tuần hoàn bàng hệ trên rốn, cổ trướng tự do kết hợp với cận lâm sàng là siêu âm ổ bụng (TMC giãn > 13 mm, đường kính dọc lách > 12 cm) và/hoặc nội soi thực quản dạ dày có hình ảnh giãn TMTQ, giãn tĩnh mạch phình vị.

- Thay đổi hình thái gan: lâm sàng gan to chắc hoặc teo, kết hợp với siêu âm hoặc CLVT cho hình ảnh gan nhu mô thô, tăng âm dạng nốt, bờ không đều.

Khi không đáp ứng đủ tiêu chuẩn lâm sàng, sử dụng phương pháp chẩn đoán xơ gan không xâm lấn theo Quyết định 2065/QĐ-BYT năm 2021 [81] khi BN có đủ 2 điều kiện:

- Chỉ số APRI ≥ 2 .
- FibroScan (Transient elastography) $\geq 12,5$ kPa (F4).

2.1.1.3. Nhóm tham chiếu NKM

Gồm 41 người khám sức khỏe được lựa chọn ngẫu nhiên, đáp ứng đầy đủ các tiêu chí sau:

- Không có triệu chứng lâm sàng hay tiền sử bệnh lý gan.
- Xét nghiệm HBsAg (-), Anti HCV (-).
- Không uống rượu hoặc sử dụng $< 20\text{g/ngày}$.
- Enzym gan AST, ALT trong giới hạn bình thường.
- Siêu âm gan bình thường, không ghi nhận bất thường về nhu mô gan, thay đổi kích thước gan hoặc các dấu hiệu gợi ý tổn thương mạn tính.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

2.1.2.1. Nhóm nghiên cứu (nhóm UTBMTBG)

- Ung thư gan thứ phát (di căn từ cơ quan khác) hoặc đồng mắc các ung thư khác.
- Đã từng được điều trị UTBMTBG bằng các phương pháp như: phẫu thuật, can thiệp mạch, đốt nhiệt bằng sóng cao tần, tiêm cồn tuyệt đối hay thuốc điều trị toàn thân.
- BN đang có biến chứng nặng (chảy máu tiêu hóa, nhiễm khuẩn, vỡ khối u...) hoặc có bệnh nặng kèm theo như suy tim, suy thận nặng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính đợt bùng phát...
- Không có đầy đủ dữ liệu theo thiết kế nghiên cứu.

2.1.2.2. Nhóm tham chiếu BGMT

- BGMT chưa rõ nguyên nhân.
- Có u gan chưa rõ bản chất trên các phương pháp thăm dò hình ảnh.

- BN đang có biến chứng nặng (chảy máu tiêu hóa, nhiễm khuẩn,...) hoặc có bệnh nặng kèm theo như suy tim, suy thận nặng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính đợt bùng phát...

- Không đồng ý tham gia nghiên cứu hoặc không có đầy đủ dữ liệu theo thiết kế nghiên cứu.

2.1.2.3. Nhóm tham chiếu NKM

- Đang có bệnh cấp tính hoặc các bệnh mạn tính như đái tháo đường, tăng huyết áp, bệnh thận mạn, bệnh tim phổi...

- Không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả, cắt ngang có đối chứng.

2.2.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

2.2.2.1. Cỡ mẫu

Cỡ mẫu đáp ứng mục tiêu phân tích tương quan giữa mức độ mSEPT9 trong mẫu mô với mẫu huyết tương ở BN UTBMTBG

Nghiên cứu của He N. và CS (2019) ghi nhận mức độ tương đồng về tần suất đột biến giữa cfDNA trong huyết tương và DNA mô khối u lên đến 80,9%, với 75% số BN có các đột biến giống nhau trong cả hai mẫu ở BN UTBMTBG [82]. Từ dữ liệu này, chúng tôi lựa chọn phương pháp tính cỡ mẫu cho kiểm định t ghép cặp (paired t-test) theo công thức:

$$n = \left(\left(Z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) + Z(1 - \beta) \right) * \frac{\sigma d}{\Delta} \right)^2$$

Trong đó:

- n: số cặp mẫu cần thiết

- $\alpha = 0,05$, mức ý nghĩa thống kê, tương đương $Z(1 - \alpha/2) = 1,96$

- $\beta = 0,20$, tương ứng với độ mạnh (power) 80%, nên $Z(1 - \beta) = 0,84$

- $\sigma d = 12$ (ng/mL): độ lệch chuẩn của hiệu số cfDNA giữa hai loại mẫu [82]

- $\Delta = 5$ (ng/mL): chênh lệch trung bình mong đợi có ý nghĩa lâm sàng

Từ công thức trên tính ra $n = 45,2$. Như vậy để đảm bảo nghiên cứu và tăng độ tin cậy đã lựa chọn số lượng cặp mẫu mô và mẫu huyết tương trong nghiên cứu $n = 58$ BN.

Cỡ mẫu được xác định nhằm đảm bảo đủ độ mạnh thống kê để thực hiện các phân tích mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG và các mối liên quan với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng

Việc ước tính cỡ mẫu theo công thức:

$$n = Z^2 \cdot x \frac{p(1-p)}{d^2}$$

Trong đó:

- n : cỡ mẫu cần thiết
- Z : hệ số tin cậy ($Z = 1,96$ cho khoảng tin cậy 95%)
- p : tỷ lệ dự kiến (Se hoặc Sp)
- d : sai số mong muốn

Theo nghiên cứu Oussalah A. và CS (2018) giá trị chẩn đoán UTBMTBG của mSEPT9 huyết tương (ngưỡng tối ưu $\geq 2/3$ dương tính) có $Se = 90,6\%$, $Sp = 87,2\%$ [10]. Với $d = 0,05$; $Z = 1,96$; $Se = 0,906$ cho nhóm bệnh UTBMTBG thì số lượng cỡ mẫu cần thiết cho nhóm bệnh khoảng 131 BN. Với $d = 0,07$; $Z = 1,96$; $Sp = 0,872$ cho nhóm tham chiếu không UTBMTBG thì số lượng cỡ mẫu cần thiết cho nhóm tham chiếu khoảng 88 BN.

Trong nghiên cứu này, nhóm bệnh 133 BN UTBMTBG và nhóm tham chiếu 111 không UTBMTBG (trong đó có 70 BN BGMT và 41 người không có bệnh lý gan), đáp ứng yêu cầu cỡ mẫu tối thiểu để thực hiện các phân tích theo mục tiêu đề ra.

2.2.2.2. Phương pháp chọn mẫu

Chọn mẫu có chủ đích tất cả BN UTBMTBG, BGMT và nhóm NKM đáp ứng đủ tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ cho đến khi đủ cỡ mẫu nghiên cứu cần thiết.

2.2.3. Thời gian, địa điểm nghiên cứu

2.2.3.1. Thời gian nghiên cứu

Thời gian thực hiện đề tài từ: 01/2021 - 06/2024

2.2.3.2. Địa điểm nghiên cứu

- Mẫu huyết tương và mô ung thư ở nhóm bệnh được thu thập tại các khoa thuộc Bệnh viện Quân y 103 bao gồm:

- + Khoa Nội tiêu hóa, Bệnh viện Quân y 103
- + Trung tâm Ung bướu, Bệnh viện Quân y 103
- + Khoa phẫu thuật gan mật tụy, Bệnh viện Quân y 103
- + Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quân y 103

- Mẫu huyết tương ở các nhóm tham chiếu được thu thập tại các địa điểm:

- + Khoa Nội tiêu hóa, Bệnh viện Quân y 103
- + Khoa truyền nhiễm, Bệnh viện Quân y 103
- + Khoa khám bệnh, Bệnh viện Quân y 103

- Các xét nghiệm phân tích methyl hóa gen *SEPTIN9* được thực hiện tại Phòng Công nghệ Gen và Di Truyền, Viện Nghiên cứu Y dược học quân sự, Học viện Quân y.

2.2.4. Trang thiết bị, hóa chất dùng trong nghiên cứu

2.2.4.1. Trang thiết bị tại bệnh viện phục vụ chẩn đoán và đánh giá lâm sàng - cận lâm sàng

- Các máy huyết học, sinh hoá, miễn dịch đặt tại các khoa cận lâm sàng tại Bệnh viện Quân y 103, bao gồm:

+ Máy xét nghiệm huyết học tự động Unicel DxH 600, hãng Beckman Coulter và đông máu cơ bản ACL TOP-500 và 550, Instrumentation Laboratory (Hoa Kỳ) tại Trung tâm Huyết học truyền máu - Bệnh viện Quân y 103.

+ Hệ thống máy xét nghiệm sinh hóa tự động AU5800M2 (Beckman Coulter - Mỹ) tại khoa Sinh hóa - Bệnh viện Quân y 103.

+ Máy xét nghiệm sinh hóa miễn dịch Máy DXI 800 thuộc hãng Beckman Coulter, của Hoa Kỳ: xét nghiệm AFP tại khoa Sinh hóa - Bệnh viện Quân y 103.

+ Máy miễn dịch tự động Roche - Cosbas E411 (Thụy Sĩ): xét nghiệm HBsAg và anti-HCV tại khoa Vi sinh vật - Bệnh viện Quân y 103.

- Máy siêu âm Philip Affiniti 30 và máy siêu âm Fibroscan GE Logiq S8 (Mỹ) tại Trung tâm chẩn đoán hình ảnh, Bệnh viện Quân y 103.

- Máy chụp CLVT 64 dãy, Ingenuity, hãng Philip, Hà Lan và máy chụp CLVT 128 dãy, Revolution EVO, GE, Hoa Kỳ.

- Máy nội soi ống mềm Olympus, CV-170 (Nhật Bản) tại Khoa Nội tiêu hóa, Bệnh viện Quân y 103.

2.2.4.2. Trang thiết bị tại phòng thí nghiệm phục vụ phân tích methyl hóa gen SEPTIN9

- Máy PCR 9800 fast thermal cycler hãng Applied Biosystems ABI của Mỹ và máy Realtime PCR Rotor-Gene Q hãng Qiagen của Đức (*Phụ lục 6*).

- Tủ lạnh (-20⁰C, -80⁰C) (hãng Sanaky, Nhật Bản)

- Tủ hút an toàn sinh học ATSH cấp II (NUAIRE, Mỹ)

- Máy ly tâm nhiệt độ thường (Eppendorf, Đức)

- Máy vortex IKA MS 3 Digital (IKA, Đức)

- Máy ủ nhiệt lắc rung thermomixer comfort (Eppendorf, Đức)

- Pipete bán tự động các loại (0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL) và đầu côn tương ứng (Phoenix instrument, Đức).

- Falcon 15mL, 50mL (Medisafe, Trung Quốc).

- Ống eppendorf loại 1,5 mL (Biofil, Trung Quốc), ống PCR 0,2 mL (Novas bio, Mỹ); strip 4 ống 0,1mL (Gunster biotech, Đài Loan).

- Máy quang phổ định lượng DNA/RNA SpectraMax Quickdrop

- Ống EDTA K2 loại 3 mL; 5mL, collection tubes 1,5 mL; 2 mL, găng tay, giấy bạc, giấy thấm đã được vô trùng tuyệt đối,...

2.2.4.3. Hóa chất và sinh phẩm sử dụng trong phân tích methyl hóa gen *SEPTIN9*

- Bộ kit tách acid nucleic từ huyết tương: QIAamp Circulating Nucleic acid Kit (Qiagen, Đức).
- Bộ kit acid nucleic từ mẫu mô: QIAamp Tissue Kit (Qiagen).
- Bộ kit EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research, Irvine, Hoa Kỳ).
- Môi: hãng IDT, Mỹ.
- Thiết kế môi và đầu dò: Thiết kế môi PCR và đầu dò TaqMan đặc hiệu cho trình tự methyl hóa sau chuyển đổi bisulfite.
- HTOne MaX qPCR Green Master Mix (HTBiotec, Việt Nam)

Bảng 2.1. Trình tự của các môi cho semi-nested realtime PCR

Môi/Probe	Trình tự	Vòng khuếch đại
<i>SEPTIN9_Fo</i>	<u>CGACGTAAAACGACGGCCAGT-</u> CAACCCAACACCCACCT	Vòng 1
<i>SEPTIN9_Ro</i>	<u>CACACAGGAAACAGCTATGACCATGGATTC-</u> GTTGTTTATTAGTTATTATGT	
<i>SEPTIN9/Fi</i> <i>Môi xuôi</i>	TGGATTTTGTGGTTAATGT- AAATAATCCCATCCAATA	Vòng 2
<i>TaqMan probe</i> <i>(SEPTIN9_P)</i>	FAM-TTAACCGCGAAATCCGAC-BHQ1	
<i>SEPTIN9_Ri</i> <i>Môi ngược</i>	CACACAGGAAACAGCTATGACCATG	
<i>Môi xuôi-Ft</i>	AATCCGAAATAATCCCATCCAATA	Định lượng tổng số <i>mSEPT9</i>
<i>SEPTIN9_Ri</i> <i>Môi ngược</i>	CACACAGGAAACAGCTATGACCATG	

Ghi chú: Các vùng được gạch chân là đoạn trình tự không bổ sung ở đầu 5'

* Nguồn: Trình tự môi do nhóm nghiên cứu tự thiết kế, đã kiểm định tính đặc hiệu trên dữ liệu Primer-BLAST của NCBI

2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu

2.3.1. Khám và đánh giá lâm sàng - cận lâm sàng

2.3.1.1. Khám lâm sàng tổng thể

- Khai thác tiền sử bệnh: tiền sử viêm gan, xơ gan (thời gian, các biến chứng đã có, thuốc đang điều trị...); tiền sử nhiễm và điều trị virus viêm gan B, C; tiền sử uống rượu (thời gian, số lượng/ngày) và đánh giá tình trạng lạm dụng rượu theo bộ câu hỏi AUDIT-C [83].

- Khai thác lí do khám bệnh, đánh giá các triệu chứng cơ năng (mệt, đau hạ sườn phải/thượng vị, sụt cân, chán ăn, rối loạn tiêu hóa...), triệu chứng thực thể (phù, vàng da/niêm mạc, xuất huyết dưới da, sao mạch, lòng bàn tay son, gan to, lách to, tuần hoàn bàng hệ, cổ trướng).

- Khám đánh giá điểm tổng trạng theo ECOG [84].

2.3.1.2. Xét nghiệm máu

- Tổng phân tích tế bào máu ngoại vi (hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, bạch cầu, tiểu cầu) sử dụng nguyên lý trở kháng, xung điện cộng hưởng đa chiều và tia laser, thực hiện trên máy xét nghiệm huyết học tự động tại Trung tâm Huyết học truyền máu - Bệnh viện Quân y 103.

- Định lượng albumin, tỷ lệ prothrombin, ALT (Alamine transaminase), AST (Aspartate transaminase), bilirubin huyết thanh dựa trên nguyên lý đo quang bằng máy phân tích hóa sinh tự động tại Khoa Sinh hoá Bệnh viện Quân y 103.

- Định lượng nồng độ AFP huyết tương bằng phương pháp miễn dịch hóa phát quang trên máy xét nghiệm DXI 800 (hãng Beckman Coulter, Hoa Kỳ) tại khoa Sinh hóa - Bệnh viện Quân y 103. Các tính nồng độ dựa trên đồ thị chuẩn được xây dựng dựa theo nồng độ chuẩn AFP.

- Định tính HBsAg và kháng thể kháng HCV huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn enzym ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) với chất đánh dấu là enzyme (Peroxidase) tại Khoa Vi sinh vật - Bệnh viện Quân y 103.

Các xét nghiệm được công nhận tiêu chuẩn chất lượng theo ISO 15189.

2.3.1.3. Các phương pháp chẩn đoán hình ảnh

- Soi dạ dày - thực quản bằng hệ thống nội soi ống mềm Olympus, CV-170 (Nhật Bản) tại Khoa Nội tiêu hóa, Bệnh viện Quân y 103: đánh giá mức độ giãn tĩnh mạch thực quản, giãn tĩnh mạch dạ dày.

- Siêu âm ổ bụng tổng quát bằng hệ thống máy siêu âm Philip Affiniti 50 (Mỹ) tại Trung tâm chẩn đoán hình ảnh, Bệnh viện Quân y 103 nhằm đánh giá hình thái gan, khối u gan, hệ thống mạch máu gan, lách, dịch ổ bụng. Với BN BGMT theo dõi bằng siêu âm tối thiểu trong vòng 6 tháng, không phát hiện u gan mới chọn vào nghiên cứu.

- Đánh giá xơ hóa gan bằng máy siem âm Fibroscan GE Logiq S8 (Mỹ) tại Trung tâm chẩn đoán hình ảnh, Bệnh viện Quân y 103, độ đàn hồi của gan được thể hiện bằng đơn vị Kilopascal (kPa) với bảng phân chia mức độ xơ hóa.

- Chụp CLVT đa lớp cắt ba thì được thực hiện tại Trung tâm Chẩn đoán hình ảnh, Bệnh viện Quân y 103. Chụp CLVT nhằm đánh giá vị trí, số lượng, đường kính và hình thái khối u, đánh giá hệ động mạch tạng, đặc biệt là giải phẫu động mạch gan và các biến thể giải phẫu, và mức độ tăng sinh mạch máu của khối u, huyết khối/xâm lấn mạch và di căn ngoài gan, kích thước lách, dịch ổ bụng.

- Nhóm BN UTBMTBG nghi ngờ có di căn xa sẽ mở rộng xét nghiệm để khẳng định chẩn đoán như chụp xạ hình xương, CLVT lồng ngực, CLVT hoặc CHT sọ não...

2.3.1.4. Sinh thiết gan

- Những BN không đáp ứng tiêu chuẩn chẩn đoán theo Bộ Y tế Việt Nam (2020) dựa trên nồng độ AFP huyết tương và chẩn đoán hình ảnh sẽ được tư vấn sinh thiết gan và BN đồng ý sinh thiết gan bằng văn bản.

- Thực hiện sinh thiết dưới hướng dẫn của siêu âm theo quy trình của Bộ Y tế Việt Nam (2014) [85].

- Xử lý mẫu bệnh phẩm và đánh giá mẫu bệnh phẩm:

+ Bệnh phẩm được cố định ngay trong formol đậm trung tính 10%, sau đó được xử lý theo quy trình thống nhất bằng máy xử lý mô STP 120, vùi bệnh phẩm trong parafin, cắt mảnh bằng máy cắt Microtome độ dày 2 - 5 μ m. Nhuộm tiêu bản theo phương pháp Hematoxylin - Eosin theo quy trình của Bộ Y tế.

+ Mô bệnh học được đọc bởi các bác sĩ chuyên khoa giải phẫu bệnh theo các tiêu chí của nghiên cứu bao gồm tiêu chuẩn độ biệt hóa theo WHO 2019, độ biệt hóa theo Edmondson-Steiner, hình thái tế bào và cấu trúc mô học.

2.3.1.5. Đánh giá giai đoạn bệnh

- Đánh giá tình trạng chung:

+ Hội chứng thể chất: mệt mỏi, chán ăn và sút cân.

+ Điểm tổng trạng theo ECOG [84].

- Gánh nặng khối u “tumor burden”: được Hội gan học châu Âu định nghĩa là số lượng và kích thước khối u, khối lượng u thay thế mô gan, huyết khối TMC và di căn ngoài gan [27].

- Đánh giá giai đoạn bệnh theo hệ thống BCLC năm 2018 [28].

2.3.2. Thu thập và bảo quản mẫu sinh học

2.3.2.1. Thu thập mẫu máu, tách huyết tương và bảo quản mẫu

- Nhóm BN UTBMTBG, nhóm tham chiếu BN BGMT (xơ gan, viêm gan B/C mạn) và nhóm NKM được thực hiện lấy máu ngoại vi.

- *Quy trình kỹ thuật lấy mẫu máu tĩnh mạch ngoại vi:* Lấy 10 mL mẫu máu tĩnh mạch ngoại vi của BN UTBMTBG, BN BGMT (xơ gan, viêm gan B/C mạn) và nhóm người khỏe mạnh vào ống chứa chất chống đông K2 EDTA. Mẫu máu sau khi thu thập sẽ bảo quản ở nhiệt độ 4°C, sau đó được vận chuyển đến phòng thí nghiệm để xử lý mẫu (tách huyết tương trong vòng 6 giờ kể từ khi lấy máu) và bảo quản mẫu.

- *Quy trình tách huyết tương từ mẫu máu ngoại vi:* Ly tâm mẫu máu toàn phần 5000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, sau đó tách lấy huyết tương vào 02 tube Eppendorf 1,5mL và để lưu trong tủ lạnh âm 80°C.

2.3.2.2. Quy trình tách chiết DNA từ mẫu huyết tương

Theo hướng dẫn của Bộ KIT tách Nucleic acid từ huyết tương: QIAamp Circulating Nucleic acid Kit (Qiagen, Đức):

Bước 1. Hút 200 μ L QIAGEN Proteinase K vào Fancol 15 mL.

Bước 2. Thêm 2 mL huyết tương/huyết thanh vào Fancol 15mL.

Bước 3. Thêm 1,6 mL Buffer ACL. Vortex 30 giây.

Bước 4. Ủ ở 60°C, 30 phút.

Bước 5. Để Fancol trở lại khay.

Bước 6. Thêm 3,6 mL Buffer ACB tới hỗn hợp trên. Vortex 30 giây.

Bước 7. Ủ ống chứa hỗn hợp mẫu - dung dịch ly giải ở trên đá trong vòng 5 phút.

Bước 8. Chuẩn bị đặt cột lọc (bảo quản ở tủ 4°C), chèn phễu - cột lọc lên VacConnector trên hệ thống hút chân không. Ống thu được giữ lại cho bước 13.

Bước 9. Đổ từ từ dịch mẫu từ Fancol vào phễu. Mở van để cho dịch chảy từ từ qua cột lọc. Sau khi dịch được lọc hoàn toàn qua cột lọc, đóng van, loại bỏ phễu. Giữ cho nắp cột lọc mở.

Bước 10. Bổ sung 600 μ L ACW1 vào cột lọc. Mở van để cho dịch chảy từ từ qua cột lọc. Sau khi dịch được lọc hoàn toàn qua cột lọc, đóng van, giữ cho nắp cột lọc mở.

Bước 11. Bổ sung 750 μ L ACW2 vào cột lọc. Mở van để cho dịch chảy từ từ qua cột lọc. Sau khi dịch được lọc hoàn toàn qua cột lọc, đóng van, giữ cho nắp cột lọc mở.

Bước 12. Bổ sung 750 μ L ethanol (96 - 100%) vào cột lọc. Mở van để cho dịch chảy từ từ qua cột lọc. Sau khi dịch được lọc hoàn toàn qua cột lọc, đóng van.

Bước 13. Đóng nắp cột lọc và tách cột lọc ra khỏi hệ thống hút chân không, đặt cột lọc lên ống thu ban đầu. Ly tâm khô cột bằng cách ly tâm 14.000 rpm trong 3 phút. Loại bỏ ống thu, đặt cột lọc lên ống thu mới.

Bước 14. Đặt cột lọc - ống thu lên khối ổn nhiệt đã được cài nhiệt độ sẵn ở 56°C. Tiếp tục ủ ống thu - cột lọc ở 56°C trong 10 phút để làm khô màng lọc.

Bước 15. Loại bỏ ống thu, đặt cột lọc lên ống eppendorf 1,5 mL. Thêm 50 μ L Buffer AVE vào trung tâm cột lọc. Đóng nắp và ủ ở nhiệt độ phòng khoảng 3 phút. Ly tâm 14.000 rpm, 1 phút, loại bỏ cột lọc và giữ lại dịch chiết acid nucleic. Bảo quản mẫu ở -80°C.

- Thẻ tích huyết tương được sử dụng để tách chiết DNA là 2 mL và thẻ tích DNA tách chiết thu được cuối cùng là 50 μ L. Kiểm tra nồng độ và chất lượng của mẫu DNA tách chiết được bằng phương pháp đo phổ (Nanodrop) và kỹ thuật điện di phân tích DNA.

2.3.2.3. Thu thập mẫu mô và tách chiết DNA từ mẫu mô

- *Thu thập mẫu mô*: Mẫu mô khối u gan đã đúc nên của BN UTBMTBG trước điều trị can thiệp được sử dụng để phân tích. Từ mỗi mẫu sinh thiết hoặc mẫu mô phẫu thuật đúc nên, sau khi cắt 10 lát cắt với bề dày mỗi lát 5 μ m, bác sĩ giải phẫu bệnh đối chiếu với tiêu bản nhuộm HE để đánh dấu vùng có giàu tế bào UTBMTBG trên lát, sau đó bảo quản lạnh hoặc lấy vùng đã đánh dấu chuyển sang ống eppendorf 1,5 mL bảo quản.

- *Tách chiết DNA từ mẫu mô*: Từ mỗi mẫu đã cắt, tách chiết DNA bằng bộ kit QIAamp Tissue Kit (Qiagen) theo quy trình khuyến cáo của nhà sản xuất và thẻ tích thu DNA tách chiết cuối cùng là 50 μ L.

Bước 1. Thêm 200 μ L Buffer FTL2 vào tube eppendorf 1,5 mL.

Bước 2. Lấy 10 lát cắt mô từ khối nên dày khoảng 5 - 10 μ M (chú ý: không sử dụng 2 - 3 lát cắt đầu tiên) hoặc 10mg mẫu mô đã cắt.

Bước 3. Bỏ các lát cắt vào ống tube có chứa FTL2 Buffer 4. Vortex khoảng 20 giây để trộn đều.

Bước 5. Ủ ở 90°C trong 15 phút để làm tan parafin.

Bước 6. Để mẫu ở nhiệt độ phòng khoảng 5 phút để làm nguội trước khi thêm Proteinase K.

Bước 7. Thêm 20 μL proteinase K tới tube chứa mẫu và vortex để trộn đều. 8. Ủ 55°C trong 3 giờ (bước ủ có thể thực hiện qua đêm).

Bước 9. Ly tâm nhẹ để dịch không bị dính trên nắp và thành ống.

Bước 10. Thêm 220 μL BL Buffer tới tube chứa mẫu và vortex để trộn đều.

Bước 11. Thêm 250 μL ethanol 96 - 100% tới tube chứa mẫu và vortex trộn đều.

Bước 12. Đặt cột lọc MicroElute LE DNA trên một ống thu 2 mL (cung cấp trong bộ Kit).

Bước 13. Chuyển toàn bộ mẫu lên cột (khoảng 650 μL) (chú ý chỉ thu kết tủa của acid nucleic, những kết tủa dạng trắng đặc thường là của paraffin, sẽ dẫn đến tắc cột lọc). Ủ ở nhiệt độ phòng khoảng 2 phút.

Bước 14. Ly tâm phức hợp cột lọc - ống thu 14,000 rpm, 1 phút.

Bước 15. Loại bỏ dịch và ống thu, chuyển cột lọc lên ống thu mới.

Bước 16. Thêm 500 μL HBC Buffer lên cột lọc.

Bước 17. Ly tâm phức hợp cột lọc - ống thu 14,000 rpm, 1 phút.

Bước 18. Loại bỏ dịch và ống thu, chuyển cột lọc lên ống thu mới.

Bước 19. Thêm 700 μL DNA Wash Buffer lên cột lọc.

Bước 20. Ly tâm phức hợp cột lọc - ống thu 14,000 rpm, 1 phút, loại bỏ dịch nổi, giữ ống thu.

Bước 21. Lặp lại bước 19, 20.

Thể tích DNA tách chiết thu được cuối cùng là 50 μL . Kiểm tra nồng độ và chất lượng của mẫu DNA tách chiết được bằng phương pháp đo phổ (Nanodrop) và kỹ thuật điện di phân tích DNA. DNA đã chiết xuất được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C để chuyển đổi bisulfite.

2.3.3. Đánh giá mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9*

Việc định lượng mức độ m*SEPT9* được thực hiện trên cả mẫu huyết tương và mô ung thư đúc nén, sử dụng hệ thống Real-time PCR Rotor-Gene Q

(Qiagen, Đức) tại Phòng Công nghệ Gen và Di truyền, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

2.3.3.1. Chuyển đổi bisulfite DNA

- Chuyển đổi bisulfite của DNA đã chiết xuất được thực hiện bằng Bộ Kit EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research, Irvine, Hoa Kỳ).

- Nguyên lý bisulfite: Quy trình này chuyển đổi cytosine không bị methyl hóa trên DNA thành Uracil, và trở thành Thymine trong phản ứng PCR, trong khi Cytosine methyl hóa không bị chuyển đổi. Do đó, các thông tin di truyền được chuyển thành các thông tin trình tự cho phép phát hiện cụ thể DNA bị methyl hóa trong quá trình phân tích cụ thể methyl hóa sau đó.

- Các bước tiến hành

Bước 1. Chuẩn bị thuốc thử CT Conversion Reagent

Thêm vào 1 ống CT Conversion: 900 μ L nước; 300 μ L dung dịch M-Dilution Buffer; 50 μ L dung dịch M-Dissolving Buffer. Sau đó lắc đều 10 phút ở nhiệt độ phòng được sử dụng ngay ở nhiệt độ 4 °C.

Bước 2: Biến đổi DNA

Phản ứng chuyển đổi, với tổng thể tích là 150 μ L , bao gồm 20 μ L mẫu DNA và 130 μ L thuốc thử chuyển đổi CT. Các mẫu được đưa vào điều kiện tuần hoàn nhiệt như sau: biến tính ở 98°C trong 10 phút, sulfon hóa ở 64°C trong 150 phút và giữ ở 4°C.

Bước 3: Làm sạch và tách DNA

1. Chuẩn bị cột Zymo-Spin™ IC: Thêm 600 μ L M-Binding Buffer vào cột.
2. Nạp toàn bộ hỗn hợp từ bước biến đổi DNA lên cột.
3. Ly tâm >10.000 g - 30 giây.
4. Rửa cột: 1 lần với 100 μ L M - Wash Buffer
5. Khử sulfon: Thêm 200 μ L M - Desulphonation Buffer, ủ ở nhiệt độ phòng 15 - 20 phút, ly tâm 30 giây
6. Rửa lại 2 lần bằng 200 μ L M- Wash Buffer (Ly tâm mỗi lần 30 giây)

Bước 4: Thu DNA

1. Chuyển cột sang ống 1,5 mL sạch
2. Thêm 10 μ L M-Elution Buffer trực tiếp vào cột
3. Ly tâm 30 giây để thu DNA đã biến đổi bisulfite

Kết thúc quá trình DNA chuyển đổi bisulfite đã tinh chế được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng trong các thí nghiệm PCR định lượng.

2.3.3.2. Quy trình phản ứng semi-nested realtime PCR định lượng *mSEPT9*

Quy trình sử dụng các đầu dò TaqMan cùng công nghệ mồi dò khóa kéo dài (Extendable blocking probe - ExBP). Việc bổ sung các đầu dò TaqMan cho phép định lượng dựa trên huỳnh quang trong các chu kỳ PCR thời gian thực, cho phép đo chính xác mức độ *mSEPT9*.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR vòng 1

STT	Thành phần	Nồng độ môi/ hóa chất ban đầu	Nồng độ môi/hóa chất trong phản ứng	Đơn vị	Thể tích phản ứng (μ L)
1	HTOne MaX qPCR Green Master Mix	5	1	x	4
2	Môi xuôi vòng 1_Fo	10	0,1	μ M	0,2
3	Môi ngược vòng 1_Ro	10	0,1	μ M	0,2
4	dH ₂ O				10,6
5	Sản phẩm DNA chuyển đổi bisulfite			μ L	5

Xét nghiệm PCR định lượng để phát hiện *mSEPT9* được thiết kế như một quy trình khuếch đại hai vòng (Hình 2.1) để đạt được độ đặc hiệu và độ nhạy cao, đặc biệt đối với nồng độ DNA khối u lưu hành thấp.

Vòng khuếch đại đầu tiên: hỗn hợp phản ứng cho vòng đầu tiên bao gồm $1 \times$ HTOne MaX qPCR Green Master Mix (HTBiotec, Việt Nam) với các đoạn môi xuôi và ngược ở nồng độ 100 mM (Bảng 2.2). Thiết kế các đoạn môi này và các điều kiện chu trình nhiệt tuân theo phương pháp đã mô tả nhằm vào các vùng không phải CpG trong gen *SEPTIN9* để cho phép khuếch đại cả DNA bị methyl hóa và không bị methyl hóa. Các sản phẩm khuếch đại được pha loãng 20 lần và được sử dụng cho vòng khuếch đại thứ hai.

Vòng khuếch đại thứ hai: vòng khuếch đại thứ hai sử dụng PCR thời gian thực bán lồng, kết hợp môi xuôi (*SEPT9/Fi*) và môi ngược (*SEPT9/Ri*). Tuy nhiên, không giống như phương pháp trước đó, dựa vào phân tích đường cong nóng chảy DNA để phát hiện định tính, xét nghiệm này bổ sung một đầu dò TaqMan đặc hiệu cho trình tự gen *SEPTIN9* bị methyl hóa.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR vòng 2 đặc hiệu cho m*SEPT9*

STT	Thành phần	Nồng độ môi/ hóa chất ban đầu	Nồng độ môi/hóa chất trong phản ứng	Đơn vị	Thể tích phản ứng (μL)
1	HTOne MaX qPCR Green Master Mix	5	1	x	4
2	Môi xuôi đặc hiệu_Fi	10	0,2	μM	0,4
3	Môi ngược vòng 2_Ri	10	0,1	μM	0,2
4	Probe	10	0,2	μM	0,4
5	dH ₂ O				10
6	Sản phẩm PCR của vòng 1			μL	5

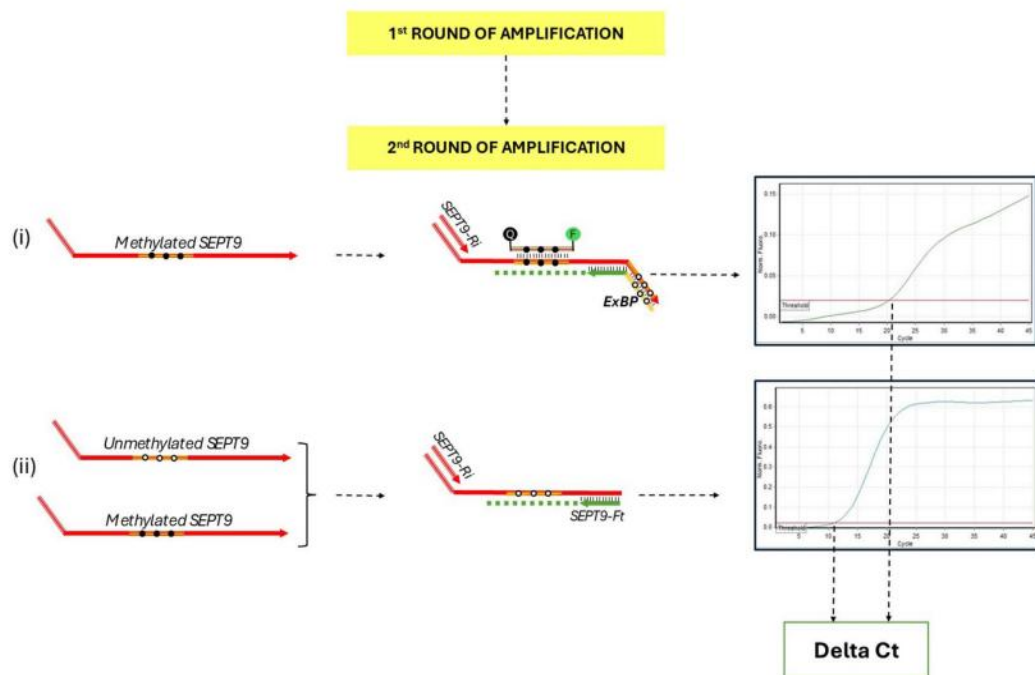
Đầu dò TaqMan cho phép định lượng tương đối m*SEPT9*, thể hiện sự cải tiến đáng kể so với phương pháp định tính trước đó. Hỗn hợp phản ứng bao gồm

1× HTOne MaX qPCR Green Master Mix, một môi xuôi (100 mM), một môi ngược (200 mM) và một đầu dò TaqMan (200 mM). Quá trình khuếch đại được thực hiện bằng thiết bị Rotor-Gene Q (Qiagen, Đức) với các điều kiện sau: biến tính ban đầu ở 95 °C trong 15 phút, sau đó là một chu kỳ ở 94 °C trong 15 giây, 56 °C trong 30 giây và 72 °C trong 30 giây và 45 chu kỳ 94 °C trong 15 giây, 60 °C trong 30 giây và 72 °C trong 30 giây. Thu nhận tín hiệu huỳnh quang thực hiện ở 94 °C, để giảm thiểu tín hiệu nền.

Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR vòng 2 xác định *SEPTIN9* tổng số

STT	Thành phần	Nồng độ trước	Nồng độ sau	Đơn vị	Thể tích phản ứng (μL)
1	HTOne MaX qPCR Green Master Mix	5	1	x	4
2	Môi xuôi tổng số_Ft	10	0,2	μM	0,4
3	Môi ngược vòng 2_Ri	10	0,4	μM	0,8
4	dH ₂ O				9,8
5	Sản phẩm PCR của vòng 1			μL	5

Định lượng nồng độ gen *SEPTIN9* tổng số: để đảm bảo diễn giải chính xác phân tích methyl hóa, nồng độ gen *SEPTIN9* tổng số được định lượng đồng thời với xét nghiệm methyl hóa đặc hiệu. Điều này được thực hiện trong phản ứng PCR song song sử dụng cùng một đoạn môi ngược *SEPT9_Ri* và một đoạn môi xuôi đặc hiệu (*SEPT9_Ft*), tuân theo các điều kiện chu kỳ nhiệt của vòng thứ hai. Các tín hiệu huỳnh quang, phát ra từ thuốc nhuộm giống màu xanh lá cây SYBR liên kết với DNA sợi đôi, được thu thập ở 72°C trong bước kéo dài của các điều kiện chu kỳ nhiệt ở vòng PCR thứ hai, đảm bảo định lượng đáng tin cậy tổng nồng độ gen *SEPTIN9*.



Hình 2.1. Sơ đồ xét nghiệm semi-nested realtime PCR định lượng mSEPT9

Xét nghiệm gồm hai vòng khuếch đại. Trong vòng đầu tiên, cả trình tự gen *SEPTIN9* methyl hóa và không methyl hóa đều được khuếch đại. Trong vòng thứ hai, hai phản ứng riêng biệt được tiến hành để phát hiện gen *SEPTIN9* methyl hóa và tổng số. Hình (i): khuếch đại gen *SEPTIN9* methyl hóa sử dụng một đoạn mồi xuôi (*SEPT9-Fi*) với ExBP, làm giàu có chọn lọc các trình tự methyl hóa, phát hiện thông qua một đầu dò TaqMan đặc hiệu vùng methyl hóa. Hình (ii): khuếch đại gen *SEPTIN9* tổng số (methyl hóa và không methyl hóa) sử dụng một đoạn mồi xuôi (*SEPT9-Ft*) mà không có ExBP. Sự khác biệt về giá trị Ct giữa gen *SEPTIN9* methyl hóa và tổng số (ΔCt) cung cấp định lượng tương đối mSEPT9 trong mẫu

* Nguồn: Nhóm nghiên cứu sơ đồ hóa nguyên lý xét nghiệm semi-nested realtime PCR định lượng mSEPT9 [12]

Để đánh giá độ lặp lại và độ tin cậy của phương pháp định lượng, hệ số biến thiên (CV) được xác định trên dải tỷ lệ methyl hóa từ thấp đến cao. Ở tỷ lệ thấp nhất 0,001% (1 : 100 000), phương pháp đạt CV = 12,37%. Với các tỷ lệ cao hơn (0,01 - 10%), giá trị CV ổn định trong khoảng 1,14 - 5,56%. Kết quả này chứng tỏ phương pháp có độ ổn định và tin cậy cao trên toàn dải nồng độ, bảo đảm khả năng phát hiện chính xác mức mSEPT9 trong mẫu phân tích.

*** Cách đánh giá kết quả methyl hóa gen *SEPTIN9***

Mức độ methyl hóa tương đối của gen *SEPTIN9* trong mẫu được đánh giá bằng phương pháp ΔCt , dựa trên hai phản ứng khuếch đại realtime PCR thực hiện song song với mỗi mẫu (Hình 2.1) theo cách tính đã được công bố trong một số nghiên cứu trên thế giới [86], [87].

Trong đó:

- Một phản ứng sử dụng môi và dò chuyên biệt để khuếch đại chỉ trình tự gen *SEPTIN9* methyl hóa (gọi là phản ứng m*SEPT9*).
- Phản ứng còn lại khuếch đại tổng lượng gen *SEPTIN9*, bao gồm cả phần methyl hóa và không methyl hóa (gọi là phản ứng *SEPTIN9* tổng số).

Giá trị ΔCt được tính bằng hiệu số giữa hai giá trị Ct của hai phản ứng:

$$\Delta Ct = Ct^{mSEPT9} - Ct^{SEPT9 \text{ tổng số}}$$

Giá trị ΔCt càng thấp cho thấy mức độ methyl hóa càng cao, do phản ứng đặc hiệu với trình tự *SEPTIN9* methyl hóa đạt ngưỡng khuếch đại sớm hơn so với phản ứng tổng số.

Để đảm bảo độ tin cậy, mỗi mẫu được thực hiện hai lần lặp lại kỹ thuật độc lập, và giá trị ΔCt trung bình được sử dụng trong phân tích. Đối với những mẫu không xuất hiện tín hiệu khuếch đại, giá trị Ct được lấy là 45, tương ứng với số chu kỳ tối đa của phản ứng (tương tự như một số nghiên cứu đã công bố trên thế giới [88]) nhằm đảm bảo tính nhất quán trong xử lý dữ liệu.

Khi giá trị Ct^{mSEPT9} có tín hiệu với ngưỡng < 45 chu kỳ là dương tính, còn giá trị $Ct^{mSEPT9} \geq 45$ là âm tính và giá trị ΔCt (phản ánh tương đối mức độ m*SEPT9*) được xử lý như một biến liên tục để mô tả và so sánh mức độ methyl hóa giữa các nhóm đối tượng nghiên cứu.

2.4. Chỉ tiêu nghiên cứu và tiêu chuẩn đi kèm

Mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương được xác định là chỉ tiêu nghiên cứu trọng tâm nhằm đánh giá giá trị chẩn đoán và tiềm năng ứng dụng lâm sàng trong UTBMTBG. Các chỉ tiêu lâm sàng, cận lâm sàng, đặc

điểm khối u, mô bệnh học và giai đoạn bệnh được thu thập đồng thời để phân tích mối liên quan với mức độ methyl hóa gen và hỗ trợ đánh giá giá trị chẩn đoán của chỉ dấu này trong từng phân nhóm BN cụ thể.

2.4.1. Chỉ tiêu lâm sàng

Tên biến số	Tính chất biến số	Giá trị
Tuổi (xác định tại thời điểm lấy mẫu bệnh phẩm)	Định lượng	Trung bình Chia 4 nhóm tuổi: < 50 tuổi, 50 - 59 tuổi; 60 - 69 tuổi, ≥ 70 tuổi
Giới	Nhị phân	Nam/ nữ
Lí do vào viện: có hay không có biểu hiện lâm sàng (tình cờ phát hiện)	Định tính	Có/ không
Triệu chứng lâm sàng: • Mệt mỏi • Chán ăn • Gầy sút cân • Xuất huyết dưới da • Vàng da, niêm mạc • Sao mạch, lòng bàn tay son • Phù chi dưới • Đau hạ sườn phải, thượng vị • Gan to • Cổ trướng • Tuần hoàn bàng hệ • Lách to • Giãn tĩnh mạch thực quản/ giãn tĩnh mạch dạ dày	Định tính	Có/không
Các yếu tố nguy cơ: • Rượu • Nhiễm HBV • Nhiễm HCV	Định tính	Có/không

2.4.2. Chỉ tiêu cận lâm sàng

Bảng 2.5. Các thông số cận lâm sàng

Thông số		Giá trị bình thường	Tăng	Giảm
Albumin (g/L)		35 - 42	> 42	< 35
Bilirubin TP ($\mu\text{mol/L}$)		≤ 21	> 21	-
Tỷ lệ Prothrombin (%)		≥ 70	-	< 70
INR		$\leq 1,7$	> 1,7	-
AST (U/L)		< 40	≥ 40	
ALT (U/L)		< 37	≥ 37	
Hồng cầu (T/L)	Nam	4,3 - 5,8	> 5,8	< 4,3
	Nữ	3,9 - 4,2	> 4,2	< 3,9
Hemoglobin (g/L)	Nam	130 - 160	> 165	< 130
	Nữ	120 - 145	> 160	< 120
Bạch cầu (G/L)		4 - 10	> 10	< 4
Tiểu cầu (G/L)		150 - 400	> 400	< 150

* Nguồn: Các chỉ số xét nghiệm máu theo ngưỡng máy tại Bệnh viện Quân y 103

- Nồng độ AFP huyết tương chia 3 mức độ: bình thường ($\leq 20\text{ng/mL}$), tăng ($20 - 400\text{ng/mL}$) và tăng cao ($> 400\text{ng/mL}$).

2.4.3. Chỉ tiêu đặc điểm khối u gan trên chẩn đoán hình ảnh

- Số lượng khối u: 1 khối, ≥ 2 khối.
- Vị trí khối u: gan phải, gan trái, 2 thùy gan.
- Đường kính khối u: đường kính lớn nhất của khối u trên chụp CLVT đa dãy. Trường hợp nhiều khối u sẽ tính tổng đường kính lớn nhất của các khối u chính. Chia thành ba phân nhóm $< 20\text{mm}$, $20 - 50\text{ mm}$ và $> 50\text{ mm}$.
- Huyết khối TMC (có/không): xác định trên chụp CLVT (khối u gan nằm sát ngay nhánh TMC, xâm lấn rõ tạo huyết khối trong lòng TMC và sau tiêm thuốc cản quang có hình ảnh tăng tỷ trọng của huyết khối (mạch tân tạo trong huyết khối) theo tác giả Chartampilas E. và CS (2022) [89].

- Di căn ngoài gan (di căn phổi, di căn hạch, di căn tuyến thượng thận, di căn phúc mạc,...): có/ không theo Marrero J.A. và CS (2018) [28].

2.4.4. *Chỉ tiêu mô bệnh học*

Dựa trên tiêu chuẩn chẩn đoán UTBMTBG của WHO năm 2019 [34]:

- Mức độ biệt hóa của tế bào khối u có thể được mô tả theo phân loại của WHO năm 2019 [34] và phân loại Edmondson-Steiner [35].

- Hình thái mô học của UTBMTBG thường được chia thành thể bề, thể đặc, thể giả tuyến, thể bề lớn, hoặc thể hỗn hợp.

- Các loại UTBMTBG cụ thể bao gồm thể thông thường, các biến thể khác (biến thể nhiễm mỡ, biến thể tế bào sàng, biến thể xơ cứng, biến thể tế bào kỵ màu, giàu bạch cầu trung tính và giàu tế bào lympho).

- Mức độ và phạm vi hoại tử khối u, thâm nhiễm tế bào lympho và xơ hóa mô đệm.

2.4.5. *Chỉ tiêu chức năng gan và giai đoạn bệnh*

- Chức năng gan của BN được đánh giá bằng hai thang điểm là Child - Pugh và ALBI (Albumin-Bilirubin).

Bảng 2.6. Đánh giá chức năng gan theo Child-Pugh

Các yếu tố	Điểm		
	1	2	3
Cấp độ bệnh não gan	Không có	I-II/ nhẹ	III-IV/ hôn mê
Cổ trướng	Ít	Vừa	Nhiều
Albumin máu (g/L)	> 35	28 - 35	< 28
Bilirubin máu ($\mu\text{mol/L}$)	< 34	34 - 51	> 51
Thời gian prothrombin (giây kéo dài)	1 - 4	4 - 6	> 6
Ghi chú: Child - Pugh A: 5 - 6 điểm; Child - Pugh B: 7 - 9 điểm; Child - Pugh C: ≥ 10 điểm.			

* Nguồn: theo Pugh R.N. và CS (1973) [90]

Bảng 2.7. Đánh giá chức năng gan theo điểm ALBI

$ALBI = (0,66 \times \log \text{ bilirubin } [\mu\text{mol/L}]) - (0,085 \times \text{albumin } [\text{g/L}])$
ALBI 1: $< -2,6$
ALBI 2: $-2,6 \leq ALBI \leq -1,39$
ALBI 3: $> -1,39$

* Nguồn: theo Pinato D.J. và CS (2017) [91]

- Phân chia giai đoạn UTBMTBG dựa theo tiêu chuẩn phân chia giai đoạn ung thư gan lâm sàng Barcelona (BCLC 2018):

Bảng 2.8. Phân loại giai đoạn UTBMTBG theo BCLC

Giai đoạn bệnh	ECOG	Đặc điểm khối u	Child - Pugh
0 (rất sớm)	0 - 1	1 khối $< 2\text{cm}$	A
A (sớm)	0 - 1	1 khối hoặc 2-3 khối $< 3\text{cm}$	A - B
B (trung gian)	0 - 1	Nhiều khối	A - B
C (tiến triển)	0 - 2	Huyết khối TMC, di căn hạch hoặc di căn xa	A - B
D (cuối)	> 2	Bất kỳ T, N hoặc M	C

* Nguồn: theo Marrero J.A. và CS (2018) [28]

Bảng 2.9. Điểm tổng trạng theo ECOG

Điểm	Tình trạng thể chất
0	Hoạt động bình thường, không có triệu chứng
1	Có triệu chứng (mệt/và ăn kém/và sút cân) nhưng gần như hoạt động bình thường
2	Thời gian nằm trên giường $< 50\%$, có khả năng tự chăm sóc, không thể lao động
3	Giới hạn trong giường hoặc ghế $> 50\%$ giờ thức dậy, hạn chế tự chăm sóc
4	Nằm liệt giường hoàn toàn

* Nguồn: theo Oken M.M và CS (1982) [84]

2.4.6. Chỉ tiêu mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9*

- Mức độ *mSEPT9* trong huyết tương và mẫu mô ung thư được phản ánh gián tiếp qua giá trị ΔCt (giá trị ΔCt càng thấp phản ánh mức độ methyl hóa càng cao và ngược lại): tính trung vị, tứ phân vị, so sánh và đánh giá mối tương quan giữa mẫu huyết tương và mẫu mô trên nhóm chung (58 BN) và trên các phân nhóm theo yếu tố nguy cơ, gánh nặng khối u, giai đoạn bệnh theo BCLC và mô bệnh học.

- Xác định mối liên quan giữa mức độ *mSEPT9* huyết tương (thông qua giá trị ΔCt) với tuổi, giới, một số yếu tố nguy cơ (nhiễm HBV, nhiễm HCV, lạm dụng rượu), một số đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm máu, AFP, mức độ suy chức năng gan (điểm Child - Pugh, ALBI), gánh nặng khối u, mức độ biệt hóa tế bào u trên mô bệnh học và giai đoạn bệnh theo phân loại BCLC.

- Đánh giá giá trị chẩn đoán UTBMTBG của mức độ *mSEPT9* huyết tương: tính diện tích dưới đường cong AUC, điểm cắt, độ nhạy, độ đặc hiệu của mức độ *mSEPT9* huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG, UTBMTBG giai đoạn rất sớm/sớm và UTBMTBG có AFP < 20 ng/mL khi lấy nhóm tham chiếu là BGMT, NKM và nhóm không ung thư (gồm BGMT và NKM), giá trị khi sử dụng đơn độc dấu ấn *mSEPT9* so với khi phối hợp AFP huyết tương.

2.5. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý và phân tích bằng phần mềm MedCalc phiên bản 22.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Bỉ) và SPSS 25.0.

- Các biến định lượng được kiểm định xác định phân phối chuẩn bằng test Kolmogorov Smirnov và Shapiro-Wilk trước khi phân tích.

+ Các biến định lượng xác định tuân theo phân phối chuẩn thì được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ($X \pm SD$) và giá trị nhỏ nhất, giá trị lớn nhất (min - max).

+ Các biến định lượng xác định là không tuân theo phân phối chuẩn thì được trình bày dưới dạng trung vị và khoảng tứ phân vị (Q1 - Q3).

- Để so sánh giá trị ΔC_t giữa các nhóm, các phương pháp thống kê phi tham số được áp dụng. Cụ thể:

+ Khi so sánh giữa hai nhóm độc lập (ví dụ: giới tính, tình trạng lạm dụng rượu, nhiễm HBV, có/không triệu chứng lâm sàng hoặc thực thể, có/không huyết khối TMC...), sử dụng kiểm định Mann - Whitney U với độ tin cậy 95%.

+ Khi so sánh giữa ba nhóm trở lên (ví dụ: nhóm tuổi, vị trí khối u gan, mức độ biệt hóa mô học...), sử dụng kiểm định Kruskal - Wallis. Khi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, kiểm định hậu nghiệm được thực hiện để xác định cặp nhóm khác biệt.

- Phân tích mối liên quan giữa các biến định lượng hoặc biến định danh với một số biến phụ thuộc nhị phân: sử dụng hồi quy logistic, tính OR (Odd ratio).

+ Phân tích tương quan tuyến tính giữa hai biến định lượng, tính hệ số tương quan Pearson (r). Khi dữ liệu đáp ứng giả định phân phối chuẩn và mối quan hệ tuyến tính, hệ số tương quan Pearson được áp dụng. Kết quả phân tích được trình bày dưới dạng hệ số r và giá trị p nhằm xác định ý nghĩa thống kê, với ngưỡng $p < 0,05$. Mức độ tương quan được diễn giải theo thang điểm: rất yếu ($r < 0,2$), yếu ($0,20 - 0,39$), trung bình ($0,40 - 0,59$), mạnh ($0,60 - 0,79$) và rất mạnh ($r \geq 0,80$).

+ Đối với các biến định lượng không tuân theo phân phối chuẩn hoặc có mối quan hệ phi tuyến, hệ số tương quan Spearman (ρ) được sử dụng. Kết quả phân tích được trình bày dưới dạng hệ số ρ và giá trị p , với ngưỡng ý nghĩa thống kê xác định là $p < 0,05$. Mức độ tương quan được phân loại theo thang điểm: rất yếu ($\rho < 0,20$), yếu ($0,20 \leq \rho < 0,40$), trung bình ($0,40 \leq \rho < 0,60$), mạnh ($0,60 \leq \rho < 0,80$) và rất mạnh ($\rho \geq 0,80$).

+ Nếu r hay ρ mang giá trị dương: hai biến có tương quan thuận

+ Nếu r hay ρ mang giá trị âm: hai biến có tương quan nghịch

- Xác định giá trị chẩn đoán UTBMTBG của dấu ấn sinh học mSEPT9 (khi so với các nhóm tham chiếu) bằng đường cong ROC, tính diện tích dưới

đường cong (Area under the curve - AUC), độ nhạy (Sensitivity - Se), độ đặc hiệu (Specificity - Sp). Đường cong ROC là đường biểu diễn các điểm có tọa độ tương ứng với trục tung là Se, trục hoành là giá trị dương tính giả ($1 - Sp$) của phương pháp tính từ thấp đến cao.

+ Các thông số bao gồm AUC, Se, Sp và điểm cắt tối ưu được xác định theo tiêu chí Youden. $AUC \geq 0,7$: độ chính xác khá; $AUC \geq 0,8$: độ chính xác tốt; $AUC \geq 0,9$: độ chính xác rất tốt). Giá trị ngưỡng (cut-off) được chọn tại điểm có chỉ số Youden (J) cao nhất ($J = Se + Sp - 1$), từ đó tính ra Se, Sp, giá trị dự đoán dương và giá trị dự đoán âm.

+ Xác định giá trị kết hợp của hai dấu ấn mSEPT9 với AFP bằng cách tạo ra phương trình hồi quy tuyến tính trên phần mềm thống kê y học Medcal 22.0. So sánh giá trị chẩn đoán phối hợp hai dấu ấn với từng dấu ấn riêng lẻ bằng cách so sánh AUC theo phép kiểm định De Long.

- Đánh giá giá trị của một số biến số trong chẩn đoán UTBMTBG bằng mô hình phân tích hồi quy logistic, thể hiện qua chỉ số OR và p.

Đối với tất cả phép kiểm, $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

2.6. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu tiến hành theo đề cương nghiên cứu đã thông qua hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh Bệnh viện Quân y 103 và cho phép thực hiện theo chứng nhận số 15/2021/CNCh1-HĐĐĐ.

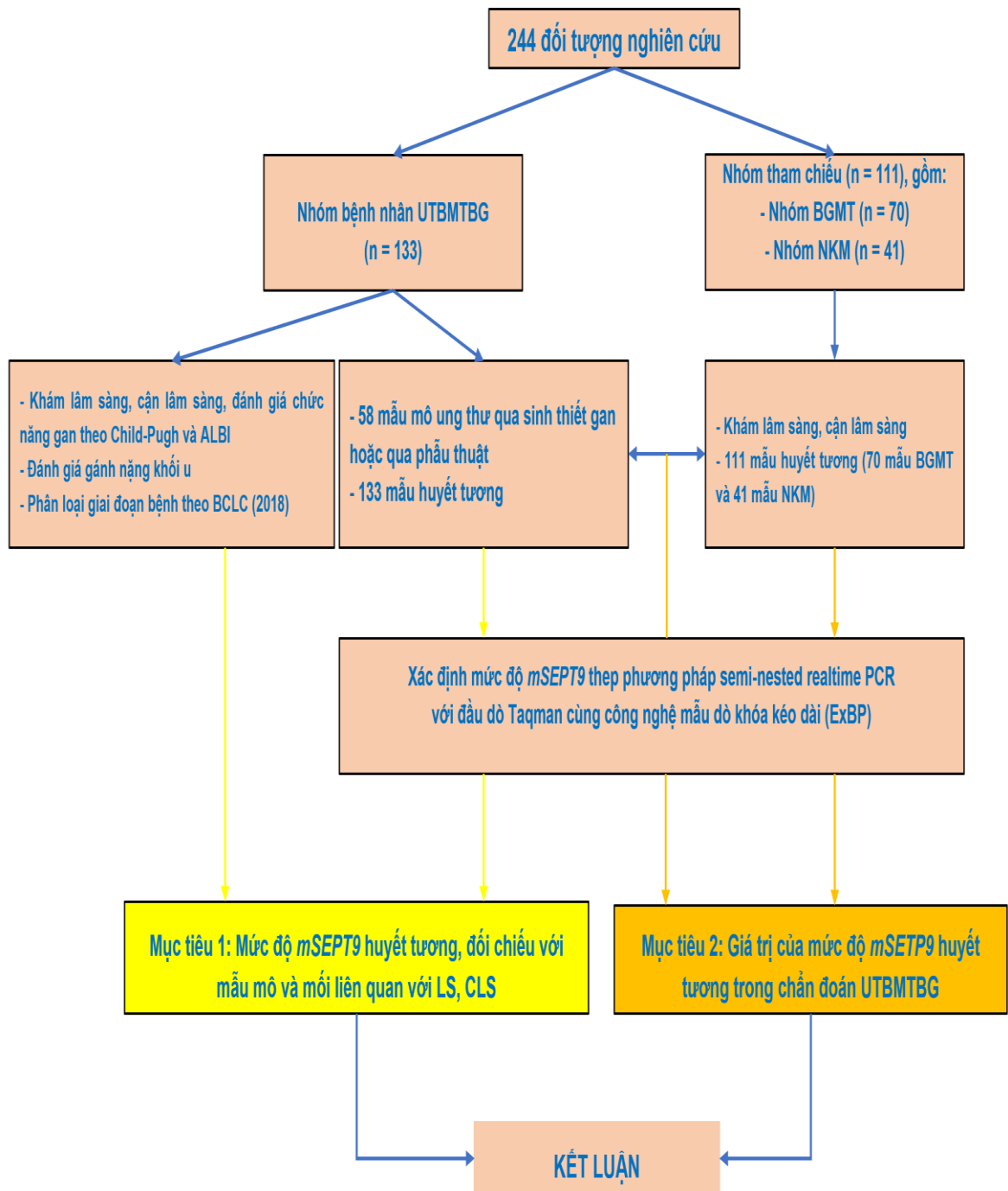
- Tất cả các BN tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia nghiên cứu.

- Các thông tin liên quan đến BN được bảo đảm bí mật.

- Các mẫu thu thập không can thiệp và ảnh hưởng tới quá trình điều trị cũng như gánh nặng tài chính cho BN.

- Kỹ thuật, thao tác liên quan đến BN được bảo đảm đúng chuyên môn theo quy trình của Bộ Y tế.

SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong thời gian từ tháng 01/2021 đến 6/2024, 133 BN UTBMTBG (trong đó có 58 BN thu thập được mẫu mô ung thư qua sinh thiết và phẫu thuật), 70 BN BGMT (xơ gan, viêm gan virus B/C mạn tính) và 41 NKM đáp ứng tiêu chuẩn được đưa vào nghiên cứu, chúng tôi thu được kết quả chính như sau:

3.1. Đặc điểm nhóm nghiên cứu

3.1.1. Đặc điểm tuổi, giới

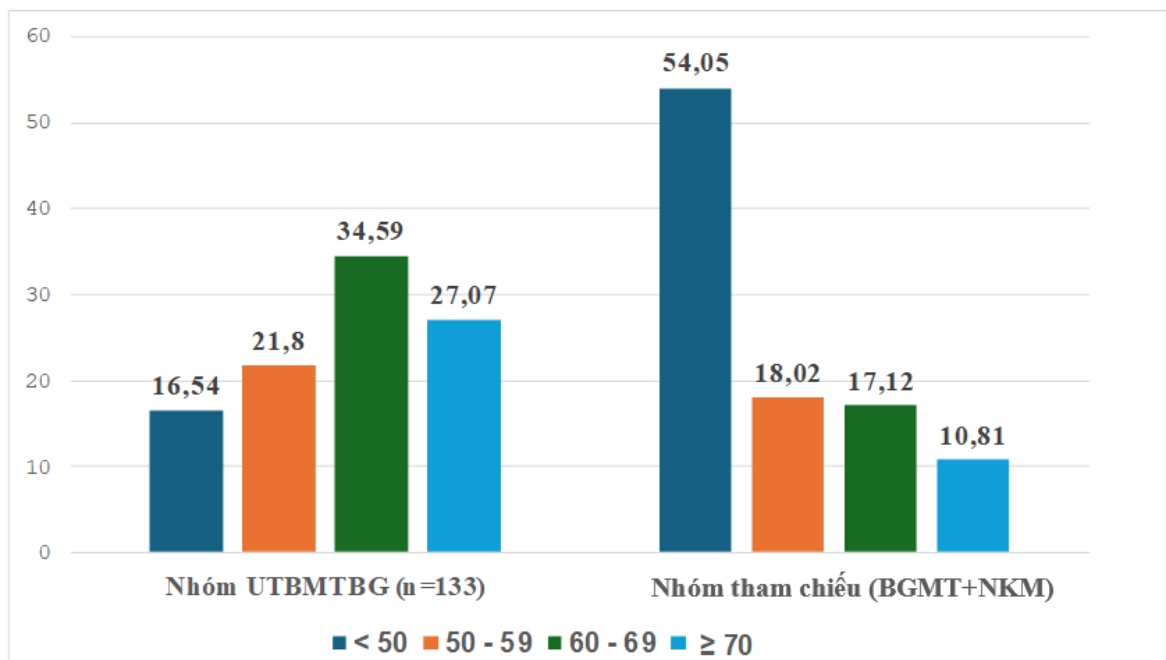
Bảng 3.1. Đặc điểm tuổi của các nhóm nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu	n	$\bar{X} \pm SD$	Min - Max	p
UTBMTBG ^a	133	$61,82 \pm 11,18$	28 - 84	$p_{a-b} < 0,001^*$ $p_{a-c} < 0,001^*$ $p_{b-c} = 0,20^*$
BGMT ^b	70	$51,40 \pm 13,06$	27 - 82	
NKM ^c	41	$47,83 \pm 15,96$	17 - 76	

* Kiểm định t-test

Nhận xét:

Tuổi trung bình của nhóm UTBMTBG là $61,82 \pm 11,18$, cao hơn so với tuổi trung bình của hai nhóm tham chiếu, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong khi đó, không có sự khác biệt có ý nghĩa tuổi trung bình giữa nhóm BN BGMT và nhóm NKM ($p = 0,20$).



Biểu đồ 3.1. Phân bố đối tượng nghiên cứu theo nhóm tuổi

Nhận xét:

Tỷ lệ BN UTBMTBG có tuổi ≥ 50 chiếm đa số (83,46%), trong đó nhiều nhất là nhóm 60 - 69 tuổi (34,59%). Nhóm tham chiếu chủ yếu ở độ tuổi < 50 (54,05%).

Bảng 3.2. Đặc điểm giới tính của các nhóm nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu	n	Nam <i>n (%)</i>	Nữ <i>n (%)</i>	Tỉ lệ Nam/ Nữ	p
UTBMTBG	133	126 (94,74)	7 (5,26)	18,00	0,26
BGMT	70	63 (90,00)	7 (10,00)	9,00	
NKM	41	36 (87,80)	5 (12,20)	7,29	

* Kiểm định Chi-square

Nhận xét:

Nam giới chiếm đa số trong các nhóm nghiên cứu, đặc biệt ở nhóm UTBMTBG (94,74%), với tỷ lệ nam/nữ là 18:1. Sự khác biệt về giới tính giữa các nhóm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,26$).

3.1.2. Đặc điểm yếu tố nguy cơ

Bảng 3.3. Đặc điểm các yếu tố nguy cơ nhóm UTBMTBG và BGMT

Yếu tố nguy cơ	Nhóm	UTBMTBG (n = 133)	BGMT (n = 70)	p
HBV (n, %)		109 (81,95)	65 (92,86)	0,035*
HCV (n, %)		8 (6,02)	3 (4,29)	0,61**
Đồng nhiễm HBV và HCV		1 (0,75)	1 (1,43)	0,64**
Lạm dụng rượu (n, %)		22 (16,54)	10 (14,29)	0,18*

*: Kiểm định Chi-square, **: Kiểm định Fisher exact test

Nhận xét: Nhiễm HBV là yếu tố nguy cơ phổ biến nhất ở cả hai nhóm, chiếm 81,95% ở nhóm UTBMTBG và 92,86% ở nhóm BGMT, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,035$). Các yếu tố nguy cơ khác như nhiễm HCV, đồng nhiễm HBV-HCV, lạm dụng rượu và xơ gan không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm ($p > 0,05$).

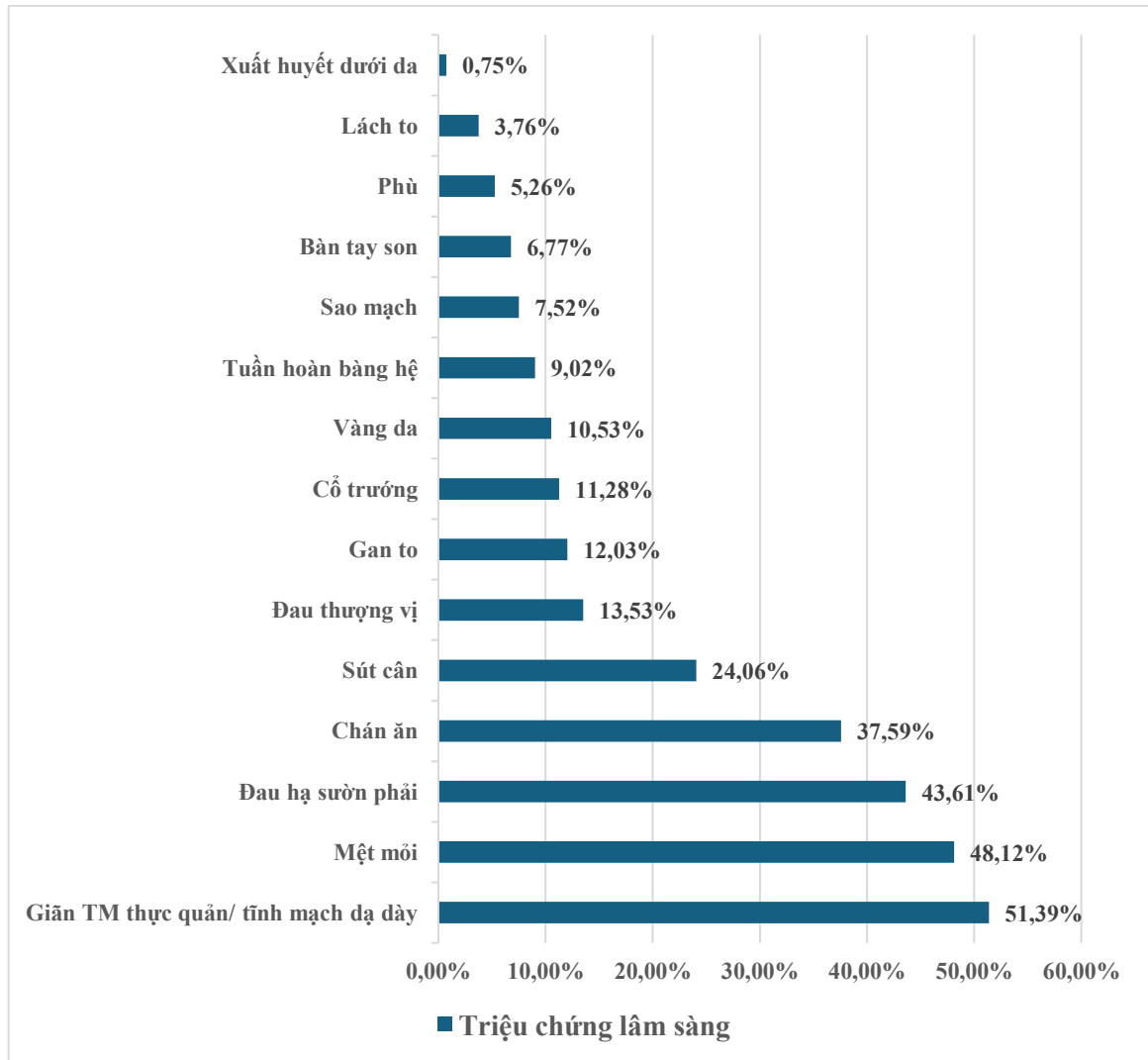
3.1.3. Đặc điểm lâm sàng nhóm bệnh nhân UTBMTBG

Bảng 3.4. Đặc điểm lý do phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan

Lý do vào viện	Giai đoạn bệnh		Tổng số n (%)	p
	theo BCLC (n = 133)			
	0 + A n (%)	B + C + D n (%)		
Chưa có biểu hiện lâm sàng	28 (84,85)	5 (15,15)	33 (24,81)	< 0,001*
Có biểu hiện lâm sàng	43 (43,00)	57 (57,00)	100 (75,19)	

* Kiểm định Fisher

Nhận xét: 24,81% BN được chẩn đoán UTBMTBG khi chưa có biểu hiện lâm sàng (qua tầm soát hoặc phát hiện tình cờ), trong đó có đến 84,85% đang ở giai đoạn 0/A theo phân loại BCLC, cao hơn có ý nghĩa thống kê so tỷ lệ tương ứng ở nhóm có biểu hiện lâm sàng (43,0%), $p < 0,001$.



Biểu đồ 3.2. Một số triệu chứng lâm sàng ở nhóm ung thư biểu mô tế bào gan
Nhận xét:

Trong số 133 BN UTBMTBG, triệu chứng phổ biến là mệt mỏi (48,12%) và đau hạ sườn phải (43,61%), triệu chứng thực thể hay gặp là gan to (12,03%). Có 51,39% BN được nội soi có giãn tĩnh mạch thực quản hoặc tĩnh mạch dạ dày và 11,28% cổ trướng phát hiện trên chẩn đoán hình ảnh.

3.1.4. Đặc điểm cận lâm sàng

Bảng 3.5. Đặc điểm chỉ số huyết học nhóm UTBMTBG và BGMT

Chỉ số huyết học		UTBMTBG (n = 133)	BGMT (n = 70)	p
Bạch cầu (G/L)	Trung vị (Tứ phân vị)	6,40 (5,49 - 7,99)	5,80 (4,80 - 6,70)	0,02*
	Giảm (< 4) (n, %)	12 (9,02)	8 (11,42)	0,59**
	Bình thường (n, %)	121 (90,98)	62 (88,57)	
	Tăng (> 10) (n, %)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Hồng cầu (T/L)	Trung vị (Tứ phân vị)	4,54 (3,94 - 4,86)	4,65 (4,06 - 5,14)	0,25*
Hemoglobin (g/L)	Trung vị (Tứ phân vị)	140,00 (126,75 - 149,00)	144,00 (129,00- 158,00)	0,06*
	Thiếu máu (n, %)	36 (27,07)	18(25,71)	0,75**
	Đa hồng cầu (n, %)	1 (0,75)	0 (0,00)	
Tiểu cầu (G/L)	Trung vị (Tứ phân vị)	170,00 (121,00 - 213,25)	158,00 (99,00 – 211,00)	0,13*
	> 400 (n, %)	2 (1,50)	0(0,00)	0,51**
	150 - 400 (n, %)	78 (58,65)	39(55,71)	
	< 150 (n, %)	53 (39,85)	31(44,29)	

*: Kiểm định Mann-Whitney U, **: Kiểm định Chi-square

Nhận xét:

Không có sự khác biệt về số lượng hồng cầu, nồng độ Hemoglobin và số lượng tiểu cầu giữa 2 nhóm UTBMTBG và BGMT, ngoại trừ số lượng bạch cầu nhóm UTBMTBG cao hơn rõ so với nhóm BGMT ($p = 0,02$).

0,8% BN UTBMTBG có tình trạng đa hồng cầu và 1,5% có tăng tiểu cầu > 400G/L.

Bảng 3.6. Đặc điểm một số chỉ số chức năng gan và enzyme gan nhóm UTBMTBG và BGMT

Chỉ số chức năng gan và enzyme gan		UTBMTBG (n = 133)	BGMT (n = 70)	p
Albumin (g/L)	Trung vị (Tứ phân vị)	38,00 (34,50 - 40,47)	35,08 (28,41 - 39,95)	0,02*
	< 35 (n, %)	39 (29,32)	16 (22,86)	0,32**
Bilirubin toàn phần (μ mol/L)	Trung vị (Tứ phân vị)	14,30 (11,10 - 19,93)	14,91 (10,80 - 25,10)	0,88*
	> 21 (n, %)	28 (21,05)	21 (30,00)	0,16**
Tỷ lệ Prothrombin (%)	Trung vị (Tứ phân vị)	84,00 (77,00 - 92,00)	72,00 (58,75 - 85,00)	0,002*
	< 70%	14 (10,53)	11 (15,71)	0,29**
AST (U/L)	Trung vị (Tứ phân vị)	52,20 (34,35 - 86,79)	48,89 (28,81 - 77,52)	0,17*
	> 40	85 (63,91)	38 (54,28)	0,18**
ALT (U/L)	Trung vị (Tứ phân vị)	43,44 (30,71 - 63,85)	41,55 (28,95 - 61,54)	0,80**
	> 40	76 (57,14)	37 (52,86)	0,56**

*: Kiểm định Mann-Whitney U, **: Kiểm định Chi-square

Nhận xét:

Nồng độ albumin huyết tương và tỷ lệ Prothrombin thấp hơn rõ ở nhóm BGMT so với nhóm UTBMTBG ($p = 0,02$ và $0,002$, theo thứ tự). Các chỉ số còn lại (Bilirubin và enzyme gan) không khác biệt rõ rệt giữa 2 nhóm.

Bảng 3.7. Đặc điểm nồng độ AFP huyết tương ở các nhóm nghiên cứu

Nồng độ AFP (ng/mL)		Nhóm UTBMTBG (n = 133)	Nhóm BGMT (n = 70)	p
Trung vị (Q1 - Q3)		49,36 (5,90 - 1089,59)	4,11 (2,56 - 6,71)	< 0,001*
Phân nhóm nồng độ AFP (n, %)	< 20 ng/mL	56 (42,11)	66 (94,29)	< 0,001**
	20 - 400 ng/mL	37 (27,82)	4 (5,71)	
	> 400 ng/mL	40 (30,08)	0 (0,00)	
Tổng		133 (100,00)	70 (100,00)	

*: Kiểm định Mann-Whitney U, **: Kiểm định Chi-square

Nhận xét:

Nhóm BN UTBMTBG có trung vị nồng độ AFP huyết tương cao hơn đáng kể so với nhóm BGMT (49,36 so với 4,11 ng/mL, $p < 0,001$).

42,11% BN UTBMTBG có nồng độ AFP huyết tương < 20 ng/mL. Tỷ lệ BN UTBMTBG tăng AFP > 400ng/mL là 30,08%.

3.1.5. Đặc điểm khối u gan và mô bệnh học

Bảng 3.8. Đặc điểm khối u gan ở nhóm BN UTBMTBG (n = 133)

Đặc điểm khối u gan		Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Vị trí	Gan phải	78	58,60
	Gan trái	25	18,80
	Cả hai thùy	30	22,60
Số lượng	1 u	82	61,65
	≥ 2 u	51	38,35
Đường kính tổng u (mm)	< 20 mm	9	6,77
	20 - 50 mm	66	49,62
	> 50 mm	58	43,61
	Trung vị (Q1 - Q3)	46,00 (29,75 - 70,25)	
Huyết khối TMC	Không	98	73,68
	Có	35	26,32
Di căn ngoài gan	Có	9	6,77
	Không	124	93,23

Nhận xét:

Đa số BN có khối u ở thùy gan phải (58,6%), khối u đơn độc (61,65%), với 43,61% khối u có đường kính lớn (> 50 mm).

Tỷ lệ BN có xâm lấn tạo huyết khối TMC là 26,32% và di căn ngoài gan là 6,77%.

Bảng 3.9. Đặc điểm mô bệnh học khối u gan (n = 58)

Đặc điểm mô học		Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Cấu trúc mô học	Dạng bè	34	58,63
	Dạng bè lớn	3	5,17
	Dạng đặc	3	5,17
	Dạng giả tuyến	0	0,0
	Dạng hỗn hợp	18	31,03
Hình thái tế bào	Thông thường	42	72,42
	Tế bào sáng	6	10,34
	Tế bào gan nhiễm mỡ	10	17,24
Mức độ biệt hóa theo WHO 2019	Biệt hóa cao	9	15,52
	Biệt hóa vừa	49	84,48
	Biệt hóa kém	0	0,0
Độ biệt hóa theo Edmondson-Steiner	Độ I	9	15,52
	Độ II	37	63,79
	Độ III	12	20,69
	Độ IV	0	0,0

Nhận xét:

Đa số mẫu mô có cấu trúc dạng bè (58,63%), hình thái tế bào dạng thông thường (72,42%).

Mức biệt hóa tế bào theo WHO chủ yếu gặp mức độ biệt hóa vừa (84,48%), còn theo phân loại Edmondson - Steiner (ES) thì biệt hóa độ II chiếm 63,79%.

3.1.6. Đặc điểm chức năng gan và giai đoạn bệnh

3.1.6.1. Đặc điểm chức năng gan

Bảng 3.10. Mức độ suy gan theo thang điểm Child-Pugh và ALBI ở BN UTBMTBG (n = 133)

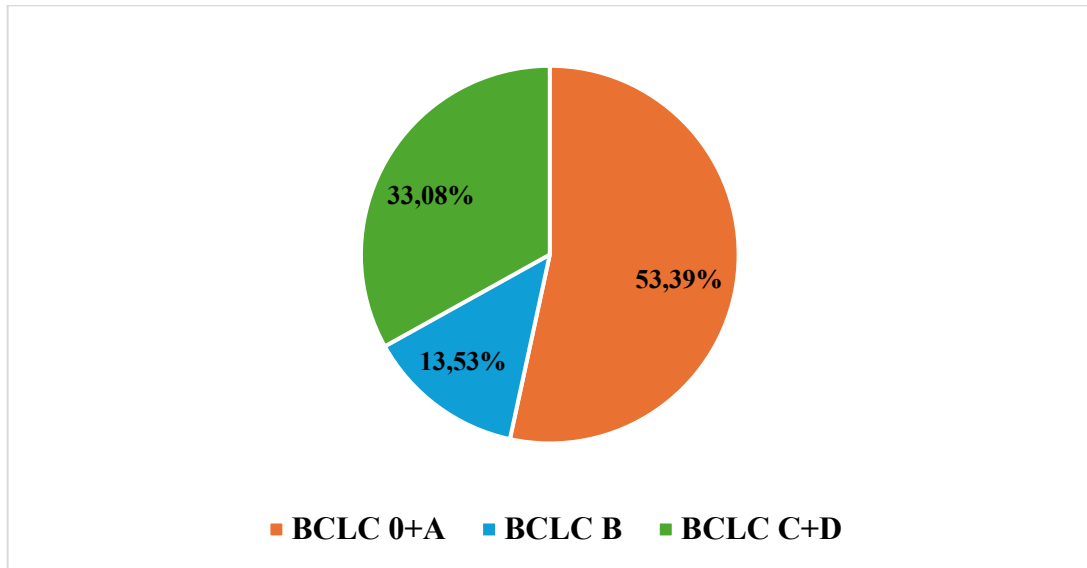
Mức độ suy gan	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Child - Pugh A	113	84,96
Child - Pugh B	17	12,78
Child - Pugh C	3	2,26
ALBI 1	41	30,83
ALBI 2	87	65,41
ALBI 3	5	3,76

Nhận xét:

Đa số BN (84,96%) có chức năng gan còn tốt (Child - Pugh A), chỉ có 2,26 % BN suy gan Child - Pugh C.

Theo thang điểm ALBI: Đa số BN ở mức ALBI 2 là 65,41%, mức ALBI 3 chỉ chiếm 3,76%.

3.1.6.2. Đặc điểm giai đoạn bệnh



Biểu đồ 3.3. Đánh giá giai đoạn UTBMTBG theo BCLC (n = 133)

Nhận xét:

53,39% BN UTBMTBG được chẩn đoán ở giai đoạn rất sớm hoặc sớm. Khoảng 1/3 số BN được phát hiện ở giai đoạn giai đoạn tiến triển có xâm lấn mạch hoặc di căn ngoài gan.

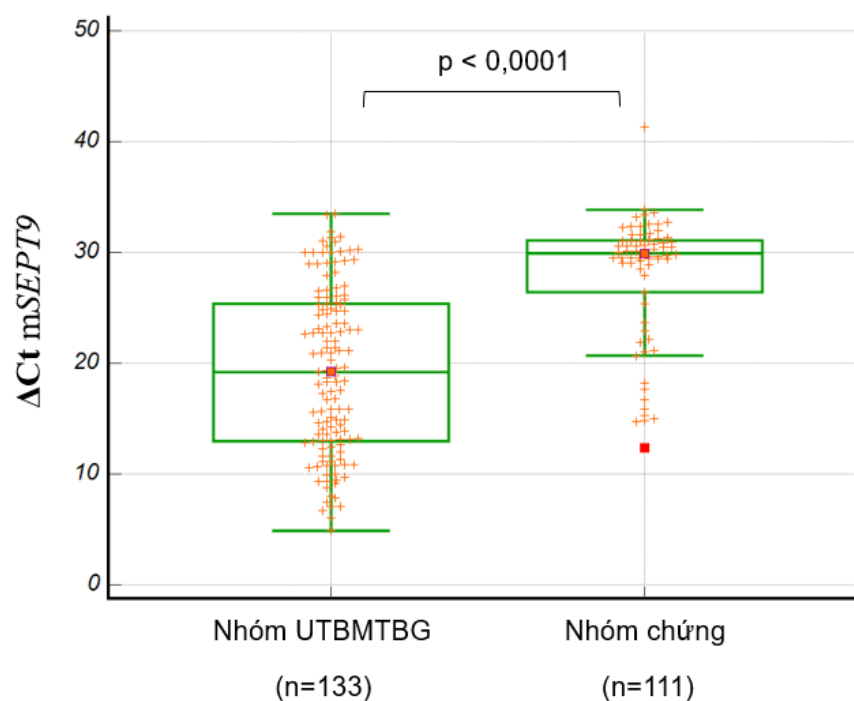
3.2. Mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư và mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở BN ung thư biểu mô tế bào gan

Giá trị ΔCt , như đã trình bày trong phần phương pháp nghiên cứu, được sử dụng để phản ánh mức độ methyl hóa tương đối của gen *SEPTIN9* (giá trị ΔCt càng cao thì phản ánh mức độ *mSEPT9* càng thấp). Trong các phân tích dưới đây, ΔCt được xử lý như một biến định lượng liên tục.

Phân tích trên 58 cặp mẫu mô ung thư và mẫu huyết tương được lấy trên cùng một BN UTBMTBG, 57 mẫu (98,3%) có tín hiệu khuếch đại đặc hiệu cho gen *SEPTIN9* bị methyl hóa. Giá trị ΔCt , phản ánh mức độ methyl hóa tương đối, được tính cho toàn bộ các mẫu được phân tích, trung vị ΔCt là 9,20 chu kỳ (Tứ phân vị: 6,74 - 16,88).

3.2.1. Mức độ methyl hóa gen SEPTIN9 trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư ở BN ung thư biểu mô tế bào gan

3.2.1.2. Mức độ methyl hóa gen SEPTIN9 trong huyết tương



* Kiểm định Mann-Whitney

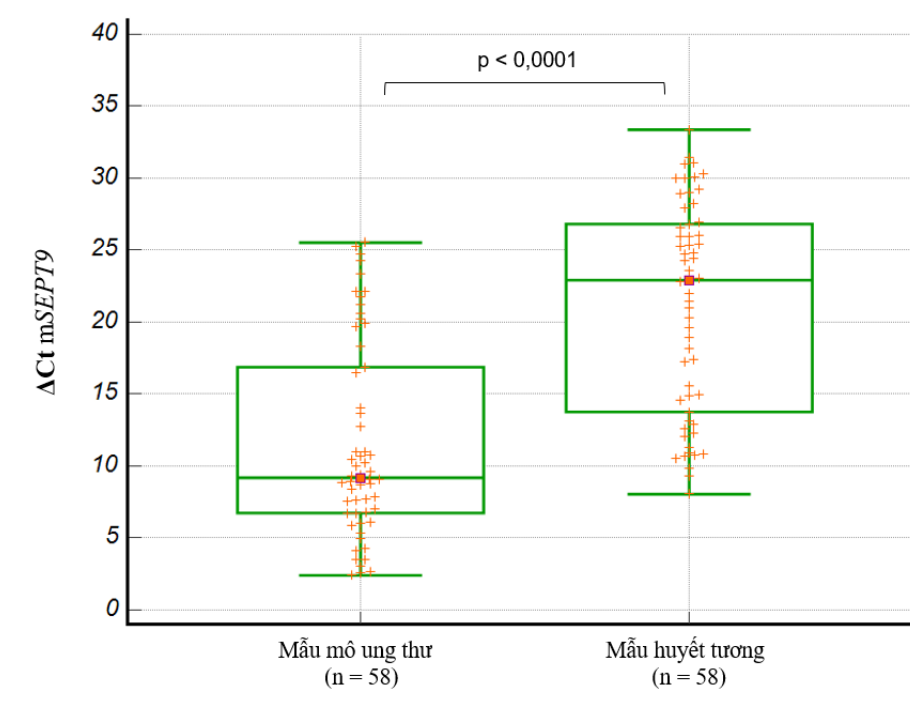
Biểu đồ 3.4. So sánh giá trị ΔC_t của mSEPT9 trong huyết tương giữa nhóm UTBMTBG (n = 133) và nhóm tham chiếu (n = 111)

Nhận xét:

Giá trị ΔC_t của mSEPT9 trong huyết tương được so sánh giữa nhóm BN UTBMTBG (n = 133) và nhóm tham chiếu (n = 111). Trung vị ΔC_t ở nhóm UTBMTBG là 19,22 chu kỳ (Q1 - Q3: 12,97 - 25,38), thấp hơn đáng kể so với nhóm tham chiếu là 29,55 chu kỳ (Q1 - Q3: 25,99 - 30,83), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,0001$).

3.2.1.2. Đối chiếu giữa mức độ mSEPT9 trong mô và huyết tương

Trong 133 BN UTBMTBG, chúng tôi thu được mẫu mô ung thư của 58 BN qua sinh thiết hoặc phẫu thuật để xác định mức độ mSEPT9 trên mẫu mô. Sau đây chúng tôi xin phân tích, đối chiếu giữa mức độ mSEPT9 trên 58 cặp mẫu mô và mẫu huyết tương, đồng thời bước đầu tìm hiểu mối tương quan giữa mức độ mSEPT9 trong mẫu mô so với mẫu huyết tương.

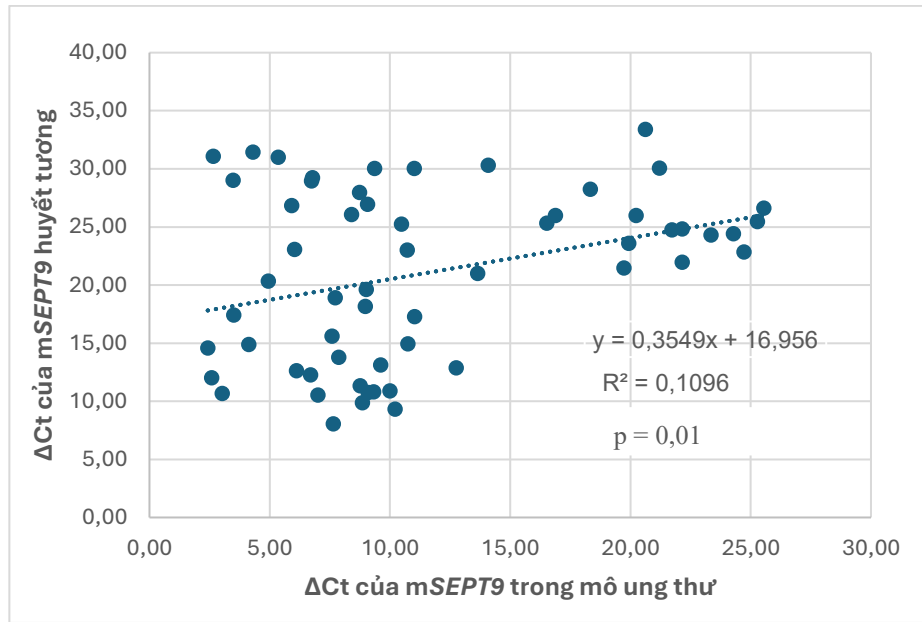


* Kiểm định Mann-Whitney U

Biểu đồ 3.5. So sánh giá trị ΔC_t của mSEPT9 giữa mẫu huyết tương và mẫu mô ung thư (n = 58)

Nhận xét:

Trong số 58 BN có cả mẫu huyết tương và mô ung thư, giá trị ΔC_t của mSEPT9 trong mô ung thư thấp hơn rõ rệt so với huyết tương (trung vị (Q1 - Q3) là 9,20 (6,74 - 16,88) chu kỳ ở mô ung thư và 22,93 (13,77 - 26,82) chu kỳ ở huyết tương, $p < 0,001$).



* *Tương quan Pearson*

Biểu đồ 3.6. Mối tương quan giữa giá trị ΔCt của mSEPT9 huyết tương và ΔCt của mSEPT9 trong mô ung thư (n = 58)

Nhận xét: Có mối tương quan thuận, mức độ yếu giữa ΔCt của mSEPT9 huyết tương và mẫu mô (hệ số tương quan $r = 0,33$; $p = 0,01$).

Bảng 3.11. Mối tương quan giữa mSEPT9 trong mẫu huyết tương và mẫu mô ung thư theo yếu tố nguy cơ (n = 58)

Nhóm BN		n	Hệ số tương quan r	p
Nhiễm HCV	Dương tính	3	-0,97	0,15
	Âm tính	55	0,35	0,008
Nhiễm HBV	Dương tính	40	0,35	0,03
	Âm tính	18	0,26	0,29
Lạm dụng rượu	Có	6	0,36	0,49
	Không	52	0,33	0,02

* *Tương quan Pearson*

Nhận xét:

Mối tương quan có ý nghĩa được ghi nhận ở nhóm nhiễm HBV ($r = 0,35$; $p = 0,03$), tuy nhiên không ghi nhận ở nhóm nhiễm HCV và lạm dụng rượu.

Bảng 3.12. Mối tương quan giữa mSEPT9 trong huyết tương và mẫu mô ung thư theo phân nhóm AFP, gánh nặng khối u và giai đoạn bệnh (n = 58)

Phân nhóm BN		n	Hệ số tương quan r	p
AFP (ng/mL)	≤ 400	48	0,35	0,01
	> 400	10	0,26	0,47
Vị trí khối u	Thùy phải	38	0,25	0,13
	Thùy trái	12	0,38	0,22
	Hai thùy	8	0,80	0,02
Số lượng u	1	40	0,35	0,03
	≥ 2	18	0,32	0,20
Kích thước khối u (mm)	≤ 50	36	0,24	0,15
	> 50	22	0,53	0,01
Huyết khối TMC	Có	7	0,70	0,10
	Không	51	0,30	0,03
Di căn ngoài gan	Có	6	0,6	0,21
	Không	52	0,28	0,04
Giai đoạn bệnh theo BCLC	0/A	39	0,27	0,10
	B/ C/ D	19	0,58	0,01

* Tương quan Pearson

Nhận xét:

Tương quan có ý nghĩa được ghi nhận ở nhóm có khối u > 50 mm ($r = 0,53$; $p = 0,01$), tổn thương cả hai thùy gan ($r = 0,80$; $p = 0,02$) và nhóm có nồng độ AFP ≤ 400 ng/mL ($r = 0,35$; $p = 0,01$), nhưng không đạt ý nghĩa thống kê ở các nhóm còn lại.

Ở nhóm BN UTBMTBG giai đoạn BCLC B/C/D, hệ số tương quan đạt $r = 0,58$ ($p = 0,01$), trong khi ở giai đoạn sớm hơn (BCLC 0/A), tương quan không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.13. Mối tương quan giữa mSEPT9 trong huyết tương và mẫu mô ung thư theo phân nhóm mô bệnh học (n = 58)

Phân nhóm BN		n	Hệ số tương quan r	p
Mức độ biệt hóa theo WHO	Biệt hóa cao	9	0,35	0,30
	Biệt hóa vừa	49	0,32	0,02
	Biệt hóa thấp	0	-	-
Mức độ biệt hóa theo ES	Độ 1	9	0,39	0,30
	Độ 2	37	0,33	0,04
	Độ 3	8	0,31	0,33
Cấu trúc mô học	Dạng bè	34	0,35	0,047
	Dạng khác	24	0,27	0,19
Hình thái tế bào	Thông thường	42	0,39	0,01
	Khác	16	0,10	0,72
Tình trạng xơ gan	Có	19	0,07	0,77
	Không	39	0,38	0,02

* *Tương quan Pearson*

Nhận xét:

Nhóm BN UTBMTBG có mô bệnh học điển hình, bao gồm cấu trúc dạng bè và hình thái tế bào thông thường, cho thấy tương quan đều có ý nghĩa ($r = 0,35$; $p = 0,01$ và $r = 0,39$; $p = 0,01$, theo thứ tự). Tương quan cũng có ý nghĩa ở nhóm biệt hóa vừa (theo WHO) và độ II (theo Edmondson-Steiner) với r lần lượt là 0,32 và 0,33; $p < 0,05$.

3.2.2. Mối liên quan giữa mức độ mSEPT9 huyết tương với lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân UTBMTBG

3.2.2.1. Mối liên quan giữa mức độ mSEPT9 huyết tương với lâm sàng

Bảng 3.14. Mối liên quan giữa mSEPT9 huyết tương với tuổi, giới và yếu tố nguy cơ (n = 133)

Tuổi, giới và yếu tố nguy cơ		mSEPT9 huyết tương (ΔCt)	
		Trung vị (Tứ phân vị)	p
Giới tính	Nam (n = 126)	19,29 (13,00 - 25,45)	0,35*
	Nữ (n = 7)	14,59 (11,28 - 22,30)	
Tuổi	< 60 (n = 51)	20,88 (12,23 - 26,04)	0,59*
	$\geq$ 60 (n = 82)	19,06 (13,17 - 25,24)	
Nhiễm HBV	Có (n = 109)	18,35 (12,87 - 25,26)	0,24*
	Không (n = 24)	23,04 (14,09 - 26,27)	
Nhiễm HCV	Có (n = 8)	23,69 (14,09 - 30,01)	0,23*
	Không (n = 125)	18,91 (12,87 - 25,26)	
Lạm dụng rượu	Có (n = 22)	18,82 (12,50 - 24,87)	0,94*
	Không (n = 111)	19,22 (13,03 - 25,43)	

*: Kiểm định Mann-Whitney U

Nhận xét:

Không ghi nhận mối liên quan giữa mức độ mSEPT9 huyết tương với giới tính (nam/nữ), phân nhóm tuổi (< 60 và $\geq$ 60) và yếu tố nguy cơ của UTBMTBG, $p > 0,05$.

Bảng 3.15. Mối liên quan giữa mSEPT9 huyết tương với một số triệu chứng lâm sàng (n = 133)

Đặc điểm lâm sàng		mSEPT9 huyết tương (Δ Ct)		Đặc điểm lâm sàng		mSEPT9 huyết tương (Δ Ct)	
		Trung vị (Tứ phân vị)	p			Trung vị (Tứ phân vị)	p
Chán ăn	Có (n = 50)	20,25 (11,12 - 25,45)	0,72	Sụt cân	Có (n = 32)	18,92 (12,20 - 25,08)	0,71
	Không (n = 83)	18,91 (13,69 - 25,35)			Không (n = 101)	19,22 (12,97 - 25,53)	
Đau hạ sườn phải	Có (n = 58)	19,58 (13,00 - 24,87)	0,83	Đau thượng vị	Có (n = 18)	16,29 (9,71 - 23,55)	0,19
	Không (n = 75)	18,91 (12,91 - 26,04)			Không (n = 115)	19,55 (13,13 - 25,69)	
Sốt	Có (n = 2)	20,06 (18,16 - 21,96)	0,91	Phù	Có (n = 7)	13,00 (11,45 - 21,41)	0,25
	Không (n = 131)	19,22 (12,91 - 25,43)			Không (n = 126)	19,46 (13,09 - 25,45)	
Vàng da	Có (n = 14)	18,91 (12,50 - 23,55)	0,56	Sao mạch	Có (n = 10)	17,13 (12,50 - 23,55)	0,66
	Không (n = 119)	19,22 (13,02 - 25,69)			Không (n = 123)	19,37 (13,03 - 25,43)	
Gan to	Có (n = 16)	13,40 (8,29 - 21,54)	0,02	Lách to	Có (n = 5)	21,12 (13,67 - 23,31)	0,95
	Không (n = 117)	19,55 (13,10 - 26,01)			Không (n = 128)	19,06 (12,94 - 25,40)	
Tuần hoàn bàng hệ	Có (n = 12)	13,58 (11,80 - 16,72)	0,03	Cổ trướng	Có (n = 15)	13,90 (11,1 - 24,87)	0,20
	Không (n = 121)	20,33 (13,08 - 25,98)			Không (n = 118)	19,58 (13,10 - 25,53)	

*: Kiểm định Mann-Whitney U

Nhận xét: Không có liên quan giữa mức độ mSEPT9 huyết tương với một số triệu chứng lâm sàng ở BN UTBMTBG.

3.2.2.2. Liên quan giữa mSEPT9 huyết tương với một số chỉ số xét nghiệm máu

Bảng 3.16. Mối liên quan giữa mSEPT9 trong huyết tương với một số chỉ số xét nghiệm máu (n = 133)

Xét nghiệm tiểu cầu và enzym gan		mSEPT9 huyết tương (Δ Ct)		Xét nghiệm chức năng gan		mSEPT9 huyết tương (Δ Ct)	
		Trung vị (Tứ phân vị)	p			Trung vị (Tứ phân vị)	p
Tiểu cầu (G/L)	≥ 150 (n = 53)	18,3 (13,0 - 23,4)	0,3	Albumin (g/L)	≥ 35 (n = 94)	15,8 (11,1 - 24,3)	0,09
	< 150 (n = 80)	21,1 (12,8 - 26,3)			< 35 (n = 39)	20,9 (13,6 - 25,8)	
	rho	0,08	0,33		rho	0,23	0,01
AST (U/L)	≥ 40 (n = 85)	15,9 (11,1 - 23,4)	0,02	Bilirubin (μ mol/L)	≥ 21 (n = 28)	14,8 (11,2 - 22,5)	0,03
	< 40 (n = 48)	22,8 (16,2 - 26,9)			< 21 (n = 105)	19,6 (13,4 - 26,0)	
	rho	-0,19	0,02		rho	-0,16	0,07
ALT (U/L)	≥ 40 (n = 76)	15,8 (11,2 - 22,7)	0,001	Prothrombin (%)	≥ 70 (n = 119)	19,6 (13,1 - 25,6)	0,17
	< 40 (n = 57)	23,1 (15,3 - 26,9)			< 70 (n = 14)	14,8 (10,7 - 22,1)	
	rho	-0,13	0,14		rho	0,13	0,11

*: Kiểm định Mann-Whitney U và tương quan Spearman

Nhận xét:

Mức mSEPT9 huyết tương ở nhóm BN có hoạt độ ALT, AST ≥ 40 U/L và Bilirubin ≥ 21 μ mol/L cao hơn (thông qua giá trị Δ Ct thấp hơn) so với BN có ALT < 40 U/L và Bilirubin < 21 μ mol/L (các p $< 0,05$).

Không ghi nhận mối liên quan giữa mSEPT9 huyết tương với các chỉ số như số lượng tiểu cầu, nồng độ Albumin và tỷ lệ Prothrombin máu.

Bảng 3.17. Mối liên quan giữa mSEPT9 với nồng độ AFP huyết tương (n = 133)

AFP huyết tương (ng/mL)		mSEPT9 huyết tương (Δ Ct)	
		Trung vị (Tứ phân vị)	p
Phân mức AFP	≤ 20 (n = 56)	20,97 (14,91 - 25,35)	0,15
	> 20 (n = 77)	15,89 (11,92 - 25,46)	
Phân mức AFP	≤ 400 (n = 93)	20,33 (13,95 - 26,01)	0,04
	> 400 (n = 40)	15,13 (11,35 - 23,42)	
Hệ số tương quan (rho)		- 0,25	0,005

*: Kiểm định Mann-Whitney U và tương quan Spearman

Nhận xét:

Giá trị Δ Ct của mSEPT9 huyết tương thấp hơn ở nhóm AFP > 20 ng/mL so với ≤ 20 ng/mL nhưng chưa có ý nghĩa thống kê ($p = 0,15$). Tuy nhiên lại ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm BN có AFP ≤ 400 ng/mL và > 400 ng/mL ($p = 0,04$).

Bảng 3.18. Tương quan giữa giá trị ΔC_t của mSEPT9 huyết tương với một số chỉ số xét nghiệm và thang điểm đánh giá chức năng gan

ΔC_t mSEPT9 Chỉ số	Hệ số tương quan (rho)	p*
Tiểu cầu	0,08	0,33
Prothrombin(%)	0,13	0,11
INR	-0,14	0,09
AST (U/L)	-0,19	0,02
ALT (U/L)	-0,13	0,14
Bilirubin TP(μ mol/L)	-0,16	0,07
Albumin (g/L)	0,23	0,01
AFP (ng/ml)	- 0,25	0,005
Điểm Child-Pugh	-0,18	0,03
Điểm ALBI	-0,25	0,004

* Tương quan Spearman

Nhận xét:

Mức độ mSEPT9 có tương quan nghịch rất yếu với chỉ số AST ($r = -0,19$, $p = 0,02$) và điểm Child-Pugh ($r = -0,18$, $p = 0,03$); tương quan nghịch mức độ yếu với chỉ số AFP ($r = -0,25$, $p = 0,005$), điểm ALBI ($r = -0,25$, $p = 0,004$) và có tương quan thuận mức độ yếu với chỉ số Albumin ($r = 0,23$, $p = 0,01$).

3.2.2.3. Mối liên quan giữa mSEPT9 huyết tương với đặc điểm khối u và giai đoạn bệnh ở BN ung thư biểu mô tế bào gan

Bảng 3.19. Mối liên quan giữa mSEPT9 trong huyết tương với gánh nặng khối u (n = 133)

Gánh nặng khối u		mSEPT9 huyết tương (Δ Ct)	
		Trung vị (Tứ phân vị)	p
Vị trí u	Thùy phải ^(a)	22,68 (14,29 - 26,49)	$p_{a-b} = 0,53^*$
	Thùy trái ^(b)	17,27 (13,02 - 27,26)	$p_{a-c} < 0,001^*$
	2 thùy ^(c)	14,24 (10,53 - 19,22)	$p_{b-c} = 0,03^*$
Số lượng u	1 (n = 82)	21,23 (13,60 - 25,82)	0,01[*]
	≥ 2 (n = 51)	15,86 (11,61 - 22,54)	
	rho	-0,3	< 0,001^{**}
Đường kính u (mm)	≥ 50 (n = 58)	15,38 (11,12 - 22,84)	0,003[*]
	< 50 (n = 75)	21,46 (14,54 - 26,66)	
	rho	-0,4	< 0,001^{**}
Huyết khối TMC	Không (n = 98)	21,43 (14,29 - 26,49)	< 0,001[*]
	Có (n = 35)	13,00 (9,53 - 20,64)	
Di căn ngoài gan	Không (n = 124)	19,29 (13,00 - 25,40)	0,62 [*]
	Có (n = 9)	15,59 (9,61 - 26,14)	

*: Kiểm định Mann-Whitney, **: Tương quan Spearman

Nhận xét:

- BN có khối u ở cả hai thùy gan có giá trị Δ Ct của mSEPT9 thấp hơn đáng kể so với nhóm u ở thùy phải ($p < 0,001$) và thùy trái ($p = 0,03$).

- BN có ≥ 2 khối u hoặc kích thước u ≥ 50 mm có giá trị Δ Ct mSEPT9 thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm có 1 u hoặc kích thước < 50 mm.

- Giá trị Δ Ct của mSEPT9 thấp hơn rõ ở nhóm BN huyết khối TMC ($p < 0,001$), nhưng không khác biệt ở nhóm có/ không di căn ($p = 0,62$).

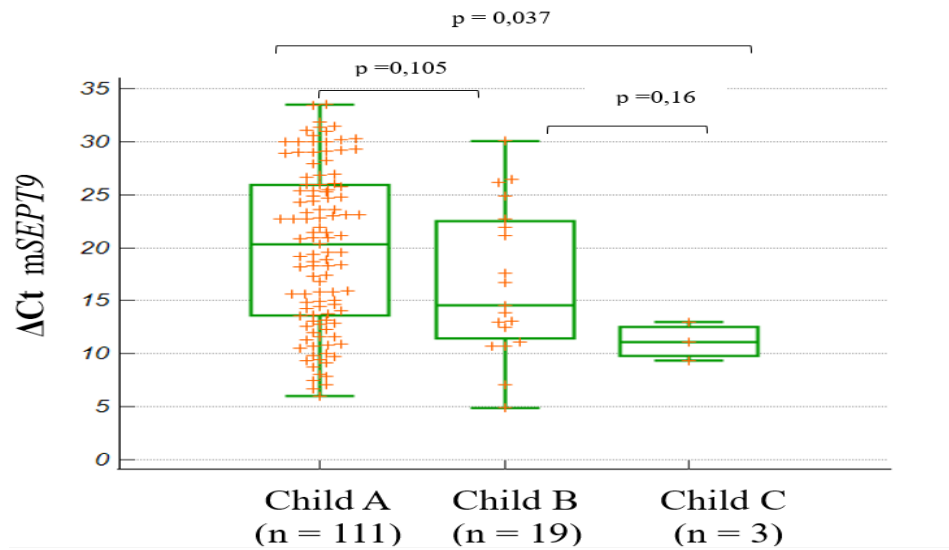
Bảng 3.20. Mối liên quan giữa mSEPT9 trong huyết tương với độ biệt hóa tế bào u trên mô bệnh học (n = 58)

Độ biệt hóa tế bào u		mSEPT9 huyết tương (ΔCt) Trung vị (Tứ phân vị)	p
Mức độ biệt hóa theo WHO 2019	Biệt hóa cao (n = 9)	24,31 (19,43 - 27,46)	0,24*
	Biệt hóa vừa (n = 49)	21,71 (12,88 - 26,60)	
Độ biệt hóa theo ES	Độ I + II (n = 46)	22,94 (13,77 - 27,97)	0,84**
	Độ III + IV (n = 12)	22,49 (13,81 - 25,75)	

*: Kiểm định Mann – Whitney; **: Kiểm định Kruskal - Wallis

Nhận xét:

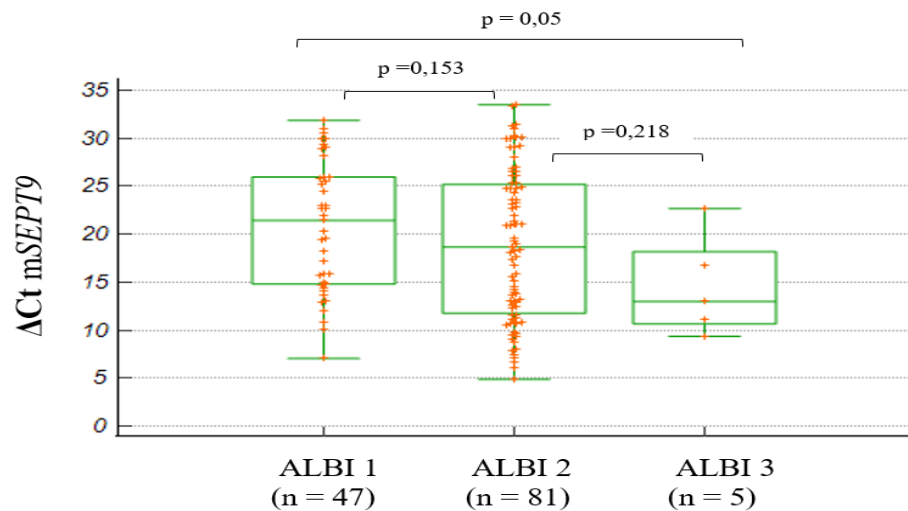
Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị Δ Ct của mSEPT9 huyết tương giữa các nhóm phân theo mức độ biệt hóa mô học theo WHO 2019 và Edmondson - Steiner.



* Kiểm định Mann-Whitney U

Biểu đồ 3.7. Mối liên quan giữa mức độ mSEPT9 huyết tương với chức năng gan theo phân loại Child-Pugh (n = 133)

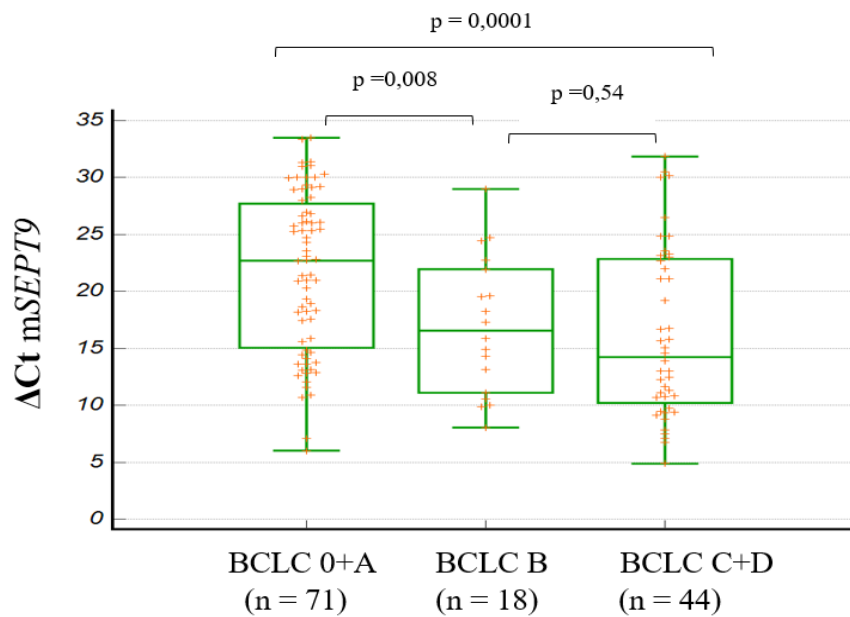
Nhận xét: Giá trị ΔC_t của mSEPT9 giảm dần theo mức phân loại suy gan Child – Pugh, khác biệt rõ giữa nhóm Child-Pugh A và Child-Pugh C (p = 0,037).



* Kiểm định Mann-Whitney U

Biểu đồ 3.8. Giá trị ΔC_t mSEPT9 trong huyết tương theo chức năng gan theo điểm ALBI (n = 133)

Nhận xét: Giá trị ΔC_t của mSEPT9 giảm dần theo mức phân loại suy gan ALBI, khác biệt rõ giữa nhóm ALBI 1 và ALBI 3 (p = 0,05).



* Kiểm định Mann-Whitney U

Biểu đồ 3.9. Giá trị ΔC_t mSEPT9 trong huyết tương theo giai đoạn bệnh BCLC 2018 (n = 133)

Nhận xét:

Giá trị ΔC_t của mSEPT9 huyết tương ở nhóm BN UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm (BCLC O và A) cao hơn rõ rệt với nhóm BN ở giai đoạn trung gian (BCLC B) và giai đoạn tiến triển/ cuối (BCLC C và D), p lần lượt là 0,008 và $< 0,001$.

3.3. Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan

Bên cạnh việc phân tích mối liên quan giữa mức độ mSEPT9 huyết tương với các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở BN UTBMTBG, trong phần tiếp theo chúng tôi tập trung đánh giá vai trò của dấu ấn này trong nhận diện nguy cơ mắc UTBMTBG. Cụ thể, luận án thực hiện các phân tích tổng hợp nhằm xác định khả năng phân biệt giữa BN UTBMTBG và các nhóm tham chiếu, bao gồm: xác định điểm cắt tối ưu, tính toán độ nhạy - độ đặc hiệu, ước lượng nguy cơ tương đối và phân tích hồi quy đa biến. Những phân tích này nhằm kiểm định tiềm năng của mSEPT9 huyết tương như một dấu ấn không xâm lấn hỗ trợ sàng lọc và phát hiện UTBMTBG.

3.3.1. Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan

Bảng 3.21. So sánh mức độ mSEPT9 huyết tương ở các đối tượng nghiên cứu

Chỉ số		UTBMTBG ^a (n = 133)	BGMT ^b (n = 70)	NKM ^c (n = 41)	p
mSEPT9 (ΔCt)	Trung vị	19,20	29,93	29,29	p_{a-b} < 0,001
	Tứ phân vị	12,97 - 25,37	26,43 - 31,10	25,96 - 30,39	p_{a-c} < 0,001
	Min - Max	4,88 - 33,50	12,37 - 41,34	20,75 - 33,70	p _{b-c} > 0,05

* Kiểm định Mann-Whitney U

Nhận xét:

Giá trị ΔCt của mSEPT9 huyết tương ở nhóm BN UTBMTBG thấp hơn rõ (thể hiện mức methyl hóa cao hơn) so với nhóm BN BGMT và NKM (trung vị 19,20 so với 29,93 và 29,29, p < 0,001), trong khi không có sự khác biệt về mức độ methyl hóa SEPTIN9 giữa nhóm BGMT và NKM.

Bảng 3.22. Giá trị của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG
(so với các nhóm tham chiếu)

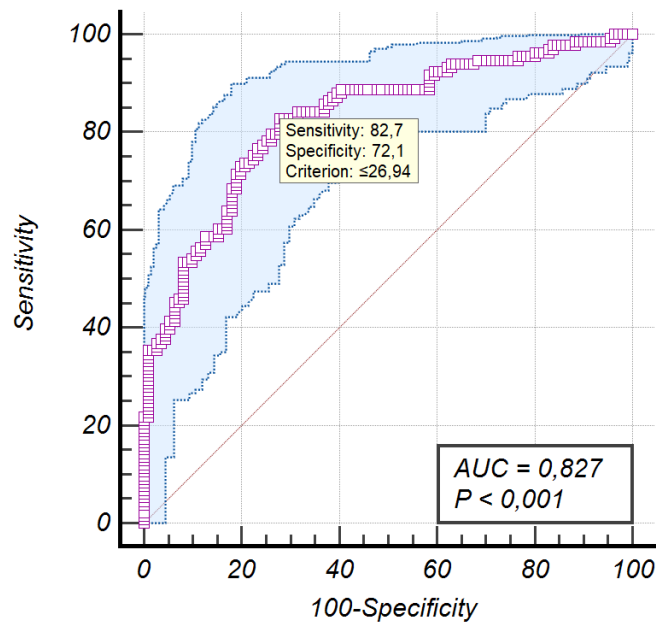
Chỉ số	AUC	Điểm cắt	95% CI	Se (%)	Sp (%)	OR	p
Nhóm không ung thư (BGMT và NKM) (n = 111)							
mSEPT9 (Δ Ct)	0,827	26,94	0,764 - 0,874	82,71	72,07	11,72	< 0,001
Nhóm BGMT (n = 70)							
mSEPT9 (Δ Ct)	0,824	28,25	0,764 - 0,874	84,21	72,86	14,32	< 0,001
Nhóm NKM (n = 41)							
mSEPT9 (Δ Ct)	0,833	24,75	0,769 - 0,885	71,43	87,80	17,35	< 0,001

Nhận xét:

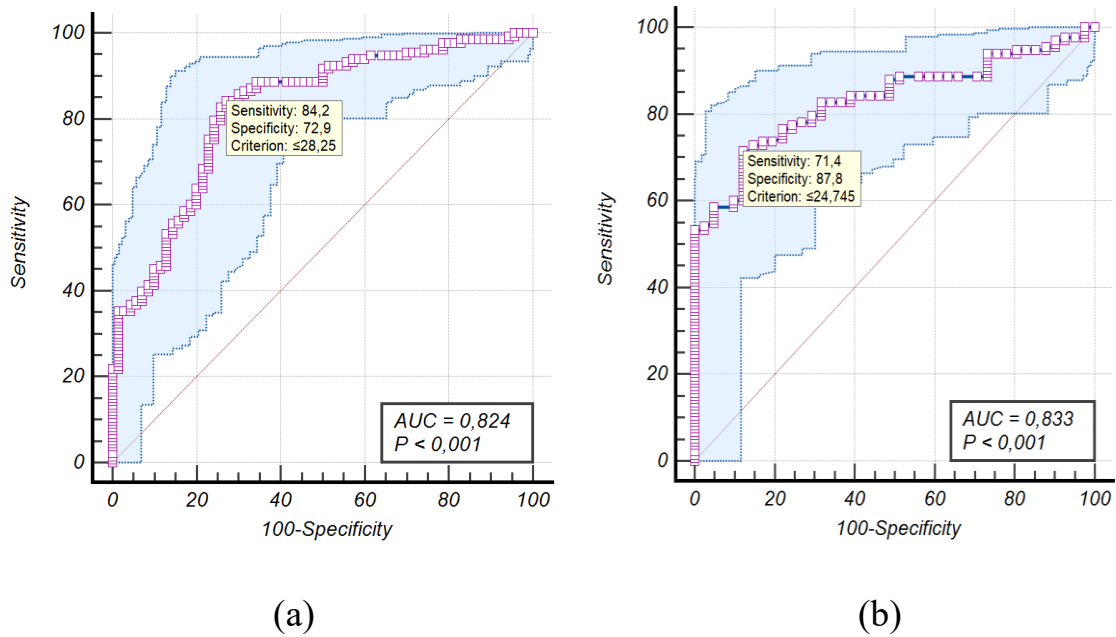
- So với nhóm không ung thư gan, mSEPT9 huyết tương có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG với AUC 0,827, tại điểm cắt 26,94 có độ nhạy 82,71% và độ đặc hiệu 72,07%. BN có Δ Ct $\leq$ 26,94 có nguy cơ mắc UTBMTBG cao gấp 11,72 lần so với người có Δ Ct $>$ 26,94, $p < 0,001$.

- Với nhóm BGMT, mSEPT9 huyết tương có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG với AUC 0,824, tại điểm cắt 28,25 có độ nhạy 84,21% và độ đặc hiệu 72,86%. BN có Δ Ct $\leq$ 28,25 có nguy cơ mắc UTBMTBG cao gấp 14,32 lần so với người có Δ Ct $>$ 28,25, $p < 0,001$.

- mSEPT9 huyết tương cũng có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG với AUC 0,833 khi nhóm tham chiếu là NKM.



Biểu đồ 3.10. Đường cong ROC của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm không ung thư (BGMT + NKM)



Biểu đồ 3.11. Đường cong ROC của mSEPT9 huyết tương chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm BGMT (a) và NKM (b)

3.3.2. Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan có AFP < 20ng/mL

Bảng 3.23. mSEPT9 huyết tương ở nhóm UTBMTBG có AFP < 20ng/mL so với nhóm BGMT và NKM

Chỉ số		UTBMTBG có AFP < 20ng/mL ^a (n = 56)	BGMT ^b (n = 70)	NKM ^c (n = 41)	p
mSEPT9 (ΔCt)	Trung vị	20,97	29,93	29,29	p_{a-b} < 0,05
	Tứ phân vị	14,89 - 25,39	26,43 - 31,10	25,96 -30,39	p_{a-c} < 0,05
	Min - max	6,03 - 31,06	12,37 - 41,34	20,75 -33,70	p _{b-c} > 0,05

* Kiểm định Mann-Whitney U

Nhận xét:

Giá trị ΔCt của mSEPT9 huyết tương ở nhóm BN UTBMTBG có AFP < 20 ng/mL thấp hơn rõ (thể hiện mức methyl hóa cao hơn) so với nhóm BN BGMT và NKM (trung vị 20,97 so với 29,93 và 29,29, p < 0,05), trong khi không có sự khác biệt về mức độ methyl hóa giữa nhóm BGMT và NKM.

Bảng 3.24. Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL so với các nhóm tham chiếu

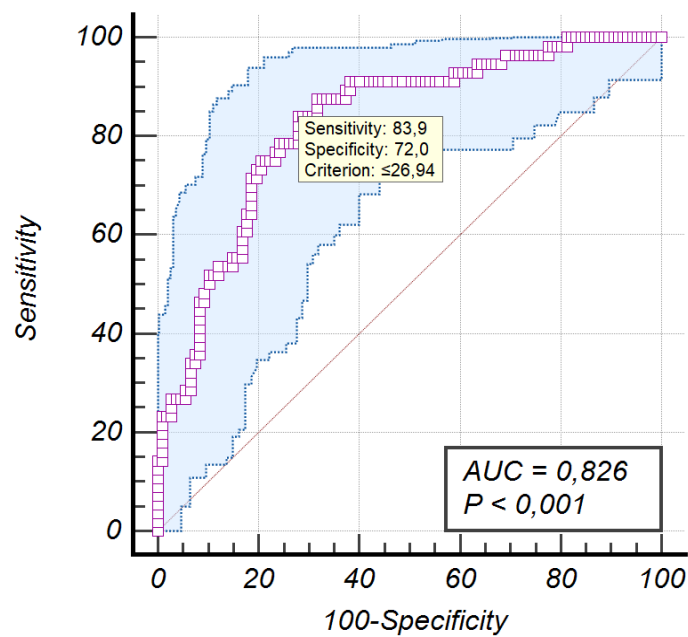
Chỉ số	AUC	Điểm cắt	95%CI	Se (%)	Sp (%)	OR	p
Nhóm không ung thư (BGMT và NKM) (n = 111)							
mSEPT9 (ΔCt)	0,826	26,94	0,76 - 0,88	83,9	72,0	11,87	< 0,001
Nhóm BGMT (n = 70)							
mSEPT9 (ΔCt)	0,817	28,25	0,74 - 0,88	87,5	72,7	18,67	< 0,001
Nhóm NKM (n = 41)							
mSEPT9 (ΔCt)	0,841	24,745	0,75 - 0,91	71,4	87,8	18,00	< 0,001

Nhận xét:

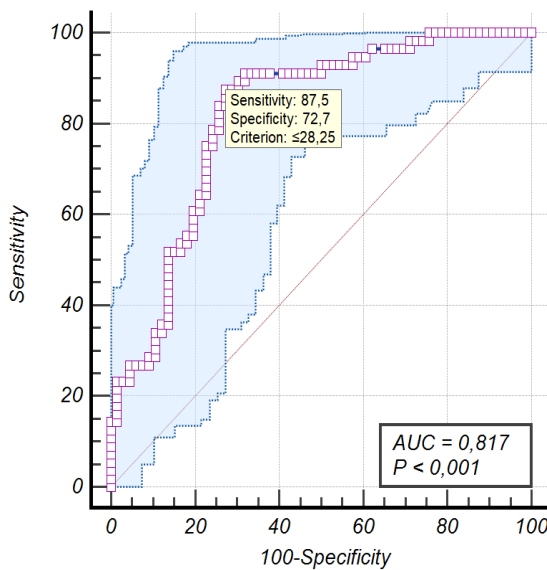
- So với nhóm không ung thư gan, mSEPT9 huyết tương có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG có AFP < 20ng/mL với AUC 0,826, tại điểm cắt 26,94 có độ nhạy 83,9% và độ đặc hiệu 72,07%.

- Với nhóm BGMT, mSEPT9 huyết tương có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG với AUC 0,817, tại điểm cắt 28,25 có độ nhạy 87,5% và độ đặc hiệu 72,7%. BN có Δ Ct $\leq$ 28,25 có nguy cơ mắc UTBMTBG cao gấp 18,67 lần so với người có Δ Ct > 28,25, p < 0,001.

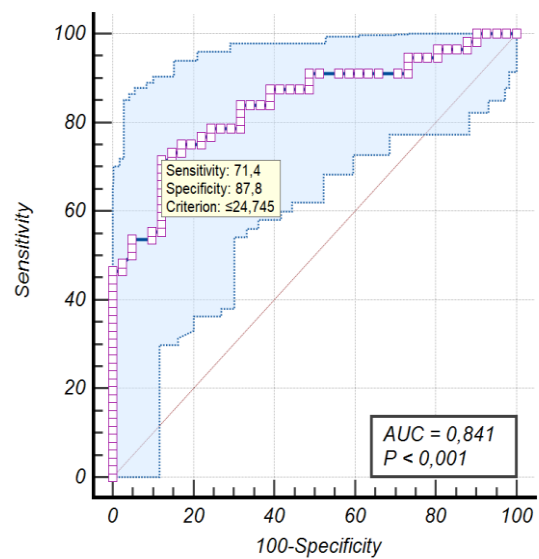
- mSEPT9 huyết tương cũng có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG với AUC 0,841 khi nhóm tham chiếu là NKM.



Biểu đồ 3.12. Đường cong ROC của mSEPT9 trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL so với nhóm không ung thư (BGMT+NKM)



(a)



(b)

Biểu đồ 3.13. Đường cong ROC của mSEPT9 trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL so với nhóm BGMT (a) và NKM (b)

3.3.3. Giá trị của *mSEPT9* huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan giai đoạn rất sớm và sớm

Bảng 3.25. So sánh mức độ *mSEPT9* huyết tương ở nhóm UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm so với nhóm BGMT và NKM

Chỉ số		UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm ^a (n = 71)	BGMT ^b (n = 70)	NKM ^c (n = 41)	p
<i>mSEPT9</i> (ΔCt)	Trung vị	22,71	29,93	29,29	$p_{a-b} < 0,001$
	Tứ phân vị	15,05 - 27,71	26,43 - 31,10	25,96 - 30,39	$p_{a-c} < 0,001$
	Min - Max	6,02 - 33,50	12,37 - 41,34	20,75 - 33,70	$p_{b-c} = 0,091$

* Kiểm định Mann-Whitney U

Nhận xét:

Giá trị Δ Ct của *mSEPT9* huyết tương ở nhóm BN UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm (BCLC O/A) thấp hơn rõ (thể hiện mức methyl hóa cao hơn) so với nhóm BN BGMT và NKM (trung vị 22,71 so với 29,93 và 29,29 chu kỳ, $p < 0,001$), trong khi không có sự khác biệt về mức độ methyl hóa giữa nhóm BGMT và NKM.

Bảng 3.26. Giá trị mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm so với các nhóm tham chiếu

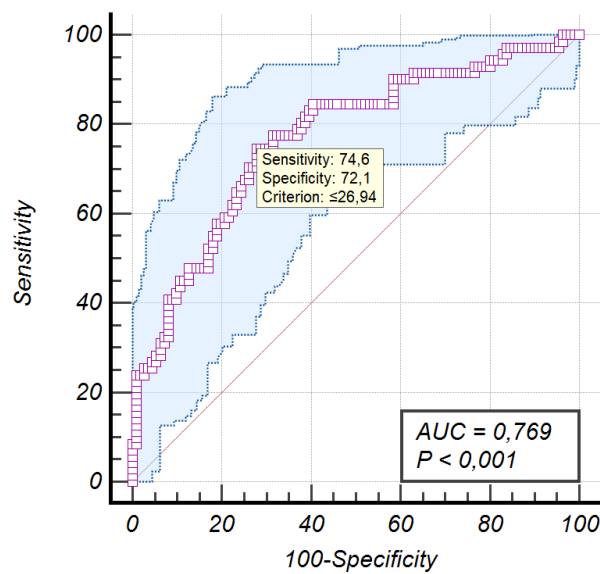
Chỉ số	AUC	Điểm cắt	95%CI	Se (%)	Sp (%)	OR	p
Nhóm không ung thư (BGMT và NKM) (n = 111)							
mSEPT9 (ΔCt)	0,769	26,94	0,70 - 0,83	74,65	72,07	7,46	< 0,001
Nhóm BGMT (n = 70)							
mSEPT9 (ΔCt)	0,771	28,25	0,69 - 0,84	77,46	72,86	9,23	< 0,001
Nhóm NKM (n = 41)							
mSEPT9 (ΔCt)	0,766	24,72	0,68 - 0,84	57,75	87,80	9,84	< 0,001

Nhận xét:

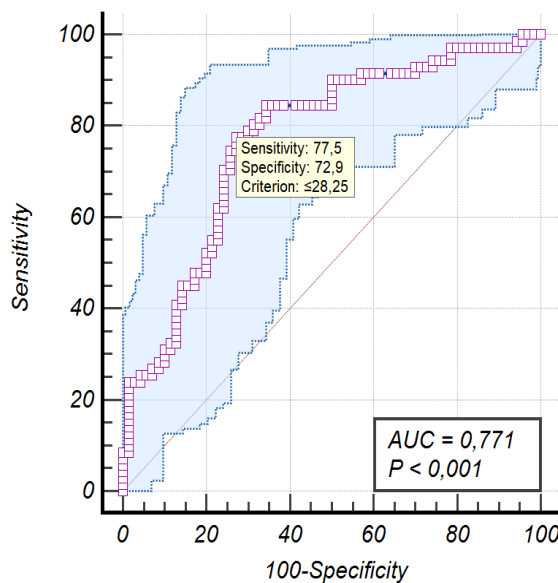
- So với nhóm không ung thư gan, mSEPT9 huyết tương có giá trị chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm ở mức khá với AUC 0,769, tại điểm cắt 26,94 có độ nhạy 74,65% và độ đặc hiệu 72,07%.

- Với nhóm BGMT, mSEPT9 huyết tương có giá trị chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm với AUC 0,771, tại điểm cắt 28,25 có độ nhạy 77,46% và độ đặc hiệu 72,86%.

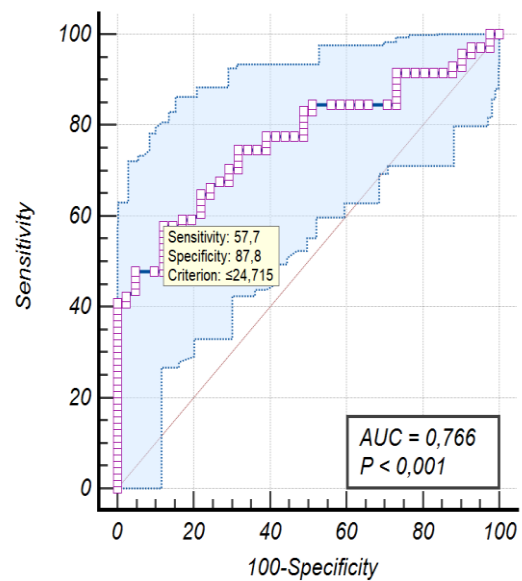
- mSEPT9 huyết tương cũng có giá trị chẩn đoán khá UTBMTBG giai đoạn sớm và rất sớm với AUC 0,766 khi nhóm tham chiếu là NKM.



Biểu đồ 3.14. Đường cong ROC của mSEPT9 trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm so với nhóm không ung thư



(a)



(b)

Biểu đồ 3.15. Đường cong ROC của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm so với nhóm BGMT (a) và NKM (b)

3.3.4. Giá trị của phối hợp mSEPT9 huyết tương với nồng độ AFP huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG

Sau khi đã đánh giá giá trị chẩn đoán của mSEPT9 huyết tương một cách độc lập trong các nhóm bệnh và chứng, luận án tiếp tục phân tích hiệu quả chẩn đoán khi phối hợp chỉ số mSEPT9 với AFP huyết tương, một dấu ấn sinh học đã được sử dụng phổ biến trong lâm sàng. Đồng thời, phân tích hồi quy logistic cũng được thực hiện nhằm đánh giá vai trò độc lập của mSEPT9 trong chẩn đoán UTBMTBG, so sánh với các yếu tố dịch tễ, sinh hóa và lâm sàng liên quan. Kết quả được thể hiện trên các bảng sau:

Bảng 3.27. Giá trị của phối hợp mSEPT9 với AFP huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG (nhóm tham chiếu BGMT)

Chỉ số	AUC	Điểm cắt	95% CI	Se (%)	Sp (%)	OR	p
mSEPT9 (Δ Ct)	0,824	28,25	0,76 - 0,87	84,21	72,86	9,22	< 0,001
AFP (ng/mL)	0,827	8,59	0,77 - 0,88	72,18	85,71	11,04	< 0,001
mSEPT9 + AFP	0,90	-	0,85 - 0,94	87,22	77,14	-	< 0,001

Nhận xét:

mSEPT9 và AFP huyết tương đều có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG với AUC lần lượt là 0,824 và 0,827. Khi phối hợp mSEPT9 và AFP làm tăng khả năng chẩn đoán lên mức rất tốt với AUC 0,90, độ nhạy đạt 87,22% và độ đặc hiệu 77,14%.

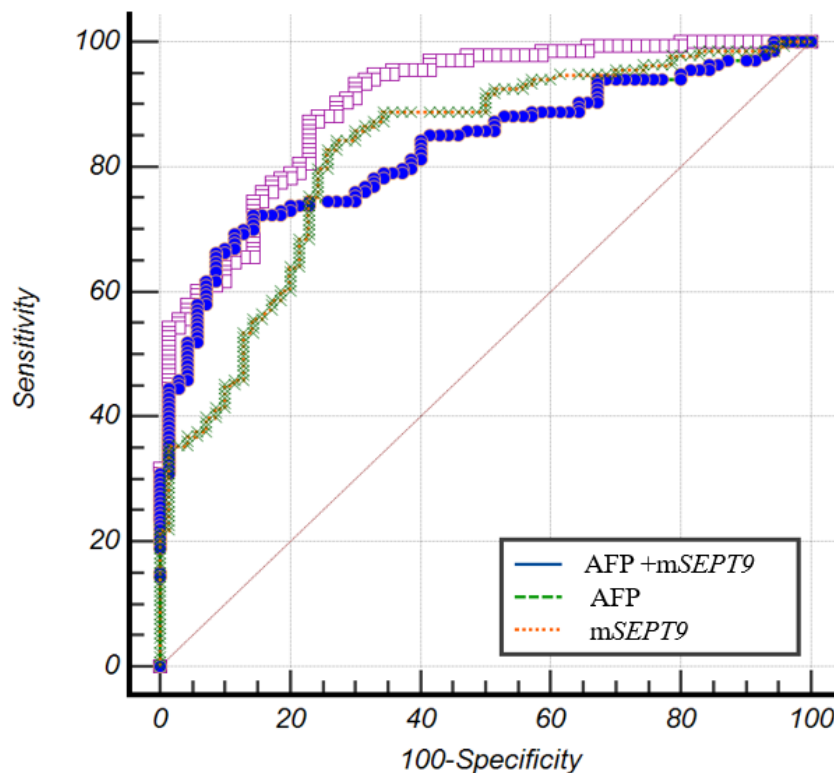
Bảng 3.28. So sánh giá trị phối hợp mSEPT9 và AFP huyết tương với mSEPT9, AFP đơn thuần trong chẩn đoán UTBMTBG (nhóm tham chiếu BGMT)

Thông số		mSEPT9 (Δ Ct)	AFP (ng/mL)
mSEPT9 + AFP	Δ AUC	0,076	0,073
	z statistic	3,345	2,717
	p	< 0,001	0,007

* Kiểm định De Long

Nhận xét:

Phối hợp mSEPT9 với AFP huyết tương có giá trị chẩn đoán tốt hơn có ý nghĩa so với chỉ sử dụng mSEPT9 (Δ AUC = 0,076, $p < 0,001$), cũng như AFP đơn thuần (Δ AUC = 0,073, $p = 0,007$).



Biểu đồ 3.16. So sánh AUC của phối hợp mSEPT9 và AFP huyết tương với mSEPT9, AFP đơn thuần trong chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm BGMT

Bảng 3.29. Giá trị của phối hợp mSEPT9 với AFP huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm (nhóm tham chiếu BGMT)

Chỉ số	AUC	Điểm cắt	95% CI	Se (%)	Sp (%)	OR	p
mSEPT9 (Δ Ct)	0,771	28,25	0,69 - 0,84	77,46	72,86	9,23	< 0,001
AFP (ng/mL)	0,798	8,59	0,72 - 0,86	64,79	85,71	11,04	< 0,001
mSEPT9 + AFP	0,867	-	0,80 - 0,92	90,14	70,00	-	< 0,001

Nhận xét:

Trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm, mSEPT9 và AFP huyết tương đều có giá trị chẩn đoán mức khá với AUC lần lượt là 0,771 và 0,798, theo thứ tự. Khi phối hợp mSEPT9 và AFP làm tăng khả năng chẩn đoán lên mức rất tốt với AUC 0,867, độ nhạy đạt 90,14% và độ đặc hiệu 70,0%.

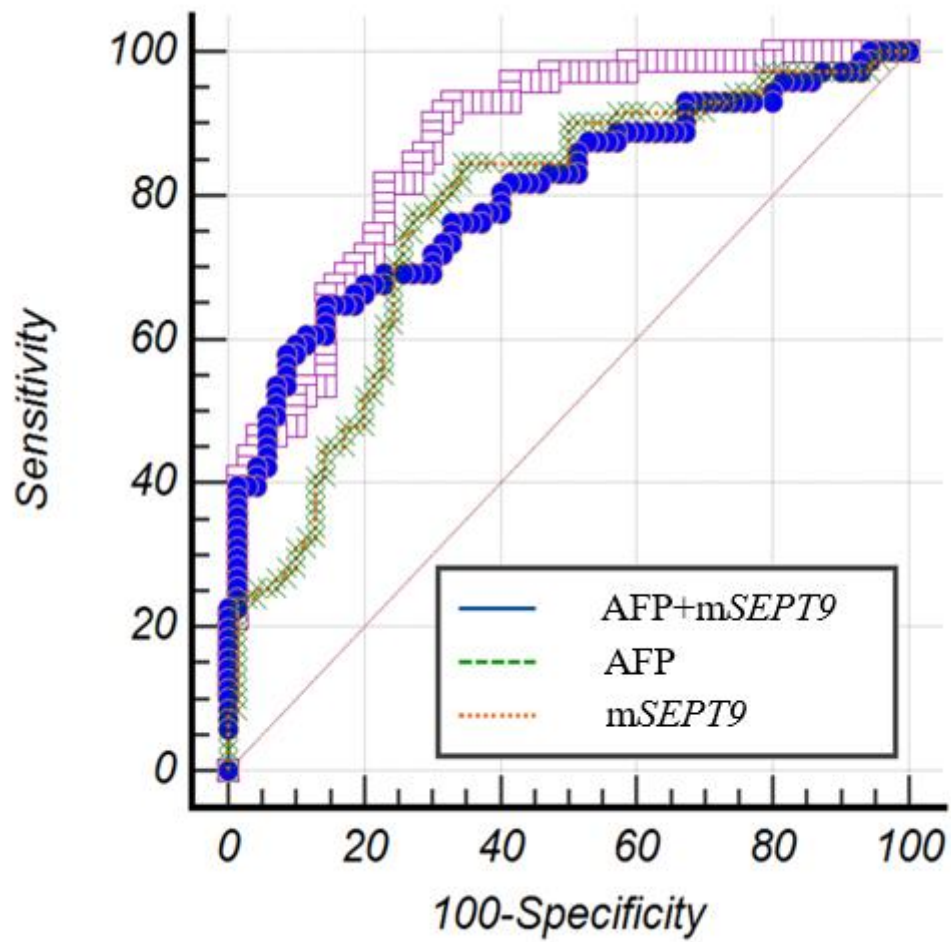
Bảng 3.30. So sánh giá trị phối hợp mSEPT9 và AFP huyết tương với mSEPT9, AFP đơn thuần trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn sớm và rất sớm (nhóm tham chiếu BGMT)

Thông số		mSEPT9 (Δ Ct)	AFP (ng/mL)
mSEPT9 + AFP	Δ AUC	0,096	0,069
	z statistic	3,708	1,789
	p	< 0,001	0,074

* Kiểm định De Long

Nhận xét:

Phối hợp mSEPT9 với AFP huyết tương có giá trị chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm tốt hơn có ý nghĩa so với chỉ sử dụng mSEPT9 (Δ AUC = 0,096, $p < 0,001$), nhưng không khác biệt khi so sánh với sử dụng AFP đơn thuần (Δ AUC = 0,069, $p = 0,074$).



Biểu đồ 3.17. So sánh AUC của phối hợp *mSEPT9* và AFP huyết tương với *mSEPT9*, AFP đơn thuần trong chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm và sớm (nhóm tham chiếu BGMT)

Bảng 3.31. Phân tích hồi quy logistic đánh giá giá trị của một số yếu tố trong chẩn đoán UTBMTBG (nhóm tham chiếu BGMT)

Các chỉ tiêu	Phân tích đơn biến			Phân tích đa biến		
	OR	95%CI	p	OR	95%CI	p
Tuổi	1,07	1,04 - 1,10	< 0,001	1,06	1,02 - 1,10	0,0007
Giới tính	0,50	0,17 - 1,49	0,21			
HBsAg (<i>dương tính và âm tính</i>)	2,86	1,04 - 7,87	0,04	5,58	1,68 - 18,50	0,005
AST (<i>> 40 và ≤ 40U/L</i>)	1,49	0,83 - 2,69	0,18			
ALT (<i>> 40 và ≤ 40U/L</i>)	1,19	0,66 - 2,13	0,56			
AFP (ng/mL)	1,02	1,01 - 1,03	0,003	1,01	1,003 – 1,03	0,01
Xơ gan (<i>có và không</i>)	0,79	0,44 - 1,41	0,42			
$\Delta\text{Ct-mSEPT9}$	0,83	0,79 - 0,88	< 0,001	0,86	0,81 - 0,92	< 0,001

Nhận xét:

Phân tích hồi quy đa biến cho thấy giá trị ΔCt của mSEPT9 huyết tương là yếu tố liên quan độc lập với tình trạng mắc UTBMTBG (OR = 0,86; 95% CI: 0,81 - 0,92; $p < 0,0001$), bên cạnh các yếu tố như tuổi, AFP và tình trạng HBsAg dương tính.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

4.1.1. Đặc điểm tuổi, giới tính và yếu tố nguy cơ

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên 133 BN UTBMTBG với độ tuổi trung bình $61,82 \pm 11,18$, dao động từ 28 đến 84 tuổi (*Bảng 3.1*). Phần lớn BN thuộc nhóm tuổi ≥ 50 (83,46%), trong đó nhóm 60 - 69 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất (34,59%). Tỷ lệ nam/nữ là 18:1, với nam giới chiếm tới 94,74%.

Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước, cho thấy UTBMTBG là bệnh lý chủ yếu gặp ở nam giới và người lớn tuổi. Chẳng hạn, nghiên cứu của Nguyễn Đình Song Huy (2018) trên hơn 24.000 BN tại Việt Nam ghi nhận nam giới chiếm 81,8% và 72,4% BN ở độ tuổi 40 - 70 [14]. Một số nghiên cứu khác tại Việt Nam như của Phạm Văn Hùng (2021) và Nguyễn Công Long (2022) cũng ghi nhận độ tuổi trung bình xấp xỉ 60 và tỷ lệ nam giới chiếm ưu thế rõ rệt [16], [92].

Trên thế giới, UTBMTBG cũng thường gặp ở nam giới lớn tuổi. Nghiên cứu của Abboud Y. và CS (2024) tại Hoa Kỳ cho thấy chỉ 26% BN là nữ giới [93]. Tuổi trung bình khi chẩn đoán tại nước phát triển như Mỹ và Nhật Bản dao động từ 60 - 69 tuổi [94]. Ở các quốc gia Châu Phi - nơi gánh nặng nhiễm HBV cao - tuổi chẩn đoán trung bình thấp hơn, khoảng 46 - 58 tuổi [95].

Nhiều nghiên cứu cho rằng estrogen có vai trò bảo vệ tế bào gan, góp phần lý giải sự khác biệt về giới trong tỷ lệ mắc UTBMTBG [96]. Ngoài ra, BN nhiễm HBV thường khởi phát UTBMTBG ở độ tuổi trẻ hơn so với BN nhiễm HCV [97]. Do phần lớn BN trong nghiên cứu của chúng tôi có HBsAg dương tính, điều này có thể giải thích vì sao tuổi trung bình trong mẫu nghiên cứu tương đối trẻ so với một số nghiên cứu quốc tế.

Về yếu tố nguy cơ của UTBMTBG, kết quả nghiên cứu cho thấy nhiễm HBV là yếu tố nguy cơ phổ biến nhất trong nhóm BN UTBMTBG, với tỷ lệ

HBsAg dương tính lên tới 81,95%. Tỷ lệ nhiễm HCV là 6,02%, và có 16,54% BN có tiền sử sử dụng rượu, trong khi các yếu tố khác không được ghi nhận trong nhóm bệnh. Xu hướng này phù hợp với thực trạng dịch tễ tại Việt Nam và nhiều nước châu Á, nơi HBV là nguyên nhân chủ yếu gây UTBMTBG. Nghiên cứu của Tôn Thất Ngọc (2021) và Trần Thị Thu Thảo (2023) đều ghi nhận tỷ lệ nhiễm HBV trong nhóm BN UTBMTBG ($> 75\%$), cho thấy sự đồng nhất về đặc điểm yếu tố nguy cơ trong các nghiên cứu trong nước [98], [99].

Bảng 4.1. Tỷ lệ các yếu tố nguy cơ của UTBMTBG ở một số nghiên cứu

Các nghiên cứu	Quốc gia/ khu vực	HBV (%)	HCV (%)	Rượu (%)	Yếu tố khác (%)
Tôn Thất Ngọc (2021) [98]	Việt Nam	90	12,8		
Trần Thị Thu Thảo (2023) [99]	Việt Nam	75,9	22,9		
Long J. và CS (2024) [100]	Trung Quốc	60	18	10	6 (NASH)
Karim M.A. và CS (2023) [101]	Hoa Kỳ	13,3	33,6	17,5	35,6 (NAFLD)
El-Kassas M. và CS (2022) [102]	Châu Phi cận Sahara (nhiều quốc gia)	55 - 60	15 - 20		17 (Aflatoxin)
Chúng tôi (2025)	Việt Nam	81,95	6,02	16,54	

(NAFLD: Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, NASH: viêm gan nhiễm mỡ không do rượu)

Ngược lại, tại các khu vực khác trên thế giới, cơ cấu yếu tố nguy cơ có sự khác biệt rõ rệt. Các nước Châu Âu, Hoa Kỳ và những khu vực đã kiểm soát tốt viêm gan virus B/ C, thì các yếu tố nguy cơ chuyển hóa ngày càng nổi bật.

Tại Hoa Kỳ, nghiên cứu giai đoạn 2011 - 2015 cho thấy NAFLD/NASH đã vượt qua viêm gan virus để trở thành căn nguyên hàng đầu, chiếm khoảng 36% ca UTBMTBG, so với 33% do HCV và khoảng 17% do lạm dụng rượu [101]. Trong khi đó, tại các quốc gia Châu Phi đặc biệt vùng cận Sahara, HBV vẫn là nguyên nhân chính.

Những khác biệt về yếu tố nguy cơ giữa các khu vực phản ánh sự chuyển dịch dịch tễ học của UTBMTBG toàn cầu. Ở Việt Nam, kiểm soát tốt tình trạng nhiễm HBV và nhiễm HCV vẫn là ưu tiên hàng đầu để cải thiện tình trạng mắc UTBMTBG. Bên cạnh đó, cần theo dõi sát sự gia tăng các yếu tố chuyển hóa trong bối cảnh đô thị hóa, thay đổi lối sống và dân số đang già hóa.

Những đặc điểm về tuổi, giới và tình trạng nhiễm HBV phản ánh đặc trưng dịch tễ học của UTBMTBG tại Việt Nam và gợi ý những đối tượng cần ưu tiên trong chương trình sàng lọc.

4.1.2. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu

4.1.2.1. Đặc điểm lâm sàng của đối tượng nghiên cứu

Triệu chứng lâm sàng của UTBMTBG thường không rõ ràng ở giai đoạn sớm. Kết quả nghiên cứu này giúp làm rõ bức tranh lâm sàng theo từng giai đoạn phát hiện.

Trong tổng số 133 BN UTBMTBG, có 33 trường hợp (24,81%) được chẩn đoán tình cờ khi khám sức khỏe định kỳ hoặc điều trị bệnh lý khác. Ngược lại, 100 BN (75,19%) nhập viện do có biểu hiện lâm sàng. Đáng chú ý, trong nhóm được phát hiện tình cờ, có đến 84,85% BN đang ở giai đoạn rất sớm (0) và sớm (A) theo phân loại BCLC, trong khi tỷ lệ này ở nhóm có triệu chứng chỉ là 43,00%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$), cho thấy những trường hợp phát hiện sớm thường không có biểu hiện lâm sàng rõ ràng (Bảng 3.4).

Về các triệu chứng lâm sàng cụ thể, phổ biến nhất là mệt mỏi (chiếm 48,12%); đau hạ sườn phải (chiếm 43,61%), chán ăn (37,59%) sút cân (24,06%), tiếp theo là gan to (12,03%), cổ trướng (11,28%), vàng da (10,53%). Ngoài ra, một số dấu hiệu khác gặp với tỷ lệ khá thấp ($< 10\%$) như tuần hoàn bàng hệ

(9,02%), lòng bàn tay son (6,77%) và sao mạch (7,52%)...Trong số 72 BN được nội soi, có 37 trường hợp (51,39%) phát hiện giãn tĩnh mạch thực quản hoặc dạ dày, phản ánh tình trạng TALTMC khá phổ biến trong nhóm nghiên cứu (*Biểu đồ 3.1*).

Triệu chứng lâm sàng của UTBMTBG thường không rõ ràng ở giai đoạn sớm. Đến khi xuất hiện triệu chứng, bệnh thường đã tiến triển sang giai đoạn muộn, dẫn đến hạn chế lựa chọn các phương pháp điều trị và thời gian sống còn ngắn [103]. Các biểu hiện lâm sàng của UTBMTBG đa phần không đặc hiệu gồm các nhóm triệu chứng liên quan đến đau (triệu chứng của khối u gan hoặc do di căn), triệu chứng tiêu hóa, triệu chứng liên quan chức năng gan, triệu chứng liên quan cảm xúc và tâm lý và triệu chứng toàn thân khác [103].

So sánh với các nghiên cứu quốc tế (Hoa Kỳ, Trung Quốc, Hàn Quốc và Thái Lan từ năm 2010 - 2019), tỉ lệ các triệu chứng phổ biến của UTBMTBG như mệt mỏi, đau bụng, chán ăn chiếm trên 50%, trong khi tiêu chảy và táo bón chiếm khoảng 30%; còn vàng da do bệnh lý gan mạn tính chiếm khoảng 28,3% [103]. Ở Việt Nam, nghiên cứu của Đặng Chiều Dương (2020), Phan Thị Hiền Lương (2020) cũng ghi nhận các triệu chứng như đau vùng gan, mệt mỏi, sụt cân ở khoảng 47,5 - 60% [104], [105].

Trong nghiên cứu này, các triệu chứng nói trên vẫn phổ biến nhưng xuất hiện với tỷ lệ thấp hơn. Điều này có thể được lý giải bởi thực tế nhiều BN trong nghiên cứu được phát hiện bệnh qua khám sức khỏe định kỳ hoặc khi điều trị bệnh lý khác, và phần lớn ở giai đoạn sớm, khi triệu chứng còn nhẹ hoặc chưa xuất hiện.

Về cơ chế bệnh sinh, nồng độ TNF- α , IL-1, IL-6 trong huyết thanh - do khối u hoặc tế bào gan cận u tiết ra - có thể gây mệt mỏi và chán ăn. Tuy nhiên, ở giai đoạn sớm, các yếu tố này chưa tăng cao đáng kể, dẫn đến triệu chứng không rõ ràng [103]. Triệu chứng đau vùng gan có thể do tổn thương nguyên phát hoặc do di căn ổ bụng, nhưng cũng thường chỉ xuất hiện rõ ở giai đoạn muộn.

Trong khi đó, dấu hiệu của TALTMC như giãn tĩnh mạch thực quản - dạ dày ghi nhận qua nội soi khá phổ biến (51,39%), nhưng các biểu hiện lâm sàng trực tiếp của TALTMC (như cổ trướng, tuần hoàn bàng hệ, lách to) lại có tỷ lệ thấp hơn (dưới 10%), phù hợp với đặc điểm là nhiều BN chưa có xơ gan mất bù rõ rệt. Điều này cho thấy, TALTMC tiềm ẩn có thể đã xuất hiện từ giai đoạn sớm, nhưng chưa biểu hiện lâm sàng rõ rệt. Các biểu hiện lâm sàng liên quan đến suy chức năng gan như vàng da, phù... cũng xuất hiện nhưng chiếm tỷ lệ không cao, phản ánh mức độ tiến triển còn nhẹ ở phần lớn BN.

Tóm lại, đặc điểm lâm sàng trong nghiên cứu này phản ánh đúng thực trạng của UTBMTBG được phát hiện ngày càng sớm hơn, đặc biệt ở nhóm BN nhiễm HBV được theo dõi hoặc khám định kỳ. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tăng cường sàng lọc ở nhóm nguy cơ cao nhằm phát hiện sớm bệnh và mở ra nhiều cơ hội can thiệp điều trị kịp thời, cải thiện tiên lượng cho BN.

4.1.2.2. Đặc điểm cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu

a) Đặc điểm xét nghiệm huyết học

Trong nghiên cứu của chúng tôi khi phân tích các chỉ số máu ngoại vi hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu giữa nhóm UTBMTBG và nhóm BGMT thì nhận thấy không có sự khác biệt giữa chỉ số tiểu cầu và hồng cầu giữa hai nhóm, tuy nhiên có sự khác biệt rõ ràng về chỉ số bạch cầu trong máu ngoại vi ở nhóm UTBMTBG với nhóm BGMT ($p = 0,02$). Điều này có thể liên quan đến vai trò của phản ứng viêm trong vi môi trường khối u - yếu tố đã được đề cập trong nhiều nghiên cứu trước đây [106].

Một số tài liệu cho rằng các tế bào u có khả năng kích hoạt dòng bạch cầu trung tính và đại thực bào, tạo điều kiện cho sự xâm lấn và di căn. Mặt khác, hiện tượng tăng tiểu cầu trong UTBMTBG - do khối u tiết thrombopoietin hoặc các yếu tố tăng trưởng kích thích tủy xương - có thể xuất hiện ở BN có khối u tiến triển [107]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh

nhận có tăng tiểu cầu thấp (1,5%), phù hợp với thực tế rằng đa số BN có chức năng gan tốt (Child - Pugh A) và ở giai đoạn sớm. Tỷ lệ này thấp hơn so với các nghiên cứu tại Đài Loan (6%) và Mỹ (9%) [108].

b) Đặc điểm xét nghiệm sinh hóa

Về sinh hóa máu (*Bảng 3.6*), chỉ có nồng độ albumin có sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai nhóm, dù cả hai vẫn trong giới hạn bình thường. Các chỉ số protein, bilirubin, AST và ALT không khác biệt rõ rệt. Tuy nhiên, giá trị trung vị AST của cả hai nhóm cao hơn mức bình thường, phù hợp với các nghiên cứu trong và ngoài nước như Tôn Thất Ngọc (2021) [36].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, hoạt độ AST cao hơn đáng kể so với hoạt độ ALT huyết tương, phù hợp với đặc điểm tổn thương gan tiến triển. Tình trạng này được lý giải do tổn thương ty thể khiến AST được giải phóng trực tiếp vào máu với mức độ cao hơn so với ALT. Một số nghiên cứu chứng minh BN có tỷ lệ AST/ALT cao hơn có tiên lượng kém hơn những BN có tỷ lệ AST/ALT thấp hơn và tỷ lệ AST/ALT là một yếu tố nguy cơ đối với sự sống còn nói chung ở những BN ung thư gan nguyên phát [109].

c) Đặc điểm nồng độ AFP

AFP huyết tương ở nhóm UTBMTBG có giá trị trung vị 49,36 ng/mL, cao hơn đáng kể so với nhóm BGMT (4,11 ng/mL), với $p < 0,0001$ (*Bảng 3.8*). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trong nước như của Đặng Chiều Dương [104], Nguyễn Việt Phương [110] nhưng cao hơn so với nghiên cứu của Wei Z. và CS (2022) [111]. Điều này có thể do nồng độ AFP ở các nghiên cứu khác nhau phụ thuộc vào đặc điểm giai đoạn bệnh, kích thước u và đặc điểm dân số nghiên cứu.

AFP là một dấu ấn sinh học được đưa vào các khuyến cáo trong sàng lọc, chẩn đoán và tiên lượng BN UTBMTBG. AFP được xem là dương tính khi nồng độ lớn hơn hoặc bằng 20 ng/mL và âm tính khi mức này nhỏ hơn 20 ng/mL [28]. Kết quả các nghiên cứu trong nước cũng như trên thế giới (trình

bày ở *Bảng 4.2*) cho thấy tỷ lệ BN UTBMTBG có AFP < 20 ng/mL dao động khoảng 30 - 50%. Các nghiên cứu gần đây còn ghi nhận mức AFP có xu hướng giảm ở những trường hợp chẩn đoán lần đầu, phản ánh tỷ lệ UTBMTBG được phát hiện ở giai đoạn sớm ngày càng tăng [112]. Điều đó cũng cho thấy những hạn chế của AFP trong phát hiện UTBMTBG giai đoạn sớm. Khi sử dụng ngưỡng cắt AFP là 20 ng/mL, xét nghiệm có độ nhạy tương đối cao nhưng độ đặc hiệu thấp; ngược lại, nếu chọn ngưỡng 200 ng/mL thì độ đặc hiệu tăng lên nhưng độ nhạy lại giảm đáng kể [113]. Một số nghiên cứu cho thấy khi sử dụng ngưỡng 400 ng/mL, AFP có giá trị chẩn đoán chính xác hơn với AUC đạt 0,9368 [114].

Bảng 4.2. So sánh giá trị AFP huyết tương giữa các nghiên cứu

Nghiên cứu (tác giả, năm)	Cỡ mẫu	Giá trị trung vị của AFP ng/mL	Tỷ lệ AFP < 20 ng/mL	Tỷ lệ AFP (20 - 400 ng/mL	Tỷ lệ AFP > 400 ng/mL
Đặng Chiêu Dương (2020) [104]	101	40,29	35,6%	64,4 %	
Nguyễn Việt Phương (2023) [110]	41	42,50	41,5%	34,1%	24,4%
Wei Z. và CS (2022) [111]	248	15,9 (4,8 -239,3)			
Huang F. và CS (2022) [77]	111		49,5%	50,5%	
Zhang J. và CS (2020) [114]	260		52%	31%	17%
Chúng tôi (2025)	133	49,36 (5,9 -1089,59)	42,11%	27,82%	30,8%

4.1.2.3. Đặc điểm khối u gan

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong số 133 BN UTBMTBG, phần lớn khối u được phát hiện ở gan phải (58,60%), có đặc điểm đơn độc (61,65%), với đường kính trung vị là 46,0 mm. Tỷ lệ BN có khối u nhỏ < 20 mm tương đối thấp (6,77%), trong khi tỷ lệ có khối u lớn > 50 mm chiếm tới 43,61%, cho thấy phần lớn khối u được phát hiện khi đã có kích thước khá lớn.

So sánh với một số nghiên cứu trong nước và quốc tế cho thấy đặc điểm khối u gan trong nghiên cứu này tương đồng ở nhiều khía cạnh. Nghiên cứu của Phạm Văn Hùng (2022) trên 189 BN UTBMTBG ghi nhận tỉ lệ khối u ở gan phải 57,7%, đơn độc 41,8%, khối u < 3 cm chiếm 23,8%, và kích thước khối u trung bình $4,7 \pm 3,2$ cm [16]; Nghiên cứu của Trần Quang Tú (2021) trên 220 BN UTBMTBG ghi nhận 55,6% khối u ở gan phải, 47,3% đơn độc và 27,3% có khối u < 3 cm, với trung vị kích thước u là 3,6 cm [115]. Tại Đài Loan, Dai và CS (2018) nghiên cứu trên 397 BN ghi nhận tới 84,5% có khối u đơn độc, với kích thước trung bình là $4,3 \pm 3,6$ cm [116]. Nghiên cứu quy mô lớn tại Hoa Kỳ (2020) trên 11.522 BN UTBMTBG cho thấy 32,7% có một khối u, 33,8% khối u < 5 cm và 39,8% khối u > 5 cm [114].

Tổng hợp các số liệu cho thấy đặc điểm thường gặp của UTBMTBG là khối u nằm ở thùy phải gan, đa phần 1 khối u, và kích thước khối u lớn > 5 cm còn chiếm tỷ lệ đáng kể. Trong đó, kích thước khối u > 5 cm là 1 yếu tố tiên lượng có liên quan đến xâm lấn vi mạch ở BN UTBMTBG. Ngoài ra, khối u gan có tốc độ phát triển nhanh với thời gian tăng gấp đôi thể tích khối u gan trung bình khoảng 4,6 tháng. Đáng chú ý, có tới 35% BN UTBMTBG có tốc độ phát triển khối u rất nhanh, tăng gấp đôi thể tích chỉ trong vòng < 3 tháng [117]. Điều đó thể hiện mức độ ác tính cao của khối u gan, đồng thời nhấn mạnh tầm quan trọng của việc phát hiện sớm khi khối u khi còn nhỏ để có thể áp dụng các phương pháp điều trị triệt căn, giúp cải thiện thời gian sống còn của BN UTBMTBG.

Ngoài ra, trong nghiên cứu của chúng tôi, có tới 26,32% BN có huyết khối TMC và 6,77% có di căn ngoài gan. Tỷ lệ này tương đồng với nghiên cứu của Đặng Chiêu Dương, ghi nhận 22,7% có huyết khối TMC [104]; trong khi đó, nghiên cứu của Saeki I. và CS [11] và Kotoh Y. và CS [58] ghi nhận tỷ lệ di căn ngoài gan cao hơn đáng kể, lần lượt là 25 - 30,6% và khoảng 11,5%. Sự khác biệt này có thể xuất phát từ tiêu chí lựa chọn BN trong các nghiên cứu trên, chủ yếu là các trường hợp được chỉ định điều trị toàn thân, thường ở giai đoạn muộn hơn so với nghiên cứu hiện tại.

Huyết khối TMC và sự di căn của khối u là yếu tố quan trọng đánh giá sự tiến triển của khối u. Khi BN xuất hiện các đặc điểm này, điều đó đồng nghĩa với việc UTBMTBG đã ở giai đoạn không còn áp dụng các biện pháp điều trị phẫu thuật, hay tắc mạch khối u gan mà chỉ có thể áp dụng các biện pháp điều trị toàn thân. Do đó, việc phát hiện khối u gan trước khi xảy ra huyết khối hoặc di căn là đặc biệt quan trọng để mở ra cơ hội điều trị hiệu quả hơn.

4.1.2.4. Đặc điểm mô bệnh học

Nghiên cứu cho thấy cấu trúc u dạng bè chiếm đa số (58,63%), dạng đặc chỉ chiếm 5,17%. So sánh với một số nghiên cứu trước đó như của Lê Minh Huy (2012), tỷ lệ dạng bè (47,3%), dạng đặc (30,4%) [118]; hay nghiên cứu của Lauwers G.Y. và CS lần lượt là 48,5% và 36% [119], cho thấy sự khác biệt về phân bố. Mặc dù tỷ lệ cụ thể khác nhau, các nghiên cứu đều nhận thấy cấu trúc mô học dạng bè chiếm tỷ lệ cao nhất sau đó mới đến dạng đặc và dạng giả tuyến, dạng hỗn hợp. Cấu trúc u dạng bè thường liên quan đến UTBMTBG biệt hóa mức độ cao hoặc vừa. UTBMTBG biệt hóa cao dạng bè thường được phát hiện ở giai đoạn sớm nên tiên lượng phẫu thuật tốt hơn, còn dạng bè với tế bào dị dạng nhiều (độ III) có thể tiến triển thành dạng đặc kém biệt hóa hơn, dạng hỗn hợp thì tiên lượng kém thể hiện tình trạng tiến triển của khối u gan [120].

Theo phân loại WHO 2019, ngoài dạng hình thái mô học của UTBMTBG thông thường, còn tới 12 dạng hình thái dưới nhóm loại mô học biến thể, chiếm

khoảng 35% trường hợp UTBMTBG [121]. Trong nghiên cứu này, 72,42% trường hợp có dạng hình thái tế bào thông thường, còn lại 27,58% là các biến thể mô học khác, trong đó chủ yếu là biến thể dạng tế bào sáng và tế bào gan nhiễm mỡ.

Về mức độ biệt hóa tế bào, nghiên cứu sử dụng hệ thống phân loại Edmondson-Steiner (ES) từ năm 1954 và vẫn được sử dụng rộng rãi cho đến nay [35]. Kết quả nghiên cứu cho thấy ES độ I (15,52%), độ II (63,79%), độ III (20,69%), không có trường nào ghi nhận ES độ IV. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu gần đây như của giả Wang Y. và CS (2023) cho thấy ES độ I-II chiếm đa số (60,8%) [122]; Park B.V. và CS (2019) ES độ I (10,6%), ES độ II (76,4%), ES độ III (13%), ES độ IV (0%) [123]. Trong khi đó, các nghiên cứu cũ như từ những năm 1996-2012 của tác giả Lee K. và CS lại cho thấy tỷ lệ ES độ III-IV chiếm từ 26-36% [124]. Sự khác biệt này có thể phản ánh xu hướng phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm hơn trong những năm gần đây, khi UTBMTBG còn ở mức độ biệt hóa cao, dẫn đến tiên lượng khả quan hơn.

Ngoài hệ thống ES, phân loại WHO 2019 cũng chia UTBMTBG thành ba mức độ biệt hóa: cao, vừa và kém. Kết quả nghiên cứu cho thấy 15,52% độ biệt hóa cao, 84,48% độ biệt hóa vừa, không có trường hợp nào độ biệt hóa kém trong 58 mẫu mô được phân tích. Điều này khác biệt một phần so với một số nghiên cứu quốc tế như của Shinkawa H. và CS (2021) trên 1107 BN UTBMTBG phẫu thuật cắt gan, cho thấy tỷ lệ biệt hóa kém lên tới (286/1107) 25,8% [36]. Hay nghiên cứu của Shin S.H. và CS (2023), ghi nhận tỷ lệ biệt hóa cao, vừa và kém lần lượt là 46,8%, 39,8%, 13,3%, tương ứng tỷ lệ sống còn sau 5 năm lần lượt là 86,1%; 75,8%; 67,2% [125]. Sự khác biệt trong nghiên cứu của chúng tôi có thể lý giải bởi nguồn mẫu chủ yếu đến từ BN giai đoạn sớm, được sinh thiết hoặc phẫu thuật cắt gan khi còn có chỉ định điều trị triệt căn, chưa tiến triển đến giai đoạn biệt hóa kém.

Nhìn chung, các đặc điểm mô học trong nghiên cứu này phản ánh tính chất sinh học ít ác tính hơn của UTBMTBG được phát hiện ở giai đoạn sớm. Việc

phân tích kỹ lưỡng các yếu tố mô học, đặc biệt là biến thể dạng tế bào sáng, tế bào gan nhiễm mỡ theo WHO phiên bản 5 (2019), góp phần nâng cao độ chính xác trong đánh giá tiên lượng bệnh và lựa chọn chiến lược điều trị phù hợp cho từng nhóm BN.

4.1.3. Đặc điểm chức năng gan và giai đoạn UTBMTBG

Bảng 4.3 trình bày so sánh tỷ lệ suy chức năng gan theo phân loại Child - Pugh trong nghiên cứu của chúng tôi với một số nghiên cứu trong và ngoài nước:

Bảng 4.3. So sánh tỷ lệ suy chức năng gan theo Child - Pugh giữa các nghiên cứu

Nghiên cứu	Quốc gia	Cỡ mẫu	Child-Pugh A (%)	Child-Pugh B (%)	Child-Pugh C (%)
Trần Thị Thu Thảo (2020) [99]	Việt Nam	170	89,4	10	0,6
Tôn Thất Ngọc (2021) [98]	Việt Nam	70	87,1	12,9	0
Lewin J. và CS (2021) [126]	Mỹ	104	57,7	41,3	1
Saeki I. và CS (2023) [11]	Nhật Bản	85	77,6	22,4	0
Chúng tôi (2025)	Việt Nam	133	84,96	12,78	2,26

Kết quả từ nghiên cứu của chúng tôi so sánh với các nghiên cứu ở Việt Nam cũng như trên thế giới cho kết quả tương đồng với tỷ lệ BN UTBMTBG có chức năng gan Child - Pugh A chiếm đa số, trong khi số lượng BN có Child - Pugh C rất thấp. Điều này phản ánh đặc điểm chọn bệnh và có thể là kết quả của việc phát hiện bệnh ở giai đoạn chưa có xơ gan mất bù.

Thời gian sống còn của UTBMTBG không chỉ phụ thuộc và gánh nặng khối u mà còn phụ thuộc vào chức năng gan, do đó Child - Pugh được chứng minh là yếu tố tiên lượng độc lập của UTBMTBG [127]. Một phân tích gộp cho thấy tỷ

lệ sống trên 1 năm ở BN UTBMTBG được điều trị tại chỗ là 71% đối với Child - Pugh A, 60% với Child - Pugh B, và 53,6% với Child - Pugh C nếu được ghép gan [128].

Phân độ ALBI là một chỉ số mới được mô tả về rối loạn chức năng gan ở UTBMTBG, chỉ dựa trên nồng độ albumin và bilirubin. So với Child Pugh, chỉ số ALBI có nhiều ưu điểm như tính khách quan cao, không phụ thuộc vào yếu tố lâm sàng chủ quan khi đánh giá cổ trướng và biểu hiện não gan giai đoạn tiềm ẩn, và khả năng phân tầng chính xác hơn, đặc biệt ở nhóm BN UTBMTBG có chức năng gan còn bù. Tỷ lệ ALBI 1 và ALBI 2 chiếm đa số, chỉ có 3,8% ALBI 3 cho thấy kết quả tương đồng với NC Pinato D.J. và CS ALBI 3 chỉ chiếm 4% [91].

Bên cạnh chức năng gan, giai đoạn bệnh cũng là yếu tố then chốt trong phân tầng điều trị. Trong nhiều hệ thống phân giai đoạn được phát triển từ năm 1985 đến nay như Okuda, CLIP, TNM..., hệ thống BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) được EASL và AASLD khuyến cáo sử dụng rộng rãi do vừa đơn giản, vừa gắn liền với hướng dẫn điều trị cụ thể [4], [27], [129].

Theo phân loại BCLC, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận giai đoạn 0 (2,26%), giai đoạn A (51,13%), giai đoạn B (13,53%); giai đoạn C (29,32%), giai đoạn D (3,76%). So sánh với một số nghiên cứu tại Việt Nam như Đặng Chiều Dương (2020) giai đoạn A (15,84%), Giai đoạn B (49,51%), Giai đoạn C (34,65%) [104]; Đặng Trung Thành (2020) giai đoạn A (43,3%) và giai đoạn B (45,6%) [130]. Trong khi đó, nghiên cứu lớn trên thế giới của tác giả An J. và CS (2025) từ 2016 - 2018 trên 4462 BN UTBMTBG cho thấy: giai đoạn 0 (14,9%), A (28,8%), B (7,5%), C (39,0%) và D (9,8%) [131].

Sự khác biệt trong phân bố giai đoạn BCLC giữa các nghiên cứu có thể bắt nguồn từ tiêu chí lựa chọn đối tượng nghiên cứu, sự phát triển của chương trình sàng lọc, cũng như hệ thống chăm sóc y tế tại từng quốc gia. Tuy nhiên, điểm chung là tỷ lệ giai đoạn A ngày càng cao hơn trong các nghiên cứu gần đây, phản ánh nỗ lực cải thiện chẩn đoán sớm UTBMTBG - yếu tố quan trọng quyết định khả năng áp dụng các phương pháp điều trị triệt căn và tiên lượng sống còn.

4.2. Mức độ methyl hoá gen *SEPTIN9* trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư và mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

4.2.1. Mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ở bệnh nhân UTBMTBG

4.2.1.1. Mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong mô và trong huyết tương ở bệnh nhân UTBMTBG

Phân tích trên 58 BN UTBMTBG có đồng thời mẫu mô ung thư và mẫu huyết tương cho thấy giá trị ΔC_t của m*SEPT9* trong mô ung thư thấp hơn đáng kể so với trong huyết tương (trung vị: 9,20 chu kỳ so với 22,93 chu kỳ; $p < 0,001$, *Biểu đồ 3.5*). Kết quả này chứng tỏ mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong mô ung thư cao hơn đáng kể so với huyết tương, phù hợp với giả thuyết rằng mô u là nguồn gốc chính của m*SEPT9* trong huyết tương. Mức chênh lệch trung vị ΔC_t khoảng 13,73 chu kỳ cho thấy tỷ lệ m*SEPT9* so với *SEPTIN9* tổng số trong mẫu huyết tương thấp hơn xấp xỉ 13000 lần so với tỷ lệ này trong mô ung thư (tương ứng với $2^{13,73}$ khoảng 13000 lần), qua đó củng cố nhận định rằng mức độ m*SEPT9* trong huyết tương chỉ phản ánh một phần rất nhỏ mức methyl hóa thực sự trong mô u.

Kết quả này phù hợp với các phân tích từ cơ sở dữ liệu TCGA trên nền tảng UALCAN [132]. Theo Huang F. và CS (2022), mức methyl hóa gen *SEPTIN9* ở mô UTBMTBG cao hơn đáng kể so với mô bình thường tương ứng với $p = 4.8 \times 10^{-8}$ [77]. Ngoài ra, nghiên cứu của Kotoh Y. và CS (2020) cũng ghi nhận số bản sao *SEPTIN9* bị methyl hóa trong huyết thanh thấp hơn đáng kể so với mô khối u ($p < 0,001$), dù sử dụng phương pháp khác biệt về kỹ thuật (PCR số hóa dạng giọt) [58]. Tỷ lệ biệt hóa mô u mức trung bình chiếm ưu thế trong nghiên cứu của chúng tôi (84,48%) và trong nghiên cứu của Kotoh Y và CS (65,7%), cho thấy tính tương đồng về đặc điểm bệnh học cũng góp phần giải thích sự nhất quán của kết quả.

Biến đổi methyl gen *SEPTIN9* đã được chứng minh là một cơ chế quan trọng liên quan đến phát sinh ung thư gan. Từ nghiên cứu nền tảng mô người của Villanueva A. và CS (2015) [5], tỷ lệ mô ung thư có methyl hóa *SEPTIN9* đạt 61% trong khi mô gan lành hoàn toàn không phát hiện, với sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,001$). Gần đây, nghiên cứu của Kmeid M. và CS (2023) [71] cũng cho thấy tỷ lệ dương tính *SEPTIN9* trong mô UTBMTBG là 32%, cao hơn nhiều so với u tuyến tế bào gan (3%) hay nốt loạn sản (0%). Một số nghiên cứu còn cho thấy rằng methyl hóa bất thường gen *SEPTIN9* có thể làm mất ổn định chức năng protein gắn kết bộ khung tế bào và kiểm soát chu kỳ tế bào, từ đó góp phần thúc đẩy quá trình ung thư hóa [52].

Như vậy, tình trạng methyl hóa *SEPTIN9* cao trong mô ung thư là đặc điểm sinh học phù hợp với cơ chế bệnh sinh của UTBMTBG và là cơ sở cho việc phát hiện m*SEPT9* trong huyết tương. Ngoài ý nghĩa trong nghiên cứu cơ chế bệnh sinh, tình trạng này còn gợi mở khả năng sử dụng m*SEPT9* như một dấu ấn sinh học mô học có giá trị hỗ trợ chẩn đoán khi kết hợp với các chỉ dấu khác.

Tuy nhiên, mức độ thấp của m*SEPT9* trong huyết tương phản ánh rằng chỉ một phần nhỏ cfDNA có nguồn gốc từ khối u có thể được phát hiện do giới hạn sinh học như: (1) cfDNA từ khối u chỉ chiếm khoảng 1% tổng cfDNA trong huyết tương [133]; (2) thời gian bán hủy cfDNA ngắn (16 phút đến 2,5 giờ) [134]; (3) ảnh hưởng của các enzyme phân giải như DNAase [135]. Những yếu tố này giải thích tại sao dù mô u có tỷ lệ methyl hóa cao, mức độ m*SEPT9* phát hiện được trong huyết tương vẫn thấp và cần kỹ thuật nhạy mới phát hiện được.

Để đánh giá khả năng ứng dụng m*SEPT9* huyết tương như một dấu ấn sinh thiết lỏng phản ánh tổn thương mô u, cần xem xét mối tương quan định lượng giữa mức độ methyl hóa *SEPTIN9* trong mô và huyết tương trên từng cá thể, được trình bày trong phần tiếp theo.

4.2.1.2. *Mối tương quan giữa mức độ methyl hóa gen SEPTIN9 trong mô và huyết tương*

Phân tích 58 BN UTBMTBG có cả mẫu mô ung thư và mẫu huyết tương cho thấy giá trị ΔCt của mSEPT9 trong mẫu huyết tương và trong mẫu mô ung thư có mối tương quan tuyến tính mức độ vừa (hệ số tương quan $r = 0,33$; $p < 0,01$; *Biểu đồ 3.6*). Kết quả này cho thấy khi mức độ methyl hóa SEPTIN9 trong mô tăng thì mức độ methyl hóa trong huyết tương cũng có xu hướng tăng tương ứng, tuy nhiên không hoàn toàn song hành. Điều này gợi ý rằng mức độ mSEPT9 trong huyết tương có thể phản ánh các biến đổi biểu sinh từ mô u, nhưng đồng thời cũng chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố sinh học và kỹ thuật khác.

Trước hết, cần nhấn mạnh rằng kỹ thuật được sử dụng trong nghiên cứu này là định lượng mSEPT9 dựa trên phản ứng PCR sau xử lý bisulfite, với kết quả được biểu diễn dưới dạng ΔCt . Chỉ số này phản ánh tỷ lệ tương đối giữa bản sao SEPTIN9 bị methyl hóa và tổng số bản sao SEPTIN9 (bị methyl hóa và không bị methyl hóa). Vì vậy, sự biến thiên của giá trị ΔCt không chỉ phụ thuộc vào mức methyl hóa tuyệt đối mà còn liên quan đến tổng lượng DNA có mặt trong mẫu. Bản thân hai loại mẫu (mô và huyết tương) có tính chất nền sinh học khác nhau, nên giá trị ΔCt giữa chúng khó có thể so sánh tuyệt đối theo cách tuyến tính hoàn toàn.

Thêm vào đó, việc phân tích mô chỉ dựa trên một mẫu sinh thiết nhỏ, không phản ánh toàn bộ tính dị hợp của khối u gan, trong khi mSEPT9 trong huyết tương lại có thể chịu tác động bởi nhiều yếu tố sinh học toàn thân như kích thước khối u, số lượng khối u, mức độ xâm lấn, tình trạng hoại tử, và khả năng phóng thích cfDNA vào tuần hoàn... Như vậy, một mô u có tỷ lệ methyl hóa cao tại điểm sinh thiết vẫn có thể đi kèm với nồng độ mSEPT9 thấp trong huyết tương nếu khối u nhỏ, ít phóng thích DNA hoặc bị enzyme phân giải nhanh chóng. Ngược lại, khối u lớn với hoại tử trung tâm có thể giải phóng

hiều cfDNA, làm tăng lượng mSEPT9 tuần hoàn ngay cả khi vùng mô sinh thiết không cho thấy methyl hóa quá mạnh.

Khi phân tích sâu theo đặc điểm mô bệnh học, kết quả cho thấy mối tương quan giữa mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong mô và huyết tương nổi bật ở nhóm có đặc điểm mô học điển hình. Cụ thể, tương quan có ý nghĩa được ghi nhận ở nhóm có cấu trúc dạng bè ($r = 0,35$; $p = 0,01$), hình thái tế bào thông thường ($r = 0,39$; $p = 0,01$), biệt hóa mức độ vừa theo WHO ($r = 0,32$; $p = 0,02$) và độ II theo ES ($r = 0,33$; $p = 0,04$). Những nhóm này đại diện cho đặc điểm mô học ổn định và phổ biến nhất trong UTBMTBG. Mối tương quan không đạt ý nghĩa ở các nhóm biệt hóa cao, thấp hoặc không điển hình có thể do cỡ mẫu nhỏ và tính không đồng nhất của đặc điểm sinh học giữa các nhóm. Điều này cho thấy những khối u mang đặc điểm mô bệnh học phổ biến, điển hình có thể có quy luật phóng thích DNA và biểu hiện dấu ấn methyl hóa ổn định và dễ tiên đoán hơn. Trong khi đó, ở các dạng mô học không điển hình, sự biến thiên cao về đặc điểm tế bào có thể ảnh hưởng đến tính đại diện của mẫu sinh thiết hoặc khiến cho cfDNA được phóng thích không đồng đều vào tuần hoàn.

Mặc dù nghiên cứu của Wang D. và CS (2019) không ghi nhận sự khác biệt tổng lượng cfDNA giữa các mức độ biệt hóa (Edmondson-Steiner độ I - II so với III - IV), nhưng điều này không mâu thuẫn với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, bởi vì tổng số cfDNA không phản ánh đặc hiệu methyl hóa gen *SEPTIN9* là một dấu hiệu biểu sinh cụ thể [136]. Hơn nữa, các dữ liệu lâm sàng cho thấy UTBMTBG có độ biệt hóa kém hơn (độ III - IV) có tỷ lệ tái phát cao hơn, tiên lượng xấu hơn, và khả năng chữa khỏi bằng phẫu thuật thấp hơn so với nhóm biệt hóa cao hơn (độ I - II), từ đó cho thấy mức độ bất ổn sinh học cao hơn - vốn có thể làm nhiều tín hiệu methyl hóa đặc hiệu trong tuần hoàn [137], [138].

Phân tích theo đặc điểm khối u cũng cho thấy tương quan có xu hướng rõ ràng hơn ở nhóm có khối u lớn hơn 50 mm ($r = 0,53$; $p = 0,01$) và nhóm có tổn thương cả hai thùy gan ($r = 0,80$; $p = 0,02$). Những khối u này có thể có diện

tiếp xúc lớn với tuần hoàn gan, gia tăng phóng thích cfDNA từ mô u vào máu ngoại vi, làm tăng khả năng phát hiện m*SEPT9* và nâng cao tương quan với mô. Ở chiều ngược lại, khối u nhỏ hơn hoặc khu trú có thể không giải phóng đủ DNA mang methyl hóa *SEPTIN9* để phản ánh tương quan rõ ràng.

Xét theo giai đoạn BCLC, chỉ có nhóm BN giai đoạn B+C+D (giai đoạn muộn) có mối tương quan có ý nghĩa ($r = 0,58$; $p = 0,01$), trong khi giai đoạn sớm (0+A) không đạt ý nghĩa. Điều này phản ánh rằng khi khối u tiến triển, mức độ phóng thích cfDNA và biểu hiện bất thường của gen tăng cao, làm gia tăng khả năng phát hiện methyl hóa trong máu.

Các yếu tố lâm sàng cũng góp phần làm rõ sự biến thiên của mối tương quan. Cụ thể, mối tương quan có ý nghĩa ở nhóm HBsAg dương tính ($r = 0,35$; $p = 0,03$) và không xơ gan ($r = 0,38$; $p = 0,02$). BN không xơ gan có tuần hoàn gan – cửa ổn định hơn, cho phép cfDNA từ khối u dễ dàng vào máu ngoại vi. Ngược lại, xơ gan gây rối loạn huyết động và có thể tạo ra sự tiếp cận không đồng đều của cfDNA từ gan vào tuần hoàn ngoại vi.

Cuối cùng, khi phân tích theo mức AFP huyết tương, mối tương quan có ý nghĩa chỉ được ghi nhận ở nhóm $AFP \leq 400$ ng/mL ($r = 0,35$; $p = 0,01$). Điều này cho thấy m*SEPT9* trong huyết tương có thể cung cấp thêm thông tin biểu sinh ở các trường hợp không có biểu hiện rõ rệt của dấu ấn protein truyền thống, gợi ý khả năng bổ sung chẩn đoán của m*SEPT9* đối với các BN có nồng độ AFP thấp.

Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy mức methyl hóa gen *SEPTIN9* trong mô u và huyết tương có mối tương quan tuyến tính mức độ vừa, và mối tương quan này rõ nét hơn ở các nhóm BN có đặc điểm mô học điển hình, khối u lớn, lan rộng, không có xơ gan, và ở giai đoạn bệnh tiến triển hơn. Tuy nhiên, mối tương quan này không phải lúc nào cũng hiện diện rõ ràng ở tất cả các trường hợp, do ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như tính không đồng nhất của mô u, khả năng phóng thích cfDNA, hoạt động phân giải DNA trong máu, và đặc điểm

huyết động học của người bệnh... Những quan sát này nhấn mạnh rằng mSEPT9 trong huyết tương không chỉ đơn thuần phản ánh mức methyl hóa trong mô u, mà còn bị chi phối bởi nhiều yếu tố sinh học - lâm sàng liên quan đến chính người bệnh và đặc điểm tiến triển của khối u. Việc hiểu rõ các yếu tố này không chỉ giúp giải thích sự biến thiên của kết quả mSEPT9 giữa mô và huyết tương, mà còn mở ra hướng ứng dụng mSEPT9 trong huyết tương như một chỉ dấu phản ánh toàn diện hơn trạng thái sinh học và giai đoạn bệnh của UTBMTBG.

Chính vì vậy, trong phần tiếp theo, luận án sẽ tập trung phân tích mối liên quan giữa tình trạng methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương với các yếu tố lâm sàng, cận lâm sàng và giai đoạn bệnh, nhằm đánh giá giá trị thực tiễn của dấu ấn này trong phát hiện và theo dõi UTBMTBG.

4.2.2. Mối liên quan giữa mức độ methyl hoá gen SEPTIN9 huyết tương với lâm sàng, cận lâm sàng ở BN UTBMTBG

4.2.2.1. Mối liên quan với triệu chứng lâm sàng, chỉ số sinh hóa và chức năng gan

Phân tích các yếu tố lâm sàng, cận lâm sàng và chức năng gan nhằm đánh giá tính liên quan của mSEPT9 trong huyết tương với đặc điểm bệnh lý của BN UTBMTBG cho thấy một số kết quả đáng chú ý.

Thứ nhất, phân tích giá trị ΔC_t của mSEPT9 huyết tương theo các đặc điểm nhân khẩu học cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa hai giới nam và nữ ($p > 0,05$), cũng như không có khác biệt giữa các nhóm tuổi trong nhóm UTBMTBG (Bảng 3.14). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Huang F. và CS thực hiện trên 205 đối tượng, trong đó cũng ghi nhận không có sự khác biệt giữa giá trị mSEPT9 dương tính hay âm tính ở nhóm tuổi < 50 và ≥ 50 ($p = 0,262$), cũng như giữa hai giới nam và nữ ($p = 0,124$) ở nhóm UTBMTBG [77]. Tỷ lệ nam giới chiếm đa số trong cả hai nghiên cứu, phản ánh đặc điểm dịch tễ học chung của bệnh. Tương tự, nghiên cứu khác của He N. và CS [76] cũng cho thấy không có sự khác biệt về giới, nhưng xét nghiệm mSEPT9 có độ nhạy cao

hơn ở những BN > 50 tuổi so với những BN trẻ tuổi hơn [76]. Những thay đổi methyl hóa theo tuổi là hiện tượng được ghi nhận trong cả mô ung thư và mô lành, do sự tích lũy dần các bất thường biểu sinh. Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi không có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi có thể do BN UTBMTBG chủ yếu ở nhóm tuổi cao.

Về biểu hiện lâm sàng, UTBMTBG thường không có triệu chứng đặc hiệu, nhất là ở giai đoạn sớm - chủ yếu phát hiện qua khám sức khỏe định kỳ hoặc tình cờ khi kiểm tra các bệnh lý khác. Khi phân tích mối liên quan giữa nồng độ *mSEPT9* huyết tương với đặc điểm lâm sàng của UTBMTBG, hầu hết không ghi nhận khác biệt đáng kể về giá trị ΔCt , ngoại trừ nhóm có triệu chứng gan to: giá trị ΔCt của *mSEPT9* huyết tương thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm này ($p = 0,02$) so với BN không có gan to. Triệu chứng gan to thường phản ánh giai đoạn tiến triển muộn, khi khối u đã phát triển với kích thước lớn. Kết quả này phù hợp với cơ chế sinh học khi khối u lớn phóng thích nhiều cfDNA mang methyl hóa *SEPTIN9* vào tuần hoàn. Nghiên cứu của tác giả Li B. và CS (2020) [75] đã củng cố nhận định này khi ghi nhận mức độ *mSEPT9* giảm rõ rệt sau khi cắt u gan với $p = 0,001$, cho thấy *mSEPT9* phản ánh trực tiếp gánh nặng khối u.

Đáng chú ý, giá trị ΔCt *mSEPT9* huyết tương thấp hơn có ý nghĩa ở nhóm BN có tăng hoạt độ enzyme gan AST và ALT ($p = 0,02$ và $0,001$, theo thứ tự). Tăng AST và ALT phản ánh tình trạng tổn thương và hoại tử tế bào gan, do đó có thể làm tăng lượng cfDNA được giải phóng vào huyết tương, bao gồm cả đoạn mang methyl hóa gen *SEPTIN9*. Kết quả này góp phần khẳng định ngoài khối u, mức độ tổn thương gan lan tỏa cũng có thể ảnh hưởng đến mức độ *mSEPT9* trong tuần hoàn, và điều này cần được cân nhắc khi diễn giải kết quả xét nghiệm.

Xét về tình trạng nhiễm HBV - yếu tố nguy cơ chính gây UTBMTBG - giá trị ΔCt của *mSEPT9* trong huyết tương thấp hơn ở nhóm HBsAg dương

tính, nhưng chưa đạt ngưỡng ý nghĩa thống kê ($p = 0,12$). Mặc dù không có sự khác biệt rõ ràng, nhưng điều này gợi ý nhiễm HBV có thể làm tăng mức methyl hóa gen *SEPTIN9*. Nhiễm HBV ảnh hưởng cụ thể đến cfDNA tuần hoàn có thể phức tạp hơn, phụ thuộc vào giai đoạn nhiễm, mức độ xơ hóa gan và tình trạng viêm gan mạn tính.

Khi phân tích mối liên quan giữa *mSEPT9* và AFP - dấu ấn huyết thanh truyền thống trong chẩn đoán UTBMTBG - kết quả cho thấy giá trị ΔCt của *mSEPT9* thấp hơn ở nhóm có AFP > 20 ng/mL, tuy chưa đạt ngưỡng ý nghĩa ($p = 0,15$). Tuy nhiên, khi phân tầng theo ngưỡng AFP > 400 ng/mL, sự khác biệt trở nên có ý nghĩa thống kê ($p = 0,04$). Điều này cho thấy rằng nồng độ *mSEPT9* huyết tương có xu hướng tăng ở nhóm BN có AFP rất cao, đồng thời phản ánh gánh nặng khối u lớn hơn. Đây là cơ sở cho thấy *mSEPT9* có thể hoạt động bổ trợ cho AFP trong đánh giá bệnh, đặc biệt ở các trường hợp AFP tăng rõ rệt hoặc cần kết hợp nhiều chỉ dấu để tăng độ nhạy phát hiện.

Cuối cùng, xét theo thang điểm Child – Pugh và ALBI - chỉ số đánh giá mức độ suy chức năng gan - giá trị ΔCt của *mSEPT9* giảm dần theo phân loại Child - Pugh cũng như ALBI, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm Child – Pugh A so với Child – Pugh C ($p = 0,037$) và ALBI 1 so với ALBI 3 ($p = 0,05$). Kết quả này gợi ý rằng suy giảm chức năng gan có thể làm tăng mức độ giải phóng cfDNA vào tuần hoàn, nhưng mức ảnh hưởng lên *mSEPT9* có thể biến thiên theo nhiều yếu tố khác, bao gồm xơ gan, viêm mạn và khả năng thanh thải DNA tuần hoàn.

Như vậy, giá trị ΔCt của *mSEPT9* trong huyết tương ở BN UTBMTBG có liên quan với một số chỉ số phản ánh gánh nặng khối u (AFP), tổn thương tế bào gan (enzym AST/ALT), và chức năng gan (Child - Pugh), đồng thời có xu hướng thấp hơn ở nhóm nhiễm HBV hoặc có triệu chứng gan to. Các kết quả này cho thấy *mSEPT9* không chỉ là chỉ dấu phản ánh biểu hiện methyl hóa từ mô u mà còn chịu ảnh hưởng của các yếu tố sinh học toàn thân, do đó có tiềm

năng ứng dụng như một chỉ dấu động học theo dõi tiến triển bệnh nếu được chuẩn hóa và đánh giá kết hợp với các yếu tố lâm sàng khác.

4.2.2.2. *Mối liên quan với gánh nặng khối u*

Giá trị ΔC_t của *mSEPT9* huyết tương cho thấy mối liên quan đáng kể với các đặc điểm khối u gan ở BN UTBMTBG. Cụ thể, giá trị ΔC_t của *mSEPT9* huyết tương thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm BN có khối u gan lan tỏa cả hai thùy so với nhóm chỉ có khối u khu trú tại thùy phải hoặc trái ($p < 0,05$). Điều này cho thấy khối u lan rộng ở cả hai thùy có thể làm tăng lượng DNA mang methyl hóa *SEPTIN9* được giải phóng vào tuần hoàn. Ngược lại, giữa hai nhóm có khối u khu trú tại thùy phải và thùy trái gan, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$), gợi ý rằng vị trí khối u riêng lẻ ít ảnh hưởng đến nồng độ *mSEPT9* hơn so với mức độ lan tỏa.

Bên cạnh đó, kết quả phân tích cho thấy giá trị ΔC_t của *mSEPT9* huyết tương thấp hơn ở nhóm BN có từ hai khối u gan trở lên so với nhóm chỉ có một khối u đơn độc, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,01$). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Huang F. và CS, trong đó BN UTBMTBG đa khối u có tỷ lệ *mSEPT9* dương tính 31,6%, cao gấp nhiều lần so với 9,3% ở nhóm chỉ có một khối u đơn độc ($p = 0,004$). Đồng thời, mức biểu hiện Ki-67 - chỉ số tăng sinh tế bào - cũng cao hơn ở nhóm đa khối ($p = 0,015$), và có tương quan thuận với mức *mSEPT9* huyết tương ($r = 0,356$; $p \approx 1,3 \times 10^{-4}$) [77]. Những phát hiện này củng cố vai trò của *mSEPT9* như một chỉ dấu phản ánh tính chất tiến triển và tăng sinh mạnh của khối u gan.

Về kích thước khối u, kết quả cho thấy giá trị ΔC_t của *mSEPT9* huyết tương thấp hơn ở nhóm BN kích thước khối u lớn (≥ 50 mm) so với nhóm BN kích thước u nhỏ (< 50 mm), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,003$). Nghiên cứu Huang F. và CS (2022) cũng ghi nhận tỷ lệ dương tính *mSEPT9* cao hơn ở nhóm khối u ≥ 3 cm (71,9%) so với nhóm < 3 cm (33,3%), với $p \approx 4,6 \times 10^{-5}$ [77]. Mức *mSEPT9* trung bình (biểu thị qua giá trị $-\Delta\Delta C_t$) cũng cao hơn ở nhóm BN có khối u lớn so với nhóm khối u nhỏ [77]. Tương tự, một

nghiên cứu khác tại Trung Quốc của Zheng K. và CS (2023) ghi nhận *mSEPT9* tăng dần theo giai đoạn khối u - nghĩa là ở UTBMTBG giai đoạn muộn (khối u lớn hơn) thì nồng độ *mSEPT9* cao hơn hẳn giai đoạn sớm [139], qua đó càng củng cố giá trị chỉ điểm tiên triển của chỉ dấu này.

Huyết khối TMC là một yếu tố tiên lượng xấu ở BN UTBMTBG, thường gặp trong 10 - 40% các ca chẩn đoán ban đầu, và tới 44% ở các trường hợp tử vong [140], [141]. Huyết khối TMC phát triển thông qua nhiều cơ chế sinh học bao gồm: (1) xâm lấn trực tiếp của tế bào ung thư xâm nhập vào TMC; (2) tăng sinh mạch máu với sự tăng biểu hiện của VEGF và HIF-1 α thúc đẩy hình thành huyết khối; và (3) rối loạn miễn dịch và viêm với tế bào miễn dịch và cytokine trong vi môi trường khối u góp phần vào sự hình thành HKTMC [142]. Đáng chú ý, *bảng 3.19* cho thấy giá trị ΔC_t của *mSEPT9* huyết tương thấp hơn rõ rệt ở nhóm BN có tình trạng huyết khối TMC so với BN không có tình trạng huyết khối TMC ($p < 0,0001$). Hiện tại, chưa có nghiên cứu nào trực tiếp đánh giá mối liên quan giữa nồng độ *mSEPT9* huyết tương và sự hiện diện của huyết khối TMC ở BN UTBMTBG. Tuy nhiên, nghiên cứu của Huang F. và CS (2022) đã chứng minh rằng *mSEPT9* huyết tương là yếu tố dự báo độc lập cho xâm lấn vi mạch ($p = 0,020$), một đặc điểm sinh học tương đồng với xâm lấn vào TMC [77]. Khi kết hợp *mSEPT9* huyết tương với chỉ số PIVKA-II, khả năng dự báo xâm lấn vi mạch được cải thiện, với diện tích dưới đường cong ROC (AUC) đạt 0,72, cao hơn so với *mSEPT9* huyết tương hoặc PIVKA-II đơn lẻ. Huyết khối TMC phản ánh mức độ xâm lấn tại chỗ của khối u vào hệ TMC, cho thấy sinh học ung thư tiên triển hơn thường song hành với các biểu hiện khác như sự phát triển của khối u bằng các đặc điểm như khối u kích thước lớn, nhiều khối, lan tỏa hai thùy gan. Do đó, kết quả này thêm một lần nữa khẳng định sự biến đổi của *mSEPT9* trong huyết tương có liên quan tới mức độ tiên triển của khối u.

Ngược lại, khi phân tích mối liên quan giữa mức độ *mSEPT9* trong huyết tương với tình trạng di căn xa ở BN UTBMTBG thì chưa thấy sự khác biệt (p

= 0,62). Một khả năng có lẽ do số lượng BN đi căn trong nghiên cứu còn hạn chế (9/133 BN), gây khó khăn cho phân tích thống kê. Tuy chưa có nghiên cứu nào công bố trực tiếp OR hay AUC chuyên biệt cho dự báo di căn xa, các bằng chứng gián tiếp cho thấy mSEPT9 có tiềm năng như một chỉ dấu liên quan tiến triển xa, cần được xác nhận thêm trong các nghiên cứu tiếp theo.

Tổng hợp lại, nồng độ mSEPT9 huyết tương có xu hướng tăng theo mức độ lan rộng, số lượng và kích thước khối u, cũng như sự hiện diện của huyết khối TMC - những yếu tố phản ánh tiến triển sinh học của UTBMTBG. Những kết quả này gợi ý tiềm năng ứng dụng của mSEPT9 như một dấu ấn sinh học động học theo dõi tiến triển bệnh nếu được đánh giá song song với các chỉ số lâm sàng khác.

4.2.2.3. Mối liên quan với giai đoạn bệnh

Theo *Biểu đồ 3.9*, giá trị ΔC_t của mSEPT9 huyết tương cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm BN UTBMTBG giai đoạn sớm (BCLC 0 & A) so với nhóm giai đoạn muộn (BCLC B; C & D) ($p < 0,05$). Điều này cho thấy mức độ mSEPT9 huyết tương có xu hướng tăng theo tiến triển của bệnh. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm BCLC B và BCLC C & D, có thể do cỡ mẫu nhóm C và D còn hạn chế. Những phân tích này củng cố quan sát trước đó rằng mSEPT9 huyết tương hiện diện nhiều hơn ở những khối u gan lớn, lan rộng (giai đoạn muộn) so với khối u nhỏ giới hạn (giai đoạn đầu).

Kết quả phù hợp với các nghiên cứu trước đó. Nghiên cứu của Kotoh Y. và CS (2020) sử dụng kỹ thuật CORD-PCR với độ nhạy cao cho thấy số bản sao (copy) của mSEPT9 huyết tương tăng dần rõ rệt qua các giai đoạn BCLC. Cụ thể, giá trị trung vị tăng từ 2,1 copy ở BCLC 0 lên 53,7 copy ở BCLC D (giai đoạn cuối). Đồng thời, tỷ lệ BN dương tính mSEPT9 tăng từ 41,7% (giai đoạn 0) lên 75,6% (giai đoạn C) và 100% ở giai đoạn D [58]. Tương tự, nghiên cứu của Li B. và CS (2020) ghi nhận mSEPT9 hiện diện ở nhóm UTBMTBG giai đoạn muộn nhiều hơn hẳn nhóm giai đoạn sớm (khác biệt có ý nghĩa với $p = 0,03$) [75]. Nghiên cứu của Huang F. và CS (2022) cũng báo cáo mức

mSEPT9 huyết tương trước điều trị tương quan chặt với mức độ tiến triển của ung thư gan theo hệ thống phân giai đoạn BCLC, với ý nghĩa thống kê rõ rệt ($p = 0,012$). Cụ thể, giá trị $-\Delta\Delta Ct$ của mSEPT9 - một chỉ số phản ánh mức biểu hiện mSEPT9 huyết tương - tăng dần khi so sánh giữa các giai đoạn: so sánh giữa BCLC 0 và BCLC A cho thấy sự khác biệt với $p = 3,27 \times 10^{-3}$; và giữa BCLC A với nhóm BCLC B + C với $p = 0,040$ [77]. Những dữ liệu này, cùng với kết quả từ nghiên cứu của chúng tôi, củng cố vai trò của mSEPT9 như một dấu ấn phản ánh tiến triển bệnh lý ở BN UTBMTBG.

Những phân tích trên khẳng định rằng mSEPT9 trong huyết tương tăng lên ở các giai đoạn tiến triển của UTBMTBG, phù hợp với nhiều nghiên cứu trên thế giới. Giá trị dự đoán của mSEPT9 đối với giai đoạn bệnh và các đặc điểm sinh học khối u không chỉ được thể hiện rõ qua sự khác biệt ΔCt , mà còn ở tỷ lệ vượt ngưỡng điểm cắt, và các phân tích ROC tiếp theo. Những dữ kiện này đặt nền tảng quan trọng để tiếp tục đánh giá vai trò của mSEPT9 trong chẩn đoán sớm và ứng dụng lâm sàng, được trình bày ở phần tiếp theo.

4.3. Giá trị của mức độ mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan

4.3.1. Giá trị chẩn đoán UTBMTBG so với các nhóm tham chiếu

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi trong *Biểu đồ 3.4* cho thấy giá trị trung vị ΔCt của mSEPT9 trong nhóm BN UTBMTBG là 19,22 chu kỳ, thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm tham chiếu (bao gồm BGMT và người không mắc BGMT), với giá trị trung vị là 29,55 chu kỳ ($p < 0,0001$). Khi phân tích riêng rẽ (*Bảng 3.21*), ΔCt mSEPT9 ở nhóm UTBMTBG cũng thấp hơn đáng kể so với nhóm tham chiếu BGMT (trung vị = 29,93 chu kỳ) và nhóm tham chiếu khỏe mạnh, không mắc BGMT (trung vị = 29,29 chu kỳ), với $p > 0,05$).

Kết quả này hoàn toàn tương đồng với nghiên cứu của Li B. và CS (2020) [75], trong đó giá trị Ct trung bình của mSEPT9 huyết tương ở nhóm UTBMTBG ($n = 104$) là khoảng 37 chu kỳ, thấp hơn đáng kể so với nhóm BGMT (43 chu kỳ) và người khỏe mạnh (44 chu kỳ). Sự tương đồng này có thể

một phần do đặc điểm nhóm nghiên cứu giống nhau về tỷ lệ nhiễm HBV, giai đoạn bệnh BCLC, tuổi, giới và chủng tộc châu Á.

Kết quả phân tích đường cong ROC giữa nhóm UTBMTBG và nhóm tham chiếu (gồm 70 BGMT và 41 người khỏe mạnh, không mắc BGMT) cho thấy xét nghiệm $\Delta\text{Ct mSEPT9}$ có giá trị chẩn đoán tốt với $\text{AUC} = 0,827$ ($p < 0,0001$), độ nhạy 82,71% và độ đặc hiệu 71,07%. Khi chỉ so sánh với nhóm BGMT, AUC vẫn đạt mức tốt (0,824), với độ nhạy 84,21% và độ đặc hiệu 72,86%.

So sánh với các nghiên cứu trên thế giới (*Bảng 4.4*), AUC của chúng tôi tương đương với Kotoh Y. và CS (2020, $\text{AUC} = 0,81$) [58], He N. và CS (2020, $\text{AUC} = 0,85$) [76] và Bannaga A.S. và CS (2021, $\text{AUC} = 0,854$) [73]. Tuy nhiên, độ đặc hiệu của chúng tôi thấp hơn so với một số nghiên cứu. Một phần nguyên nhân có thể do khác biệt liên quan tới đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Bên cạnh đó, nhóm tham chiếu trong nghiên cứu của chúng tôi gồm cả BN xơ gan chưa rõ tiến triển và người không mắc BGMT, trong khi một số nghiên cứu chỉ giới hạn nhóm tham chiếu NKM hoặc xơ gan rõ rệt. Xét về mặt ứng dụng lâm sàng, việc lựa chọn nhóm tham chiếu là BN có nguy cơ cao (BGMT) phản ánh đúng thực tế sàng lọc và phân tầng nguy cơ trong cộng đồng. Dù có thể làm giảm nhẹ độ đặc hiệu của xét nghiệm, nhưng điều này lại tăng giá trị thực tế và khả năng ứng dụng lâm sàng của xét nghiệm mSEPT9 trong bối cảnh Việt Nam. Mặt khác, kỹ thuật mà chúng tôi sử dụng để phân tích mSEPT9 trong nghiên cứu là semi - nested PCR kết hợp đầu dò TaqMan và công nghệ mẫu dò khóa có khả năng kéo dài chuỗi (ExBP). Phương pháp này giúp tăng đáng kể độ nhạy, cho phép phát hiện cả những nồng độ rất thấp của DNA methyl hóa, là đặc điểm đặc biệt quan trọng trong các mẫu huyết tương có lượng DNA thấp. Tuy nhiên, giống như nhiều kỹ thuật có độ nhạy cao khác, việc tăng cường phát hiện cũng có thể làm tăng nguy cơ phát hiện những tín hiệu nền hoặc kết quả dương tính cận ngưỡng, từ đó ảnh hưởng đến độ đặc hiệu chung của xét nghiệm. Điều này phần nào lý giải vì sao độ đặc hiệu trong nghiên cứu của chúng tôi không cao bằng một số nghiên cứu sử dụng kỹ thuật truyền thống khác.

Bảng 4.4. So sánh giá trị AUC, độ nhạy và độ đặc hiệu của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm tham chiếu

Tác giả	Năm	Phương pháp xét nghiệm	Cỡ mẫu (UTBMTBG, nhóm tham chiếu)	AUC	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)
Oussalah A. và CS [10]	2018	qMSP (Epi proColon)	98 UTBMTBG; 191 xơ gan	0,94	90,6	87,2
He N. và CS (Trung Quốc) [76]	2020	qMSP (SensiColon)	64 UTBMTBG; 44 xơ gan; 298 khỏe mạnh	0,85	76,7	95,9
Li B. và CS [75]	2020	qMSP (PCR huỳnh quang đặc hiệu)	104 UTBMTBG; 95 BGMT; 174 khỏe mạnh	0,961	82,7	96,0
Kotoh Y. và CS [58]	2020	ddPCR	136 UTBMTBG; 45 bệnh gan mạn; 80 khỏe mạnh	0,81	63,2	90,0
Bannaga A.S. và CS [73]	2021	qPCR (Epi proColon v2.0)	38 UTBMTBG; 108 BGMT	0,854	89,5	81,6
Zheng K. và CS [139]	2023	qMSP (MethyLight)	51 UTBMTBG; 121 xơ gan	0,80	65,3	92,9
Chúng tôi	2025	semi-nested qPCR	133 UTBMTBG, 111 (BGMT, NKM)	0,827	82,71	71,07
Chúng tôi	2025	semi-nested qPCR	133 UTBMTBG, 70 BGMT	0,824	84,21	72,86
Chúng tôi	2025	semi-nested qPCR	133 UTBMTBG, 41 NKM	0,833	71,43	87,80

Methyl hóa gen *SEPTIN9* ban đầu được nghiên cứu trong chẩn đoán ung thư đại trực tràng, tuy nhiên từ năm 2018, tiềm năng ứng dụng của dấu ấn này trong UTBMTBG cũng được ghi nhận. Oussalah A. và CS là nhóm đầu tiên báo cáo vai trò chẩn đoán của m*SEPT9* huyết tương trong UTBMTBG, khi cho thấy sự gia tăng methyl hóa vùng khởi động của gen *SEPTIN9* ở BN xơ gan có và không mắc UTBMTBG [10]. Cơ sở biểu sinh này được củng cố từ phân tích mô khối u gan của Villanueva A. và CS (2015) [5]. Tuy nhiên, phương pháp của Oussalah A. và CS sử dụng bộ kit thương mại Epi proColon 2.0 theo nguyên lý định tính và có chi phí cao, đồng thời không cung cấp thông tin định lượng mức độ methyl hóa [10].

Từ đó đến nay, nhiều nhóm nghiên cứu đã phát triển các kỹ thuật định lượng mức độ m*SEPT9*, trong đó phổ biến nhất là qMSP (quantitative methylation - specific PCR), được ứng dụng trong các nghiên cứu của He N. và CS (2020) [76] và Li B. và CS (2020) [75]. Một kỹ thuật tiên tiến hơn là ddMSP (digital droplet MSP) kết hợp đặc hiệu methyl hóa với công nghệ ddPCR, cho phép định lượng tuyệt đối số bản sao DNA bị methyl hóa ngay cả ở tải lượng rất thấp, được sử dụng bởi Kotoh Y. và CS (2020) [58]. Phương pháp semi-nested PCR kết hợp với đầu dò TaqMan và công nghệ mẫu dò khóa có khả năng kéo dài chuỗi (ExBP) được thiết lập trong nghiên cứu của chúng tôi là kết quả của quá trình phát triển độc lập, sáng tạo bởi chính các tác giả trong nước và đã được công bố trên tạp chí quốc tế uy tín [143], [144]. Phương pháp này không dựa vào bộ kit thương mại hiện có với chi phí đắt tiền mà được tối ưu hóa từng bước từ thiết kế môi, mẫu dò, điều kiện phản ứng cho tới chiến lược phân tích định lượng dựa trên giá trị ΔC_t . Việc làm chủ hoàn toàn công nghệ này không chỉ góp phần nâng cao tính tự chủ trong nghiên cứu y sinh học tại Việt Nam mà còn giúp hạ giá thành xét nghiệm, phù hợp với điều kiện triển khai thực tế tại các cơ sở y tế trong nước. Đồng thời, phương pháp có độ nhạy kỹ thuật cao, phát hiện được nồng độ rất thấp của m*SEPT9* trong huyết tương, cho thấy tiềm

năng ứng dụng rộng rãi trong sàng lọc và chẩn đoán UTBMTBG ở cộng đồng nguy cơ cao.

Phân tích thêm từ dữ liệu nghiên cứu hiện tại cũng củng cố cho tiềm năng hỗ trợ chẩn đoán UTBMTBG của *mSEPT9*: theo bảng 3.22, những BN có giá trị $\Delta Ct \leq 26,94$ chu kỳ có nguy cơ mắc UTBMTBG cao gấp 11,72 lần so với nhóm tham chiếu ($p < 0,001$). Phân tích riêng giữa nhóm UTBMTBG so với BGMT ghi nhận những BN có giá trị $\Delta Ct \leq 28,25$ chu kỳ có nguy cơ mắc UTBMTBG cao gấp 14,32 lần ($p < 0,001$), còn khi so với nhóm NKM thì BN có giá trị $\Delta Ct \leq 24,72$ chu kỳ có nguy cơ mắc UTBMTBG cao gấp 17,35 lần ($p < 0,001$).

Kết quả của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Oussalah A. và CS [10], trong đó *mSEPT9* huyết tương được đánh giá ba lần liên tiếp, và kết quả dương tính ba lần là biến độc lập duy nhất liên quan mạnh tới UTBMTBG (OR = 91,53; $p < 0,0001$). Nghiên cứu của Bannaga A.S. và CS (2021) tại Anh cũng cho thấy BN UTBMTBG có khả năng dương tính với *mSEPT9* cao hơn 27,4 lần so với người không mắc UTBMTBG khi sử dụng bộ kit Epi proColon cải tiến [73].

Tổng hợp các kết quả trong và ngoài nước cho thấy *mSEPT9* là dấu ấn biểu sinh có độ đặc hiệu cao, khả năng phân biệt rõ ràng giữa UTBMTBG và các nhóm tham chiếu, bao gồm cả BGMT - nhóm có nguy cơ thực tế. Dù các phương pháp phân tích có thể khác nhau, nhưng đều chỉ ra vai trò tiềm năng của xét nghiệm này trong chẩn đoán và phân tầng nguy cơ BN có nguy cơ cao. Việc nhóm nghiên cứu chúng tôi phát triển phương pháp bán định lượng semi-nested PCR với đầu dò ExBP - có độ nhạy cao, tối ưu phù hợp với điều kiện thực tiễn - là bước tiến quan trọng, góp phần làm chủ công nghệ và đưa xét nghiệm *mSEPT9* trở thành công cụ khả thi để sàng lọc và chẩn đoán sớm UTBMTBG tại Việt Nam.

4.3.2. Giá trị chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL

AFP hiện nay vẫn là dấu ấn sinh học hàng đầu được khuyến cáo trong sàng lọc, chẩn đoán và theo dõi BN UTBMTBG với ngưỡng 20 ng/mL được khuyến nghị bởi hướng dẫn EASL-EORTC (2012) [145]. Tuy nhiên vẫn có tỷ lệ lớn BN UTBMTBG có nồng độ AFP bình thường < 20ng/mL nhất là khi BN có khối u nhỏ, mức độ biệt hóa tế bào cao, gây khó khăn cho chẩn đoán nhất là ở giai đoạn sớm để có thể điều trị triệt căn. Chính vì vậy phát hiện và ứng dụng các dấu ấn sinh học mới để thay thế cho AFP trong tình huống AFP bình thường ở đối tượng nguy cơ cao UTBMTBG vẫn là một vấn đề cấp thiết hiện nay.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tìm hiểu vai trò chẩn đoán của dấu ấn mSEPT9 trong tình huống AFP < 20ng/mL. Kết quả cho thấy giá trị delta Ct của mSEPT9 huyết tương ở nhóm BN UTBMTBG có AFP < 20 ng/mL thấp hơn rõ (thể hiện mức methyl hóa cao hơn) so với nhóm BN BGMT và NKM (trung vị 21,0 so với 29,9 và 29,3, $p < 0,05$) (Bảng 3.23).

So với nhóm tham chiếu không ung thư gan, mSEPT9 huyết tương có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG có AFP < 20ng/mL với AUC 0,826, tại điểm cắt 26,94 có độ nhạy 83,9% và độ đặc hiệu 72,07%. Với nhóm tham chiếu BGMT, mSEPT9 huyết tương cũng có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG với AUC 0,817, tại điểm cắt 28,25 chu kỳ có độ nhạy 87,5% và độ đặc hiệu 72,7%. BN có $\Delta Ct \leq 28,25$ có nguy cơ mắc UTBMTBG cao gấp 18,67 lần so với người có $\Delta Ct > 28,25$, $p < 0,001$.

Như vậy, mSEPT9 huyết tương có thể phát hiện UTBMTBG kể cả ở những trường hợp mà AFP không tăng. Nghiên cứu của Li B. và CS (2020) cũng cho kết quả tương tự, khi cho thấy tỷ lệ dương tính của mSEPT9 ở BN UTBMTBG có AFP ≤ 20 ng/mL và > 20 ng/mL là tương đương nhau (79,5% so với 85,0%, $p = 0,468$) [75]. Ngoài ra, nghiên cứu của He N. và CS (2020) báo cáo độ nhạy của mSEPT9 (76,7%) cao hơn hẳn AFP (56,7%), khẳng định vai trò bổ sung quan trọng của dấu ấn này [76].

Với kết quả ban đầu nêu trên chúng tôi nhận thấy dấu ấn sinh học mSEPT9 thực sự rất tiềm năng có thể thay thế được AFP trong tình huống AFP bình thường để sàng lọc nhóm đối tượng nguy cơ UTBMTBG, đặc biệt khi công nghệ xét nghiệm mSEPT9 trong nước đang dần được chuẩn hóa và với giá thành hợp lý.

4.3.3. Giá trị chẩn đoán UTBMTBG ở giai đoạn rất sớm và sớm

Những kết quả phân tích trên đã chứng minh rằng mức độ mSEPT9 trong huyết tương có thể phân biệt rõ ràng giữa BN UTBMTBG và các nhóm tham chiếu, bao gồm cả NKM và BGMT tính. Tuy nhiên, ý nghĩa lâm sàng của xét nghiệm này sẽ càng nổi bật nếu nó có thể phát hiện được ung thư ở giai đoạn sớm - khi các can thiệp điều trị như phẫu thuật cắt gan hay đốt u bằng sóng cao tần có thể mang lại hiệu quả triệt để và cải thiện đáng kể tiên lượng sống còn cho người bệnh. Do đó, phần tiếp theo tập trung làm rõ giá trị của xét nghiệm mSEPT9 trong phát hiện UTBMTBG ở giai đoạn BCLC 0&A, nhằm đánh giá tiềm năng ứng dụng của dấu ấn này trong sàng lọc sớm UTBMTBG ở nhóm đối tượng có nguy cơ cao.

Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị ΔC_t của mSEPT9 huyết tương ở nhóm BN UTBMTBG giai đoạn BCLC 0 & A (trung vị = 22,71 chu kỳ) thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm BGMT (trung vị = 29,93 chu kỳ; $p < 0,0001$), cũng như khi so với nhóm NKM (trung vị 29,29, $p < 0,001$). Khi đánh giá khả năng chẩn đoán UTBMTBG giai đoạn rất sớm/sớm (BCLC 0&A) so với nhóm BGMT, chỉ số ΔC_t của mSEPT9 cho thấy hiệu quả chẩn đoán khá tốt với $AUC = 0,771$ ($p < 0,0001$), tại điểm cắt tối ưu là 28,25 chu kỳ, xét nghiệm đạt độ nhạy 77,46% và độ đặc hiệu 72,86%, còn khi so với nhóm NKM giá trị chẩn đoán cũng đạt mức khá với $AUC = 0,766$, tại điểm cắt 24,72 chu kỳ có độ nhạy 57,75% và độ đặc hiệu 87,80%.

Phân tích thêm cho thấy với đối chứng là BGMT thì BN có giá trị ΔC_t của mSEPT9 $\leq 28,25$ chu kỳ có nguy cơ mắc UTBMTBG giai đoạn rất sớm/sớm

cao hơn gấp 9,23 lần so với nhóm còn lại ($OR = 9,23; p < 0,0001$), còn khi đối chứng là NKM thì OR cũng đạt giá trị 9,34.

Các nghiên cứu quốc tế cũng củng cố nhận định này. Trong một nghiên cứu đa trung tâm trên BN xơ gan, xét nghiệm *mSEPT9* phát hiện UTBMTBG giai đoạn sớm (BCLC A) với độ nhạy khoảng 64 - 88% và độ đặc hiệu khoảng 68 - 95% [10]. Nghiên cứu của Kotoh Y. và CS (2020) cho thấy AUC đạt khoảng 0,86 khi phân biệt UTBMTBG giai đoạn A với xơ gan. Đặc biệt, Kotoh Y. và CS còn ghi nhận một nửa số ca UTBMTBG được phát hiện bằng *mSEPT9* mà AFP âm tính nằm ở giai đoạn BCLC 0 - A; cụ thể, trong nhóm *mSEPT9* (+)/ AFP(-), có 57,1% BN thuộc giai đoạn rất sớm hoặc sớm (4 ca BCLC 0, 24 ca BCLC A) [58].

Những kết quả trên không chỉ củng cố tiềm năng của *mSEPT9* huyết tương trong phát hiện UTBMTBG ở giai đoạn rất sớm và sớm (BCLC 0&A), mà còn cho thấy khả năng ứng dụng của xét nghiệm này như một công cụ hỗ trợ sàng lọc có giá trị lâm sàng thực tiễn trong nhóm BN có nguy cơ cao như BGMT. Tuy nhiên, trong bối cảnh thực hành, việc kết hợp *mSEPT9* với các dấu ấn sinh học truyền thống như AFP có thể góp phần nâng cao hơn nữa hiệu quả chẩn đoán. Phần tiếp theo sẽ làm rõ hiệu quả chẩn đoán của *mSEPT9* khi sử dụng đơn lẻ và khi phối hợp với AFP.

4.3.4. Giá trị chẩn đoán UTBMTBG của mức độ *mSEPT9* kết hợp với AFP huyết tương

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy giá trị chẩn đoán của chỉ số ΔCt của *mSEPT9* huyết tương khi phối hợp với AFP huyết tương được cải thiện rõ rệt so với việc sử dụng từng chỉ số đơn lẻ. Cụ thể, diện tích dưới đường cong ROC (AUC) đạt 0,900 đối với chỉ số phối hợp, trong khi AUC của AFP đơn lẻ là 0,824 và của *mSEPT9* là 0,827; sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ (Bảng 3.30). Phân tích hiệu năng chẩn đoán tại điểm cắt tối ưu cho thấy chỉ số phối hợp đạt độ nhạy 87,22% và độ đặc hiệu 77,14%, cho thấy khả năng

phân biệt tốt giữa BN UTBMTBG và nhóm tham chiếu.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy giá trị chẩn đoán của *mSEPT9* huyết tương có giá trị AUC khác biệt không đáng kể so với AFP huyết tương ($p = 0,9246$) trong chẩn đoán UTBMTBG phân biệt nhóm bệnh và nhóm tham chiếu BGMT. Tuy nhiên, việc phối hợp hai dấu ấn này cải thiện giá trị chẩn đoán rõ rệt, cả về độ nhạy và độ đặc hiệu. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu gần đây. Nghiên cứu của He N. và CS (2020) cho thấy *mSEPT9* đạt độ nhạy 76,7% và độ đặc hiệu 95,9%, cao hơn đáng kể so với AFP (độ nhạy 56,7%; độ đặc hiệu 94,6%) [76]. Tương tự, nghiên cứu của Bannaga A.S. và CS (2021) ghi nhận *mSEPT9* có độ nhạy 89,5% - gần gấp đôi so với AFP (50%), mặc dù độ đặc hiệu của AFP cao hơn (97,1% so với 81,6%) [73].

Ngoài ra, nghiên cứu của Li B. và CS (2020) báo cáo rằng độ nhạy phát hiện UTBMTBG tăng lên hơn 91% khi kết hợp *mSEPT9* với AFP, so với mức 82,7% của *mSEPT9* đơn độc, giá trị AUC cũng đạt tới 0,986, phản ánh khả năng phân biệt vượt trội [75]. Các kết quả tương tự được ghi nhận trong phân tích nhóm BN UTBMTBG và xơ gan (103 UTBMTBG và 114 xơ gan) của Zheng K. và CS (2023), sự kết hợp của *mSEPT9* và AFP cũng cho thấy AUC cao hơn đáng kể (0,89) so với *mSEPT9* ($p = 0,046$) hoặc AFP ($p = 0,001$) [139].

Các phân tích trên đã làm rõ vai trò của *mSEPT9* không chỉ có hiệu quả chẩn đoán UTBMTBG cao khi sử dụng đơn lẻ, mà còn đặc biệt hữu ích khi phối hợp với AFP để cải thiện độ nhạy - nhất là trong các trường hợp AFP không tăng. Điều này mở ra tiềm năng ứng dụng lâm sàng của *mSEPT9* như một dấu ấn bổ sung quan trọng trong chiến lược phát hiện sớm và phân tầng nguy cơ UTBMTBG.

HẠN CHẾ CỦA ĐỀ TÀI

Nghiên cứu được thực hiện trên cỡ mẫu giới hạn (nhất là mới chỉ xác định được mức độ *mSEPT9* ở 58 mẫu mô ung thư) và thu nhận tại một trung tâm, do đó kết quả chưa phản ánh đầy đủ tính đại diện cho quần thể BN ở nhiều vùng địa lý hoặc cơ sở y tế khác nhau. Ngoài ra, sự không đồng nhất về tuổi giữa các nhóm nghiên cứu cũng ảnh hưởng đến các kết quả so sánh đối chiếu.

Nghiên cứu đánh giá đồng thời trên 2 loại mẫu nghiên cứu là mẫu mô và mẫu huyết tương tuy nhiên mẫu mô ung thư được đánh giá bằng mẫu mô đúc nền và chỉ đánh giá được những BN có chỉ định sinh thiết gan hoặc được thực hiện phẫu thuật (cỡ mẫu còn hạn chế). Do đó tương quan trên mẫu mô và mẫu huyết tương được đánh giá chủ yếu ở giai đoạn sớm của UTBMTBG.

Phương pháp phân tích sử dụng là một phương pháp phân tích methyl hóa gen *SEPTIN9* được nhóm nghiên cứu và ứng dụng lần đầu nên cần thêm các nghiên cứu tiếp theo để chứng minh giá trị của phương pháp.

Ngoài ra, đề tài hiện tập trung vào đánh giá vai trò của *mSEPT9* huyết tương là một dấu ấn sinh thiết lỏng trong chẩn đoán ban đầu. Các khía cạnh khác như theo dõi sau điều trị, phát hiện tái phát hoặc dự báo tiên lượng chưa được khai thác và sẽ là hướng cần xem xét trong các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương trên 133 BN UTBMTBG (trong đó có 58 BN đánh giá được mức độ methyl gen *SEPTIN9* trên mẫu mô ung thư), tham chiếu với 70 BN BGMT và 41 NKM, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Mức độ methyl hoá gen *SEPTIN9* trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư và mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở BN ung thư biểu mô tế bào gan

1.1. Mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương, đối chiếu với mẫu mô ung thư

- Trung vị ΔCt của *mSEPT9* ở nhóm UTBMTBG là 19,22 chu kỳ, thấp hơn rõ so với nhóm tham chiếu không ung thư là 29,55 chu kỳ ($p < 0,001$), thể hiện mức độ *mSEPT9* cao hơn ở BN UTBMTBG.

- Tín hiệu khuếch đại đặc hiệu của *mSEPT9* được ghi nhận trong 98,3% (57/58) mẫu mô UTBMTBG, với giá trị ΔCt trung vị là 9,20 chu kỳ (tứ phân vị: 6,74 - 16,88). Giá trị ΔCt của *mSEPT9* trong huyết tương cùng BN cao hơn rõ rệt (trung vị: 22,93; tứ phân vị: 13,77 - 26,82; $p < 0,001$), phản ánh mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương thấp hơn so với mô ung thư xấp xỉ 13600 lần.

- Mức độ *mSEPT9* trong huyết tương và mô u có tương quan tuyến tính mức độ vừa ($r = 0,33$; $p < 0,01$). Mối tương quan rõ nét hơn ở nhóm có đặc điểm mô học điển hình (cấu trúc dạng bè, biệt hóa độ II), khối u lớn (> 50 mm), tổn thương lan tỏa hai thùy, giai đoạn tiến triển (BCLC B/C/D), không xơ gan và AFP huyết tương ≤ 400 ng/mL.

1.2. Mối liên quan giữa mức độ *mSEPT9* huyết tương với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng

- Trung vị giá trị ΔCt thấp hơn (thể hiện mức *mSEPT9* cao hơn) ở nhóm BN có tổn thương tế bào gan (tăng hoạt độ 2 enzym AST và ALT) ($p < 0,05$)

và ở nhóm suy chức năng gan nặng (Child - Pugh C, ALBI 3) so với nhóm suy gan nhẹ (Child - Pugh A, ALBI 1) với $p = 0,037$ và $0,05$, theo thứ tự.

- Mức độ *mSEPT9* huyết tương có liên quan ý nghĩa với các yếu tố phản ánh sự tiến triển của khối u như huyết khối TMC, đường kính khối u > 50 mm ($p = 0,01$), tổn thương hai thùy gan ($p = 0,004$), và nồng độ AFP huyết tương ở ngưỡng > 20 ng/mL ($p = 0,04$).

- Mức độ *mSEPT9* huyết tương không liên quan đến tuổi, giới và một số triệu chứng lâm sàng.

2. Giá trị của mức độ methyl hóa gen *SEPTIN9* huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan

- *mSEPT9* huyết tương đơn lẻ có giá trị chẩn đoán tốt UTBMTBG so với nhóm tham chiếu chung (BGMT và NKM) với $AUC = 0,827$, tại điểm cắt 26,94 chu kỳ có độ nhạy 82,71% và độ đặc hiệu 72,07%; so với nhóm BGMT có $AUC = 0,824$ tại điểm cắt 28,25 chu kỳ độ nhạy 84,21%; độ đặc hiệu 72,86%.

- *mSEPT9* vẫn cho hiệu quả chẩn đoán tốt UTBMTBG có AFP ≤ 20 ng/mL ($AUC = 0,817$; OR = 18,67; $p < 0,001$) và chẩn đoán khá UTBMTBG giai đoạn BCLC 0/A ($AUC = 0,771$, OR = 9,23, $p < 0,001$).

- Khi phối hợp *mSEPT9* với AFP huyết tương cho giá trị rất tốt trong phân biệt UTBMTBG với BGMT ($AUC = 0,90$, độ nhạy 87,22% và độ đặc hiệu 77,14%), cao hơn rõ so với khi sử dụng từng dấu ấn đơn lẻ, $p < 0,001$.

- ΔCt của *mSEPT9* là yếu tố liên quan độc lập với tình trạng mắc UTBMTBG (OR = 0,86; 95% CI: 0,81 - 0,92; $p < 0,0001$), bên cạnh các yếu tố như tuổi, AFP và tình trạng HBsAg dương tính.

KIẾN NGHỊ

1. Kết quả nghiên cứu cho thấy methyl hóa gen *SEPTIN9* trong huyết tương là dấu ấn biểu sinh tiềm năng trong chẩn đoán UTBMTBG, đặc biệt ở giai đoạn sớm và trong các trường hợp AFP âm tính. Do đó, cần xem xét triển khai các nghiên cứu đa trung tâm với cỡ mẫu lớn hơn để xác nhận độ chính xác và khả năng ứng dụng của dấu ấn này trong thực hành lâm sàng. Đồng thời, cần tiến tới chuẩn hóa quy trình kỹ thuật, đánh giá chi phí - hiệu quả để phục vụ xét nghiệm thường quy.

2. Để tăng độ chính xác và khả năng phân tầng nguy cơ, cần tiếp tục nghiên cứu kết hợp m*SEPT9* với các dấu ấn phân tử khác và xây dựng mô hình chẩn đoán đa dấu ấn trên nền tảng sinh học phân tử hiện đại như PCR định lượng hoặc giải trình tự.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN**

1. Yen Hai Tran, Trang Thuy Dao, Ung Dinh Nguyen, Thien Ba Tran, Loi Phuc Luu, Huy Quang Duong, Tho Huu Ho (2025). Sensitive detection of circulating methylated *SEPTIN9* in hepatocellular carcinoma patients using a novel quantitative PCR assay. *Anal Methods*, 17(9), 2181 - 2190.
3. Trần Hải Yến, Hồ Hữu Thọ, Dương Quang Huy (2025). Mối liên quan giữa tình trạng methyl hóa gen *SEPTIN9* huyết tương với một số đặc điểm khối u gan ở BN ung thư biểu mô tế bào gan. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 555(1), 316 - 321.
4. Trần Hải Yến, Hồ Hữu Thọ, Dương Quang Huy (2025). Mối tương quan giữa tình trạng methyl hóa gen *SEPTIN9* trong mẫu huyết tương với mẫu mô ung thư ở BN ung thư biểu mô tế bào gan. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 555(2).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., *et al.* (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74 (3), 229-263.
2. Tu J., Wang B., Wang X., *et al.* (2024). Current status and new directions for hepatocellular carcinoma diagnosis. *Liver Res*, 8 (4), 218-236.
3. Galle P. R., Foerster F., Kudo M., *et al.* (2019). Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 39 (12), 2214-2229.
4. Singal A. G., Llovet J. M., Yarrow M., *et al.* (2023). AASLD Practice Guidance on prevention, diagnosis, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 78 (6), 1922-1965.
5. Villanueva A., Portela A., Sayols S., *et al.* (2015). DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 61 (6), 1945-1956.
6. Scott M., Hyland P. L., McGregor G., *et al.* (2005). Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. *Oncogene*, 24 (29), 4688-4700.
7. Kakehashi A., Ishii N., Shibata T., *et al.* (2011). Mitochondrial prohibitins and septin 9 are implicated in the onset of rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci*, 119 (1), 61-72.
8. Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G., *et al.* (2013). Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer*, 13, 398.
9. Xu R. H., Wei W., Krawczyk M., *et al.* (2017). Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater*, 16 (11), 1155-1161.

10. Oussalah A., Rischer S., Bensenane M., *et al.* (2018). Plasma mSEPT9: A Novel Circulating Cell-free DNA-Based Epigenetic Biomarker to Diagnose Hepatocellular Carcinoma. *EBioMedicine*, 30, 138-147.
11. Saeki I., Suehiro Y., Yamauchi Y., *et al.* (2023). Methylated SEPT9 assay-based liquid biopsy as a biomarker in molecular targeted agent-treated hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int*, 17 (5), 1289-1299.
12. Tran Y. H., Dao T. T., Nguyen U. D., *et al.* (2025). Sensitive detection of circulating methylated SEPT9 in hepatocellular carcinoma patients using a novel quantitative PCR assay. *Anal Methods*, 17 (9), 2181-2190.
13. Reveron-Thornton R. F., Teng M. L. P., Lee E. Y., *et al.* (2022). Global and regional long-term survival following resection for HCC in the recent decade: A meta-analysis of 110 studies. *Hepatol Commun*, 6 (7), 1813-1826.
14. Nguyen Dinh S. H., Do A., Pham T. N. D., *et al.* (2018). High burden of hepatocellular carcinoma and viral hepatitis in Southern and Central Vietnam: Experience of a large tertiary referral center, 2010 to 2016. *World J Hepatol*, 10 (1), 116-123.
15. Nguyễn Công Long, Đàm Thị Phương (2022). Một số đặc điểm dịch tễ và lâm sàng bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan tại bệnh viện Bạch Mai giai đoạn 2018 - 2019. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 32 (2), 123-128.
16. Phạm Văn Hùng, Đoàn Hữu Thiển (2022). 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*, 514 (2), 254-259.
17. Kim D. Y. (2024). Changing etiology and epidemiology of hepatocellular carcinoma: Asia and worldwide. *J Liver Cancer*, 24 (1), 62-70.

18. Nevola R., Beccia D., Rosato V., *et al.* (2023). HBV Infection and Host Interactions: The Role in Viral Persistence and Oncogenesis. *Int J Mol Sci*, 24 (8), 7651.
19. Huang D. Q., Terrault N. A., Tacke F., *et al.* (2023). Global epidemiology of cirrhosis - aetiology, trends and predictions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 20 (6), 388-398.
20. Ali H., Vikash F., Moond V., *et al.* (2024). Global trends in hepatitis C-related hepatocellular carcinoma mortality: A public database analysis (1999-2019). *World J Virol*, 13 (1), 89469.
21. Qin M., Lin L., Wang L., *et al.* (2024). Disease Burden Estimation of Hepatocellular Carcinoma Attributable to Dietary Aflatoxin Exposure in Sichuan Province, China. *Nutrients*, 16 (24), 4381.
22. Tarao K., Nozaki A., Ikeda T., *et al.* (2019). Real impact of liver cirrhosis on the development of hepatocellular carcinoma in various liver diseases- meta-analytic assessment. *Cancer Med*, 8 (3), 1054-1065.
23. Refolo M. G., Messa C., Guerra V., *et al.* (2020). Inflammatory Mechanisms of HCC Development. *Cancers (Basel)*, 12 (3), 641.
24. Setshedi M., Andersson M., Kgatle M. M., *et al.* (2018). Molecular and cellular oncogenic mechanisms in hepatocellular carcinoma. *S Afr Med J*, 108 (8b), 41-46.
25. Manaf A., Walid A., Kambiz K., *et al.* (2025). Pathophysiology of liver cirrhosis and risk correlation between immune status and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Research*, 11, 7.
26. Nishida N., Kudo M. (2013). Recent advancements in comprehensive genetic analyses for human hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 84 Suppl 1, 93-97.
27. European Association for the Study of the Liver (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 69 (1), 182-236.

28. Marrero J. A., Kulik L. M., Sirlin C. B., *et al.* (2018). Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 68 (2), 723-750.
29. Mohnasky M., Gad S., Moon A., *et al.* (2025). Hepatocellular Carcinoma Screening: From Current Standard of Care to Future Directions. *J Am Coll Radiol*, 22 (3), 260-268.
30. Chernyak V., Fowler K. J., Kamaya A., *et al.* (2018). Liver Imaging Reporting and Data System (LI-RADS) Version 2018: Imaging of Hepatocellular Carcinoma in At-Risk Patients. *Radiology*, 289 (3), 816-830.
31. Candita G., Rossi S., Cwiklinska K., *et al.* (2023). Imaging Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A State-of-the-Art Review. *Diagnostics*, 13 (4), 625.
32. Kudo M., Izumi N., Kokudo N., *et al.* (2011). Management of hepatocellular carcinoma in Japan: Consensus-Based Clinical Practice Guidelines proposed by the Japan Society of Hepatology (JSH) 2010 updated version. *Dig Dis*, 29 (3), 339-364.
33. Parra N. S., Ross H. M., Khan A., *et al.* (2023). Advancements in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Translational Medicine*, 3 (1), 51-65.
34. Nagtegaal I. D., Odze R. D., Klimstra D., *et al.* (2020). The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, 76 (2), 182-188.
35. Edmondson H. A., Steiner P. E. (1954). Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*, 7 (3), 462-503.
36. Shinkawa H., Tanaka S., Kabata D., *et al.* (2021). The Prognostic Impact of Tumor Differentiation on Recurrence and Survival after Resection of Hepatocellular Carcinoma Is Dependent on Tumor Size. *Liver Cancer*, 10 (5), 461-472.

37. Piñero F., Dirchwolf M., Pessôa M. G. (2020). Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells*, 9 (6), 1370.
38. Zhao J., Hu Z., Zheng X., *et al.* (2024). Blood biomarkers of hepatocellular carcinoma: a critical review. *Front Cell Dev Biol*, 12, 1489836.
39. Fares S., Wehrle C. J., Hong H., *et al.* (2024). Emerging and Clinically Accepted Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 16 (8), 1453.
40. Zhang X., Wu L. N., Li X. Q., *et al.* (2023). Whether the Golgi protein 73 could be a diagnostic serological marker in hepatocellular carcinoma: a meta analysis. *BMC Gastroenterol*, 23 (1), 85.
41. Guo M., Zhang H., Zheng J., *et al.* (2020). Glypican-3: A New Target for Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer*, 11 (8), 2008-2021.
42. Zhang Y., Li T., Qiu Y., *et al.* (2017). Serum microRNA panel for early diagnosis of the onset of hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 96 (2), e5642.
43. Tang J. C., Feng Y. L., Guo T., *et al.* (2016). Circulating tumor DNA in hepatocellular carcinoma: trends and challenges. *Cell Biosci*, 6, 32.
44. Wong I. H., Lo Y. M., Yeo W., *et al.* (2000). Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, 6 (9), 3516-3521.
45. Wong I. H., Lo Y. M., Zhang J., *et al.* (1999). Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res*, 59 (1), 71-73.
46. Yin C. Q., Yuan C. H., Qu Z., *et al.* (2016). Liquid Biopsy of Hepatocellular Carcinoma: Circulating Tumor-Derived Biomarkers. *Dis Markers*, 2016, 1427849.

47. Bộ Y tế (2020). *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị ung thư biểu mô tế bào gan*, Quyết định 3129/QĐ-BYT.
48. Vogel A., Cervantes A., Chau I., *et al.* (2018). Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 29 (Suppl 4), iv238-iv255.
49. Reig M., Forner A., Rimola J., *et al.* (2022). BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol*, 76 (3), 681-693.
50. Kalikin L. M., Sims H. L., Petty E. M. (2000). Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics*, 63 (2), 165-172.
51. McIlhatton M. A., Burrows J. F., Donaghy P. G., *et al.* (2001). Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. *Oncogene*, 20 (41), 5930-5939.
52. Sun J., Zheng M. Y., Li Y. W., *et al.* (2020). Structure and function of Septin 9 and its role in human malignant tumors. *World J Gastrointest Oncol*, 12 (6), 619-631.
53. Collie A. M., Landsverk M. L., Ruzzo E., *et al.* (2010). Non-recurrent SEPT9 duplications cause hereditary neuralgic amyotrophy. *J Med Genet*, 47 (9), 601-607.
54. Hartwell L. H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res*, 69 (2), 265-276.
55. Weber M., Hellmann I., Stadler M. B., *et al.* (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39 (4), 457-466.

56. Xie L., Jiang X., Li Q., *et al.* (2018). Diagnostic Value of Methylated Septin9 for Colorectal Cancer Detection. *Front Oncol*, 8, 247.
57. Klutstein M., Nejman D., Greenfield R., *et al.* (2016). DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Research*, 76 (12), 3446-3450.
58. Kotoh Y., Suehiro Y., Saeki I., *et al.* (2020). Novel Liquid Biopsy Test Based on a Sensitive Methylated SEPT9 Assay for Diagnosing Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol Commun*, 4 (3), 461-470.
59. Amir S., Mabweesh N. J. (2007). SEPT9_V1 protein expression is associated with human cancer cell resistance to microtubule-disrupting agents. *Cancer Biol Ther*, 6 (12), 1926-1931.
60. Gonzalez M. E., Makarova O., Peterson E. A., *et al.* (2009). Up-regulation of SEPT9_v1 stabilizes c-Jun-N-terminal kinase and contributes to its pro-proliferative activity in mammary epithelial cells. *Cell Signal*, 21 (4), 477-487.
61. Rath N., Olson M. F. (2012). Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. *EMBO Rep*, 13 (10), 900-908.
62. Cerchietti L., Melnick A. (2017). DNA Methylation–Based Biomarkers. *Journal of Clinical Oncology*, 35 (7), 793-795.
63. Forner A., Reig M., Bruix J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 391 (10127), 1301-1314.
64. Kurebayashi Y., Ojima H., Tsujikawa H., *et al.* (2018). Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification. *Hepatology*, 68 (3), 1025-1041.
65. Kanai Y. (2010). Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. *Cancer Sci*, 101 (1), 36-45.

66. Tsuda H., Zhang W. D., Shimosato Y., *et al.* (1990). Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (17), 6791-6794.
67. Wu Y., Bu F., Yu H., *et al.* (2017). Methylation of Septin9 mediated by DNMT3a enhances hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 315, 35-49.
68. Burrows J. F., Chanduloy S., McIlhatton M. A., *et al.* (2003). Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *The Journal of Pathology*, 201 (4), 581-588.
69. Grützmann R., Molnar B., Pilarsky C., *et al.* (2008). Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One*, 3 (11), e3759.
70. Kakehashi A., Ishii N., Shibata T., *et al.* (2010). Mitochondrial Prohibitins and Septin 9 Are Implicated in the Onset of Rat Hepatocarcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 119 (1), 61-72.
71. Kmeid M., Park Y. N., Chung T., *et al.* (2023). SEPT9 Expression in Hepatic Nodules: An Immunohistochemical Study of Hepatocellular Neoplasm and Metastasis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 31 (5), 278-287.
72. Akil A., Peng J., Omrane M., *et al.* (2016). Septin 9 induces lipid droplets growth by a phosphatidylinositol-5-phosphate and microtubule-dependent mechanism hijacked by HCV. *Nat Commun*, 7, 12203.
73. Bannaga A. S., Alvarez R., Zhou L., *et al.* (2021). Role of methylated septin 9 as an adjunct diagnostic and prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*, 23 (10), 1595-1606.

74. Park E., Wang X., Subasi N. B., *et al.* (2025). SEPT9 and PAI-1 are immunohistochemical biomarkers of the hepatocellular carcinoma immune microenvironment. *Discov Oncol*, 16 (1), 483.
75. Li B., Huang H., Huang R., *et al.* (2020). SEPT9 Gene Methylation as a Noninvasive Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Dis Markers*, 2020, 6289063.
76. He N., Feng G., Zhang C., *et al.* (2020). Plasma levels of methylated septin 9 are capable of detecting hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Mol Med Rep*, 22 (4), 2705-2714.
77. Huang F., Yang G., Jiang H., *et al.* (2022). Role of Plasma methylated SEPT9 for Predicting Microvascular Invasion and Tumor Proliferation in Hepatocellular Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat*, 21, 15330338221144510.
78. Phan T. H., Chi Nguyen V. T., Thi Pham T. T., *et al.* (2022). Circulating DNA methylation profile improves the accuracy of serum biomarkers for the detection of nonmetastatic hepatocellular carcinoma. *Future Oncol*, 18 (39), 4399-4413.
79. Nguyễn Văn Hương, Trần Thủy Tiên, Hồng Thị Khánh Ngân,CS. (2022). Ảnh hưởng của gen p16 và RASSF1A đến bệnh nhân ung thư gan. *Tạp chí Y dược lâm sàng* 108, 17 (Số đặc biệt 7/2022), 68.
80. Bộ Y tế (2019). *Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh viêm gan virus B*, Quyết định 2065/QĐ-BYT.
81. Bộ Y tế (2021). *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh viêm gan vi rút C*, Quyết định 2065/QĐ-BYT
82. He G., Chen Y., Zhu C., *et al.* (2019). Application of plasma circulating cell-free DNA detection to the molecular diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res*, 11 (3), 1428-1445.

83. Isaacson J. H., Butler R., Zacharek M., *et al.* (1994). Screening with the Alcohol use Disorders Identification Test (AUDIT) in an inner-city population. *J Gen Intern Med*, 9 (10), 550-553.
84. Oken M. M., Creech R. H., Tormey D. C., *et al.* (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 5 (6), 649-655.
85. Bộ Y tế (2014). *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật Nội Khoa, Chuyên ngành Tiêu hóa*, Quyết định 3805/QĐ-BYT.
86. Ma G., Wang J., Huang H., *et al.* (2020). Identification of the plasma total cfDNA level before and after chemotherapy as an indicator of the neoadjuvant chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Cancer Med*, 9 (7), 2271-2282.
87. Bendixen K. K., Mindegaard M., Epistolio S., *et al.* (2023). A qPCR technology for direct quantification of methylation in untreated DNA. *Nat Commun*, 14 (1), 5153.
88. Rodems T. S., Juang D. S., Stahlfeld C. N., *et al.* (2022). SEEMLIS: a flexible semi-automated method for enrichment of methylated DNA from low-input samples. *Clin Epigenetics*, 14 (1), 37.
89. Chartampilas E., Rafailidis V., Georgopoulou V., *et al.* (2022). Current Imaging Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*, 14 (16),
90. Pugh R. N., Murray-Lyon I. M., Dawson J. L., *et al.* (1973). Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 60 (8), 646-649.
91. Pinato D. J., Sharma R., Allara E., *et al.* (2017). The ALBI grade provides objective hepatic reserve estimation across each BCLC stage of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 66 (2), 338-346.

92. Nguyễn Công Long, Lưu Minh Diệp (2022). Đánh giá giai đoạn Ung thư biểu mô tế bào theo phân loại Barcelona và một số yếu tố liên quan đến nguyên nhân Ung thư gan tại bệnh viện Bạch Mai. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 514 (2), 174-177.
93. Abboud Y., Ismail M., Khan H., *et al.* (2024). Hepatocellular Carcinoma Incidence and Mortality in the USA by Sex, Age, and Race: A Nationwide Analysis of Two Decades. *J Clin Transl Hepatol*, 12 (2), 172-181.
94. Park J., Le A. K., Tseng T. C., *et al.* (2022). Progression Rates by Age, Sex, Treatment, and Disease Activity by AASLD and EASL Criteria: Data for Precision Medicine. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 20 (4), 874-885.e874.
95. McGlynn K. A., Petrick J. L., El-Serag H. B. (2021). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 73 Suppl 1 (Suppl 1), 4-13.
96. Carruba G. (2021). Estrogens in Hepatocellular Carcinoma: Friends or Foes? *Cancers (Basel)*, 13 (9), 2085.
97. Yang J. D., Hainaut P., Gores G. J., *et al.* (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16 (10), 589-604.
98. Tôn Thất Ngọc (2021). *Nghiên cứu giá trị của Alpha-Fetoprotein, Alpha-Fetoprotein-Len 3 và Des-Gamma- Carboxy prothrombin trong chẩn đoán và điều trị ung thư biểu mô tế bào gan*, Luận án tiến sĩ y học, Đại Học Y Hà Nội
99. Trần Thị Thu Thảo (2023). *Nghiên cứu giá trị các xét nghiệm alpha-fetoprotein (AFP), AFP-L3% và des-gamma carboxyprothrombin (DCP) trong chẩn đoán bệnh ung thư biểu mô tế bào gan*, Luận án tiến sĩ y học, Đại Học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh.
100. Long J., Cui K., Wang D., *et al.* (2024). Burden of Hepatocellular Carcinoma and Its Underlying Etiologies in China, 1990-2021: Findings

From the Global Burden of Disease Study 2021. *Cancer Control*, 31, 10732748241310573.

101. Karim M. A., Singal A. G., Kum H. C., *et al.* (2023). Clinical Characteristics and Outcomes of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Associated Hepatocellular Carcinoma in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 21 (3), 670-680.e618.
102. El-Kassas M., Elbadry M. (2022). Hepatocellular Carcinoma in Africa: Challenges and Opportunities. *Front Med (Lausanne)*, 9, 899420.
103. Pathomjaruwat T., Matchim Y., Armer J. M. (2024). Symptoms and symptom clusters in patients with hepatocellular carcinoma and commonly used instruments: An integrated review. *Int J Nurs Sci*, 11 (1), 66-75.
104. Đặng Chiều Dương (2020). *Nghiên cứu biểu hiện microrna-21, microrna-122 huyết tương ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan nhiễm vi rút viêm gan B*, Luận án tiến sĩ y học, Học Viện Quân Y.
105. Phan Thị Hiền Lương (2020). *Nghiên cứu đa hình gen TNF- α -308 và TGF- β 1-509 ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan có HBsAg dương tính*, Luận án Tiến sĩ y học, Học viện Quân y.
106. Arvanitakis K., Koletsa T., Mitroulis I., *et al.* (2022). Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis, Prognosis and Therapy. *Cancers (Basel)*, 14 (1), 226.
107. Zanetto A., Senzolo M., Campello E., *et al.* (2021). Influence of Hepatocellular Carcinoma on Platelet Aggregation in Cirrhosis. *Cancers*, 13 (5), 1150.
108. Liu P. H., Hsu C. Y., Su C. W., *et al.* (2020). Thrombocytosis is associated with worse survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 40 (10), 2522-2534.

109. Zhang L. X., Lv Y., Xu A. M., *et al.* (2019). The prognostic significance of serum gamma-glutamyltransferase levels and AST/ALT in primary hepatic carcinoma. *BMC Cancer*, 19 (1), 841.
110. Nguyễn Việt Phương, Trần Viết Tiến, Phạm Bá Đức *et al.* (2023). Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và mối liên quan với mỗi liên quan với một số đặc điểm mô bệnh học trên bệnh nhân Ung thư biểu mô tế bào gan nhiễm HBV đã phẫu thuật tại bệnh viện K Tân Triều. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 528 (2), 259-264.
111. Wei Z., Zhang Y., Lu H., *et al.* (2022). Serum alpha-fetoprotein as a predictive biomarker for tissue alpha-fetoprotein status and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Transl Cancer Res*, 11 (4), 669-677.
112. Vipani A., Lauzon M., Luu M., *et al.* (2022). Decreasing Trend of Serum α -Fetoprotein Level in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 20 (5), 1177-1179.e1174.
113. Trevisani F., D'Intino P. E., Morselli-Labate A. M., *et al.* (2001). Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol*, 34 (4), 570-575.
114. Zhang J., Chen G., Zhang P., *et al.* (2020). The threshold of alpha-fetoprotein (AFP) for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 15 (2), e0228857.
115. Trần Quang Tú, Trần Công Duy Long, Đỗ Thị Hồng Tươi (2021). Đặc điểm bệnh nhân Ung thư biểu mô tế bào gan tại đơn vị ung thư gan mật và ghép gan - Khoa ngoại gan mật tụy Bệnh viện đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 504 (2), 20-25.

116. Dai C. Y., Lin C. Y., Tsai P. C., *et al.* (2018). Impact of tumor size on the prognosis of hepatocellular carcinoma in patients who underwent liver resection. *J Chin Med Assoc*, 81 (2), 155-163.
117. Nathani P., Gopal P., Rich N., *et al.* (2021). Hepatocellular carcinoma tumour volume doubling time: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, 70 (2), 401-407.
118. Lê Minh Huy (2012). *Nghiên cứu giải phẫu bệnh và hóa mô miễn dịch các yếu tố tiên lượng của carcinôm tế bào gan*, Luận án tiến sĩ y học, Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.
119. Lauwers G. Y., Terris B., Balis U. J., *et al.* (2002). Prognostic histologic indicators of curatively resected hepatocellular carcinomas: a multi-institutional analysis of 425 patients with definition of a histologic prognostic index. *Am J Surg Pathol*, 26 (1), 25-34.
120. Schlageter M., Terracciano L. M., D'Angelo S., *et al.* (2014). Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 20 (43), 15955-15964.
121. El Jabbour T., Lagana S. M., Lee H. (2019). Update on hepatocellular carcinoma: Pathologists' review. *World J Gastroenterol*, 25 (14), 1653-1665.
122. Wang Y., Yuan D., Sun H., *et al.* (2023). Non-invasive preoperative prediction of Edmondson-Steiner grade of hepatocellular carcinoma based on contrast-enhanced ultrasound using ensemble learning. *Front Oncol*, 13, 1116129.
123. Park B. V., Gaba R. C., Huang Y. H., *et al.* (2019). Histology of Hepatocellular Carcinoma: Association with Clinical Features, Radiological Findings, and Locoregional Therapy Outcomes. *J Clin Imaging Sci*, 9, 52.

124. Lee K., Lee K. B., Yi N. J., *et al.* (2017). Prognosis of Hepatocellular Carcinoma after Liver Transplantation: Comparative Analysis with Partial Hepatectomy. *J Pathol Transl Med*, 51 (1), 79-86.
125. Shin S. H., Park J. Y., Hwang C., *et al.* (2023). Histological subtypes of hepatocellular carcinoma: Their clinical and prognostic significance. *Ann Diagn Pathol*, 64, 152134.
126. Lewin J., Kottwitz D., Aoyama J., *et al.* (2021). Plasma cell free DNA methylation markers for hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis: a case control study. *BMC Gastroenterol*, 21 (1), 136.
127. Le D. C., Nguyen T. M., Nguyen D. H., *et al.* (2023). Survival Outcome and Prognostic Factors Among Patients With Hepatocellular Carcinoma: A Hospital-Based Study. *Clin Med Insights Oncol*, 17, 11795549231178171.
128. Lokhandwala T., Aly A., Farrelly E., *et al.* (2023). Management of hepatocellular carcinoma from diagnosis in routine clinical practice. *Hepat Oncol*, 9 (4), Hep45.
129. Tellapuri S., Sutphin P. D., Beg M. S., *et al.* (2018). Staging systems of hepatocellular carcinoma: A review. *Indian J Gastroenterol*, 37 (6), 481-491.
130. Đặng Trung Thành (2020). *Nghiên cứu giá trị cận lâm sàng trong tiên lượng và theo dõi hiệu quả điều trị ung thư gan nút mạch hóa chất kết hợp đốt sóng cao tần*, Luận án tiến sĩ y học, Đại học Y Hà Nội.
131. An J., Chang Y., Choi G. H., *et al.* (2025). Hepatocellular carcinoma in Korea: an analysis of the 2016-2018 Korean Nationwide Cancer Registry. *jlc*, 25 (1), 109-122.

132. Chandrashekar D. S., Bashel B., Balasubramanya S. A. H., *et al.* (2017). UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, 19 (8), 649-658.
133. Newman A. M., Bratman S. V., To J., *et al.* (2014). An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*, 20 (5), 548-554.
134. Diehl F., Schmidt K., Choti M. A., *et al.* (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*, 14 (9), 985-990.
135. Tran N. H., Kisiel J., Roberts L. R. (2021). Using cell-free DNA for HCC surveillance and prognosis. *JHEP Rep*, 3 (4), 100304.
136. Wang D., Hu X., Long G., *et al.* (2019). The clinical value of total plasma cell-free DNA in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Ann Transl Med*, 7 (22), 650.
137. Qu C., Huang X., Liu K., *et al.* (2019). Effect of hepatitis B virus DNA replication level and anti-HBV therapy on microvascular invasion of hepatocellular carcinoma. *Infect Agent Cancer*, 14, 2.
138. Zhou L., Rui J. A., Zhou W. X., *et al.* (2017). Edmondson-Steiner grade: A crucial predictor of recurrence and survival in hepatocellular carcinoma without microvascular invasio. *Pathol Res Pract*, 213 (7), 824-830.
139. Zheng K., Dai L., Zhao Y., *et al.* (2023). Methylated SEPT9 combined with AFP and PIVKA-II is effective for the detection of HCC in high-risk population. *BMC Gastroenterol*, 23 (1), 260.
140. Ashmawy M. M., Mahmoud A., El-Masry M. A., *et al.* (2019). Risk factors of malignant portal vein thrombosis in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Current Medical Research and Practice*, 4 (2), 203-208.

141. Quirk M., Kim Y. H., Saab S., *et al.* (2015). Management of hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis. *World J Gastroenterol*, 21 (12), 3462-3471.
142. Galasso L., Cerrito L., Termite F., *et al.* (2024). The Molecular Mechanisms of Portal Vein Thrombosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 16 (19), 3247.
143. Ho T. H., Dang K. X., Lintula S., *et al.* (2014). Extendable blocking probe in reverse transcription for analysis of RNA variants with superior selectivity. *Nucleic Acids Research*, 43 (1), e4-e4.
144. Ho T. H., Dang K. X., Lintula S., *et al.* (2015). Extendable blocking probe in reverse transcription for analysis of RNA variants with superior selectivity. *Nucleic Acids Res*, 43 (1), e4.
145. European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer (2012). EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 56 (4), 908-943.

PHỤ LỤC 1

Đánh giá mức độ xơ hóa gan bằng sinh thiết gan và các biện pháp không xâm nhập

(Theo hướng dẫn chẩn đoán viêm gan virus B mạn tính và viêm gan
virus C mạn tính của Bộ Y tế Việt Nam [80], [81])

1. Bảng điểm Metavir (Dựa trên sinh thiết gan)

1. Bảng điểm Metavir	
F0	Không xơ hóa
F1	Xơ hóa khoảng cửa không có vách ngăn
F2	Xơ hóa khoảng cửa với vài vách ngăn
F3	Nhiều vách ngăn nhưng chưa có xơ gan
F4	Xơ gan

2. Fibroscan

F0: 1-5 kPa

F1: 5-7 kPa

F2: 7,1-9,5 kPa

F3: 9,6-12,5 kPa

F4: >12,5 kPa

3. APRI

$APRI = ((AST \text{ của BN} / AST \text{ giới hạn trên mức bình thường ULN}) \times 100) / \text{số lượng tiểu cầu (G/L)}$

APRI <0,5 :F0-F1

APRI 0,5-1,0 :F2

APRI 1,0-2 :F3

APRI >2 :F4

4. FIB-4 (Fibrosis-4)

$FIB-4 = [\text{Tuổi (năm)} \times AST \text{ (IU/L)}] / [\text{Tiểu cầu (109/L)} \times ALT1/2 \text{ (IU/L)}]$

PHỤ LỤC 2
BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Nhóm ung thư biểu mô tế bào gan

Số bệnh án nghiên cứu:

Ngày lấy mẫu:

Số lưu trữ:

Mã huyết tương:

Mã mẫu mô:

1. Hành chính

Họ và tên:

Năm sinh

Giới: o 1. Nam

o 2. Nữ

Ngày vào

viện:

Ngày ra viện:

Chẩn đoán:

2. Tiền sử

2.1. Nhiễm HBV

o 1. Có

o 2. Không

2.2. Nhiễm HCV

o 1. Có

o 2. Không

2.3. Lạm dụng rượu

o 1. Có

o 2. Không

2.4. Điều trị xơ gan

o 1. Có

o 2. Không

2.5. Mắc các loại ung thư khác

o 1. Có

o 2. Không

2.6. Khác:

3. Triệu chứng lâm sàng:

3.1. Tình cờ phát hiện u

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.3. Mệt mỏi

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.5. Đau hạ sườn phải

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.7. Sốt

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.9. Vàng da, cứng mạc

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.11. Sao mạch

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.13. Gan to

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.15. Cổ trướng

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.2. Gầy sút cân

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.4. Chán ăn

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.6. Đau thượng vị

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.8. Phù

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.10. Xuất huyết dưới da

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.12. Bàn tay son

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.14. Lách to

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.16. Tuần hoàn bàng hệ

☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.17. Điểm toàn trạng **ECOG**:

4. Xét nghiệm máu:

	Xét nghiệm		Kết quả
Công thức máu	Hồng cầu	T/L	
	HST	g/L	
	Bạch cầu	G/L	
	Tiểu cầu	T/L	
Đông máu cơ bản	PT	%	
	INR		
Sinh hóa máu	Glucose	mmol/L	

Creatinin	μmol/L
Albumin	g/L
Bilirubin TP	μmol/L
AST	(U/L)
ALT	(U/L)
AFP	ng/mL
PIVKA II	mAU/mL

APRI (AST/40) x 100)/Số lượng tiểu cầu (G/L)

Vi sinh vật	HBsAg	o	1. Dương tính	o	2. Âm tính
	Anti - HCV	o	1. Dương tính	o	2. Âm tính

5. Điểm Child-Pugh:

Tiêu chí	Điểm số					
	1 điểm		2 điểm		3 điểm	
Bệnh não gan	Không	o	1 - 2	o	3 - 4	o
Cổ trướng	Không	o	Ít	o	Vừa, nhiều	o
Bilirubin TT (μmol/L)	< 34	o	34 - 51	o	> 51	o
Albumin (g/L)	> 35	o	28 - 35	o	< 28	o
Prothrombin (%)	> 54	o	45 - 54	o	< 45	o
Tổng điểm						
Phân nhóm	1. A	o	2. B	o	3. C	o
Child-Pugh	(5-6 điểm)		(7-9 điểm)		(10-15 điểm)	

6. Cắt lớp vi tính

6.1. Số lượng u:

- o 1. 1 khối o 2. 2 khối o 3. 3 khối o 4. > 3 khối

6.2. Kích thước khối u lớn nhất:

6.3. Vị trí u:

- ☐ 1. Gan phải ☐ 2. Gan trái ☐ 3. Hai thùy

6.4. *Huyết khối tĩnh mạch cửa:*

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

6.5. *Hạch rốn gan:*

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

6.6. *Di căn xa:*

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

Vị trí di căn:

6.7. *Hình ảnh xơ gan:*

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

6.8. *Cổ chướng:*

- ☐ 1. Không ☐ 2. Ít ☐ 3. Vừa, nhiều

6.9. *Hình ảnh Lách to:*

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

7. Nội soi dạ dày – thực quản

7.1. *Giãn tĩnh mạch thực quản.*

- ☐ 1. Không ☐ 2. Độ 1 ☐ 3. Độ 2 ☐ 4. Độ 3
giãn

7.2. *Bệnh dạ dày tăng áp cửa.*

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

8. Đặc điểm mô bệnh học

8.1. **Chẩn đoán mô bệnh học:** Ung thư biểu mô tế bào gan

8.2. **Phân độ mô học theo WHO:**

- ☐ Độ 1 ☐ Độ 2 ☐ Độ 3

8.3. **Phân độ mô học theo phân loại Edmondson – Steiner (ES)**

- ☐ Độ 1 ☐ Độ 2 ☐ Độ 3 ☐ Độ 4

8.4. **Thể mô bệnh học (architecture subtypes)**

- ☐ Thở bè (trabecular)
 - ☐ Thở đặc (solid)
 - ☐ Thở giả tuyến (pseudoglandular)
 - ☐ Thở bè lớn (macrotrabecular)

8.5. Biến thể mô học (histologic variants)

- ☐ Thể thông thường (usual)
- ☐ Biến thể gan nhiễm mỡ (steatohepatic variant)
- ☐ Biến thể tế bào sáng (clear cell variant)
- ☐ Biến thể xơ cứng (scirrhous variant)
- ☐ Biến thể tế bào kỵ màu (chromophobe variant)

Biến thể

khác:.....

8.6. Hình ảnh xơ gan:

- Có

- ☐ Không

9. Chẩn đoán xơ gan:

- | | | | |
|---------------|------------------|----------------|-----------|
| o 1. Lâm sàng | o 2. Mô bệnh học | o 3. Fibroscan | o 4. APRI |
|---------------|------------------|----------------|-----------|

10. Giai đoạn bệnh theo BCLC 2019

Giai đoạn BCLC		ECOG		Đặc điểm khối u		Child - Pugh		Tăng áp cửa			
o	0	o	0-1	o	1 khối < 2cm	o	A	o	C ó	o	Khôn g
o	A	o	0-1	o	1 khối hoặc 2-3 khối < 3cm	o	A- B	o	C ó	o	Khôn g
o	B	o	0-1	o	Nhiều khối	o	A- B	o	C ó	o	Khôn g
o	C	o	0-2	o	Huyết khối TMC, di căn hạch hoặc	o	A- B	o	C ó	o	Khôn g

					di căn xa						
o	D	o	> 2	o	Bất kỳ T, N hoặc M	o	C	o	C ó	o	Khôn g

11. Kết quả xét nghiệm methyl hóa *gen SEPTIN9 (mSEPT9)*

Xét nghiệm

Kết quả

Giá trị	Giá trị	Giá trị
CT S -TB	CT T	Delta-CT

Định lượng *mSEPT9* huyết tương

Định lượng *mSEPT9* mẫu mô

Giảng viên hướng dẫn

Nghiên cứu sinh

Trần Hải Yến

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Nhóm bệnh gan mạn tính điều trị nội trú

Số bệnh án nghiên cứu:

Ngày lưu trữ:

Số lưu trữ:

Mã huyết tương:

1. Hành chính

Họ và tên:

Năm sinh

Giới:

☐ 1. Nam

☐ 2. Nữ

Ngày vào viện:

Ngày ra viện:

Chẩn đoán:

2. Tiền sử

2.1. Nhiễm HBV

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.2. Nhiễm HCV

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.3. Lạm dụng rượu

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.4. Điều trị xơ gan

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.5. Mắc các loại ung thư khác

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.6. Khác:

2. Xét nghiệm máu:

Xét nghiệm			Kết quả
Công thức máu	Bạch cầu	T/L	
	Hồng cầu	G/L	
	HST	g/L	

Xét nghiệm			Kết quả		
	Tiểu cầu	G/L			
Đông máu	PT	%			
	INR				
Sinh hóa máu	Glucose	mmol/L			
	Creatinin	micromol/L			
	Bilirubin TT	micromol/L			
	AST	U/L			
	ALT	U/L			
	AFP	ng/mL			
APRI (AST/40) x 100/Số lượng tiểu cầu (G/L)					
Vi sinh vật	HBsAg	o	1. Dương tính	o	2. Âm tính
	Anti - HCV	o	1. Dương tính	o	2. Âm tính

3. Siêu âm và nội soi

3.1. Gan to

- o 1. Có o 2. Không

3.2. Lách to

- o 1. Có o 2. Không

3.3. Khối bất thường ở gan:

- o 1. Có o 2. Không

3.4. Hình ảnh xơ gan:

- o 1. Có o 2. Không

3.5. Cổ chướng:

- o 1. Không o 2. Ít o 3. Vừa, nhiều

3.6. Tổn thương khác của hệ thống gan mật:

3.7. Fibroscan.

- o 1. F1 o 2. F2 o 3. F3 o 4. F4

3.8. *Giãn tĩnh mạch thực quản.*

- o 1. Không giãn o 2. Độ 1 o 3. Độ 2 o 4. Độ 3

3.9. *Bệnh dạ dày tăng áp cửa.*

- o 1. Có o 2. Không

4. Chẩn đoán xơ gan

- o 1. Lâm sàng o 2. Mô bệnh học o 3. Fibroscan o 4. APRI

5. Kết quả xét nghiệm methyl hóa *gen SEPTIN9 (mSEPT9)*

Xét nghiệm

Kết quả

Giá trị CT S -TB	Giá trị CT T	Giá trị Delta- CT
---------------------	-----------------	----------------------

Định lượng *mSEPT9* huyết
tương

Giảng viên hướng dẫn

Nghiên cứu sinh

Trần Hải Yến

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Nhóm bệnh gan mạn tính điều trị ngoại trú

Số bệnh án nghiên cứu:

Ngày lấy mẫu:

Mã BN:

Mã huyết tương:

1. Hành chính

Họ và tên:		Năm sinh	
Giới:	☐ 1. Nam	☐ 2. Nữ	
Ngày vào viện:			
Ngày ra viện:			
Chẩn đoán:			

2. Tiền sử

2.1. Nhiễm HBV

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

2.2. Nhiễm HCV

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

2.3. Lạm dụng rượu

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

2.4. Điều trị xơ gan

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

2.5. Mắc các loại ung thư khác

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

2.6. Khác:

2. Xét nghiệm máu:

Xét nghiệm			Kết quả
Công thức máu	Bạch cầu	G/L	
	Hồng cầu	H/L	
	HST	g/L	

Xét nghiệm			Kết quả
	Tiểu cầu	G/L	
Đông máu	PT	%	
	INR		
Sinh hóa máu	Glucose	mmol/L	
	Creatinin	micromol/L	
	Bilirubin TT	micromol/L	
	AST	U/L	
	ALT	U/L	
	AFP	ng/mL	
APRI : (AST/40) x 100)/Số lượng tiểu cầu (G/L)			
Vì sinh vật	HBsAg	☐ 1. Dương tính	☐ 2. Âm tính
	Anti - HCV	☐ 1. Dương tính	☐ 2. Âm tính

3. Siêu âm và nội soi

3.1. Gan to

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.2. Lách to

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.3. Khối bất thường ở gan:

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.4. Hình ảnh xơ gan:

- ☐ 1. Có ☐ 2. Không

3.5. Cổ chướng:

- ☐ 1. Không ☐ 2. Ít ☐ 3. Vừa, nhiều

3.6. Tổn thương khác của hệ thống gan mật:

3.7. Fibroscan.

- ☐ 1. F1 ☐ 2. F2 ☐ 3. F3 ☐ 4. F4

3.8. *Giãn tĩnh mạch thực quản.*

- o 1. Không giãn o 2. Độ 1 o 3. Độ 2 o 4. Độ 3

3.9. *Bệnh dạ dày tăng áp cửa.*

- o 1. Có o 2. Không

4. Chẩn đoán xơ gan

- o 1. Lâm sàng o 2. Mô bệnh học o 3. Fibroscan o 4. APRI

5. Kết quả xét nghiệm methyl hóa *gen SEPTIN9 (mSEPT9)*

Xét nghiệm

Kết quả

Giá trị CT S -TB	Giá trị CT T	Giá trị Delta- CT
---------------------	-----------------	----------------------

Định lượng *mSEPT9* huyết
tương

Giảng viên hướng dẫn

Nghiên cứu sinh

Trần Hải Yến

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Nhóm không có bệnh gan mạn tính

Số bệnh án nghiên cứu:

Ngày lấy mẫu:

Mã BN:

Mã huyết tương:

1. Hành chính

Họ và tên:

Năm sinh

Giới:

☐ 1. Nam

☐ 2. Nữ

Ngày khám bệnh:

Chẩn đoán:

2. Tiền sử

2.1. Nhiễm HBV

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.2. Nhiễm HCV

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.3. Lạm dụng rượu

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.4. Được chẩn đoán và điều trị xơ gan

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.5. Được chẩn đoán và điều trị ung thư

☐ 1. Có

☐ 2. Không

2.6. Khác:

2. Xét nghiệm máu:

Xét nghiệm			Kết quả
Sinh hóa máu	AST	(U/L)	
	ALT	(U/L)	
Vi sinh vật	HBsAg	1. Dương tính	Âm tính

		2. Âm tính	
	Anti - HCV	1. Dương tính	Âm tính
		2. Âm tính	

3. Siêu âm ổ bụng

3.1. Gan to

- o 1. Có o 2. Không

3.2. Lách to

- o 1. Có o 2. Không

3.3. U máu gan:

- o 1. Có o 2. Không

3.4. Hình ảnh xơ gan:

- o 1. Có o 2. Không

3.5. Cổ chướng:

- o 1. Không o 2. Ít, vừa o 3. Nhiều

3.6. Tổn thương khác của hệ thống gan mật:

4. Kết quả xét nghiệm methyl hóa gen *SEPTIN9* (*mSEPT9*)

Xét nghiệm

Kết quả

Giá trị	Giá trị	Giá trị Delta-
CT S -TB	CT T	CT

Định lượng *mSEPT9* huyết tương

Giảng viên hướng dẫn

Nghiên cứu sinh

Trần Hải Yến

PHỤ LỤC 3

QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT ACID NUCLEIC TỪ HUYẾT TƯƠNG

Thiết kế thí nghiệm	- Thực hiện tách DNA/RNA bằng bộ kit tách RNA từ huyết tương của hãng Qiagen từ mẫu huyết tương - Thể tích huyết tương tách: 2mL - Thể tích DNA thu sau khi tách: 70μL
Dụng cụ, phương tiện hoá chất	- Bộ kit TC_QCL-01, IC, ethanol 100%. - Pipet, đầu côn, eppendorf, falcol, máy li tâm, máy ủ nhiệt, máy vortex.
Quy trình thao tác (các bước tiến hành):	
1. Chuẩn bị - Set máy ủ ở 60°C, 56°C - Chuẩn bị ống eppendorf, ống falcol 15mL ghi tên mẫu - Chuẩn bị hỗn hợp Carrier RNA và ACL buffer: - Dùng pipet hút 1,8 ml ACL buffer vào ống falcol 15 mL rồi thêm 5,6 μL Carrier RNA, vortex trộn đều - Chuẩn bị máy hút chân không: - Lắp van lên máy hút rồi lắp vac connector và cột lên trên - Chuẩn bị extender ghi tên mẫu, lắp lên cột tương ứng 2. Tiến hành - Hút 200 μL QUIAGEN Proteinase K vào falcol 15ml đã chuẩn bị - Hút 2mL huyết tương vào falcol - Thêm vào falcol 1,6 mL hỗn hợp Carrier RNA và ACL buffer, 5 μL IC - Vortex 30 giây rồi ủ 60°C trong 30 phút - Thêm 3,6 mL ACB buffer vào falcol - Bật máy hút chân không, để máy chạy lên áp suất 800	

- Đổ từ từ dung dịch mẫu vào cột lọc - extender tương ứng, mở van để dịch chảy qua cột lọc. Khi dịch chảy hết, khóa van.
- Thêm 600 μL ACW1 buffer vào cột lọc. Mở van để dịch chảy hết rồi khóa van lại.
- Thêm 750 μL ACW2 buffer vào cột lọc. Mở van để dịch chảy hết rồi khóa van lại
- Thêm 750 μL ethanol 100% vào cột lọc. Mở van để dịch chảy hết rồi khóa van lại
- Đóng nắp cột lọc, để lên ống ban đầu rồi ly tâm khô 14000 rpm trong 3 phút
- Ủ cột ở 56°C trong 10 phút, mở nắp để làm khô màng lọc
- Đặt cột lọc lên ống eppendorf
- Thêm 70 μL Elution buffer lên trung tâm màng lọc, ủ 3 phút ở nhiệt độ phòng
- Ly tâm 14000rpm trong 1 phút để thu DNA và RNA
- Bỏ cột, bảo quản ống eppendorf chứa sản phẩm trong tủ -30°C

PHỤ LỤC 4
QUY TRÌNH TÁCH DNA TỪ MÔ ĐÚC NÉN

Tên quy trình	TÁCH DNA TỪ MẪU MÔ FFPE SỬ DỤNG BỘ KIT E.Z.N.A. FFPE DNA MINI KIT
Mã quy trình	TC_ODT-01
Nguyên vật liệu và trang thiết bị: Máy ly tâm, Máy vortex, Khối lăc ổn nhiệt, Pipet, đầu côn, tăm sạch, Epp 1,5 mL, Ethanol 100%, E.Z.N.A. FFPE DNA MINI KIT	
Chuẩn bị - Nếu sử dụng kit lần đầu: Bổ sung Ethanol 96-100% tới các dung dịch rửa theo hướng dẫn trên mỗi lọ. - Chuẩn bị khối lăc ổn nhiệt ở 90°C, 55°C, 70°C.	
Quy trình thực hiện 1. Thêm 200 µL Buffer FTL2 vào tube eppendorf 1,5 mL. 2. Lấy 10 lát cắt mô từ khối nén dày khoảng 5 - 10 µM (chú ý: không sử dụng 2 - 3 lát cắt đầu tiên) hoặc 10mg mẫu mô đã cắt. 3. Bỏ các lát cắt vào ống tube có chứa FTL2 Buffer 4. Vortex khoảng 20 giây để trộn đều. 5. Ủ ở 90°C trong 15 phút để làm tan parafin. 6. Để mẫu ở nhiệt độ phòng khoảng 5 phút để làm nguội trước khi thêm Proteinase K. 7. Thêm 20 µL proteinase K tới tube chứa mẫu và vortex để trộn đều. 8. Ủ 55°C trong 3 giờ (bước ủ có thể thực hiện qua đêm). 9. Ly tâm nhẹ để dịch không bị dính trên nắp và thành ống. 10. Thêm 220 µL BL Buffer tới tube chứa mẫu và vortex để trộn đều. 11. Thêm 250 µL ethanol 96-100% tới tube chứa mẫu và vortex trộn đều.	

12. Đặt cột lọc MicroElute LE DNA trên một ống thu 2 mL (cung cấp trong bộ Kit).
13. Chuyển toàn bộ mẫu lên cột (khoảng 650 μ L) (chú ý chỉ thu kết tủa của acid nucleic, những kết tủa dạng trắng đặc thường là của paraffin, sẽ dẫn đến tắc cột lọc). Ủ ở nhiệt độ phòng khoảng 2 phút.
14. Ly tâm phức hợp cột lọc - ống thu 14,000 rpm, 1 phút.
15. Loại bỏ dịch và ống thu, chuyển cột lọc lên ống thu mới. 16. Thêm 500 μ L HBC Buffer lên cột lọc.
17. Ly tâm phức hợp cột lọc - ống thu 14,000 rpm, 1 phút.
18. Loại bỏ dịch và ống thu, chuyển cột lọc lên ống thu mới.
19. Thêm 700 μ L DNA Wash Buffer lên cột lọc.
20. Ly tâm phức hợp cột lọc - ống thu 14,000 rpm, 1 phút, loại bỏ dịch nổi, giữ ống thu.
21. Lặp lại bước 19-20.

PHỤ LỤC 5
QUY TRÌNH BISULFIT - *SEPTIN9*

Tên quy trình	BISULFIT- <i>SEPTIN9</i> SỬ DỤNG BỘ KIT EZ DNA METHYLATION GOLD		
Mã quy trình	Bisulfit- <i>SEPTIN9</i>		
Bước 1: Chuẩn bị M-Wash Buffer bằng cách: thêm 24 ml Ethanol 100% vào 6 ml M-Wash Buffer trước khi sử dụng.			
Bước 2: Tiến hành xử lý DNA 1. Mix phản ứng Mỗi mẫu gồm 2 tube phản ứng 75 µL - Mix phản ứng theo bảng sau:			
Thể tích phản ứng		150 µL	
STT	Thành phần	Thể tích	
1	CT Conversion Reagent	130 µL	
2	DNA mẫu bệnh phẩm tách chiết	20 µL	
- Chia 75µL hỗn hợp mix sang tube phản ứng mới tương ứng của từng mẫu. - Spin nhanh tất cả các tube phản ứng.			
2. Ủ Đặt tất cả các tube phản ứng vào máy PCR theo chu trình nhiệt sau:			
Các bước	Nhiệt độ	Thời gian	Đơn vị
Biến tính	98	10	phút
Ủ	64	150	phút
Lưu mẫu trên máy	4	∞	
3. Chuẩn bị cột và ống thu, điền tên mẫu lên cột và ống thu Lưu ý: Tên mẫu trên ống thu Eppendorf 1.5 ml cần điền: MÃ BỆNH PHẨM_B+			

- 4.** Thêm 600 μL M-Binding Buffer vào cột. Load mẫu (từ Bước 2) lấy từ máy PCR vào cột chứa M-Binding buffer. Đóng nắp và mix bằng cách invert cột nhiều lần.
 - 5.** Ly tâm ở 13000 rpm trong 30 giây. Loại bỏ dịch chảy qua.
 - 6.** Thêm 100 μL M-Wash Buffer vào cột. Ly tâm ở 13000 rpm trong 30 giây.
 - 7.** Thêm 200 μL M-Desulphonation Buffer vào cột và để ở nhiệt độ phòng (20-30°C) trong 15 phút. Sau khi ủ, Ly tâm ở 13000 rpm trong 30 giây. Loại bỏ dịch chảy qua.
 - 8.** Thêm 200 μL M-Wash Buffer vào cột. Ly tâm ở 13000 rpm trong 30 giây. Thêm tiếp 200 μL M-Wash Buffer vào cột và ly tâm ở 13000 rpm trong 30 giây.
 - 9.** Đặt cột vào eppendorf 1,5 mL. Thêm 10 μL M-Elution Buffer vào giữa màng (cẩn thận để không làm rách màng). Để ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm ở 13000 rpm trong 30 giây.
 - 10.** Thêm tiếp 18 μL M-Elution Buffer vào giữa màng. Ly tâm ở 13000 rpm trong 30 giây.
- Mẫu sau khi xử lý phải được bảo quản trong tủ -80°C.

PHỤ LỤC 6
MỘT SỐ TRANG THIẾT BỊ SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU



Bộ kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit



**Bộ QIAvac 24 Plus, QIAvac conneting System and
Vacuum Pump**



Bộ kit E.Z.N.A. Tissue DNA (Omega Bio-tek, Mỹ)

** Nguồn: Chụp tại phòng Công nghệ gen và di truyền tế bào, Viện nghiên cứu sinh y học Quân sự, Học viện Quân y*



Máy PCR 9800 fast thermal cycler, Applied Biosystems ABI

** Nguồn: chụp tại phòng Công nghệ gen và Di truyền tế bào, Viện nghiên cứu sinh y dược học Quân sự, Học viện Quân y*



Máy PCR Rotor-Gene Q, Qiagen

** Nguồn: chụp tại phòng Công nghệ gen và Di truyền tế bào,
Viện nghiên cứu sinh y dược học Quân sự, Học viện Quân y*



Tủ thao tác An toàn sinh học cấp II (Nuair, Mỹ)

** Nguồn: chụp tại phòng Công nghệ gen và Di truyền tế bào,
Viện nghiên cứu sinh y dược học Quân sự, Học viện Quân y*

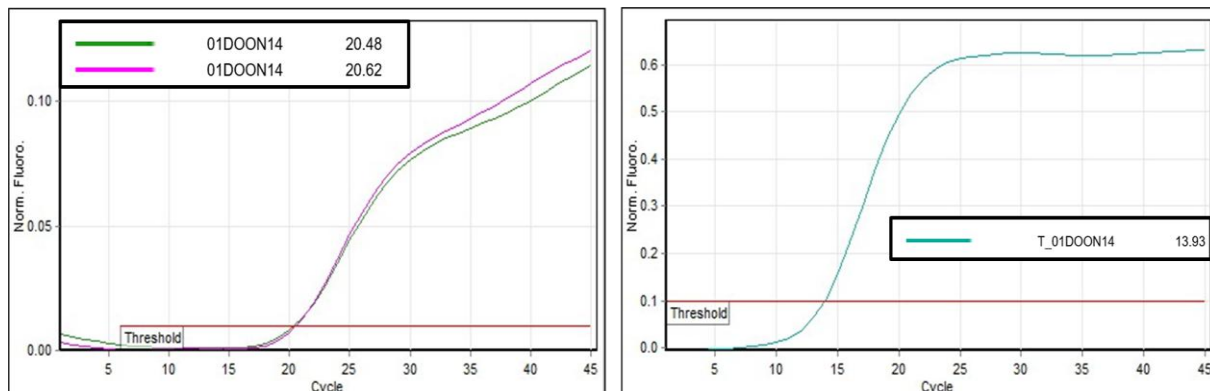


Máy ly tâm và máy lắc ủ nhiệt (Eppendorf, CHLB Đức)

** Nguồn: chụp tại phòng Công nghệ gen và Di truyền tế bào,
Viện nghiên cứu sinh y dược học Quân sự, Học viện Quân y*

PHỤ LỤC 7

MỘT SỐ HÌNH ẢNH MINH HỌA KẾT QUẢ PHÂN TÍCH *mSEPT9* Ở MẪU NGHIÊN CỨU



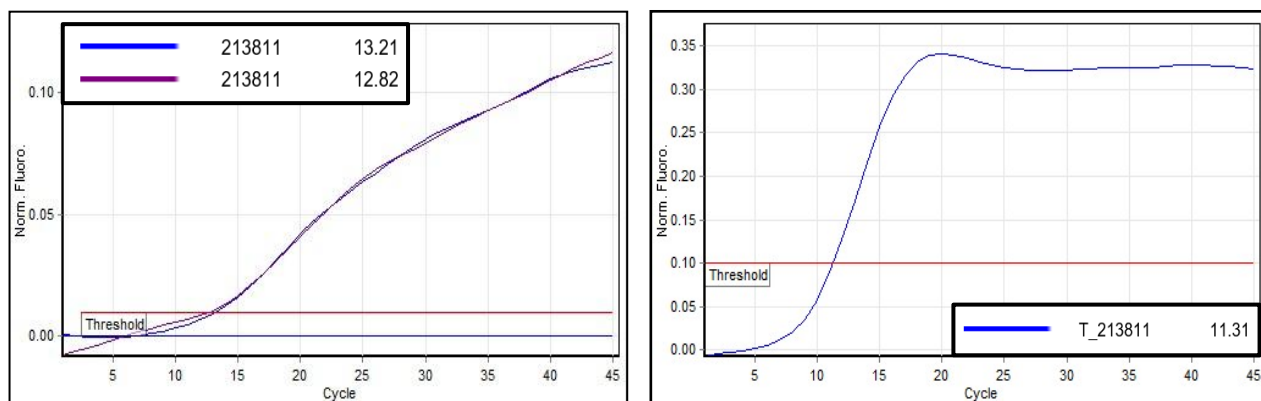
(a)

**Biểu đồ đường biểu diễn khuếch đại của xét nghiệm Realtime PCR
phát hiện *mSEPT9* trong huyết tương**

Hình (a): Biểu diễn khuếch đại phản ứng *mSEPT9* 2 lần lặp lại

Hình (b): Biểu diễn khuếch đại tổng lượng gen *SEPTIN9*

(BN Lê Văn Ch., 50t, SNC: HCC.54)



(a)

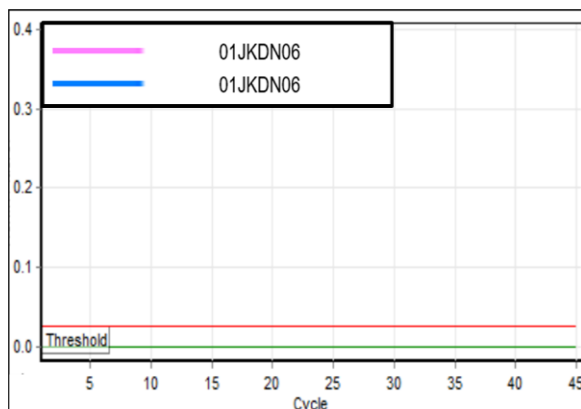
(b)

**Biểu đồ đường biểu diễn khuếch đại của xét nghiệm Realtime PCR
phát hiện *mSEPT9* trong mẫu mô ung thư**

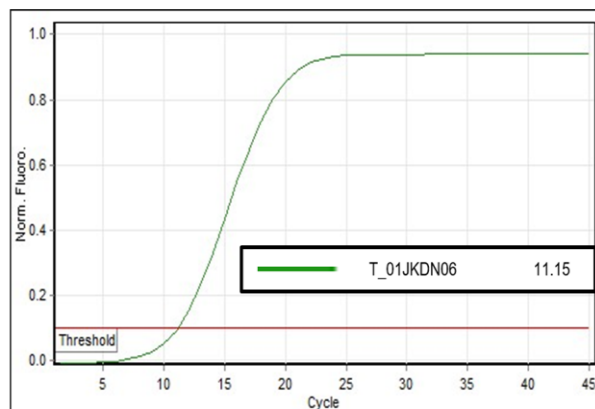
Hình (a): Biểu diễn khuếch đại phản ứng *mSEPT9* 2 lần lặp lại

Hình (b): Biểu diễn khuếch đại tổng lượng gen *SEPTIN9*

(BN Lê Văn Ch., 50t, SNC: HCC.54)



(a)



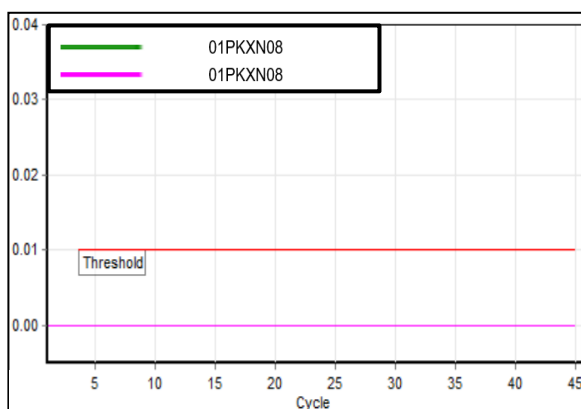
(b)

**Biểu đồ đường biểu diễn khuếch đại của xét nghiệm Realtime PCR
không phát hiện mSEPT9 trong huyết tương**

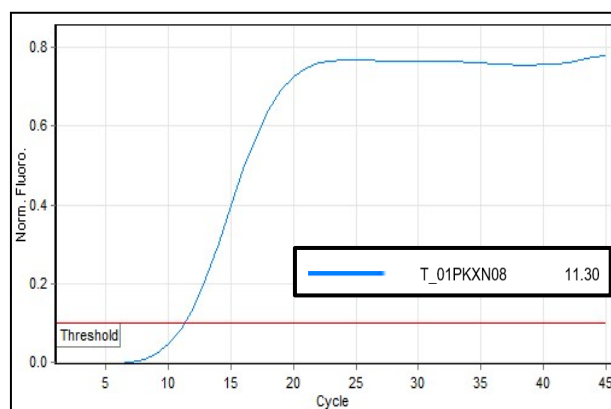
Hình (a): Biểu diễn khuếch đại phản ứng mSEPT9 2 lần lặp lại

Hình (b): Biểu diễn khuếch đại tổng lượng gen SEPTIN9

(Ca chứng BGMT: Nguyễn Thị P., 64t, SNC: BGMT27)



(a)



(b)

**Biểu đồ đường biểu diễn khuếch đại của xét nghiệm Realtime PCR
không phát hiện mSEPT9 trong huyết tương**

Hình (a): Biểu diễn khuếch đại phản ứng mSEPT9 2 lần lặp lại

Hình (b): Biểu diễn khuếch đại tổng lượng gen SEPTIN9

(Ca chứng NKM: Nguyễn Hữu B., 29t, SNC: NKM41)