

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

BỘ Y TẾ



LÊ HỒNG CÔNG

**SỰ PHÂN BỐ KIỂU GEN CYP1A1, CYP2D6
Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI**

Chuyên ngành: Hóa sinh

Mã số: 62720112

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2017

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. TẠ THÀNH VĂN

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường
học tại Trường Đại học Y Hà Nội

Vào giờ, ngày tháng năm 2017

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc Gia Việt Nam

Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

**CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ
CÓ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN**

1. Lê Hồng Công, Trần Văn Khánh, Lê Hoàng Bích Nga, Nguyễn Trọng Tuệ, Nguyễn Đức Hình, Tạ Thành Văn, Trần Huy Thịnh (2015). Tính đa hình T6235C của gen CYP1A1 và nguy cơ với ung thư phổi. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 94(2), 1-8.
2. Lê Hồng Công, Trần Huy Thịnh, Phạm Lê Anh Tuấn, Trần Văn Khánh, Phạm Ngọc Minh, Ngô Thanh Tùng, Tạ Thành Văn (2016). Tính đa hình G4268C của gen CYP2D6 trên bệnh nhân ung thư phổi. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 100(2), 42-49.

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Ung thư phổi (UTP) là loại ung thư thường gặp nhất và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu do ung thư ở nhiều nước trên thế giới, cũng như ở Việt Nam. Hút thuốc là yếu tố nguy cơ cũng như là nguyên nhân rõ ràng nhất liên quan đến UTP. Trong các CYPs thì CYP1A1 và CYP2D6 là chìa khóa hoạt hóa các chất gây ung thư sinh ra từ khói thuốc như nicotine và các hydrocacbon có nhân thơm. Ở Việt Nam các nghiên cứu về CYP1A1, CYP2D6 ở bệnh nhân UTP là chưa hề có, đặc biệt liên quan đến các yếu tố nguy cơ gây UTP. Chính vì vậy để góp phần hiểu rõ hơn về mối liên quan giữa các dạng đa hình thái đơn các gen CYP1A1, CYP2D6 và một số yếu tố nguy cơ ở bệnh nhân UTP mà chúng tôi thực hiện đề tài này.

2. Mục tiêu của đề tài:

1. Xác định tỷ lệ và sự phân bố kiểu gen của một số đa hình thái đơn trên các gen CYP1A1, CYP2D6 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng.
2. Đánh giá mối tương quan giữa các dạng đa hình thái đơn các gen CYP1A1, CYP2D6 với một số yếu tố nguy cơ ở bệnh ung thư phổi.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

Từ kết quả nghiên cứu luận án cho thấy: (1). Làm sáng tỏ vai trò của các gen CYP1A1, CYP2D6 đối với nguy cơ hình thành và phát triển ung thư phổi, là cơ sở cho việc phòng bệnh chủ động. (2). Phản ánh một cách khách quan và trung thực tính nhạy cảm của gen CYP1A1, CYP2D6 liên quan của các yếu tố nguy cơ đến sự hình thành và phát triển ung thư phổi.

Thuốc lá ngày nay đang là vấn đề y tế công cộng nghiêm trọng và đây cũng là nguyên nhân gây tử vong cần được ngăn chặn hàng đầu. Trong các CYPs thì CYP1A1 và CYP2D6 có vai trò là chìa khóa hoạt hóa các chất gây ung thư từ khói thuốc. Tuy vậy, các đề tài gen CYP1A1, CYP2D6 ở bệnh nhân ung thư phổi là không có, đặc biệt liên quan đến

thuốc lá. Chính vì vậy chúng tôi sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại gồm: PCR, PCR-RFLP, giải trình tự gen để tìm sự phân bố kiểu gen các đa hình CYP1A1, CYP2D6

4. Cấu trúc luận án:

Luận án được trình bày trong 121 trang chính (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án được chia làm 7 phần:

- + Đặt vấn đề: 2 trang
- + Chương 1: tổng quan tài liệu 37 trang
- + Chương 2: đối tượng và phương pháp nghiên cứu 13 trang
- + Chương 3: kết quả nghiên cứu 42 trang
- + Chương 4: bàn luận 24 trang
- + Kết luận: 2 trang
- + Kiến nghị: 1 trang

Luận án gồm: 3 biểu đồ, 42 bảng và 22 hình, sử dụng 92 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt và tiếng Anh.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN

1.1. Định nghĩa ung thư phổi

Ung thư phổi là bệnh ác tính phát triển từ biểu mô phế quản, tiểu phế quản, phế nang hoặc từ các tuyến của phế quản.

1.2. Dịch tễ học ung thư phổi

Tình hình UTP trên thế giới: Theo WHO UTP đứng hàng đầu ở nam (17,6%), đứng hàng thứ năm ở nữ (5,8%) trong tổng số các ung thư.

Tình hình ung thư phổi tại Việt Nam: Theo báo cáo mới nhất của WHO, năm 2016, ở Việt Nam, UTP đứng hàng thứ 2 chỉ đứng sau ung thư gan ở nam. Ở nữ UTP có tỷ mắc đứng thứ 2 sau ung thư vú.

1.3. Các yếu tố nguy cơ liên quan đến ung thư phổi

Thuốc lá: Hút thuốc lá được coi là yếu tố nguy cơ chính gây UTP

Các yếu tố khác như: Ô nhiễm không khí, bức xạ ion hóa, các bệnh ở phế quản phổi, tuổi và giới, Chế độ ăn uống.

1.4. Chẩn đoán ung thư phổi

Chẩn đoán xác định.

Kết quả mô bệnh học, tế bào học từ các bệnh phẩm lấy qua soi phế quản, sinh thiết, chọc hút qua thành ngực, dịch màng phổi, hạch thượng đòn... có tế bào, tổ chức ung thư. Đây là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán xác định UTP.

1.5. Phân loại ung thư phổi

Phân loại TNM của Mountian CF dựa trên ba tiêu chí: T: Khối u, N: Xâm lấn hạch, M: Di căn xa

Giai đoạn I: gồm các BN không có bằng chứng xâm lấn hoặc di căn xa.

Giai đoạn II: gồm các BN có bằng chứng xâm lấn hạch nằm trong phổi

Giai đoạn III: gồm các BN UTP đã tiến triển trong lồng ngực. Có bằng chứng xâm lấn hạch nằm trong phổi

Giai đoạn IV: gồm các bệnh nhân UTP đã di căn xa.

1.6. Phân loại ung thư phổi theo tế bào mô bệnh học.

Theo mô học, UTP được chia làm hai loại chính đó là: UTP tế bào nhỏ (SCLC: small cell lung carcinoma) và UTP không tế bào nhỏ (NSCLC: non-small cell lung carcinoma).

1.7. Chiến lược mới trong điều trị ung thư phổi

Điều trị bằng thuốc ức chế Tyrosinkinase trong ung thư phổi.

Điều trị ung thư phổi bằng thuốc chống sinh mạch.

Liệu pháp điều trị gen

Điều trị miễn dịch trong ung thư phổi.

1.8. Dấu ấn sinh học phân tử các gen CYP1A1, CYP2D6 trong chu trình chuyển hóa Cytochrome P450 và ung thư phổi

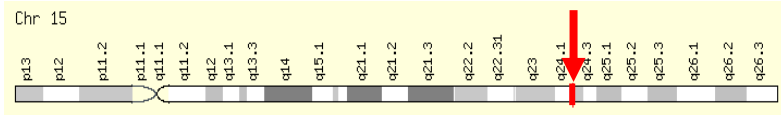
Cơ chế phân tử

Trong các CYPs thì CYP1A1 và CYP2D6 là những enzyme chính hoạt hóa các chất gây ung thư sinh ra từ khói thuốc như nicotine và các hydrocarbon có nhân thơm.

1.8.1. Tổng quan về gen *CYP1A1*

Vị trí và cấu trúc

Gen *CYP1A1* (Cytochrome P450, họ 1, phân họ A, polypeptid 1) nằm trên NST số 15, nhánh dài, ở vị trí 24.1 (Hình 1.1).



Hình 1.1. Vị trí của gen *CYP1A1* trên NST 15

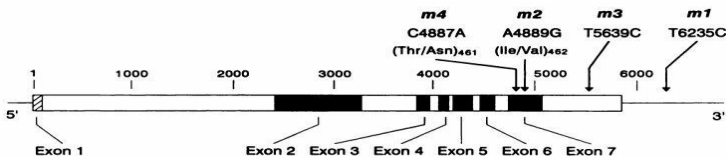
(Nguồn: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Chức năng

CYPs chuyển hóa hàng nghìn các chất nội sinh và ngoại sinh. Enzym Cytochrome P450 có mặt trong hầu hết các mô của cơ thể, đóng vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp và phân hủy hormon (estrogen, testosterone), tổng hợp cholesterol, chuyển hóa vitamin D. Enzym còn có chức năng chuyển hóa các hợp chất độc hại, bao gồm thuốc và các sản phẩm chuyển hóa nội sinh như bilirubin, chủ yếu có mặt ở gan.

Tính đa hình thái của gen *CYP1A1*

Hiện nay, các nhà nghiên cứu đã xác định được các đa hình thái đơn nucleotid trên gen *CYP1A1*. Một trong số này làm tăng cường hoạt động của protein được mã hóa và đang được nghiên cứu ảnh hưởng đến nguy cơ gây ung thư.



Hình 1.2. Tính đa hình thái của gen *CYP1A1*

Đa hình m1: thay thế T thành C ở nucleotid 6235 ở đầu 3' vùng không mã hóa.

Đa hình m2: thay thế A thành G ở nucleotid 4889 dẫn tới sự thay đổi acid amin Isoleucine thành acid amin Valine ở codon 462.

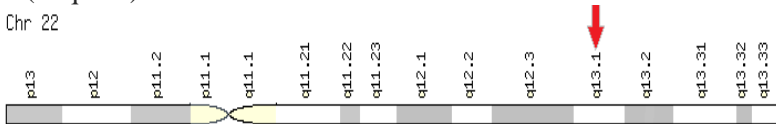
Đa hình m3: thay thế T thành C ở nucleotid 5639 ở đầu 3' vùng không mã hóa.

Đa hình m4: thay thế C thành A ở nucleotid 4887 dẫn đến sự thay đổi acid amin Threonine thành acid amin Asparagine ở codon 461.

1.8.2. Tổng quan về CYP2D6

Vị trí

Gen CYP2D6 nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể số 22, vị trí 13.1 (22q13.1).



Hình 1.3. Vị trí của gen CYP2D6 trên nhiễm sắc thể 22

(Nguồn: www.genecards.org)

Cấu trúc

Gen CYP2D6 có kích thước 4378bp. Cấu trúc gen gồm có 9 đoạn exon là vùng gen mã hoá chứa đựng thông tin di truyền và 10 đoạn intron là vùng không mã hoá xen kẽ giữa những exon. Exon 1 có chứa 1 đoạn không mã hóa (từ 1747 đến 1835).

Chức năng của enzym CYP2D6

Gen CYP2D6 mã hóa cho chuỗi polypeptide số 6, cytochrome P450 họ 2, họ phụ A. Tên của protein là CYP2D6.

Cytochrome P450D6 là một protein gồm 497 acid amin, là enzym monooxygenases xúc tác cho nhiều phản ứng trong chuyển hoá thuốc và tổng hợp cholesterol, steroids và các lipid khác.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Bệnh nhân ung thư phổi

Đối tượng nghiên cứu gồm 220 bệnh nhân UTP được khám và điều trị tại Trung tâm Hô hấp, Trung tâm Y học hạt nhân và ung bướu BV Bạch Mai từ tháng 11/2013 đến tháng 11/2015.

2.1.2. Nhóm đối chứng

200 người nhóm đối chứng, tương ứng về tuổi và giới với nhóm nghiên cứu từ những người đến khám định kỳ trong chương trình quản lý THA và ĐTĐ từ tháng 3/2014 đến tháng 11/2015.

2.1.3. Chọn cỡ mẫu nghiên cứu

Chúng tôi áp dụng công thức:

$$\overline{X} = Z (1-\alpha) \text{£} / \sqrt{n}$$

$$n = (Z (1-\alpha) \text{£} / X)^2$$

Với \overline{X} là giá trị TB

Z (1 - α) độ tin cậy 95%

£ là độ lệch chuẩn

Dựa vào một nghiên cứu trước đây của tác giả Sugimura Haruhiko của Nhật Bản, $\overline{X} = 62,1 \pm 11,2$ chúng tôi tính ra n = 220.

2.2. Phương pháp nghiên cứu.

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp mô tả cắt ngang có đối chứng.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thăm khám lâm sàng, các chẩn đoán cận lâm sàng rồi đến chẩn đoán xác định ung thư phổi.

- Các kỹ thuật sinh học phân tử gồm; tách chiết DNA, PCR, sử dụng enzym giới hạn xác định đột biến, giải trình tự gen.

- Các kết quả nghiên cứu được sử lý toán thống kê nhằm tìm hiểu sự khác biệt giữa các nhóm đối tượng nghiên cứu so với nhóm đối chứng.

2.2.3. Quy trình lấy mẫu

Bệnh nhân bị ung thư phổi, nhóm đối chứng đều được lấy 2ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA với hàm lượng 1,5mg/ml.

2.3. Quy trình tách chiết DNA từ máu ngoại vi

2.4. Kỹ thuật PCR để khuếch đại DNA

2.5. Xác định các SNPs bằng kỹ thuật PCR-RFLP .

Đoạn gen chứa các SNPs trên các gen quan tâm được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Danh sách mồi, enzym giới hạn được sử dụng trong NC

STT	Đa hình thái	Trình tự mồi (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)	Enzym cắt
1	T6235C gen CYP1A1 (m1)	F: TAG GAGTCTTGTCTCATGCCT R: CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT	340	<i>MspI</i>
2	A4889G gen CYP1A1 (m2)	F: CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC R: TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC	204	<i>MspI</i>
3	T5639C gen CYP1A1 (m3)	F: TGAGCAATCTGACCCTA R: ATCTTCCTAACAACACATGTTTGT	301	<i>HincII</i>
4	C4887A gen CYP1A1 (m4)	F: CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC R: TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC	204	<i>HincII</i>
5	C188T gen CYP2D6	F: CTGGGTAAGGGCCTGGAG R: ACCTGGTTCGAAGCATATGG	442	<i>HphI</i>
6	G1934A gen CYP2D6	F: ATGAGAGCTGCCAACCTT R: ATGTGAACCAGCTCCCTGTC	334	<i>BstNI</i>
7	G1846T gen CYP2D6	F: GTGGATGGTGGGGCTAATGCCTT R: CAGAGACTCCTCGGTCTCTCGCT	486	<i>MspI</i>
8	G4268C gen CYP2D6	F: AGCTCTTCCTTCTTTCACCTCCCTG R: GCCTCAACGTACCCCTGTCTC	332	<i>HhaI</i>

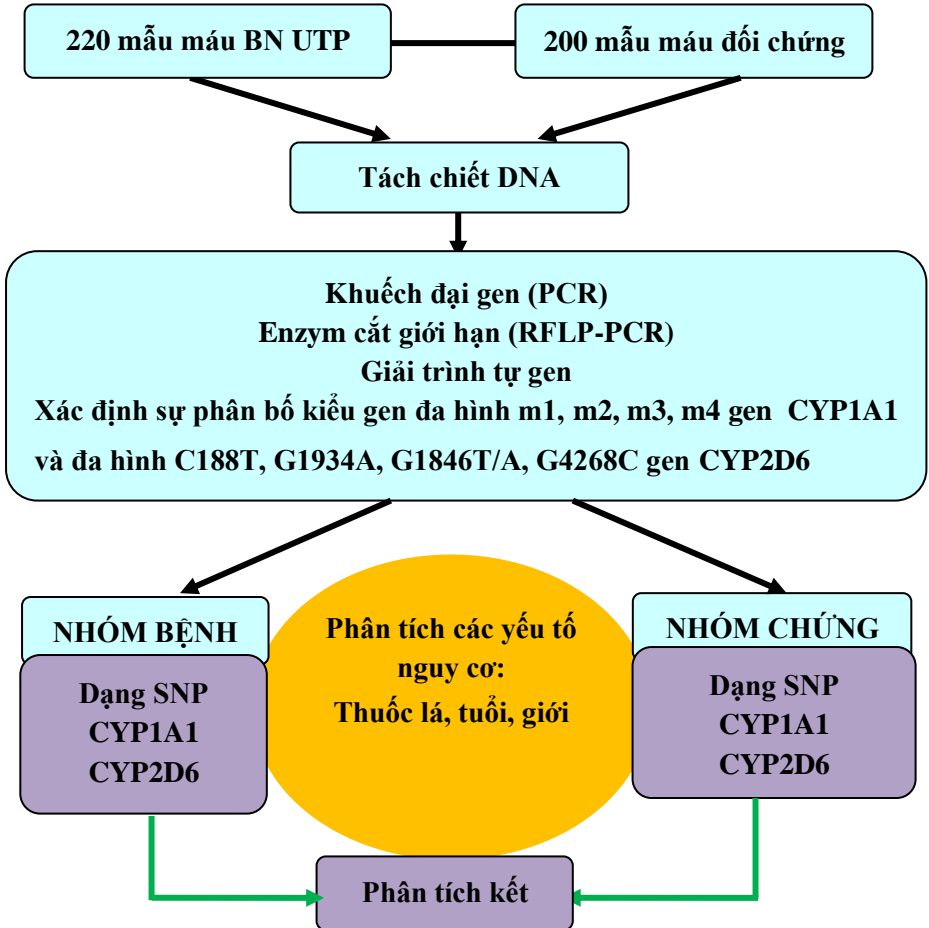
2.6. Kỹ thuật giải trình tự gen

2.7. Đề tài luận thũ chặt chẽ đạo đức nghiên cứu trong Y học.

2.8. Xử lý số liệu và sơ đồ nghiên cứu.

Xử lý số liệu theo phần mềm chương trình SPSS 20.0, STATA.

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện theo sơ đồ dưới đây.



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

3.1.1. Đặc điểm về giới nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng.

Bảng 3.1: Phân bố giới ở hai nhóm UTP và nhóm đối chứng

	Nhóm ung thư phổi	Nhóm đối chứng
Nữ	57 (25,9%)	75 (37,5%)
Nam	163 (74,1%)	125 (62,5%)
Tổng	220 (100%)	200 (100%)

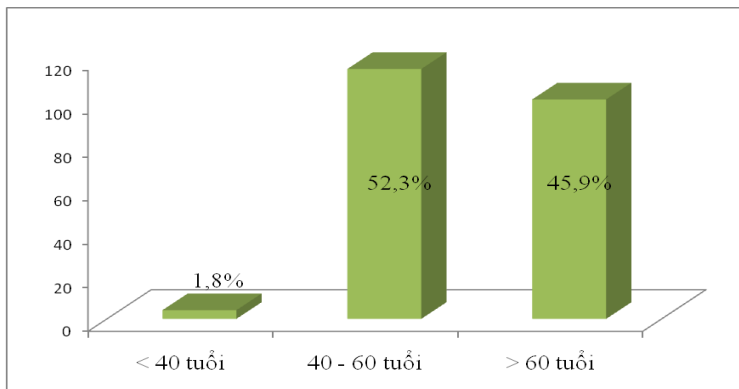
Nhận xét: Nhóm bệnh nhân UTP có tỷ lệ nam/nữ là 2,8/1

3.1.2. Đặc điểm về tuổi nhóm bệnh nhân ung thư phổi

Bảng 3.2: Tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân UTP và đối chứng

	Nhóm ung thư phổi	Nhóm đối chứng
Trung bình (năm) \bar{x}	60,0	66,0
Độ lệch (SD)	9,1	9,4

Nhận xét: Độ tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân UTP là $60,0 \pm 9,1$



Biểu đồ 3.1: Phân bố theo nhóm tuổi ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi.

Nhận xét: BN UTP thuộc nhóm tuổi từ 40 đến 60 chiếm cao nhất là 115 (52,3%),

3.2. Một số đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng.

Bảng 3.3: Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

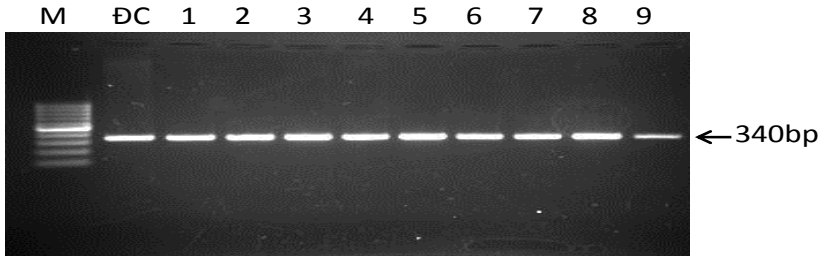
Các đặc điểm	Ung thư phổi n (%)	Nhóm chứng n (%)	P
Giới			
Nam	163 (74,1%)	125 (62,5%)	> 0,05
Nữ	57 (25,9%)	75 (37,5%)	
Tuổi			
Trung bình (M)	60	66	> 0,05
Độ lệch (SD)	9,1	9,4	
Hút thuốc lá			
Không	73 (33%)	128 (64%)	
Có	147 (67%)	72 (36%)	
< 20 bao/năm	48 (32,7%)	50 (69,4%)	
≥ 20 bao/năm	99 (67,3%)	22 (30,6%)	
Giải phẫu bệnh			
K biểu mô tuyến	127 (57,7%)		
K tế bào vảy	81 (36,8%)		
K tế bào nhỏ	12 (5,5%)		

Nhận xét: Bảng 3.3 cho thấy tỷ lệ nam cao hơn nữ ở cả 2 nhóm nghiên cứu và độ tuổi trung bình là 60 ở nhóm UTP không có sự khác biệt với nhóm đối chứng. Nhóm UTP tỷ lệ BN có hút thuốc cao hơn gấp hai lần nhóm BN không hút thuốc và hút ≥ 20 bao/năm cao hơn gấp hai lần so với số BN hút thuốc < 20 bao/năm. UTP biểu mô tuyến chiếm tỉ lệ cao nhất 127 (57,7%) rồi đến UTP tế bào vảy chiếm 81(36,8%) và cuối cùng UTP tế bào nhỏ chiếm 12 (5,5%).

3.3. Xác định sự phân bố kiểu gen các đa hình gen CYP1A1 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng

3.3.1. Xác định sự phân bố kiểu gen của đa hình T6235C trên gen CYP1A1 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng

Kết quả khuếch đại vùng T6235C của gen CYP1A1

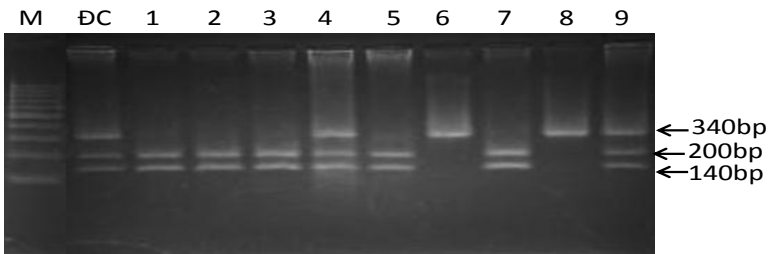


Hình 3.1. Sản phẩm khuếch đại đoạn vùng T6235C gen CYP1A1.

1-5: Mẫu bệnh nhân ung thư phổi; 6-9: nhóm đối chứng; M: thang chuẩn 100 bp; ĐC: Mẫu đối chứng dương.

Nhận xét: Sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, gồm một băng đặc hiệu có kích thước đúng như tính toán là 340 bp.

Kết quả xác định đa hình T6235C của gen CYP1A1 bằng PCR – RFLP

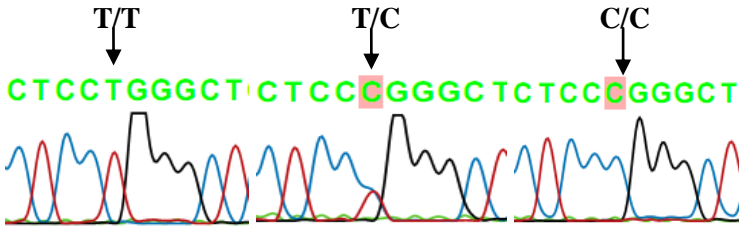


Hình 3.2. Sản phẩm enzym cắt vùng T6235C của gen CYP1A1 bằng enzym MspI. 1-5 Mẫu bệnh nhân ung thư phổi; 6-9 nhóm đối chứng; M: thang chuẩn 100 bp; ĐC: Mẫu đối chứng dương.

Nhận xét: Mẫu mang kiểu gen TT gồm một băng DNA có kích thước 340 bp (giếng 6, 8). Mẫu mang kiểu gen TC gồm 3 băng DNA có kích thước 340 bp, 200 bp, 140 bp (giếng 4, 9). Mẫu mang kiểu gen CC gồm 2 băng DNA có kích thước 200 bp và 140 bp (giếng 1, 2, 3, 5, 7).

Kết quả giải trình tự kiểm tra độ đặc hiệu của sản phẩm PCR

Sản phẩm enzym cắt giới hạn được kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự gen.



Hình 3.3. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR mang đoạn gen T6235C của gen CYP1A1 tương ứng với kiểu gen T/T; T/C; C/C.

Nhận xét: Kết quả giải trình tự DNA của bệnh nhân cho thấy hoàn toàn phù hợp với sản phẩm enzym giới hạn.

3.3.2. Phân bố kiểu gen của đa hình T6235C (m1) trên gen CYP1A1 ở nhóm bệnh nhân UTP so với nhóm đối chứng.

Bảng 3.4: Kiểu gen T6235C trên gen CYP1A1 ở nhóm UTP và ĐC

Nhóm \ Kiểu gen	CYP1A1 T6235C (m1)			n	p
	TT	TC	CC		
Đối chứng	70 (35%)	95 (47,5%)	35 (17,5%)	200 (100%)	-----
K phổi	50 (22,7%)	121 (55,0%)	49 (22,3%)	220 (100%)	< 0,02
Biểu mô tuyến	33 (26%)	69 (54,3%)	25 (19,7%)	127 (100%)	< 0,23
K tế bào vảy	15 (18,5%)	47 (58%)	19 (23,5%)	81 (100%)	< 0,02
K tế bào nhỏ	2 (16,8%)	5 (41,6%)	5 (41,6%)	12 (100%)	< 0,09

Nhận xét: Bảng 3.4 cho thấy sự phân bố kiểu gen TT, TC và CC ở nhóm bệnh nhân UTP là khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng với $p < 0,02$. Nhóm UTP tế bào vảy có sự phân bố kiểu gen khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm ĐC với $p < 0,02$.

Bảng 3.5: Phân bố kiểu gen TC - CC với TT trên gen CYP1A1 ở nhóm UTP và ĐC

Kiểu gen Nhóm	CYP1A1 T6235C (mI)		n	OR CI	p
	TT	TC-CC			
Đối chứng	70	130	200	----	----
K phổi	50	170	220	1,83 (1,17 - 2,88)	< 0,005
Biểu mô tuyến	33	94	127	1,53 (0,91 - 2,60)	< 0,09
K tế bào vảy	15	66	81	2,37 (1,22 - 4,79)	< 0,006
K tế bào nhỏ	2	10	12	2,69 (0,55 - 25,8)	< 0,19

Nhận xét: Kết quả phân bố riêng kiểu gen TC và CC ở nhóm bệnh nhân UTP có tỷ suất chênh OR = 1,83 (95% CI = 1,17 - 2,88) so với kiểu gen TT ở nhóm đối chứng kê với $p < 0,005$. Nhóm UTP tế bào vảy có sự khác biệt với nhóm đối chứng với OR = 1,53 (95% CI = 1,22 - 4,79) $p < 0,006$.

Bảng 3.6: Phân bố kiểu gen TC - CC, TT với nguy cơ hút thuốc ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm đối chứng

Nhóm Hút thuốc	Nhóm UTP		n	Nhóm đối chứng		n	OR CI
	TT	TC-CC		TT	TC-CC		
Không hút	18	55	73	45	83	128	1,66 (0,83 - 3,36)
Có hút	32	115	147	25	47	72	1,91 (0,97 - 3,72)
< 20 bao/năm	13	35	48	18	32	50	1,51 (0,59 - 3,93)
≥ 20 bao/năm	19	80	99	7	15	22	1,96 (0,59 - 6,01)
Tổng	50	170	220	70	130	200	1,83 (1,16 - 2,88)

Nhận xét: Kết quả sự phân bố kiểu gen TC – CC, TT ở nhóm bệnh nhân UTP và nguy cơ hút thuốc không cho thấy sự khác biệt

Bảng 3.7: Phân bố kiểu gen TC - CC, TT với nguy cơ hút thuốc lá ở nhóm BN ung thư phổi biểu mô tuyến so với nhóm đối chứng

Nhóm <i>biểu mô tuyến</i>	Biểu mô tuyến		n	Nhóm đối chứng		n	OR CI
	TT	TC-CC		TT	TC-CC		
Không hút	14	36	50	45	83	128	1,39 (0,65 - 3,09)
Có hút	19	58	77	25	47	72	1,62 (0,75 - 3,52)
< 20 bao/năm	6	12	18	18	32	50	1,12 (0,32 - 4,30)
≥ 20 bao/năm	13	46	59	7	15	22	1,65 (0,46 - 5,48)

Nhận xét: Kết quả phân bố kiểu gen TC và CC ở nhóm bệnh nhân UTP biểu mô tuyến với nguy cơ hút thuốc không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.8: Phân bố kiểu gen TC - CC, TT với nguy cơ hút thuốc lá ở nhóm BN UTP tế bào vảy so với nhóm đối chứng

Nhóm <i>Tế bào vảy</i>	Tế bào vảy		n	Nhóm đối chứng		n	OR CI
	TT	TC-CC		TT	TC-CC		
Không hút	4	18	22	45	83	128	2,44 (0,74 - 10,4)
Có hút	11	48	59	25	47	72	3,32 (0,96 - 5,81)
< 20 bao/năm	6	19	25	18	32	50	1,78 (0,55 - 6,42)
20 bao/năm	5	29	34	7	15	22	2,71 (0,61 - 12,0)

Nhận xét: Kết quả phân bố kiểu gen TC và CC ở nhóm bệnh nhân UTP tế bào vảy với nguy cơ hút thuốc không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.9: Phân bố kiểu gen TC - CC với kiểu gen TT theo giới ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng

<i>Giới</i>	<i>Nhóm UTP</i>		<i>n</i>	<i>Nhóm ĐC</i>		<i>n</i>	OR CI
	<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		
<i>Nữ</i>	14	43	57	25	50	75	1,53 (0,66 - 3,61)
<i>Nam</i>	36	127	163	45	80	125	1,98 (1,14 - 3,45)
Tổng số	50	170	220	70	130	200	1,83 (1,16 - 2,88)

Nhận xét: Sự phân bố kiểu gen (TC - CC) của nhóm bệnh nhân UTP theo giới nữ không thấy sự khác biệt. Ở nam có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Bảng 3.10: Phân bố kiểu gen TC và CC với kiểu gen TT theo nhóm tuổi ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm đối chứng

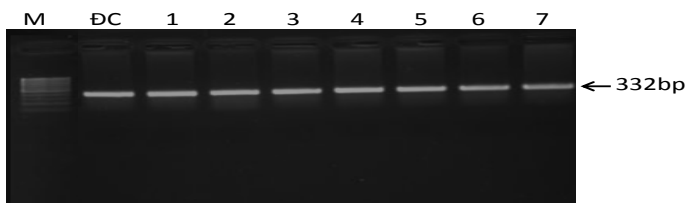
<i>Tuổi</i>	<i>Nhóm UTP</i>		<i>n</i>	<i>Nhóm ĐC</i>		<i>n</i>	OR 95% CI
	<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		
<i>< 40 tuổi</i>	3	1	4	0	1	1	----
<i>40 - 60</i>	22	93	115	13	29	42	1,89 (1,07 - 4,51)
<i>> 60 tuổi</i>	25	76	101	56	101	157	1,68 (0,93 - 3,08)
Tổng số	50	170	220	69	131	200	1,83 (1,16 - 2,88)

Nhận xét: Sự phân bố kiểu gen (TC-CC) nhóm UTP tuổi 40 đến 60 có nguy cơ bị UTP cao nhất với OR = 1,89 (95% CI = 1,07 - 4,51) với $p < 0,05$.

3.4. Xác định sự phân bố kiểu gen các đa hình gen CYP2D6 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng

3.4.1. Xác định sự phân bố kiểu gen của đa hình G4268C trên gen CYP2D6 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng

Kết quả khuếch đại vùng G4268C của gen CYP2D6

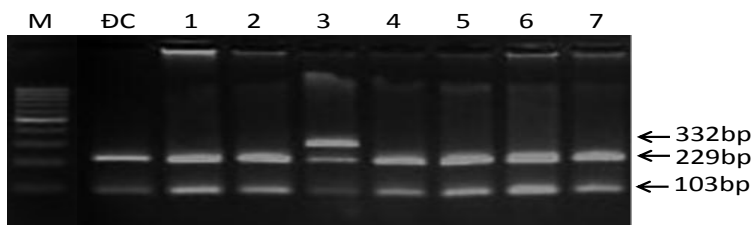


Hình 3.4. Sản phẩm khuếch đại đoạn vùng G4268C của gen CYP2D6.

1-4 mẫu UTP; 5-7 mẫu ĐC; M: thang chuẩn 100 bp; ĐC: Mẫu đối chứng dương.

Nhận xét: KQ khuếch đại đoạn vùng G4268C của gen CYP2D6 được sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, một băng 332 bp.

Kết quả xét đa hình G4268C của gen CYP2D6 bằng PCR – RFLP



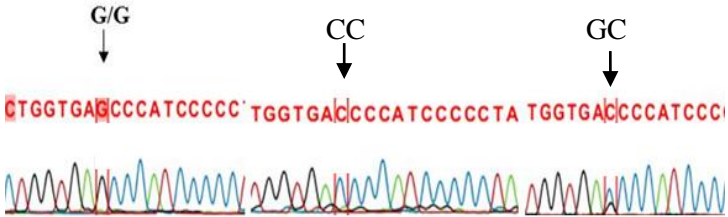
Hình 3.5. Sản phẩm enzym cắt vùng G4268C của gen CYP2D6 bằng enzym Eco91I. 1-4 Mẫu bệnh nhân ung thư phổi; 5-7 nhóm đối chứng;

M: thang chuẩn 100 bp; ĐC: Mẫu đối chứng dương.

Nhận xét: Mẫu mang kiểu gen GG gồm một băng DNA có kích thước 332 bp. Mẫu mang kiểu gen GC gồm 3 băng DNA có kích thước 332 bp, 229 bp, 103 bp (giếng 3). Mẫu mang kiểu gen CC gồm 2 băng DNA có kích thước 229 bp và 103 bp (giếng 1, 2, 4, 5, 6,7)

Kết quả giải trình tự kiểm tra độ đặc hiệu của sản phẩm PCR

Sản phẩm enzym giới hạn được kt lại bằng kỹ thuật giải trình tự gen



Hình 3.6. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR mang đoạn gen G4268C của gen CYP2D6 trên DNA của BN tương ứng với kiểu gen G/G; G/C; C/C.

Nhận xét: Kết quả giải trình tự DNA phù hợp với kết quả cắt enzym giới hạn.

Bảng 3.11: Phân bố kiểu gen của đa hình G4268C trên gen CYP2D6 ở nhóm bệnh nhân UTP so với nhóm đối chứng

Nhóm \ Kiểu gen	CYP2D6 G4268C			n	p
	GG	GC	CC		
Đối chứng	28 (14%)	51 (25,5%)	121 (60,5%)	200 (100%)	-----
K phổi	26 (11,8%)	126 (57,3%)	68 (30,9%)	220 (100%)	< 0,001
K biểu mô tuyến	14 (11,0%)	72 (56,7%)	41 (32,3%)	127 (100%)	< 0,001
K tế bào vảy	11 (13,6%)	46 (56,8%)	24 (29,6%)	81 (100%)	< 0,001
K tế bào nhỏ	1 (16,8%)	8 (41,6%)	3 (41,6%)	12 (100%)	< 0,008

Nhận xét: Kết quả phân bố kiểu gen GG, GC và CC ở nhóm UTP khác biệt rất có ý nghĩa với $p < 0,001$. UTP biểu mô tuyến, UTP tế bào vảy và UTP tế bào nhỏ đều có phân bố kiểu gen khác biệt rất có ý nghĩa với $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,008$.

Bảng 3.12: Phân bố kiểu gen GC - GG với CC

Nhóm \ Kiểu gen	CYPIA1 G4268C		n	OR CI	p
	CC	GC-GG			
Đối chứng	79	121	200	----	----
K phổi	68	152	220	3,42 (2,24 - 5,22)	< 0,001
Biểu mô tuyến	41	86	127	3,21 (1,96 - 5,28)	< 0,001
K tế bào vảy	24	57	81	3,63 (2,02 - 6,63)	< 0,001
K tế bào nhỏ	3	9	12	4,59 (1,10 - 26,99)	< 0,02

Nhận xét: Kiểu gen GC - GG ở nhóm UTP có tỷ suất chênh OR rất cao = 3,42 (95% CI = 2,24 - 5,22) so với kiểu gen CC ở nhóm đối chứng $p < 0,001$. Nhóm UTP biểu mô tuyến, tế bào vảy và tế bào nhỏ có sự phân bố kiểu gen khác biệt với nhóm đối chứng giữa kiểu gen GC - GG và kiểu gen CC với OR lần lượt là OR = 3,21 (95% CI = 1,96 - 5,28) $p < 0,001$; OR = 3,63 (95% CI = 2,02 - 6,63) $p < 0,001$; OR = 4,59 (95% CI = 1,10-26,99) $p < 0,02$.

Bảng 3.13: Phân bố kiểu gen GC - GG, CC với nguy cơ hút thuốc ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm đối chứng

Nhóm \ Hút thuốc	Nhóm UTP		n	Nhóm ĐC		n	OR CI
	CC	GC-GG		CC	GC-GG		
Không hút	28	45	73	76	52	128	2,35 (1,25 - 4,42)
Có hút	40	107	147	45	27	72	4,45 (2,35 - 8,50)
< 20 bao/năm	11	37	48	30	20	50	5,04 (1,93 - 13,5)
≥ 20 bao/năm	29	70	99	15	7	22	5,17 (1,74 - 16,4)
Tổng	68	152	220	121	79	200	3,42 (2,24 - 5,22)

Nhận xét: Phân bố kiểu gen GC - GG, CC nhóm UTP và nguy cơ hút thuốc lá so với nhóm đối chứng có sự khác biệt với $OR = 2,35$ (95% CI = 1,25 - 4,42) $p < 0,04$. Ở nhóm UTP có hút thuốc có sự khác biệt với $OR = 4,45$ (95% CI = 2,35 - 8,50) $p < 0,001$. Nhóm hút thuốc < 20 bao/năm có $OR = 5,04$ (95% CI = 1,93 - 13,5) $p < 0,001$ và ≥ 20 bao/năm có $OR = 5,17$ (95% CI = 1,74 - 16,4) $p < 0,001$.

Bảng 3.14: Phân bố kiểu gen GC - GG, CC với nguy cơ hút thuốc lá ở nhóm BN ung thư phổi biểu mô tuyến so với nhóm đối chứng

Nhóm Biểu mô tuyến	Biểu mô tuyến		n	Nhóm ĐC		n	OR CI
	CC	GC- GG		CC	GC- GG		
Không hút	18	32	50	76	52	12 8	2,59 (1,25 - 5,44)
Có hút	23	54	77	45	27	72	3,91 (1,87 - 8,21)
< 20 bao/năm	5	13	18	30	20	50	3,9 (1,07 - 15,9)
≥ 20 bao/năm	18	41	59	15	7	22	4,88 (1,52 - 16,4)

Nhận xét: Kiểu gen GC và GG nhóm UTP biểu mô tuyến có hút thuốc có $OR = 3,91$ (95% CI = 1,87 - 8,21) $p < 0,001$ với đối chứng. Hút thuốc < 20 bao/năm có $OR = 3,9$ (95% CI = 1,07 - 15,9) $p < 0,02$. ≥ 20 bao/năm có $OR = 4,88$ (95% CI = 1,52 - 16,4) $p < 0,002$.

Bảng 3.15: Phân bố kiểu gen GC - GG, CC với nguy cơ hút thuốc lá ở nhóm BN UTP tế bào vảy so với nhóm đối chứng

TB vảy \ Nhóm	Tế bào vảy		n	Nhóm ĐC		n	OR CI
	CC	GC-GG		CC	GC-GG		
Không hút	10	12	22	76	52	128	1,75 (0,63 - 4,88)
Có hút	14	45	59	45	27	72	5,35 (2,34 - 12,4)
< 20 bao/năm	4	21	25	30	20	50	5,14 (2,14 - 15,3)
≥ 20 bao/năm	10	24	34	15	7	22	7,88 (1,4 - 19,46)

Nhận xét: Kiểu gen GC – GG nhóm UTP tế bào vảy có hút thuốc có OR = 5,35 (95% CI = 2,34 - 12,4) so với kiểu gen CC ở nhóm đối chứng. Nhóm hút thuốc < 20 bao/năm có OR = 5,14 (95% CI = 2,14 - 15,3) $p < 0,004$, nhóm ≥ 20 bao/năm có OR = 7,88 (95% CI = 1,4 - 19,46) $p < 0,003$ so với nhóm đối chứng.

Bảng 3.16: Phân bố kiểu gen GC và GG với kiểu gen CC theo giới ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm đối chứng

Giới \ Nhóm	Nhóm UTP		n	Nhóm ĐC		n	OR CI
	CC	GC-GG		CC	GC-GG		
Nữ	20	37	57	42	33	75	2,35 (1,09 - 5,12)
Nam	48	115	163	79	46	125	4,11 (2,43 - 6,97)
Tổng số	68	152	220	121	79	200	3,42 (2,24 - 5,22)

Nhận xét: Sự phân bố kiểu gen GC- GG nhóm UTP theo giới nữ là có sự khác biệt OR = 2,35 (95% CI = 1,09 – 5,12) với $p < 0,02$. Đặc biệt ở nam giới có OR = 4,11 (95% CI = 2,43 – 6,97) $p < 0,001$.

Bảng 3.17: Phân bố kiểu gen GC và GG với kiểu gen CC theo nhóm tuổi ở nhóm bệnh nhân UTP so với nhóm đối chứng

Tuổi \ Nhóm	Nhóm UTP		n	Nhóm ĐC		n	OR 95% CI
	CC	GC-GG		CC	GC-GG		
< 40 tuổi	2	2	4	0	1	1	----
40 - 60	36	79	115	23	19	42	2,66 (1,21 - 5,84)
> 60 tuổi	30	71	101	98	59	157	3,93 (2,23 - 6,98)
Tổng số	68	152	220	121	79	200	3,42 (2,24 - 5,22)

Nhận xét: Sự phân bố kiểu gen GC - GG nhóm tuổi 40 đến 60 là có nguy cơ mắc UTP với OR = 2,66 (95% CI = 1,21 - 5,84) $p < 0,007$: nhóm trên 60 tuổi có OR = 3,39 (95% CI = 2,23 - 6,98) $p < 0,001$.

3.4.3. Xác định sự phân bố kiểu gen của đa hình C188T, G1846T/A G1934A trên gen CYP2D6 không khác biệt so với nhóm đối chứng.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Phân bố bệnh theo tuổi: Tuổi trung bình của 220 bệnh nhân UTP trong nghiên cứu của chúng tôi là $60 \pm 9,1$ tuổi. Kết quả này là tương đồng với kết quả trong và ngoài nước. UTP gặp nhiều nhất ở nhóm 40 đến 60 tuổi chiếm 52,3%.

Phân bố bệnh theo giới: Theo kết quả nghiên cứu 220 bệnh nhân UTP trong thời gian từ tháng 11/2013 đến tháng 11/2015 cho thấy nam chiếm 74,1%, nữ chiếm 25,9%. Tỷ lệ nam/nữ theo nghiên cứu của chúng tôi là 2,8/1.

Tiền sử hút thuốc lá - thuốc là: Kết quả nghiên cứu bệnh nhân UTP có hút thuốc lá là 67%, phù hợp với các nghiên cứu của BV Bạch Mai đã công bố trước đây.

Phân bố theo giải phẫu bệnh lý: UTP biểu mô tuyến cao nhất là 57,7%, tế bào vảy 36,8% và tế bào nhỏ chiếm 5,5%.

4.2. Mối liên quan giữa CYP P450 và sự phát sinh phát triển ung thư phổi

4.2.1. Tính đa hình thái và sự phân bố kiểu gen CYP1A1 với sự phát sinh phát triển ung thư phổi

Kết quả sự phân bố kiểu gen TT, TC và CC của đa hình T6235C trên gen CYP1A1 ở nhóm bệnh nhân UTP lần lượt là 50 (22,7%), 121 (55,0%), 49 (22,3%) là khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,02$ so với kiểu gen TT, TC và CC của nhóm đối chứng là 70 (35,0%), 95 (47,5%), 35 (17,5%). Phù hợp các tác giả châu Á đã được công bố như Sheikh M Shaffi năm 2009, C. M. Wringht năm 2010 và Nan Song năm 2011, đặc biệt cũng phù hợp với Peddireddy năm 2016.

Kết quả kiểu gen TC và CC của đa hình T6235C (m1) trên gen CYP1A1 ở nhóm bệnh nhân UTP là khác biệt rất có ý nghĩa so với kiểu gen TT ở nhóm đối chứng với $OR = 1,83$ (95% $CI = 1,17 - 2,88$) với $p < 0,005$. Kết quả này phù hợp với rất nhiều các nghiên cứu như của; Nan song năm 2011 với $OR = 2,0$ (95% $CI = 1,4 - 2,8$) $p < 0,002$, Joachim Schneider năm 2004 có $OR = 1,06$ (95% $CI = 1,06 - 1,6$), Sheikh M Shaffi năm 2009 với $OR = 2,65$ (95% $CI = 1,56 - 4,49$) $p < 0,0002$. Nhóm UTP tế bào vảy có $OR = 2,37$ (95% $CI = 1,22 - 4,79$) là khác biệt có ý nghĩa so với nhóm đối chứng với $p < 0,006$. Kết quả này tương tự Sheikh M Shaffi năm 2009 với $OR = 3,30$ (95% $CI = 1,72 - 6,32$) $p < 0,0001$, Nan Song năm 2011 với $OR = 2,2$ (95% $CI = 1,4 - 3,5$) $p < 0,05$.

4.2.2. Tính đa hình thái và sự phân bố kiểu gen CYP2D6 với phát sinh phát triển ung thư

Kết quả kiểu gen GG, GC, CC của đa hình G4268C của gen CYP2D6 lần lượt là 26 (11,8%), 126 (57,3%), 68 (30,9%) là khác biệt rất có ý nghĩa với $p < 0,001$ so với nhóm đối chứng với kiểu gen GG, GC, CC lần lượt là 28 (14,0%), 51 (25,5%), 121 (60,5%). Đặc biệt khi chúng tôi phân tích từng kiểu gen này theo phân loại giải phẫu bệnh lại càng cho thấy sự khác biệt

Kiểu gen GC và GG của đa hình G4268C trên gen CYP2D6 ở nhóm bệnh nhân UTP nói chung với nhóm đối chứng thì cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê rất cao với $OR = 3,42$ (95% $CI = 2,24-5,22$) $p < 0,001$. Kết quả phù hợp với Tomohiro S năm 2012, Kang Hui năm 2011 với $OR = 1,73$ (95% $CI = 1,02-2,95$). Khi phân tích theo từng nhóm giải phẫu bệnh thì ở nhóm ung thư phổi biểu mô tuyến có $OR = 3,21$ (95% $CI = 1,96-5,28$) $p < 0,001$ so với Kang Hui năm 2011 ở loại giải phẫu bệnh này $OR = 2,75$ (95% $CI = 1,27-5,94$). Nhóm ung thư phổi tế bào vảy có $OR = 3,63$ (95% $CI = 2,02-6,63$) $p < 0,001$. Nhóm ung thư phổi tế bào nhỏ có $OR = 4,59$ (95% $CI = 1,1-26,99$) $p < 0,02$. Kết quả này tương đương kết quả của Zhanlin Guo năm 2005 với OR ở nhóm ung thư tế bào vảy có $OR = 2,084$ (95% $CI = 1,02-4,244$) $p < 0,04$.

4.3. Sự tác động của các yếu tố nguy cơ lên sự hình thành và phát triển bệnh ung thư phổi.

4.3.1. Yếu tố về tuổi. Qua nghiên cứu cho thấy ở độ tuổi 40 đến 60 cùng với sự tác động của các yếu tố nguy cơ cũng như những thay đổi kiểu gen ở trên thì nguy cơ mắc ung thư phổi rất cao

4.3.2. Yếu tố về giới. Kết quả cho thấy cùng với yếu tố nguy cơ là hút thuốc lá và những thay đổi kiểu gen luôn làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở nam cao hơn so với nữ giới.

4.3.3. Thói quen hút thuốc lá với sự phân bố kiểu gen CYP1A1, CYP2D6 và sự phát sinh phát triển ung thư. Như vậy, qua kết quả và phân tích trong đề tài nghiên cứu của chúng tôi cho thấy yếu tố nguy cơ hút thuốc lá đóng một vai trò rất quan trọng đến nguy cơ mắc ung thư phổi đặc biệt nếu yếu tố này liên quan đến đa hình G4268C của gen CYP2D6.

4.4. Phân bố kiểu gen các đa hình gen CYP1A1, CYP2D6 theo phân loại giải phẫu bệnh lý

Kiểu gen TC-CC đa hình T6235C của gen CYP1A1 nhóm UTP tế bào vảy có sự khác biệt với $OR = 2,37$ (95% $CI = 1,22-4,79$).

Đối với đa hình G4268C của gen CYP2D6 lại cho thấy rõ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở tất cả các nhóm giải phẫu bệnh với phân bố kiểu gen GG, GC, CC đều có $p < 0,001$

KẾT LUẬN

1. Sự phân bố kiểu gen các đa hình

1.1. Đa hình thái đơn T6235C gen CYP1A1 ở bệnh nhân UTP:

Phân bố kiểu gen TT, TC, CC ở nhóm bệnh nhân UTP lần lượt là 50 (22,7%), 121 (55,0%), 49 (22,3%) khác biệt với $p < 0,02$ so với nhóm đối chứng.

Đa hình T6235C của gen CYP1A1 với kiểu gen TC và CC được xác định làm tăng nguy cơ UTP với $OR = 1,83$ (95% CI = 1,17 - 2,88) $p < 0,005$. Đặc biệt ở nhóm UTP tế bào vảy có $OR = 2,37$ (95% CI = 1,22 - 4,79) $p < 0,006$.

1.2. Đa hình thái đơn G4268C của gen CYP2D6 ở bệnh nhân UTP:

Phân bố kiểu gen GG, GC, CC ở nhóm bệnh nhân UTP lần lượt là 26 (11,8%), 126 (57,3%), 68 (30,9%) khác biệt với $p < 0,001$ so với nhóm đối chứng.

Đa hình G4268C của gen CYP2D6 với kiểu gen GG, GC được xác định làm tăng nguy cơ UTP với $OR = 3,42$ (95% CI = 2,24 - 5,22) $p < 0,001$. Ba nhóm UTP biểu mô tuyến, tế bào vảy và tế bào nhò đều cho kết quả khác biệt so với nhóm đối chứng với $p < 0,001$.

2. Mối liên quan với yếu tố nguy cơ.

Nguy cơ hút thuốc lá: Đa hình G4268C của gen CYP2D6 là nhân tố quan trọng cùng với nguy cơ hút thuốc lá làm tăng nguy cơ UTP với $OR = 4,45$ (95% CI = 2,35 - 8,5) $p < 0,001$.

Nguy cơ theo tuổi và giới: Đa hình T6235C của gen CYP1A1, đa hình G4268C của gen CYP2D6 đều làm tăng nguy cơ UTP ở nam cao hơn so với nữ. Tương tự nhóm tuổi từ 40 đến 60 ở cả hai đa hình T6235C gen CYP1A1 và đa hình G4268C gen CYP2D6.

KIẾN NGHỊ

1. Nhóm tuổi từ 40 đến 60 cần khám và sàng lọc UTP thường xuyên.
2. Mở rộng xác định kiểu đột biến theo yếu tố nguy cơ để điều trị sớm.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



LE HONG CONG

**THE DISTRIBUTION OF GENOTYPES CYP1A1, CYP2D6
IN LUNG CANCER PATIENTS**

Major: Biochemistry

Code: 62720112

MEDICAL DOCTOR DISSERTATION SUMMARY

Ha Noi - 2017

**THE DISSERTATION IS COMPLETED AT
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

Scientific guidance: Prof.PhD. Ta Thanh Van

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The dissertation will be presented to the Board of Ph.D dissertation at University level at Hanoi Medical University.

At date month year 2017

The dissertation can be found at:

- National Library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University

**LIST OF PUBLIC SCIENTIFIC WORKS RELATED
TO THE DISSERTATION**

1. Le Hong Cong, Tran Van Khanh, Le Hoang Bich Nga, Nguyen Trong Tue, Nguyen Duc Hinh, Ta Thanh Van, Tran Huy Thinh (2015). Polymorphism T6235C of CYP1A1 gene and risk of lung cancer. *Journal of Medical Research*, Volume 94, No. 2, 1-8.
2. Le Hong Cong, Tran Huy Thinh, Pham Le Anh Tuan, Tran Van Khanh, Pham Ngoc Minh, Ngo Thanh Tung, Ta Thanh Van (2016). Polymorphism G4268C of CYP2D6 gene in lung cancer patients. *Journal of Medical Research*, Volume 100, No. 2, 42-49.

BACKGROUND

1. The Essential of the topic

Lung cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer death in many countries around the world, along with Vietnam. Smoking is a risk factor and the most obvious reason related to lung cancer. Among CYPs: CYP1A1 and CYP2D6 are the key activation of carcinogens such as nicotine and aromatic hydrocarbons that generated from cigarette smoke. In Vietnam, the study of CYP1A1, CYP2D6 in lung cancer is unprecedented, especially regarding risk of lung cancer. Therefore, with the aim of clarifying relationship between single polymorphisms form of CYP1A1, CYP2D6 genes and risk factors of lung cancer, we carried out this research.

2. Objectives of the research:

1. The prevalence and distribution of polymorphisms CYP1A1, CYP2D6 between patients with lung cancer and control groups.
2. Assess the relationship between polymorphisms of CYP1A1, CYP2D6 and some risk factors of lung cancer.

3. The scientific and practical meaning of the thesis:

The research results show that: (1). Clarify the role of the CYP1A1, CYP2D6 genes on the risk of formation and development of lung cancer that will be the basis for proactive disease prevention. (2). Reflect the sensitive of CYP1A1 and CYP2D6 genes which relates to risk factors in the formation and development of lung cancer, objectively and fairly.

In Vietnam, a leading lung cancer in men and stood second in women. In the CYPs group: CYP1A1 and CYP2D6 are key roles in the activation of carcinogens. However, researches on CYP1A1 gene, CYP2D6 gene in lung cancer patients have not been done, previously. Therefore, we used the techniques of modern molecular biology including PCR, PCR-RFLP, sequencing to find the distribution of polymorphisms in CYP1A1, CYP2D6 genes.

4. Thesis structure

The thesis includes in 121 main pages (excluding references and appendices). The thesis is divided into 7 sections:

- + Background: 2 pages
- + Chapter 1: Overview document - 37 pages
- + Chapter 2: Object and methodology - 13 pages
- + Chapter 3: Research Results - 42 pages
- + Chapter 4: Discussion - 24 pages
- + Conclusion: 2 pages
- + Recommendation: 1 page

The thesis consists of: 3 graphs, 42 tables and 22 figures, using 92 references including Vietnamese and English.

CHAPTER 1: OVERVIEW

1.1. Definition of lung cancer

Lung cancer is a malignant disease develop from epithelial bronchi, bronchioles, alveoli or bronchial glands

1.2. Epidemiology of lung cancer

According to a report from WHO, the morbidity of lung cancer is highest in men (17.6%), fifth in women (5.8%).

Vietnam: In men, lung cancer ranks the second, only behind liver cancer. In women, lung cancer ranks the second after breast cancer.

1.3. The risk factors relate to lung cancer

Tobacco: Smoking is considered a major risk factor for lung cancer
Air pollution, Ionizing radiation, Bronchopulmonary diseases, Age and gender: the most common lung cancer from 40 to 60 years old

1.4. Lung Cancer Diagnosis

Definitive diagnosis.

Results of histopathology, cytology from swabs which taken via bronchoscopy, biopsy, transthoracic needle aspiration, pleural, supraclavicular lymph nodes ... cells, cancer organizations. This is the gold standard for definitive diagnosis.

1.5. Classification of Lung Cancer

Mountain TNM Classification of CF is based on three criterias: T: Tumor, N: Node, M: Metastasis

Stage I: include patients without evidence of invasive or distant metastases.

Stage II: include patients with evidence of lymph node invasion in lung.

Stage III: include patients with lung cancer progressed in their chests and evidence of lymph node invasion in lung.

Stage IV: include lung cancer patients with distant metastases.

1.6. Classification cell lung cancer bases on histopathology.

Based on histology, lung cancer is divided into two main categories: small cell lung carcinoma (SCLC) and non small cell lung carcinoma (NSCLC).

1.7. New strategies for treatment of lung cancer

Treatment with the inhibitors of Tyrosinkinase in lung cancer. Treatment with anti-angiogenesis. Gene therapy. Immune treatment.

1.8. Molecular biomarker CYP1A1, CYP2D6 genes in the metabolism cycle of cytochrome P450 and lung cancer

Molecular Mechanism

In the CYPs group: CYP1A1 and CYP2D6 are the main enzymes that activate carcinogens such as nicotine and aromatic hydrocarbons that generated from cigarette smoke.

1.8.1. Overview of the CYP1A1 gene

Location and structure

CYP1A1 gene (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1) is located on chromosome 15, long arm, in position 24.1 (Figure 1.1).

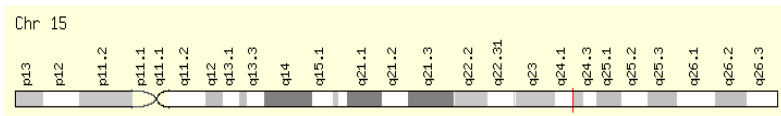


Figure 1.1. Location of CYP1A1 gene on chromosome 15

(Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Function

CYPs metabolize thousands of endogenous and exogenous substances. Cytochrome P450 enzymes are presented in most tissues of the body, play an important role in the synthesis and decomposition of hormones (estrogen, testosterone), cholesterol synthesis, vitamin D metabolism. Enzyme, moreover, functions as metabolism toxic compounds, including drugs and endogenous metabolites such as bilirubin, mainly presented in the liver.

The polymorphisms CYP1A1 gene

Currently, some researchers have identified the single nucleotide polymorphisms in the gene CYP1A1. One of those is made to strengthen the activities of encoded proteins and being studied its affect cancer risk.

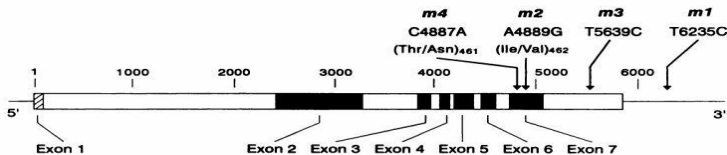


Figure 1.2. The polymorphisms of CYP1A1 gene

m1 Polymorphism: replace T to C substitution at nucleotide 6235 in the 3' non-coding regions.

m2 Polymorphism: replace A by G at nucleotide 4889 leading to change isoleucine amino acid to valine amino acid at codon 462 Valine.

m3 Polymorphism: replace T by C at nucleotide 5639 at the 3' non-coding regions.

m4 Polymorphisms: replace C by A at nucleotide 4887 resulted in changing threonine amino acid to asparagine amino acid at codon 461.

1.8.2. Overview of CYP2D6

Location

CYP2D6 gene is located on the long arm of chromosome 22, position 13.1 (22q13.1).

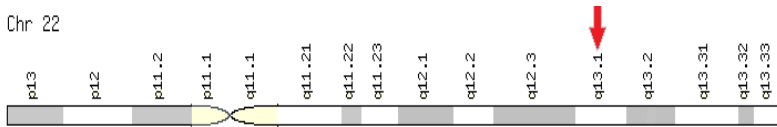


Figure 1.3. CYP2D6 gene's location on chromosome 22

(Source: www.genecards.org)

Structure

CYP2D6 gene is 4378bp size. Genetic structure consists of 9 exons containing genes which encode genetic information and 10 intron sections noncoding and interleaving with the exons. Exon 1 contains one non-coding segment (from 1747 to 1835).

Function

CYP2D6 gene encodes the polypeptide chains 6, cytochrome P450 family 2, subfamily A. The name of the protein is CYP2D6.

Cytochrome P450 D6 is a protein that composed of 497 amino acids and is monooxygenases enzymes that catalyze many reactions in drug metabolism and synthesis of cholesterol, steroids and other lipids.

CHAPTER 2: SUBJECTS AND METHODS

2.1. Research subjects

2.1.1. Lung Cancer Patients

Study subjects include 220 patients whom were examined and treated lung cancer in Respiratory Center, Center for Nuclear Medicine and Oncology of Bach Mai Hospital from 11/2013 to 11/2015

2.1.2. The control group

200 people in control group, respectively for age and sex with study group, are hypertension and diabetic patients whom periodically visit out clinic of Bach mai hospital from 3/2014 to 11/2015.

2.1.3. Choose the sample size

We apply the formula:

$$X = Z (1-\alpha) \text{ } \sigma / n \Rightarrow n = (Z (1-\alpha) \text{ } \sigma / X)^2$$
: X is the standard,
 Z (1 - α) reliability of 95%, σ is the standard deviation

Based on a previous study by the author of Japan, Haruhiko Sugimura, $X = 62.1 \pm 11.2$ we calculated $n = 220$.

2.2. Research Methods.

2.2.1. Research design

The study was done by the controlled, interrupted, descriptive method

2.2.2. Research Methods

- Clinical examination, diagnosis of subclinical and finally defined diagnosis of lung cancer.

- The molecular biology techniques include: DNA extraction, PCR, using restriction identified mutations enzymes, gene sequencing.

- Results of the study are statistical analyzed to identify the difference between the study groups and the control group.

2.2.3. Sample collection

Both lung cancer patient group and the control group were taken 2ml venous blood with EDTA anticoagulant at concentrations 1.5 mg / ml. The process is absolutely sterility.

2.3. The process of DNA extraction from peripheral blood

2.4. PCR technique to amplify DNA

2.5. Using PCR-RFLP techniques to identify genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2D6 genes.

Table 2.1. List of primers, termination enzymes used in the study

n	SNPs	Primers (5'-3')	PCR (bp)	Enzy m
1	T6235C gene CYP1A1 (m1)	F: TAG GAGTCTTGTCTCATGCCT R: CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT	340	<i>MspI</i>
2	A4889G gene CYP1A1 (m2)	F: CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC R: TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC	204	<i>MspI</i>
3	T5639C gene CYP1A1 (m3)	F: TGAGCAATCTGACCCTA R: ATCTTCCTAACAAACACATGTTTGT	301	<i>HincII</i>
4	C4887A gene CYP1A1 (m4)	F: CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC R: TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC	204	<i>HincII</i>
5	C188T gene CYP2D6	F: CTGGGTAAGGGCCTGGAG R: ACCTGGTCTGAAGCATATGG	442	<i>HphI</i>
6	G1934A gene CYP2D6	F: ATGAGAGCTGCCAACCTT R: ATGTGAACCAGCTCCCTGTC	334	<i>BstNI</i>
7	G1846T gene CYP2D6	F: GTGGATGGTGGGGCTAATGCCTT R: CAGAGACTCCTCGGTCTCTCGCT	486	<i>MspI</i>
8	G4268C gene CYP2D6	F: AGCTCTTCCTCTTCTTCACCTCCCTG R: GCCTCAACGTACCCCTGTCTC	332	<i>HhaI</i>

2.6. Sequencing technique**2.7. Obeying medical ethic in research.****2.8. Data analysis and research diagram.**

Data was analyzed with SPSS 20.0, Stata software.

Our study is performed according to the diagram below.

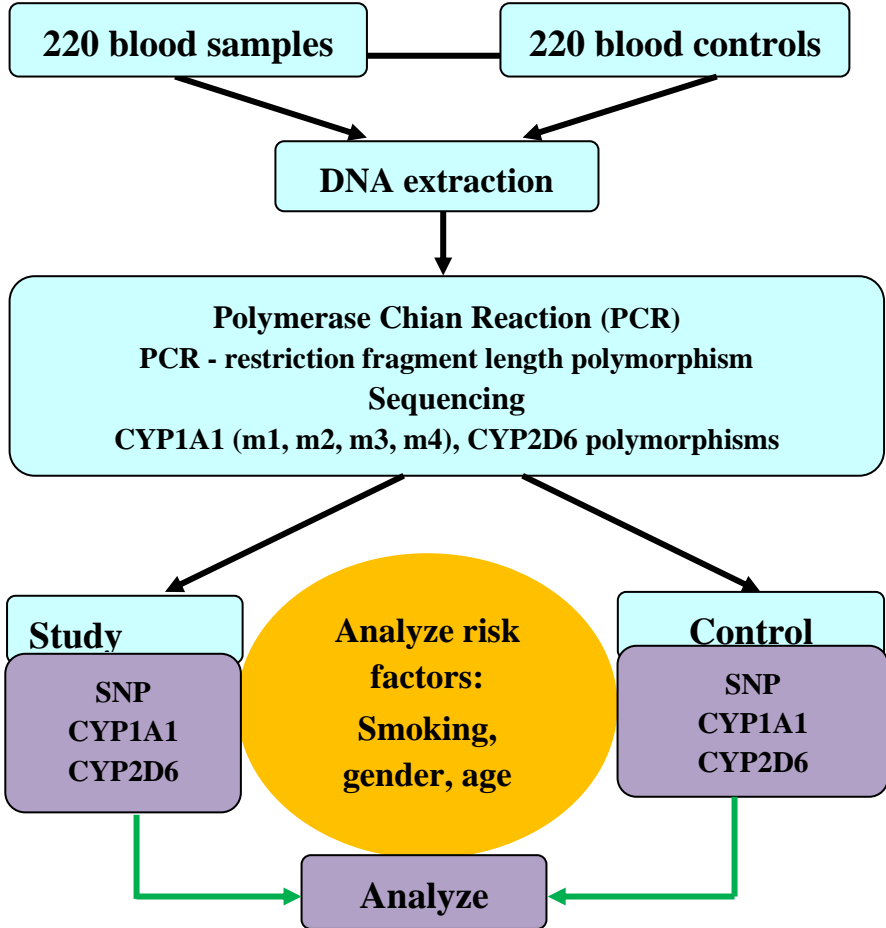


Figure 2.2. Diagram of research design

CHAPTER 3

RESULT

3.1. General characteristics of the study group

3.1.1. Gender characteristics of lung cancer and control group.

Table 3.1: Distribution of gender in two groups

	Lung cancer	Control
Female	57 (25,9%)	75 (37,5%)
Male	163 (74,1%)	125 (62,5%)
Total	220 (100%)	200 (100%)

Comment: Lung cancer group has male/female ratio is 2,8/1

3.1.2. Age characteristics of the group of lung cancer patient.

Table 3.2: The average age of the study and control groups

	Lung cancer	Control
Mean (year) \bar{x}	60,0	66,0
Standard (SD)	9,1	9,4

Comment: The average age of the lung cancer patients were 60.0 ± 9.1

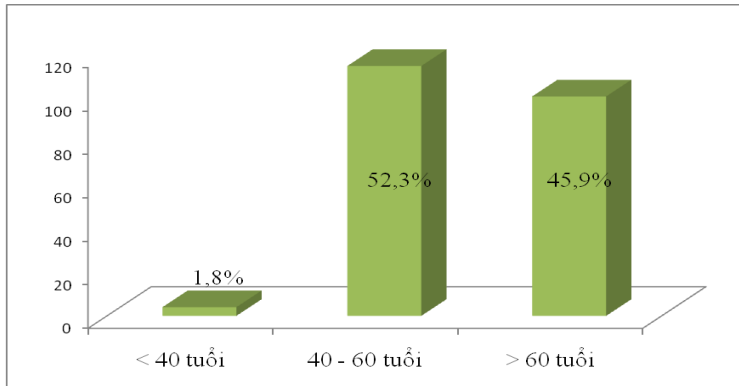


Chart 3.1: Distribution of age groups in lung cancer patients.

Comment: Patients at the age between 40 and 60 accounted for the highest number with 115 patients (52.3%).

3.2. Comparison the general characteristics of lung cancer group and control group.

Table 3.3: Comparison the general characteristics of the study group

Characteristics	Lung cancer n (%)	Control n (%)	P
Gender			
Male	163 (74,1%)	125 (62,5%)	> 0,05
Female	57 (25,9%)	75 (37,5%)	
Age			
Mean (M)	60	66	> 0,05
Standard (SD)	9,1	9,4	
Smoking			
No	73 (33%)	128 (64%)	
Yes	147 (67%)	72 (36%)	
< 20 pack/year	48 (32,7%)	50 (69,4%)	
≥ 20 pack/year	99 (67,3%)	22 (30,6%)	
Histological type			
Adenocarcinoma	127 (57,7%)		
Squamous cell carcinoma	81 (36,8%)		
Small cell lung cancer	12 (5,5%)		

Comment: The proportion of males is higher than females in both groups and the average age is 60 among lung cancer that is indifference with the control group. In the group of lung cancer patients, the number of smoking patient is twice times higher than non-smoking patients and the number of smoking patients whom smoke ≥ 20 pack/year is twice times higher than the number of patients whom smoke < 20 pack/year. Adenocarcinoma (AC) has highest proportion of 127 (57.7%), followed by squamous cell carcinoma (SCC), accounted for 81 (36.8%) and finally small cell lung cancer (SCLC), accounted for 12 (5.5%).

3.3. The distribution of genotypes of CYP1A1 polymorphisms in lung cancer patients and control group

3.3.1. The distribution of genotypes T6235C polymorphism on CYP1A1 gene in lung cancer patients and control group.

Results of amplifying T6235C region of CYP1A1 gene

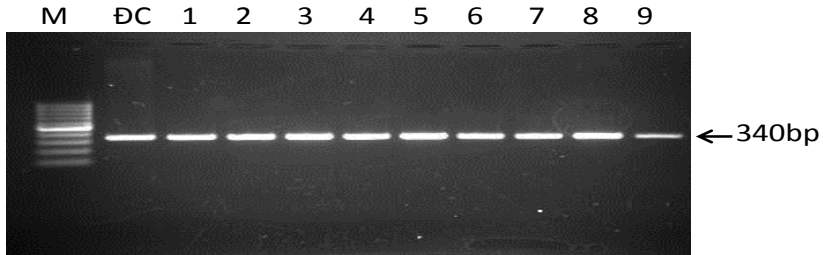


Figure 3.1. Product of amplifying the T6235C region of CYP1A1 1-5: lung cancer patients; 6-9: controls; M: ladder standards; DC: positive control

Comment: Obtained PCR products have good quality, including size of a specific band as calculated as 340 bp.

The results of identifying T6235C genetic polymorphisms of CYP1A1 by PCR - RFLP

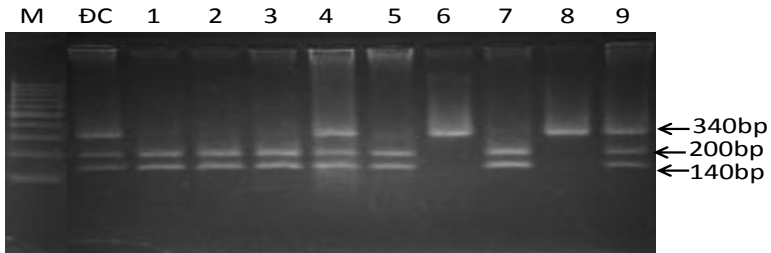


Figure 3.2. 1-5 Lung cancer patients; 6-9 Controls; M: 100 Ladder standards; DC: positive control.

Comment: TT genotype sample includes a band with 340 bp DNA size (wells 6, 8). TC genotype sample includes 3 DNA brands with 340 bp, 200 bp and 140 bp (wells 4, 9). CC genotype sample includes 2 DNA brands with 200 bp and 140 bp (wells 1, 2, 3, 5, 7).

Result of sequencing test the specificity of PCR products

Result of cutting restriction enzymes checked by using sequencing techniques.

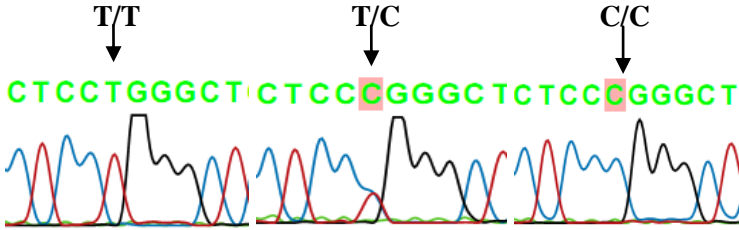


Figure 3.3. Results sequencing PCR products carrying the T6235C segment of CYP1A1 gene that matches genotype T/T; T/C; C/C.

Comment: The results of the DNA sequencing showed that patients fully consistent with the results of cutting restriction enzymes.

3.3.2. Comparing of the distribution of T6235C polymorphism in CYP1A1 gene in lung cancer patients and control group.

Table 3.4: T6235C genotype in lung cancer and control groups

Group \ Genotypes	CYP1A1 T6235C (m1)			n	p
	TT	TC	CC		
Control	70 (35%)	95 (47,5%)	35 (17,5%)	200 (100%)	-----
Lung cancer	50 (22,7%)	121 (55,0%)	49 (22,3%)	220 (100%)	< 0,02
AC	33 (26%)	69 (54,3%)	25 (19,7%)	127 (100%)	< 0,23
SCC	15 (18,5%)	47 (58%)	19 (23,5%)	81 (100%)	< 0,02
SCLC	2 (16,8%)	5 (41,6%)	5 (41,6%)	12 (100%)	< 0,09

Comment: Table 3.4 shows the distribution of genotype TT, TC and CC in lung cancer patients. The difference is statistically significant compared to the control group with $p < 0,02$. In squamous cell carcinoma (SCC) group, the difference of genotype distribution is statistically significant compared with controls with $p < 0,02$.

Table 3.5: The distribution of TC - CC genotypes with TT

<i>Group</i>	<i>CYP1A1 T6235C (mI)</i>		<i>n</i>	<i>OR CI</i>	<i>p</i>
	<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>			
<i>Control</i>	70	130	200	----	----
<i>Lung cancer</i>	50	170	220	1,83 (1,17 - 2,88)	< 0,005
<i>AC</i>	33	94	127	1,53 (0,91 - 2,60)	< 0,09
<i>SCC</i>	15	66	81	2,37 (1,22 - 4,79)	< 0,006
<i>SCLC</i>	2	10	12	2,69 (0,55 - 25,8)	< 0,19

Comment: The results of the private distribution of genotypes TC and CC in lung cancer patients with OR = 1,83 (95% CI = 1,17 – 2,88) compared with genotype TT in the controls with $p < 0,005$. This in squamous cell carcinoma group differs with the control group with OR = 1,53 (95% CI = 1,22 - 4.79), $p < 0,006$.

Table 3.6: The distribution of TC - CC, TT genotypes with the risk of smoking in lung cancer patients and control group

<i>Group</i>	<i>Lung cancer</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR CI</i>
	<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		
<i>No</i>	18	55	73	45	83	128	1,66 (0,83 - 3,36)
<i>Yes</i>	32	115	147	25	47	72	1,91 (0,97 - 3,72)
<i>< 20 pack/year</i>	13	35	48	18	32	50	1,51 (0,59 - 3,93)
<i>≥ 20 pack/year</i>	19	80	99	7	15	22	1,96 (0,59 - 6,01)
<i>Total</i>	50	170	220	70	130	200	1,83 (1,16 - 2,88)

Comment: The distribution of TC, CC and TT genotypes in lung cancer patients with the risk of smoking does not show differences

Table 3.7: The distribution of TC - CC, TT genotypes with the smoking risk in adenocarcinoma and control group

<i>Group</i> <i>AC</i>	<i>AC</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>CI</i>
	<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		
<i>No smoking</i>	14	36	50	45	83	128	1,39 (0,65 - 3,09)
<i>Yes</i>	19	58	77	25	47	72	1,62 (0,75 - 3,52)
<i>< 20 pack/year</i>	6	12	18	18	32	50	1,12 (0,32 - 4,30)
<i>≥ 20 pack/year</i>	13	46	59	7	15	22	1,65 (0,46 - 5,48)

Comment: Results of distribution TC and CC genotypes in patients with adenocarcinoma with risk of smoking is statistical insignificance.

Table 3.8: The distribution of TC - CC, TT genotypes with the smoking risk in squamous cell carcinoma and control group

<i>Group</i> <i>SCC</i>	<i>SCC</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>CI</i>
	<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		
<i>No smoking</i>	4	18	22	45	83	128	2,44 (0,74 - 10,4)
<i>Yes</i>	11	48	59	25	47	72	3,32 (0,96 - 5,81)
<i>< 20 pack/year</i>	6	19	25	18	32	50	1,78 (0,55 - 6,42)
<i>20 pack/year</i>	5	29	34	7	15	22	2,71 (0,61 - 12,0)

Comment: Distribution of TC, CC genotypes in the squamous cell carcinoma patients risk of smoking is statistical insignificance.

Table 3.9: The distribution of TC - CC genotypes with TT genotype by gender in lung cancer and control groups

<i>Group</i> <i>Gender</i>	<i>Lung cancer</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>CI</i>
	<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		
<i>Female</i>	14	43	57	25	50	75	1,53 (0,66 - 3,61)
<i>Male</i>	36	127	163	45	80	125	1,98 (1,14 - 3,45)
Total	50	170	220	70	130	200	1,83 (1,16 - 2,88)

Comment: The distribution of (TC - CC) genotypes in lung cancer women is indifference. In male, there is differences with statistical significance

Table 3.10: Comparison of the distribution of TC and CC genotypes with genotype TT by age in lung cancer patients and controls

<i>Group</i> <i>Age</i>	<i>Lung cancer</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>95% CI</i>
	<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		<i>TT</i>	<i>TC-CC</i>		
<i>< 40 Years</i>	3	1	4	0	1	1	----
<i>40 - 60</i>	22	93	115	13	29	42	1,89 (1,07 - 4,51)
<i>> 60 Years</i>	25	76	101	56	101	157	1,68 (0,93 - 3,08)
Total	50	170	220	69	131	200	1,83 (1,16 - 2,88)

Comment: The distribution of (TC-CC) genotypes in lung cancer group at the age from 40 to 60 shows the highest risk of lung cancer with OR = 1,89 (95% CI = 1,07 - 4,51) $p < 0, 05$.

3.4. The distribution of genotypes of CYP2D6 polymorphism gene in lung cancer and control groups

3.4.1. The distribution of genotypes of G4268C polymorphism in CYP2D6 gene in lung cancer patients and control group

Result of amplifying G4268C region in CYP2D6 gene

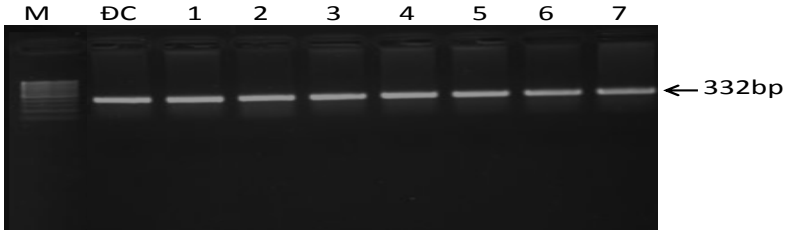


Figure 3.4. Products of amplifying G4268C regional segments in CYP2D6 gene; 1-4: Lung cancer samples; 5-7: Control samples; M: 100 bp ladder standards; DC: positive control.

Comment: Results of amplifying G4268C segment in CYP2D6 gene obtained good, quality PCR products, a 332 bp band.

Results of determining G4268C polymorphism in CYP2D6 gene by PCR - RFLP

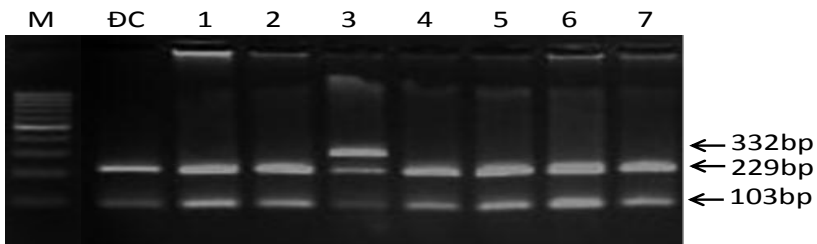


Figure 3.5. Is the cutting enzyme CYP2D6 gene G4268C region Eco91I enzyme. 1-4 lung cancer patients; 5-7 control; M: 100 bp ladder standards; DC: positive control.

Comment: Genotype GG includes a band 332 bp DNA size. Genotype GC includes 3 bands 332 bp DNA size, 229 bp, 103 bp (3). Genotype CC includes 2 bands 229 bp DNA size and 103 bp (wells 1, 2, 4, 5, 6, 7)

Results of cutting restriction enzyme is checked using sequencing techniques

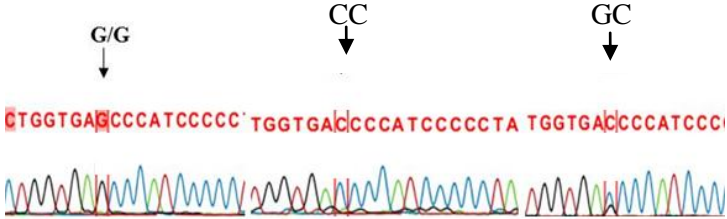


Figure 3.6. Results of sequencing PCR products that carry G4268C polymorphism segment in CYP2D6 gene of DNA matching the G / G; G / C; C / C genotype in patients.

Comment: The results of DNA sequencing corresponding to the results of cutting restriction enzymes.

Table 3.11: The distribution of genotypes of G4268C polymorphism in CYP2D6 gene in lung cancer patients and the controls.

<i>Group</i> \ <i>Genotypes</i>	<i>CYP2D6 G4268C</i>			<i>n</i>	<i>p</i>
	<i>GG</i>	<i>GC</i>	<i>CC</i>		
<i>Control</i>	28 (14%)	51 (25,5%)	121 (60,5%)	200 (100%)	-----
<i>Lung cancer</i>	26 (11,8%)	126 (57,3%)	68 (30,9%)	220 (100%)	< 0,001
<i>AC</i>	14 (11,0%)	72 (56,7%)	41 (32,3%)	127 (100%)	< 0,001
<i>SCC</i>	11 (13,6%)	46 (56,8%)	24 (29,6%)	81 (100%)	< 0,001
<i>SCLC</i>	1 (16,8%)	8 (41,6%)	3 (41,6%)	12 (100%)	< 0,008

Comment: Results of distribution of GG, GC and CC genotypes in lung cancer group is significantly different with $p < 0.001$. Adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and small cell lung cancer have difference in genotype distribution genotypes with control group ($p < 0.001$, $p < 0.001$; $p < 0.008$, correspondingly).

Table 3.12: The distribution of GC - GG genotype with that of CC

<i>Group</i> \ <i>Genotypes</i>	<i>CYP1A1 G4268C</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>CI</i>	<i>p</i>
	<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>			
<i>Control</i>	79	121	200	----	----
<i>Lung cancer</i>	68	152	220	3,42 (2,24 - 5,22)	< 0,001
<i>AC</i>	41	86	127	3,21 (1,96 - 5,28)	< 0,001
<i>SCC</i>	24	57	81	3,63 (2,02 - 6,63)	< 0,001
<i>SCLC</i>	3	9	12	4,59 (1,10 - 26,99)	< 0,02

Comment: GC - GG Genotype in lung cancer has very high odds ratio OR = 3,42 (95% CI = 2,24 – 5,22) compared with CC genotype in control group with $p < 0.001$. Adenocarcinoma, squamous cell and small cell lung cancer have the differences in genotype distribution of GC - GG and CC genotypes with OR = 3,21 (95% CI = 1,96 – 5,28), $p < 0,001$; OR = 3,63 (95% CI = 2,02 – 6,63), $p < 0,001$; OR = 4,59 (95% CI = 1,10 – 26,99), $p < 0,02$, in turn, with control group.

Table 3.13: Comparison of distribution of GC - GG, CC genotypes with risk of smoking in lung cancer patients and control group

<i>Group</i> \ <i>Smoking</i>	<i>Lung cancer</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>CI</i>
	<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		
<i>No</i>	28	45	73	76	52	128	2,35 (1,25 - 4,42)
<i>Yes</i>	40	107	147	45	27	72	4,45 (2,35 - 8,50)
< 20 pack/year	11	37	48	30	20	50	5,04 (1,93 - 13,5)
≥ 20 pack/year	29	70	99	15	7	22	5,17 (1,74 - 16,4)
<i>Total</i>	68	152	220	121	79	200	3,42 (2,24 - 5,22)

Comment: Distribution of GC - GG, CC genotypes in lung cancer group with smoking risk is different with control group with OR = 2,35 (95% CI = 1,25 – 4,42) $p < 0.04$. Lung cancer has smoking with OR = 4,45 (95% CI = 2,35 – 8,50), $p < 0,001$. Smoking groups < 20 pack/years OR = 5,04 (95% CI = 1,93 – 13,5) $p < 0,001$ and ≥ 20 packs /years OR = 5,17 (95% CI = 1,74 – 16,4) $p < 0,001$.

Table 3.14: The distribution of GC - GG, CC genotypes with smoking risk in adenocarcinoma and control groups

<i>Group</i>	<i>AC</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>CI</i>
	<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		
<i>No</i>	18	32	50	76	52	128	2,59 (1,25 - 5,44)
<i>Yes</i>	23	54	77	45	27	72	3,91 (1,87 - 8,21)
< 20 pack/year	5	13	18	30	20	50	3,9 (1,07 - 15,9)
≥ 20 pack/year	18	41	59	15	7	22	4,88 (1,52 - 16,4)

Comment: GC, GG genotype in smoker in adenocarcinoma group has OR = 3.91 (95% CI = 1.87 to 8.21), $p < 0.001$ compared with controls. Patients who smoke < 20 pack/year have OR = 3,9 (95% CI = 1,07 – 15,9) $p < 0,02$. ≥ 20 pack/ years OR = 4,88 (95% CI = 1,52 – 16,4), $p < 0,002$.

Table 3.15: The distribution of GC - GG, CC genotypes with smoking risk in the squamous cell carcinoma and the control group

<i>SCC</i> \ <i>Group</i>	<i>SCC</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>CI</i>
	<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		
<i>No</i>	10	12	22	76	52	128	1,75 (0,63 - 4,88)
<i>Yes</i>	14	45	59	45	27	72	5,35 (2,34 - 12,4)
<i>< 20 pack/year</i>	4	21	25	30	20	50	5,14 (2,14 - 15,3)
<i>≥ 20 pack/year</i>	10	24	34	15	7	22	7,88 (1,4 - 19,46)

Comment: The GC - GG genotype in smoking squamous cell carcinoma patients have OR = 5,35 (95% CI = 2,34 - 12,4) compared with the CC genotype in the control group. Smoking <20 pack /year patients have OR = 5,14 (95% CI = 2,14 - 15,3) $p < 0,004$, Smoking \geq 20 pack /year patients get OR = 7,88 (95% CI = 1, 4-19,46) $p < 0,003$ compared with control group.

Table 3.16: The distribution of GC, CC and GG genotypes by gender in lung cancer patients and control group

<i>Group</i> \ <i>Gender</i>	<i>Lung cancer</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>CI</i>
	<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		
<i>Female</i>	20	37	57	42	33	75	2,35 (1,09 - 5,12)
<i>Male</i>	48	115	163	79	46	125	4,11 (2,43 - 6,97)
Total	68	152	220	121	79	200	3,42 (2,24 - 5,22)

Comment: The distribution of GC - GG genotype of women is difference with OR = 2.35 (95% CI = 1.09 to 5.12) $p < 0.02$. Especially this genotype in men has OR = 4.11 (95% CI = 2.43 to 6.97), $p < 0.001$.

Table 3.17: The distribution of GC, CC genotypes and GG genotype by age group in lung cancer and control group

<i>Year</i> \ <i>Group</i>	<i>Lung cancer</i>		<i>n</i>	<i>Control</i>		<i>n</i>	<i>OR</i> <i>95% CI</i>
	<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		<i>CC</i>	<i>GC-GG</i>		
<i>< 40 Years</i>	2	2	4	0	1	1	----
<i>40 - 60</i>	36	79	115	23	19	42	2,66 (1,21 - 5,84)
<i>> 60 Years</i>	30	71	101	98	59	157	3,93 (2,23 - 6,98)
Total	68	152	220	121	79	200	3,42 (2,24 - 5,22)

Comment: The distribution of GC - GG genotypes in age group from 40 to 60 shows risk of getting lung cancer with OR = 2,66 (95% CI = 1,21 – 5,84), $p < 0,007$; and over 60 with OR = 3,39 (95% CI = 2,23 – 6,98), $p < 0,001$.

CHAPTER 4 DISCUSSION

4.1. General characteristics of the study group

Distribution of patients by age: The average age of the 220 lung cancer patients in the study is $60 \pm 9,1$. This result is similar to other results in Vietnam and in the world. Lung cancer is highest in the age from 40 to 60, accounted for 52, 3%.

Distribution of patients by gender: The proportion of male / female in our study is 2,8 / 1.

History of smoking: The result of lung cancer patients with smoking is 67%. It is similar to the result in one study of Bach Mai Hospital that announced previously.

Distribution by pathology: AC is the highest 57,7%, followed by SCC with 36,8% and the final is small cell lung cancer, accounted 5,5%.

4.2. The relationship between CYP P450 and lung cancer.

4.2.1. The relationship between CYP1A1 polymorphism and distribution with lung cancer development

Result of distribution TT, TC, CC genotypes of T6235C polymorphism in CYP1A1 gene in lung cancer patients; 50 (22,7%), 121 (55,0%), 49 (22,3%) in turn, are difference from the control group with TT, TC, CC genotypes; 70 (35,0%), 95 (47,5%), 35 (17,5%), $p < 0,02$, correspondingly. This result is consistent with Asian writers Sheikh M Shaffi 2009, C. M. Wringht 2010, Nan Song 2011 and Peddireddy 2016.

Result of TC, CC genotypes of T6235C polymorphism in CYP1A1 gene in the lung cancer patients is very significant difference from TT genotype in the control group with OR = 1,83 (95% CI = 1,17 - 2,88) $p < 0,005$. This result is consistent with other studies, such as; Nan song 2011 OR = 2,0 (95% CI = 1,4 - 2,8), $p < 0,002$, Joachim Schneider 2004 OR = 1,06 (95% CI = 1,06 - 1,6) Sheikh M Shaffi 2009 OR = 2,65 (95% CI = 1,56 - 4,49), $p < 0,0002$. SCC group (OR = 2,37 (95% CI = 1,22 - 4,79)) is significantly different from the control group with $p < 0,006$. This result is similar to the results of Sheikh M Shaffi 2009 OR = 3,30 (95% CI = 1,72 - 6,32), $p < 0,0001$ and Nan Song 2011 OR = 2,2 (95% CI = 1,4 - 3,5), $p < 0,05$.

4.2.2. The relationship between CYP2D6 polymorphism and the lung cancer development

Results of genotype of GG, GC, CC of G4268C polymorphism in CYP2D6 gene is 26 (11,8%), 126 (57,3%), 68 (30,9%), respectively, there is very significant difference with the control group with GG, GC, CC genotypes: 28 (14,0%), 51 (25,5%), 121 (60,5%) $p < 0,0001$. The difference is clearer when we analyze the genotypes by histological type.

GC, GG genotypes of G4268C polymorphism in lung cancer patients is very statistically significant difference with the control

group; OR = 3,42 (95% CI = 2,24 - 5,22), $p < 0,001$. This result matches the results of Tomohiro S 2012 and Kang Hui 2011 with OR = 1.73 (95% CI 1,02 - 2.95). When analyzed by histological type: Adenocarcinoma with OR = 3,21 (CI = 1,96 - 5,28 95%) $p < 0,001$ compared with Kang Hui in 2011 OR = 2,75 (95% CI = 1,27 - 5,94). SCC with OR = 3,63 (95% CI = 2,02 - 6,63) $p < 0,001$. SCLC group with OR = 4,59 (95% CI = 1,1- 26.99) $p < 0,02$. This result is equivalent to the result of Zhanlin Guo in squamous cell cancer with OR = 2,084 (95% CI = 1,02 - 4,244) $p < 0,04$.

4.3. The impact of risk factors on the formation and development of lung cancer.

Age factor. The result shows that in the age from 40 to 60, together with impact of other risk factors and changes in the genotype, risk of lung cancer is very high.

Gender factor. The result shows that the smoking and genotype change risk factors that always make the risk of lung cancer in men higher than in women.

Smoking habits with CYP1A1, CYP2D6 genotype and development of lung cancer. Our results shows that the smoking factor plays a very important role in lung cancer risk, especially involving G4268C polymorphism of CYP2D6 gene.

4.4. Genotypes of CYP1A1, CYP2D6 polymorphism by histological

TC-CC genotypes of T6235C polymorphism in CYP1A1 in squamous cell carcinoma group is difference with the controls; OR = 2,37 (95% CI 1,22 - 4,79)

With G4268C polymorphism in CYP2D6 gene, It is obviously statistically significant difference in all of the pathological types of GG, GC, CC genotypes with $p < 0,001$

CONCLUSION

1. The genotypes of CYP1A1, CYP2D6 polymorphism in the lung cancer patients compared to the control group.

1.1. T6235C polymorphism of CYP1A1 gene in lung cancer patients.

TT, TC, CC Genotypes in lung cancer patients: 50 (22.7%), 121 (55.0%), 49 (22.3%) are difference from the control group with $p < 0,02$.

T6235C polymorphism with TC, CC genotypes are identified to increase risk of the lung cancer; OR = 1,83 (95% CI = 1,17 - 2,88), $p < 0,005$. Especially in SCC with OR = 2,37.

1.2. G4268C polymorphism of CYP2D6 gene in lung cancer patients

GG, GC, CC genotypes in lung cancer patients with 26 (11,8%), 126 (57,3%), 68 (30,9%) are difference from the control group with $p < 0,001$.

GG, GC genotypes is identified to increase risk of lung cancer; OR = 3,42 (95% CI = 2,24 - 5,22), $p < 0,001$. Three groups: adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and small cell lung cancer are different from the control group with $p < 0,001$.

2. Polymorphism CYP1A1, CYP2D6 with the risk factors.

The risk of smoking: G4268C polymorphism of CYP2D6 gene is an important factor along to smoking risk increase risk of lung cancer with OR = 4,45 (95% CI = 2,35 – 8,5), $p < 0,001$.

The risk by age and gender: T6235C polymorphism of CYP1A1 gene and G4268C polymorphism of CYP2D6 gene cause risk of lung cancer in men higher than in women. Similarly, the group aged from 40 to 60 in both of polymorphism T6235C of CYP1A1 gene and polymorphism CYP2D6 of CYP2D6 gene.

RECOMMENDATION

After this study, we suggest some recommendations:

Patients in age group from 40 to 60 should be examined and screened regularly for early detection of lung cancer

Expanding early identification of mutant type by smoking risk factor according to pathology classification to apply new therapies for patients.