

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN KIẾN DỤ

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG,  
CẬN LÂM SÀNG VÀ ĐỘT BIẾN GEN  
KRAS, BRAF Ở BỆNH NHÂN UNG  
THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2017

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**NGUYỄN KIẾN DỤ**

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG,  
CẬN LÂM SÀNG VÀ ĐỘT BIẾN GEN  
KRAS, BRAF Ở BỆNH NHÂN UNG  
THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG**

Chuyên ngành: Nội tiêu hóa

Mã số: 62720143

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS.TS Tạ Thành Văn
2. PGS.TS Nguyễn Thị Vân Hồng

**HÀ NỘI - 2017**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Kiến Dụ, nghiên cứu sinh khóa 30 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Nội tiêu hóa, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy (Cô): GS.TS Tạ Thành Văn và PGS.TS Nguyễn Thị Vân Hồng.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày 20 tháng 02 năm 2017*

Người viết cam đoan

**Nguyễn Kiến Dụ**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

AJCC	American Joint Committee on Cancer (Ủy ban ung thư Hoa Kỳ)
APC	Adenomatous polyposis coli (đa polyp tuyến)
BMI	Body mass index (chỉ số khối cơ thể)
BMPR1A	Bone morphogenetic protein receptor type IA
bp	base pair
BRAF	B-Raf proto-oncogene
CA 19-9	Cancer antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonic antigen
CT	Computed Tomography (chụp cắt lớp vi tính)
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECLIA	Electro-chemiluminescence immunoassay (Miễn dịch điện hóa phát quang)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor (yếu tố tăng trưởng biểu bì)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (thụ thể Yếu tố tăng trưởng biểu bì)
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Xét nghiệm miễn dịch Enzyme)
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule (phân tử kết dính tế bào biểu mô)
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (Điều tra về ung thư và dinh dưỡng Châu Âu)
ERK	Extracellular regulated kinases (tín hiệu ngoại bào kinases)
FAP	Familial adenomatous polyposis (bệnh đa polyp tuyến gia đình)
FOBT	Fecal occult blood test (xét nghiệm tìm máu trong phân)

GDP	Guanosine diphosphate
GEFs	Guanine nucleotide exchange factors (Yếu tố trao đổi guanine nucleotide)
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ung thư đại trực tràng thể không polyp di truyền)
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	Mitogen Extracellular signal regulated Kinase
MLH1	MutL Homolog 1
MRI	Magnetic Resonance Imaging (cộng hưởng từ)
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MYH	MutY homolog
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positron emission tomography (chụp cắt lớp phát xạ positron)
PFS	Progression-free survival
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2
POLD1	Polymerase Delta 1
POLE	Polymerase Epsilon
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RLFP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMAD4	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4
STK11	Serine/threonine kinase 11

TNM	Tumor Node Metastasis
TP53	Tumor protein p53 (protein khối u p53)
UICC	Union for International Cancer Control (Liên minh kiểm soát ung thư quốc tế)
UTĐTT	Ung thư đại trực tràng
WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)

## MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. Tổng quan về ung thư đại trực tràng .....	3
1.2. Các con đường tín hiệu và đột biến gen trong ung thư đại trực tràng.....	22
1.3. Một số kỹ thuật xét nghiệm gen KRAS và gen BRAF .....	28
1.4. Điều trị đích EGFR trong ung thư đại tràng.....	34
1.5. Tình hình nghiên cứu về đột biến gen KRAS, BRAF và điều trị đích.....	38
CHƯƠNG 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	40
2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu .....	40
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	44
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....	58
3.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, BRAF .....	58
3.1.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng bệnh nhân ung thư đại trực tràng....	58
3.1.2. Tần suất và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF.....	67
3.2. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích .....	76
CHƯƠNG 4 BÀN LUẬN.....	86
4.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, BRAF .....	86
4.1.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng .....	86
4.1.2. Tỷ lệ và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF .....	93
4.2. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích .....	104
KẾT LUẬN .....	117
1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. ....	117
2. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. ....	117
KIẾN NGHỊ .....	119

## MỤC LỤC BẢNG

Bảng 2.1. Danh mục hóa chất thực hiện phản ứng Scorpions ARMS xác định đột biến gen KRAS. ....	42
Bảng 2.2. Danh mục hóa chất thực hiện phản ứng scorpions ARMS xác định đột biến gen BRAF.....	43
Bảng 2.3. Chu trình nhiệt cho phản ứng .....	51
Bảng 2.4. Chu trình nhiệt cho phản ứng.....	53
Bảng 2.5. Danh sách các môi đột biến và sự thay đổi nucleotide trên codon 12, 13 gen KRAS .....	53
Bảng 3.1. Thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh.....	60
Bảng 3.2. Tình trạng cấp cứu khi vào viện.....	60
Bảng 3.3. Một số triệu chứng lâm sàng.....	61
Bảng 3.4. Tỷ lệ bệnh nhân có di căn .....	62
Bảng 3.5. Đặc điểm kích thước u so với chu vi đại trực tràng trên nội soi.....	63
Bảng 3.6. Dạng tổn thương trên nội soi .....	63
Bảng 3.7. Phân độ mô học.....	66
Bảng 3.8. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được tách chiết từ mẫu mô.....	67
Bảng 3.9. Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF .....	74
Bảng 3.10. Liên quan tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF với giới tính.....	76
Bảng 3.11. Liên quan dạng đột biến gen KRAS, BRAF với giới tính .....	76
Bảng 3.12. Đột biến gen KRAS, BRAF với thời gian có triệu chứng .....	78
Bảng 3.13. Đột biến gen KRAS, BRAF với tình trạng cấp cứu .....	78
Bảng 3.14. Đột biến gen KRAS, BRAF với một số triệu chứng lâm sàng .....	79
Bảng 3.15. Đột biến gen KRAS, BRAF với tổn thương di căn .....	80
Bảng 4.1. Tỷ lệ dạng đột biến gen KRAS theo một số nghiên cứu.....	102
Bảng 4.2. Kết quả điều trị bằng Cetuximab của một số nghiên cứu .....	115



## MỤC LỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Phân bố của bệnh nhân nghiên cứu theo giới tính .....	58
Biểu đồ 3.2. Phân bố của bệnh nhân nghiên cứu theo nhóm tuổi .....	59
Biểu đồ 3.3. Vị trí ung thư đại trực tràng .....	59
Biểu đồ 3.4. Nồng độ CEA .....	64
Biểu đồ 3.5. Liên quan nồng độ CEA với xác suất tích lũy sống còn .....	64
Biểu đồ 3.6. Nồng độ CA19-9 .....	65
Biểu đồ 3.7. Liên quan nồng độ CA19-9 với xác suất tích lũy sống còn.....	65
Biểu đồ 3.8. Xác suất tích lũy sống còn với nồng độ CEA và CA19-9 điều chỉnh theo giai đoạn bệnh khi phân tích đa biến bằng mô hình Cox ..	66
Biểu đồ 3.9. Tỷ lệ các dạng đột biến gen KRAS .....	75
Biểu đồ 3.10. Tỷ lệ các dạng đột biến gen KRAS và BRAF .....	75
Biểu đồ 3.11. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với tuổi .....	77
Biểu đồ 3.12. Dạng đột biến gen KRAS, BRAF với tuổi .....	77
Biểu đồ 3.13. Đột biến gen KRAS, BRAF với vị trí u.....	79
Biểu đồ 3.14. Đột biến gen KRAS, BRAF và kích thước u trên nội soi .....	80
Biểu đồ 3.15. Đột biến gen KRAS, BRAF với dạng tổn thương trên nội soi .	81
Biểu đồ 3.16. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CEA .....	81
Biểu đồ 3.17. Đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CA 19-9 .....	82
Biểu đồ 3.18. Đột biến gen KRAS, BRAF với phân độ mô bệnh học .....	82
Biểu đồ 3.19. Đáp ứng điều trị đích sau 03 tháng .....	83
Biểu đồ 3.20. Đáp ứng điều trị đích sau 06 tháng .....	83
Biểu đồ 3.21. Thời gian sống bệnh không tiến triển (PFS) và CI95% của (PFS) từ khi điều trị đích.....	85
Biểu đồ 3.22. Thời gian sống tổng thể (OS) và CI95% của (OS) từ khi điều trị đích.....	85

## MỤC LỤC HÌNH

Hình 1.1: Các đoạn của đại tràng và trực tràng .....	3
Hình 1.2: Niêm mạc đại tràng bình thường.....	4
Hình 1.3: Hình ảnh chụp MRI ung thư trực tràng .....	11
Hình 1.4: Hình ảnh chụp PET/CT di căn hạch của ung thư đại trực tràng.....	12
Hình 1.5: Tổn thương ung thư đại trực tràng trên nội soi .....	13
Hình 1.6: Hình ảnh nhuộm màu nhằm bộc lộ tổn thương khó phát hiện khi soi thông thường .....	13
Hình 1.7: Hình ảnh ung thư đại trực tràng biệt hóa cao với cấu trúc tuyến hình thành rõ.....	16
Hình 1.8: Hình ảnh ung thư đại trực tràng biệt hóa kém không hình thành cấu trúc tuyến.....	16
Hình 1.9: Hình ảnh ung thư đại trực tràng không biệt hóa không hình thành cấu trúc tuyến .....	17
Hình 1.10: Năm giai đoạn ung thư đại trực tràng theo TNM.....	19
Hình 1.11: Các con đường tín hiệu trong ung thư đại trực tràng. ....	23
Hình 1.12: Con đường tín hiệu RAS/MAPK từ EGFR .....	24
Hình 1.13: Vị trí gen KRAS trên nhiễm sắc thể số 12 .....	26
Hình 1.14: Cân bằng của protein Ras.....	26
Hình 1.15: Vị trí gen BRAF trên nhiễm sắc thể số 7 .....	28
Hình 1.16: Sơ đồ kỹ thuật giải trình tự trực tiếp .....	30
Hình 1.17: Các bước của kỹ thuật Scorpions ARMS .....	33
Hình 1.18: Cấu trúc của phân tử Cetuximab .....	35
Hình 1.19: Quá trình gắn của yếu tố tăng trưởng với thụ thể EGFR. ....	36
Hình 1.20: Cơ chế tác dụng của Cetuximab.....	37
Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu .....	45
Hình 3.1: Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng mồi GAPDH.....	67

Hình 3.2: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại exon 2 của gen KRAS (A) và exon 15 của gen BRAF (B).....	68
Hình 3.4: Đột biến G13D tại exon 2 trên gen KRAS .....	69
Hình 3.5: Đột biến G12V tại exon 2 trên gen KRAS.....	69
Hình 3.6: Đột biến G12S tại exon 2 trên gen KRAS .....	70
Hình 3.7: Đột biến V600E tại exon 15 trên gen BRAF .....	70
Hình 3.8: Đột biến G13D (codon 13) trên gen KRAS .....	71
Hình 3.9: Đột biến G12V (codon 12) trên gen KRAS .....	72
Hình 3.10: Đột biến G12S (codon 12) trên gen KRAS.....	73
Hình 3.11: Đột biến V600E (codon 600) trên gen BRAF .....	74
Hình 3.12: Hình ảnh chụp cắt lớp vi tính. ....	84
Hình 3.13: Hình ảnh chụp cắt lớp vi tính.....	84
Hình 3.14: Hình ảnh chụp cắt lớp vi tính. ....	84

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng là bệnh ác tính có thể gặp ở mọi lứa tuổi và giới. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc chuẩn theo tuổi là 10,1/100.000 dân, đứng hàng thứ sáu trong các bệnh ung thư của cả hai giới [1]. Tại châu Á, tỷ lệ mắc ung thư đại trực tràng tăng nhanh ở các quốc gia như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và Singapore [2],[3],[4]. Tại Mỹ, bệnh ung thư đại trực tràng đứng thứ năm sau ung thư phổi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư bàng quang và ung thư tuyến giáp, số người tử vong do ung thư đại trực tràng ước tính khoảng 50.830 người, đứng thứ hai về tỷ lệ tử vong chỉ sau ung thư phổi [5],[6]. Ung thư đại trực tràng có thể phòng ngừa được thông qua các chương trình tầm soát phát hiện sớm để loại bỏ các polyp hoặc khối u nhỏ [7],[8],[9],[10]. Biểu hiện lâm sàng của ung thư đại trực tràng ở giai đoạn sớm không rõ ràng nên đa số bệnh nhân được phát hiện ở giai đoạn muộn. Tỷ lệ chẩn đoán muộn và tử vong cao cho thấy sự cần thiết của các biện pháp khám sàng lọc hệ thống và điều trị kịp thời [11],[12].

Những phát hiện mới về cơ chế bệnh sinh ở mức độ phân tử cho thấy ung thư đại trực tràng là kết quả sự tích lũy các đột biến gen [13]. Những đột biến gen làm suy giảm hoặc tăng cường quá mức các tín hiệu tế bào gây rối loạn các quá trình phát triển, phân chia, biệt hóa, chết theo chương trình (apoptosis) dẫn đến phát sinh ung thư. Rất nhiều các đột biến gen đã được phát hiện trong ung thư đại trực tràng bao gồm: đột biến các gen gây ung thư, đột biến các gen ức chế khối u và đột biến các gen sửa chữa. Đột biến gen gây ung thư KRAS và BRAF có tính đa dạng về vị trí, kiểu dạng và đã được chứng minh gây kháng thuốc điều trị đích EGFR (Epidermal growth factor receptor) [14]. Đột biến gen KRAS được phát hiện từ 30% đến 50% và đột biến gen BRAF được phát hiện từ 5% đến 15% các trường hợp ung thư đại trực tràng [14],[15],[16]. Hiện nay, phẫu thuật vẫn là phương pháp điều trị chính giúp loại bỏ khối u. Các loại hóa chất mới chống ung thư trong đó có

hóa chất nhắm đích EGFR góp phần cải thiện đáng kể tỷ lệ khỏi bệnh và kéo dài thời gian sống cho người bệnh [17]. Tuy nhiên, thuốc điều trị đích EGFR chỉ mang lại lợi ích cho những bệnh nhân không có đột biến gen KRAS và gen BRAF [14],[15],[16]. Từ đó, xác định tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF đã trở thành một chỉ định cần thiết trước khi điều trị thuốc nhắm đích EGFR cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Mặt khác, vai trò có tính chất tiên lượng của các đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng đối với tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF luôn là mối quan tâm của các thầy thuốc điều trị. Tại Việt Nam, tình trạng đột biến gen KRAS mới được nghiên cứu nhưng chưa có nghiên cứu nào đề cập đến đột biến cả hai gen KRAS, BRAF và kết quả điều trị đích ở người bệnh ung thư đại trực tràng. Vì vậy đề tài này được nghiên cứu với các mục tiêu sau:

***1. Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.***

***2. Mối liên quan giữa đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.***

## CHƯƠNG 1

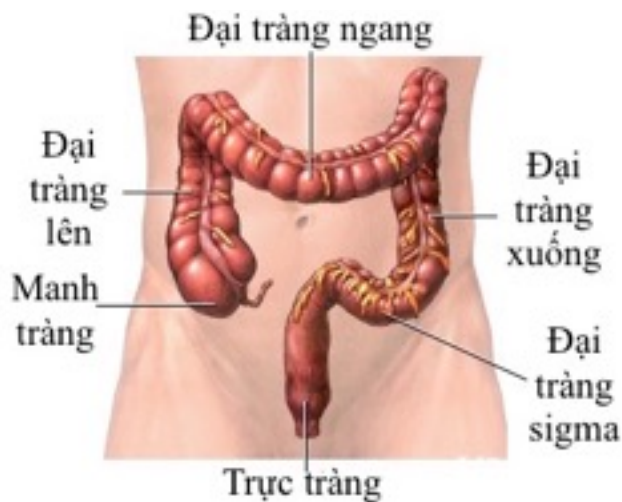
### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. TỔNG QUAN VỀ UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG

##### 1.1.1. Giải phẫu, sinh lý đại trực tràng

###### 1.1.1.1. Giải phẫu đại trực tràng

Đại trực tràng là phần cuối cùng của ống tiêu hóa người, có chiều dài từ 1,4m đến 1,8m chiếm 1/5 tổng chiều dài cả ruột non và ruột già. Đường kính của đại tràng to nhất ở manh tràng 6 đến 7cm, giảm dần đến đoạn đại tràng sigma, ở trực tràng có đoạn phình to gọi là bóng trực tràng.



**Hình 1.1: Các đoạn của đại tràng và trực tràng (nguồn: Adam.com) [18]**

Cấu tạo của thành đại tràng nhìn chung có 4 lớp:

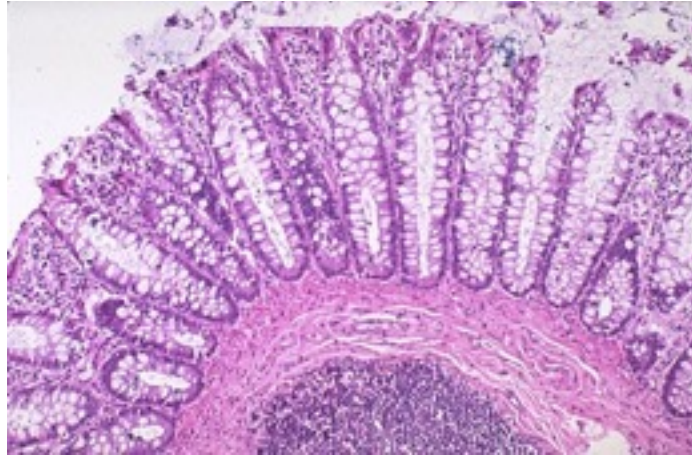
- Lớp thanh mạc tạo bởi lá tạng của phúc mạc có túi thừa mạc nối.
- Lớp dưới thanh mạc: Lớp ngoài là cơ dọc tập chung thành 3 dải cơ.

Phần giữa các dải cơ dọc thành đại tràng rất mỏng. Lớp trong là cơ vòng. Nằm giữa lớp cơ vòng và cơ dọc là mạng thần kinh Auerbach.

- Lớp dưới niêm mạc: là tổ chức liên kết có nhiều mạch máu và thần kinh. Nằm trong lớp dưới niêm mạc là mạng thần kinh Meissner.

- Lớp niêm mạc: Niêm mạc đại tràng không có nhung mao như ruột non. Bề mặt của lòng đại tràng phẳng có nhiều hốc dạng ống thẳng. Các hốc

này chạy dài đến lớp mô đệm, được lót bởi các tế bào bài tiết chế nhầy và đôi khi có tế bào nội tiết. Trong lớp niêm mạc có mô lympho.



**Hình 1.2: Niêm mạc đại tràng bình thường** (nguồn: Gulwani, 2013) [19]

Trực tràng được phúc mạc che phủ phần trên, phần dưới không có phúc mạc che phủ. Lớp cơ trực tràng gồm có hai lớp, lớp cơ dọc ở ngoài, cơ vòng ở trong. Bên trong trực tràng có 3 nếp niêm mạc nhô lên tạo thành 3 nếp ngang hình lưỡi liềm trên, giữa và dưới.

Đại trực tràng được nuôi dưỡng bởi các nhánh của động mạch mạc treo tràng dưới tách ra từ động mạch chủ bụng. Động mạch mạc treo tràng dưới có các nhánh bên: Động mạch đại tràng trái đi lên trên và chia làm hai nhánh. Nhánh lên nối với động mạch đại tràng giữa, nhánh xuống nối với động mạch đại tràng sigma. Các động mạch đại tràng sigma có từ 2 đến 4 nhánh nối với nhau. Động mạch trực tràng trên nối với động mạch sigma và động mạch trực tràng giữa. Tĩnh mạch mạc treo tràng trên nhận máu từ các nhánh của đại tràng lên. Tĩnh mạch mạc treo tràng dưới nhận máu từ các nhánh của đại tràng xuống và đại tràng sigma.

Đại tràng phải có 4 nhóm bạch huyết đại tràng: nhóm nằm sát đại tràng, nhóm nằm dọc theo cung động mạch, nhóm trung gian dọc theo các động mạch và nhóm chính nằm ở gốc các động mạch. Đại tràng trái có 2 nhóm bạch huyết: Nhóm trên theo động mạch đại tràng trái đi về chuỗi hạch chính

gân gốc động mạch mạc treo tràng dưới. Nhóm dưới đi theo tĩnh mạch mạc treo tràng dưới và đi về các hạch sau tụy.

Đại tràng được chi phối bởi các nhánh thần kinh tự động và thần kinh cảm giác. Các sợi thần kinh này xuất phát từ các đám rối thân tạng, mạc treo tràng trên và mạc treo tràng dưới. Phần xa của đại tràng được chi phối bởi các sợi thần kinh xuất phát từ đám rối hạ vị.

#### ***1.1.1.2. Sinh lý đại trực tràng***

Vai trò của đại tràng trong việc giữ cân bằng nước và điện giải là rất quan trọng đối với cơ thể. Các tế bào biểu mô bề mặt niêm mạc đại tràng chịu trách nhiệm chính cho việc hấp thụ. Các tế bào tuyến Lieberkuhn tham gia quá trình tiết dịch nhưng cũng có đóng góp vào sự hấp thụ [20]. Nước được hấp thụ chủ yếu bằng con đường thụ động theo cơ chế thẩm thấu phụ thuộc vào chênh lệch nồng độ  $\text{Na}^+$  trong các tế bào biểu mô niêm mạc đại tràng và lòng ruột [21]. Quá trình hấp thụ nước được thúc đẩy bởi các hormon chống bài niệu. Khi quá trình hấp thụ nước bị ảnh hưởng dẫn đến bị tiêu chảy.

Sự hấp thụ natri diễn ra ở đại tràng rất cần thiết để phục hồi lượng natri cho cơ thể. Trong điều kiện bình thường, đại tràng chủ yếu hấp thụ natri và clorua nhưng tiết bicarbonat và kali [20]. Khoảng 95% natri vận chuyển vào ruột già được hấp thụ. Sự hấp thụ chất điện giải natri trong đại tràng và trực tràng là điều kiện cho quá trình làm khô phân. Quá trình trao đổi natri bị ảnh hưởng bởi Aldosterone, một mineralocorticoid tiết bởi tuyến thượng thận để đáp ứng với tình trạng natri cạn kiệt, mất nước và hormon somatostatin [20].

Khoảng 0,4g đến 1g urê từ ruột non vào đại tràng hàng ngày. Urê được chuyển đổi bởi các vi sinh vật trong đại tràng sau đó là hấp thụ thụ động bởi các tế bào biểu mô bề mặt [22]. Phần lớn các amoniac hấp thụ ở đại tràng thông qua chu trình ruột - gan, tại gan nó được chuyển hóa thành urê [21].

Không giống như ruột non, đại tràng phân giải các chất dinh dưỡng từ các sản phẩm trong lòng ruột thông qua quá trình lên men. Quá trình lên men



xảy ra nhờ các vi khuẩn phân giải carbohydrate và phân giải protein hiện diện trong đại tràng. Có hơn 400 loài vi khuẩn sống trong đại tràng, phần lớn trong số đó là vi khuẩn yếm khí [20]. Sản phẩm cuối cùng quá trình lên men carbohydrate của vi khuẩn chủ yếu là các axit béo chuỗi ngắn như butyrate (15%), propionate (25%), và acetate (60%) [23],[24]. Các axit béo chuỗi ngắn, butyrate thúc đẩy tốt hấp thu nước, natri, clorua từ đại tràng giúp chống lại quá trình tiêu chảy. Acid béo chuỗi ngắn này cũng thúc đẩy quá trình sinh trưởng, biệt hóa tế bào niêm mạc ruột và tế bào có chức năng miễn dịch. Butyrate đã được chứng minh ảnh hưởng đến ung thư đại tràng [25].

### **1.1.2. Các yếu tố nguy cơ ung thư đại trực tràng**

#### ***1.1.2.1. Tiền sử gia đình***

Khoảng 20% những người ung thư đại trực tràng có ít nhất một người thân trong gia đình cũng bị ung thư đại trực tràng. Nếu một người có người thân bị ung thư đại trực tràng thì nguy cơ bị bệnh tăng lên gấp hai lần [26]. Đối với người có tuổi dưới 45 nếu có từ hai người thân bị bệnh ung thư đại trực tràng thì nguy cơ tăng lên gấp năm lần [27].

#### ***1.1.2.2. Chế độ ăn uống***

Chế độ ăn uống nhiều các loại thịt đỏ làm tăng nguy cơ ung thư đại trực tràng. Một trong những giả thuyết về cơ chế thịt đỏ liên quan đến ung thư đại trực tràng là do thịt đỏ chứa nhiều sắt làm tăng sắt huyết thanh khi ăn nhiều [28]. Chế độ ăn có nhiều chất xơ và ít chất béo bão hòa có thể giúp giảm nguy cơ ung thư ruột.

#### ***1.1.2.3. Nghiện thuốc lá***

Nghiện thuốc lá làm tăng 25% nguy cơ ung thư nói chung trong đó có ung thư đại trực tràng và các bệnh tim mạch so với người không hút thuốc. Một nghiên cứu bệnh chứng tại Nhật Bản cho thấy hút thuốc trong 10 năm có liên quan đáng kể với nguy cơ ung thư biểu mô tuyến đại tràng sigma và trực tràng [29]. Ảnh hưởng của hút thuốc đến ung thư đại trực tràng đã được quan

sát có liên quan đến số lượng thuốc lá tiêu thụ và độ tuổi bắt đầu hút thuốc [30].

#### ***1.1.2.4. Nghiện rượu***

Các nghiên cứu cho thấy rượu có liên quan đến ung thư đại trực tràng. Ngay cả một lượng rượu nhỏ có thể làm tăng nguy cơ ung thư đại trực tràng, nếu một người uống rượu trên một ly trong ngày làm tăng nguy cơ ung thư đại trực tràng [31].

#### ***1.1.2.5. Béo phì***

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh béo phì có liên quan đến ung thư đại trực tràng. Béo phì làm tăng nguy cơ ung thư đại trực tràng là 1,41 ở nam giới so với 1,08 ở nữ giới, nếu chỉ số khối cơ thể BMI (Body mass index) tăng 2 kg/m<sup>2</sup> thì nguy cơ ung thư đại trực tràng tăng 7%, nếu tăng 2 cm chu vi vòng eo thì nguy cơ ung thư đại trực tràng tăng 4% [32].

#### ***1.1.2.6. Lối sống ít vận động***

Nguy cơ ung thư đại trực tràng tăng lên ở những người có lối sống ít vận động so với những người có lối sống vận động thường xuyên. Nguy cơ ung thư đại trực tràng giảm đi 1% ở những người tập thể dục mạnh mẽ mỗi một giờ/ngày hoặc mỗi hai giờ thể dục vừa phải/ngày [33].

#### ***1.1.2.7. Bệnh viêm loét đại trực tràng***

Một số bệnh viêm loét đại trực tràng làm tăng cơ ung thư đại trực tràng [34]. Những người bị hội chứng viêm loét đại trực tràng chảy máu có cơ ung thư đại trực tràng cao gấp 2 đến 4 lần so với người không bị [35]. Nguy cơ bị ung thư ở người mắc hội chứng viêm loét đại trực tràng chảy máu có kèm theo dò hậu môn trực tràng cao hơn so với người không có lỗ dò [36].

#### ***1.1.2.8. Yếu tố di truyền***

Bệnh đa polyp tuyến gia đình (Familial adenomatous polyposis - FAP) là bệnh di truyền do đột biến gen APC gây ra. Người bị bệnh có rất nhiều polyp hình thành từ lớp biểu mô của đại trực tràng. Những polyp này ban đầu

lành tính nếu không được loại bỏ sẽ chuyển thành ác tính và bệnh chuyển thành ung thư đại trực tràng. Tỷ lệ đột biến gen APC gây bệnh FAP từ 1/10.000 đến 1/15.000 người. Hầu hết số người bệnh sẽ chuyển thành ung thư đại trực tràng nếu polyp không được loại bỏ ở tuổi 40 vì vậy phẫu thuật dự phòng trước tuổi 25 được khuyến cáo cho người bị FAP [37].

Hội chứng Lynch (HNPCC - hereditary nonpolyposis colorectal cancer) là bệnh di truyền nhiễm sắc thể xảy ra do sai sót quá trình sửa chữa DNA được Henry T. Lynch phát hiện vào năm 1966 [38]. Khoảng 2-5% trường hợp ung thư đại trực tràng là do HNPCC. Khoảng 90% nam giới và 70% phụ nữ có đột biến HNPCC sẽ phát triển ung thư đại trực tràng trước tuổi 70 [39].

### **1.1.3. Đặc điểm lâm sàng**

#### ***1.1.3.1. Tuổi và giới***

Ung thư đại trực tràng gặp nhiều nhất ở tuổi từ 50 đến 70, tuổi trung bình trong các nghiên cứu thường trên 60 tuổi [40]. Tỷ lệ người bệnh nam giới thường cao hơn nữ giới [40],[41].

#### ***1.1.3.2. Thay đổi thói quen đi ngoài***

Thay đổi thói quen đi ngoài như phân lúc táo, lúc lỏng mà không rõ nguyên nhân, đi ngoài cảm giác không hết phân, khuôn phân thu nhỏ, thay đổi hình dạng khuôn [42],[43]. Thay đổi thói quen đi ngoài thường gặp ở ung thư đại tràng trái nhiều hơn bên phải [44]. Thay đổi thói quen đi ngoài phổ biến hơn ở người bệnh nam giới, người bệnh dưới 60 tuổi [40].

#### ***1.1.3.3. Thiếu máu***

Thiếu máu thiếu sắt xảy ra khi người bệnh bị chảy máu âm ỉ trong thời gian dài. Người bệnh có biểu hiện mệt mỏi, ăn kém, gầy sút, da xanh tái, đau đầu, chóng mặt, bàn tay bàn chân lạnh, niêm mạc hồng nhạt, móng tay móng chân dễ gãy. Các yếu tố tuổi, vị trí khối u và kích thước khối u có liên quan đến biểu hiện thiếu máu, các yếu tố phân loại mô bệnh học, giai đoạn bệnh không liên quan đến biểu hiện thiếu máu [45],[46].

#### **1.1.3.4. Đau bụng**

Đau do tổ chức ung thư xâm lấn, phá huỷ các tổ chức xung quanh, các dây thần kinh [47]. Đau bụng có thể xảy ra ở tất cả các vị trí của đại tràng do khối u phát triển to lên gây chít hẹp lòng đại trực tràng, xâm lấn đến các tạng khác hoặc di căn phúc mạc. Đau bụng thường không điển hình và theo một số tác giả xảy ra trong 21% đến 60% số trường hợp, cơn đau xảy ra thường xuyên hơn ở người bệnh ung thư đại trực tràng giai đoạn muộn [43],[46],[48]. Đau bụng có liên quan chặt chẽ với giai đoạn ung thư đại trực tràng [44].

#### **1.1.3.5. Phân có máu**

Phân có máu là hiện tượng có hồng cầu trong phân. Mức độ phân có máu khác nhau tùy theo người bệnh, có người bệnh nhìn thấy máu lẫn trong phân, có người bệnh phải xét nghiệm tìm máu trong phân, một số người bệnh phân có máu nhiều phải vào viện với bệnh cảnh chảy máu đường tiêu hóa. Phân có máu có thể nhầm lẫn với nhiều bệnh lành tính khác nên nhiều người bệnh chủ quan không đi khám bệnh sớm, khi đã nhìn thấy máu trong phân thì thường bệnh đã ở giai đoạn muộn [49]. Phân có máu có liên quan đến vị trí của khối u, tỷ lệ bệnh nhân có biểu hiện phân có máu tăng lên dần từ ung thư đại tràng phải đến đại tràng trái và cao nhất là ở trực tràng, không thấy sự liên quan giữa phân có máu với các giai đoạn của bệnh [44].

#### **1.1.3.6. Sờ thấy khối u**

Khi đã sờ thấy khối u ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng thì bệnh thường đã ở giai đoạn muộn, khối u đã lớn hoặc có những biến chứng xảy ra làm người bệnh phải đi viện do hậu quả của các biến chứng này. Chỉ một số ít bệnh nhân ung thư đại trực tràng phát hiện bệnh do sờ thấy khối u trên thành bụng. Trong nghiên cứu của Flashman K và cộng sự thấy chỉ có 15,7% số bệnh nhân ung thư đại tràng sờ thấy khối u ổ bụng và 32,7% số bệnh nhân ung thư trực tràng sờ thấy khối u vùng trực tràng [50].

#### **1.1.4. Đặc điểm cận lâm sàng**

##### ***1.1.4.1. Chụp X quang đại trực tràng có cản quang***

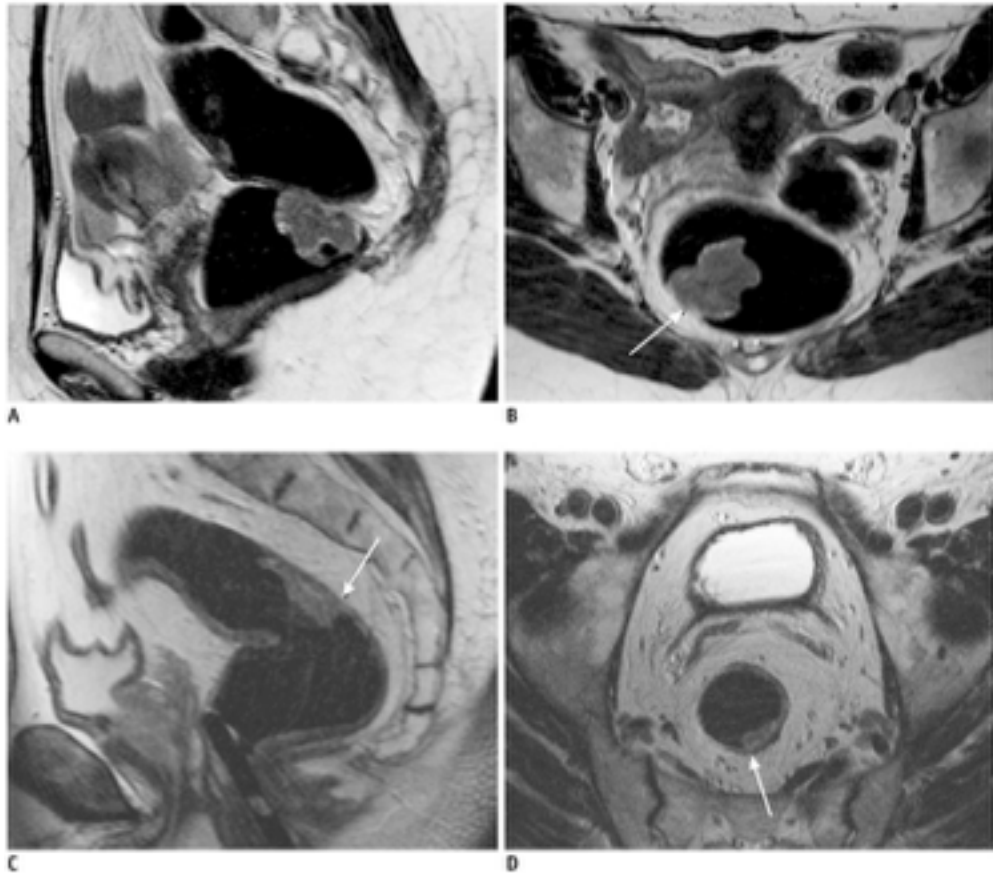
Chụp đại trực tràng có thuốc cản quang có thể thấy khối u xâm chiếm vào lòng ruột với đường bờ không đều, lòng đại trực tràng hẹp lại. Hạn chế của kỹ thuật này là khó phát hiện ung thư giai đoạn sớm, khó phân biệt được ung thư hay polyp lành tính, khó phát hiện được tổn thương ở vùng manh tràng và bóng trực tràng. Tuy nhiên đây là phương pháp an toàn, hiệu quả và có độ đặc hiệu cao trong chẩn đoán các polyp và khối ung thư có đường kính trên 1cm, khả năng phát hiện các khối u trên 1cm được báo cáo từ 90% đến 95% các trường hợp [51].

##### ***1.1.4.2. Chụp cắt lớp đại trực tràng (CT-Computed Tomography)***

Chụp cắt lớp đại trực tràng cho hình ảnh chi tiết các mô mềm, khối u đại trực tràng, cho phép phát hiện những di căn ở gan và các vị trí khác. Những người bệnh có biến chứng tắc ruột, không chấp nhận hoặc chống chỉ định nội soi đại trực tràng thì chụp cắt lớp đại trực tràng là biện pháp rất có giá trị chẩn đoán. Hình ảnh chụp cắt lớp của khối ung thư là khối có đậm độ mô mềm làm thành ruột dày lên, xâm chiếm làm hẹp lòng đại tràng, có thể nhìn thấy vùng loét trên những khối u lớn hoặc những nốt vôi hóa. Chụp cắt lớp có thể phát hiện được tổn thương ung thư hoặc polyp lớn trên 10mm với độ nhạy từ 90 đến 96% [52],[53], phát hiện xâm lấn tại chỗ, di căn hạch, di căn gan của ung thư đại trực tràng [54],[55].

##### ***1.1.4.3. Chụp cộng hưởng từ (MRI)***

Chụp MRI giúp đánh giá được tình trạng xâm lấn và di căn trong chẩn đoán giai đoạn của ung thư đại trực tràng, giúp cho phẫu thuật viên lựa chọn chính xác vùng giải phẫu và theo dõi sự tái phát của khối u sau phẫu thuật [56],[57].

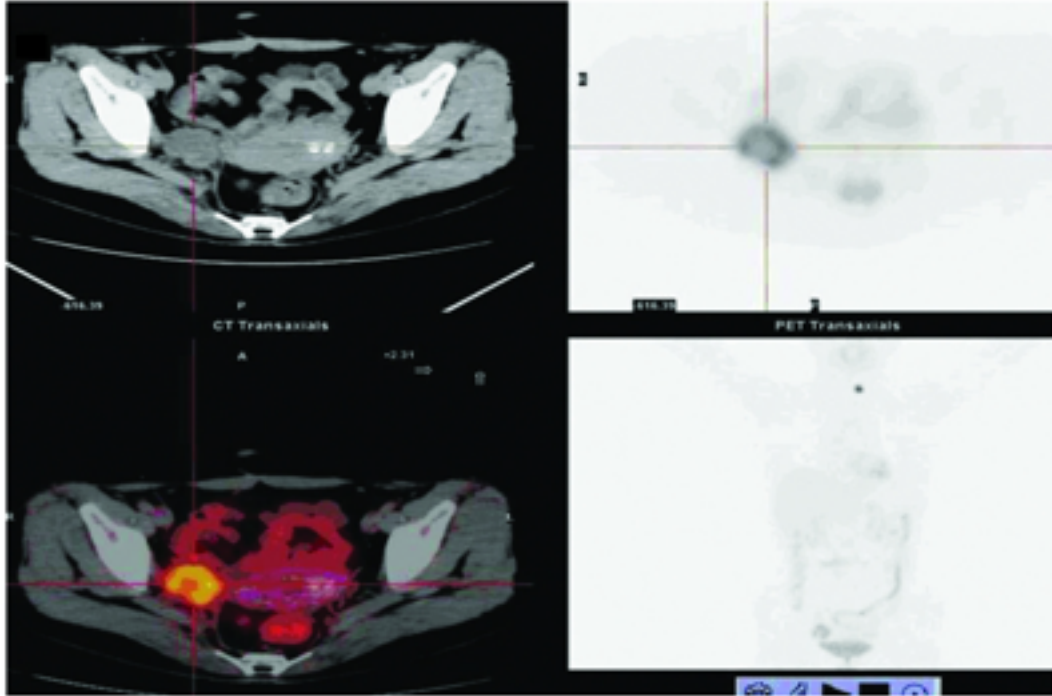


**Hình 1.3: Hình ảnh chụp MRI ung thư trực tràng** (nguồn: Iannicelli E, 2014) [58] {Hình ảnh MRI cắt dọc (A) và cắt ngang (B) cho thấy khối ung thư xâm lấn vào lòng trực tràng (mũi tên). Hình cắt dọc (C) và cắt ngang (D) cho thấy khối u giới hạn ở lớp cơ (mũi tên).}

**1.1.4.4. Chụp cắt lớp phát xạ PET/CT (PET scan Positron emission tomography/computed tomography)**

PET scan cho biết được một vùng bất thường trên hình ảnh có phải là ung thư hay không mà với kỹ thuật CT hoặc MRI không khẳng định được. PET scan cũng giúp phát hiện sự di căn của khối u trên phạm vi toàn cơ thể. Trong ung thư đại trực tràng, PET Scan rất có giá trị để theo dõi sự tái phát của bệnh khi các xét nghiệm hóa sinh ung thư ở giới hạn bình thường [59]. PET/CT phát hiện được tổn thương xâm lấn của khối u và tình trạng di căn

xa: gan, phổi, hạch, phúc mạc, xương tốt hơn so với CT và MRI với giá trị SUV max cao [60].



**Hình 1.4: Hình ảnh chụp PET/CT di căn hạch của ung thư đại trực tràng** (nguồn: Bu W, 2014) [61] (Hình ảnh chụp PET/CT cho thấy sự tăng hấp thụ của  $^{18}\text{F}$ -FDG trong hạch bạch huyết vùng chậu bên phải).

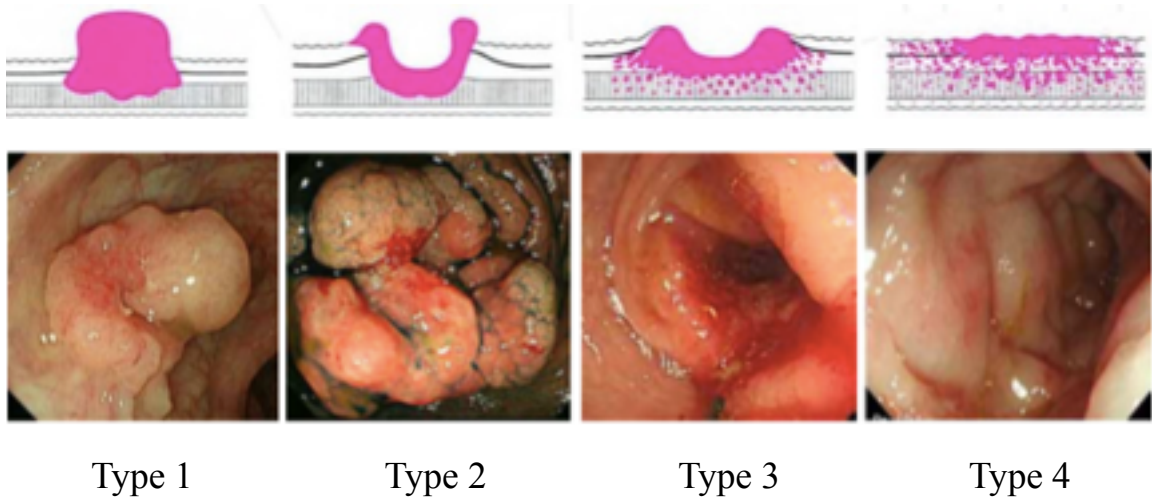
#### ***1.1.4.5. Nội soi đại trực tràng***

Nội soi đại trực tràng là kỹ thuật quan trọng trong chẩn đoán và điều trị các bệnh lý của đại trực tràng trong đó có ung thư. Nội soi được sử dụng để chẩn đoán, điều trị và theo dõi tái phát của ung thư đại trực tràng. Kỹ thuật nội soi có độ nhạy rất cao trong chẩn đoán tổn thương ung thư đại trực tràng từ 94,7% đến 98,08% [62],[63],[64].

Trên nội soi đại trực tràng hình ảnh tổn thương ung thư đại trực tràng được chia làm 6 loại theo phân loại Paris 2002 [65]:

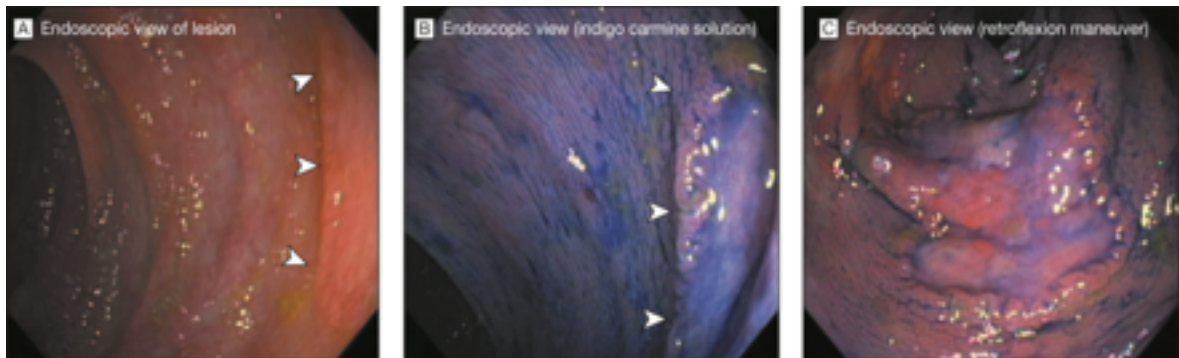
- Type 0: Tổn thương dạng ung thư dạng nhú lồi, phẳng;
- Type 1: Tổn thương ung thư dạng sùi;
- Type 2: Tổn thương ung thư dạng loét;

- Type 3: Tổn thương ung thư dạng loét và sùi kết hợp;
- Type 4: Tổn thương ung thư dạng thâm nhiễm;
- Type 5: Tổn thương ung thư dạng không thể phân loại được.



**Hình 1.5: Tổn thương ung thư đại trực tràng trên nội soi** (nguồn: Hiroyuki K, 2012) [66] (hình ảnh tổn thương tương ứng từ type 1 - type 4)

Trong quá trình nội soi có thể sử dụng các chất nhuộm màu nhằm bộc lộ những tổn thương nhỏ, nghi ngờ nhất là các tổn thương dạng phẳng.



**Hình 1.6: Hình ảnh nhuộm màu nhằm bộc lộ tổn thương khó phát hiện khi soi thông thường** (nguồn: Soetikno R.M, 2008) [67]

Hình ảnh tổn thương ung thư qua nội soi đại trực tràng đa số là ung thư phát triển lồi vào trong lòng đại trực tràng (dạng sùi), bề mặt thường xù xì, nhám nhờ giống san hô, có thể chảy máu ở những vùng hoại tử, các hình thái u dạng loét và dạng thâm nhiễm (dạng không sùi) có số lượng rất ít [67]. Sử



dụng các chất nhuộm màu làm bộc lộ vùng tổn thương giúp sinh thiết được chính xác góp phần chẩn đoán sớm để điều trị kịp thời.

#### ***1.1.4.6. Xét nghiệm tìm máu trong phân***

Xét nghiệm tìm máu trong phân dùng để khám sàng lọc giúp phát hiện sớm ung thư đại trực tràng [9],[67]. Khi phát hiện thấy máu trong phân của người bệnh thì cần tiến hành các thăm khám bổ sung để tìm ra nguyên nhân gây chảy máu trong đó có nguyên nhân ung thư, polyp.

#### ***1.1.4.7. Xét nghiệm kháng nguyên CEA (Carcinoembryonic antigen)***

Sự kết hợp của xét nghiệm kháng nguyên CEA với các kỹ thuật hình ảnh và khám lâm sàng có thể giúp theo dõi sự đáp ứng với hóa trị, đặc biệt là trong những trường hợp các phương pháp chẩn đoán hình ảnh không đo lường được. CEA tăng là chỉ số thường gặp nhất ở những bệnh nhân tái phát không triệu chứng và hiện nay là chỉ số hữu ích nhất để phát hiện sớm di căn gan ở những bệnh nhân sau phẫu thuật [68],[69]. Những bệnh nhân mà nồng độ CEA huyết thanh ban đầu cao có tỷ lệ tái phát cao hơn hoặc thời gian tái phát ngắn hơn so với bệnh nhân có nồng độ CEA huyết thanh ban đầu bình thường [70],[71].

#### ***1.1.4.8. Xét nghiệm CA 19-9 (Cancer antigen 19-9)***

Xét nghiệm kháng nguyên CA 19-9 có độ nhạy của thấp hơn so với xét nghiệm kháng nguyên CEA ở tất cả các giai đoạn của ung thư đại trực tràng [69]. Sự gia tăng nồng độ CA 19-9 trước khi có biểu hiện lâm sàng chỉ xuất hiện ở 25% đến 50% số bệnh nhân ung thư đại trực tràng tái phát [72]. Độ nhạy của xét nghiệm CA 19-9 trong phát hiện ung thư đại trực tràng tăng lên tương ứng với mức độ bệnh theo phân loại Dukes [70],[73]. Xét nghiệm CA 19-9 được sử dụng để theo dõi sự tái phát của bệnh [71]. Người bệnh có nồng độ CA 19-9 huyết thanh trước phẫu thuật càng cao có tiên lượng càng xấu [73].

#### **1.1.4.9. Xét nghiệm mô bệnh học**

**Phân loại mô học:** Theo phân loại WHO-2010, ung thư đại trực tràng gồm các typ mô bệnh học như sau [74]:

- Các u biểu mô:

- Ung thư biểu mô tuyến
- Ung thư biểu mô tủy
- Ung thư biểu mô tuyến nhú
- Ung thư biểu mô tuyến nhày
- Ung thư biểu mô tuyến “răng cưa” (Seratted Adenocarcinoma)
- Ung thư biểu mô tế bào nhẵn
- Ung thư biểu mô tuyến vảy
- Ung thư biểu mô tế bào hình thoi
- Ung thư biểu mô tế bào vảy
- Ung thư biểu mô không biệt hóa.

- Các u thần kinh nội tiết:

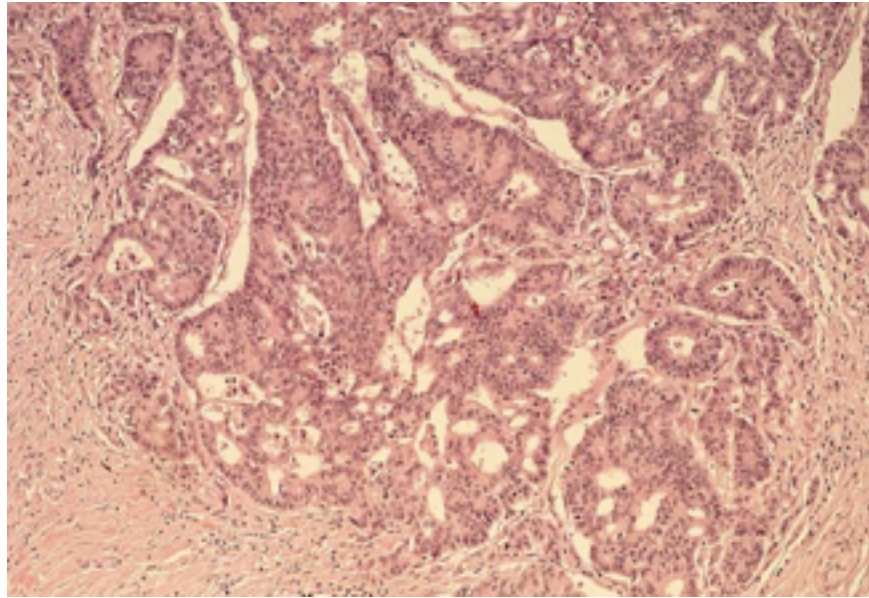
- U thần kinh nội tiết độ I (Carcinoid Tumor)
- U thần kinh nội tiết độ II (Atypical Carcinoid Tumor)
- Carcinôm thần kinh nội tiết: gồm tế bào nhỏ và tế bào lớn, thể

hỗn hợp.

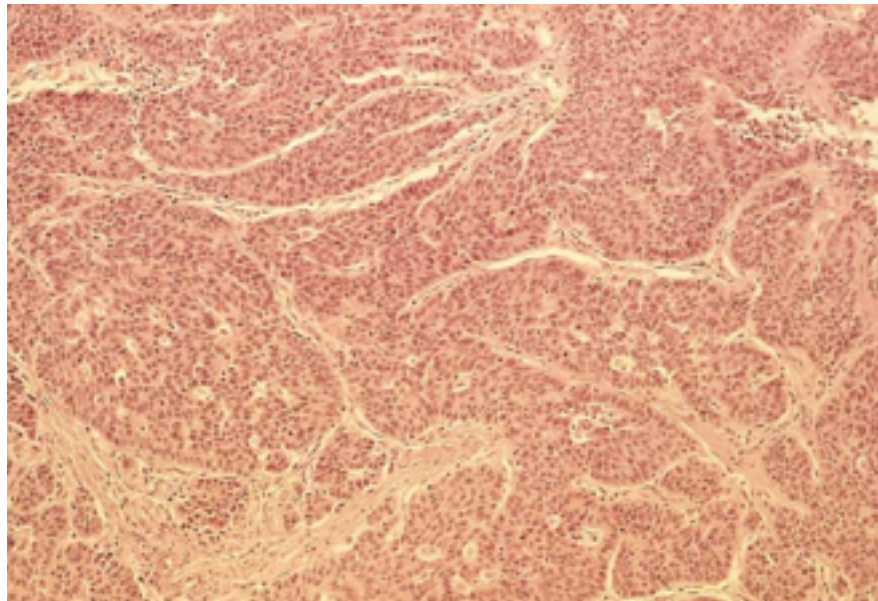
#### **Phân độ mô học:**

Dựa trên sự hình thành cấu trúc tuyến của tổ chức ung thư, xét nghiệm mô bệnh học của ung thư đại trực tràng thường được chia làm 04 mức độ mô bệnh học: biệt hóa cao, biệt hóa vừa, biệt hóa thấp và không biệt hóa [75].

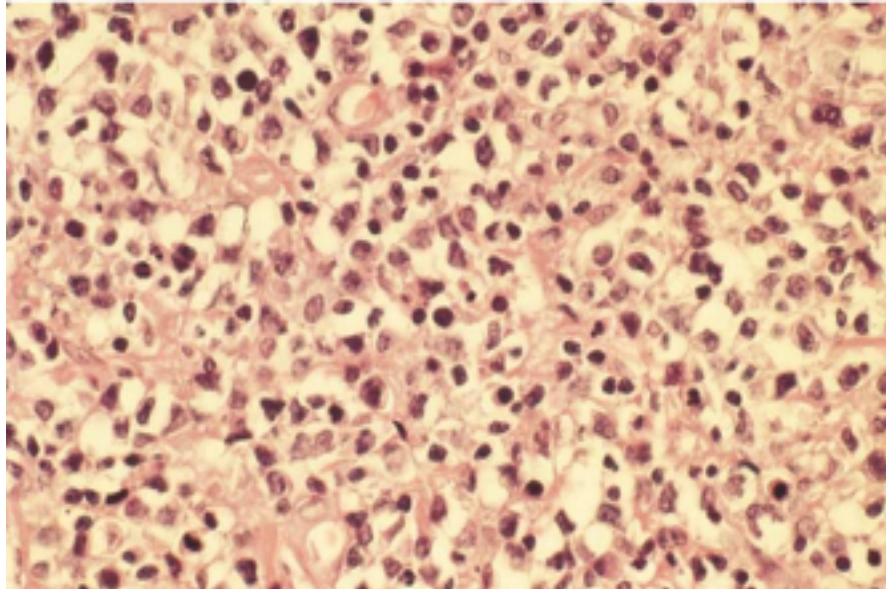
- Biệt hóa cao: Trên 95% có cấu trúc tuyến.
- Biệt hóa vừa: từ 50% đến 95% có cấu trúc tuyến.
- Biệt hóa kém: dưới 50% có cấu trúc tuyến.
- Không biệt hóa: không thấy cấu trúc tuyến.



**Hình 1.7: Hình ảnh ung thư đại trực tràng biệt hóa cao với cấu trúc tuyến hình thành rõ (nguồn Carolyn C.C, 2000) [76]**



**Hình 1.8: Hình ảnh ung thư đại trực tràng biệt hóa kém không hình thành cấu trúc tuyến (nguồn Carolyn C.C, 2000) [76]**



**Hình 1.9: Hình ảnh ung thư đại trực tràng không biệt hóa không hình thành cấu trúc tuyến** (nguồn Carolyn C.C, 2000) [76]

Ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng chiếm 95 đến 97% các loại ung thư đại trực tràng. Thể biệt hóa vừa và biệt hóa cao có tỷ lệ cao hơn thể biệt hóa kém và không biệt hóa [77],[78]. Một số nghiên cứu chứng minh hệ thống phân loại chia làm hai mức độ: mức độ ác tính cao (bao gồm thể biệt hóa kém và không biệt hóa) và mức độ ác tính thấp (bao gồm thể biệt hóa cao và biệt hóa vừa) có giá trị tiên lượng tốt [79],[80].

### **1.1.5. Chẩn đoán giai đoạn**

#### **1.1.5.1. Phân loại TNM**

Hệ thống TNM dựa trên kích thước và/hoặc mức độ xâm lấn của khối u nguyên phát (T), số lượng di căn đến các hạch bạch huyết (N), sự hiện diện của di căn (M) hoặc khối u thứ phát được hình thành bởi sự lây lan của các tế bào ung thư đến các bộ phận khác của cơ thể.

Phân loại TNM theo AJCC 7 [81]:

- Khối u nguyên phát (T):

Tx: Khối u không thể đánh giá được.

To: Không có bằng chứng của khối u nguyên phát.

Tis: Ung thư biểu mô tại chỗ (trong lớp niêm mạc).

T1: Khối u xâm lấn lớp dưới niêm mạc.

T2: Khối u xâm lấn tới lớp cơ.

T3: Khối u xâm lấn qua lớp cơ nhưng chưa qua lớp thanh mạc.

T4a: Khối u xâm lấn vào lớp phúc mạc tạng.

T4b: Khối u xâm lấn trực tiếp các cơ quan khác.

- Hạch bạch huyết khu vực (N):

Nx: Các hạch bạch huyết khu vực không xác định di căn.

No: Không có di căn hạch.

N1a: Di căn trong 1 hạch bạch huyết khu vực.

N1b: Di căn trong 2-3 hạch bạch huyết khu vực.

N1c: Khối u phát triển qua lớp thanh mạc quanh đại trực tràng nhưng chưa có hạch di căn khu vực.

N2a: Di căn trong 4-6 hạch bạch huyết khu vực.

N2b: Di căn 7 hoặc nhiều hơn hạch bạch huyết khu vực.

- Di căn xa (M):

Mx: Không xác định di căn xa.

Mo: Không có di căn xa.

M1: Di căn xa.

M1a: Di căn đến một cơ quan.

M1b: Di căn từ hai cơ quan.

#### ***1.1.5.2. Chẩn đoán giai đoạn theo TNM***

Phân loại giai đoạn theo SJCC 7, ung thư đại trực tràng được chia làm 5 giai đoạn từ giai đoạn 0 đến giai đoạn IV [81]:

- Giai đoạn 0: Tis N0 M0.

- Giai đoạn I: T1 N0 M0, T2 N0 M0.

- Giai đoạn II:

IIa: T3 N0 M0;

Iib: T4a N0 M0;

Iic: T4b N0 M0.

- Giai đoạn III:

IIIa: T1-T2 N1/N1c M0, T1 N2a M0;

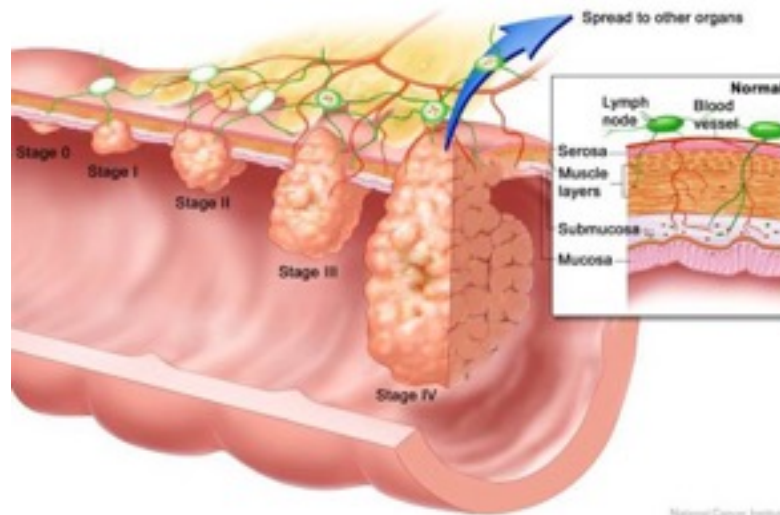
IIIb: T3-T4a N1/N1c M0, T2-T3 N2a M0, T1-T2 N2b M0;

IIIc: T4a N2a M0, T3-T4a N2b M0, T4b N1-N2 M0.

- Giai đoạn IV:

IVa: Any T Any N M1a;

IVb: Any T Any N M1b.



**Hình 1.10: Năm giai đoạn ung thư đại trực tràng theo TNM** (nguồn: Edge S.B, 2010) [81] (Sự phát triển của khối u theo năm giai đoạn)

#### **1.1.5.3. Phân loại theo Dukes** [82]

Dukes A: Khối u còn giới hạn ở lớp niêm mạc hoặc chạm tới lớp cơ thành đại trực tràng.

Dukes B: Khối u vượt qua lớp niêm mạc vào tới lớp cơ nhưng chưa di căn hạch.

Dukes C: Ung thư đã lan đến ít nhất một hạch bạch huyết khu vực.

Dukes D: Ung thư đã lan đến một cơ quan khác trong cơ thể.

### 1.1.6. Điều trị ung thư đại trực tràng

Các phương pháp điều trị ung thư đại trực tràng bao gồm:

- Phẫu thuật
- Xạ trị
- Hóa trị
- Điều trị đích.

Tùy thuộc vào giai đoạn của ung thư, các phương pháp điều trị khác nhau có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp đồng thời nhằm phát huy hiệu quả tối đa của mỗi phương pháp. Trong lựa chọn kế hoạch điều trị, một trong những yếu tố quan trọng nhất là đánh giá giai đoạn của ung thư. Các yếu tố khác để xem xét bao gồm sức khỏe tổng thể của người bệnh, các yếu tố về kinh tế và xã hội có ảnh hưởng đến lựa chọn phương pháp điều trị cho mỗi người bệnh.

#### *Giai đoạn 0:*

Vì ung thư chỉ ở lớp biểu mô tại chỗ của đại trực tràng, phẫu thuật loại bỏ tổ chức ung thư là biện pháp cần thiết và càng sớm càng tốt. Biện pháp phẫu thuật có thể được thực hiện bằng kỹ thuật cắt polyp (loại bỏ polyp ung thư hóa) hoặc cắt bỏ khối ung thư (cắt hết niêm mạc) thông qua nội soi đại tràng. Trường hợp khối u lớn hoặc ở vị trí khó không thể thực hiện qua nội soi thì cần phẫu thuật mở nhằm loại bỏ khối u.

#### *Giai đoạn I:*

Những trường hợp khối ung thư đã phát triển qua lớp dưới niêm mạc và lớp cơ nhưng chưa qua lớp thanh mạc và chưa có di căn đến các hạch. Phẫu thuật loại bỏ các phần của đại trực tràng có ung thư và các hạch bạch huyết là biện pháp điều trị tiêu chuẩn mà không cần điều trị hóa chất bổ sung.

#### *Giai đoạn II:*

Trường hợp khối ung thư đã phát triển thông qua các lớp của đại trực tràng và có thể phát triển đến mô lân cận nhưng chưa lây lan đến các hạch



bạch huyết và chưa có di căn đến các tạng khác. Phẫu thuật là biện pháp điều trị duy nhất cần thiết. Điều trị hoá chất (hóa trị) được thực hiện trong những trường hợp nguy cơ tái phát cao như:

- Ung thư có tế bào thể ác tính cao (không biệt hóa hoặc kém biệt hóa).
- Ung thư đã phát triển đến các cơ quan lân cận.
- Quá trình phẫu thuật đã không loại bỏ ít nhất 12 hạch bạch huyết.
- Ung thư được tìm thấy tại phần ranh giới của tổ chức phẫu thuật (khả năng còn sót tế bào ung thư).

- Ung thư gây tắc hoặc thủng đại trực tràng.

Xạ trị có thể được thực hiện để cố gắng loại bỏ các tế bào ung thư còn sót lại nhất là trong ung thư trực tràng.

#### *Giai đoạn III:*

Trong giai đoạn này, ung thư đã lan đến hạch bạch huyết lân cận, nhưng chưa lây lan sang các tạng khác. Phẫu thuật cùng với điều trị hóa chất bổ trợ là biện pháp điều trị tiêu chuẩn. Phẫu thuật kết hợp xạ trị có thể được thực hiện để loại bỏ các tế bào ung thư còn sót lại nhất là trong ung thư trực tràng. Ở những người không đủ sức khỏe để phẫu thuật, xạ trị và hoặc hóa trị có thể được thực hiện.

#### *Giai đoạn IV:*

Ung thư đã di căn đến các cơ quan và các mô ở xa. Ung thư đại tràng thường di căn đến gan, nhưng nó cũng có thể di căn đến những nơi khác như phổi, màng bụng, hoặc các hạch bạch huyết ở xa. Trong hầu hết các trường hợp phẫu thuật là không thể loại bỏ hết các tổ chức ung thư. Tuy nhiên, nếu chỉ có một vài khu vực nhỏ có di căn như trong gan hoặc phổi và có thể loại bỏ hoàn toàn cùng với ung thư đại trực tràng, phẫu thuật có thể giúp loại bỏ tổ chức ung thư hoặc kéo dài thời gian sống cho người bệnh. Điều trị hóa chất cần được tiến hành trước và sau phẫu thuật. Trong một số trường hợp tổn thương di căn quá lớn hoặc có nhiều không thể phẫu thuật cắt bỏ, các biện



pháp gây tắc động mạch đến khối u gan có thể được sử dụng kết hợp với điều trị hóa chất. Một số phương pháp nhằm tiêu diệt các khối u trong gan như phẫu thuật lạnh, phẫu thuật bằng sóng Radio có thể được thực hiện.

Trường hợp tổ chức ung thư phát triển lan tràn không thể loại bỏ bằng phẫu thuật, biện pháp mở thông ruột làm hậu môn nhân tạo trên khối u là cần thiết để đảm bảo lưu thông ruột. Một số trường hợp có thể tránh được làm hậu môn nhân tạo bằng cách đặt một ống đỡ (bằng kim loại hoặc nhựa - Stent) vào đại tràng qua nội soi để đảm bảo lưu thông ruột. Hầu hết các bệnh nhân ung thư đại trực tràng giai đoạn IV đều cần được điều trị hóa chất và hoặc liệu pháp điều trị đích để kiểm soát ung thư. Các phác đồ điều trị hóa chất được lựa chọn dựa trên đáp ứng điều trị và tình trạng xét nghiệm gen của từng người bệnh. Đối với người bệnh ung thư tiến triển, xạ trị cũng có thể được sử dụng để giúp ngăn ngừa hoặc làm giảm triệu chứng đau.

## **1.2. CÁC CON ĐƯỜNG TÍN HIỆU VÀ ĐỘT BIẾN GEN TRONG UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG**

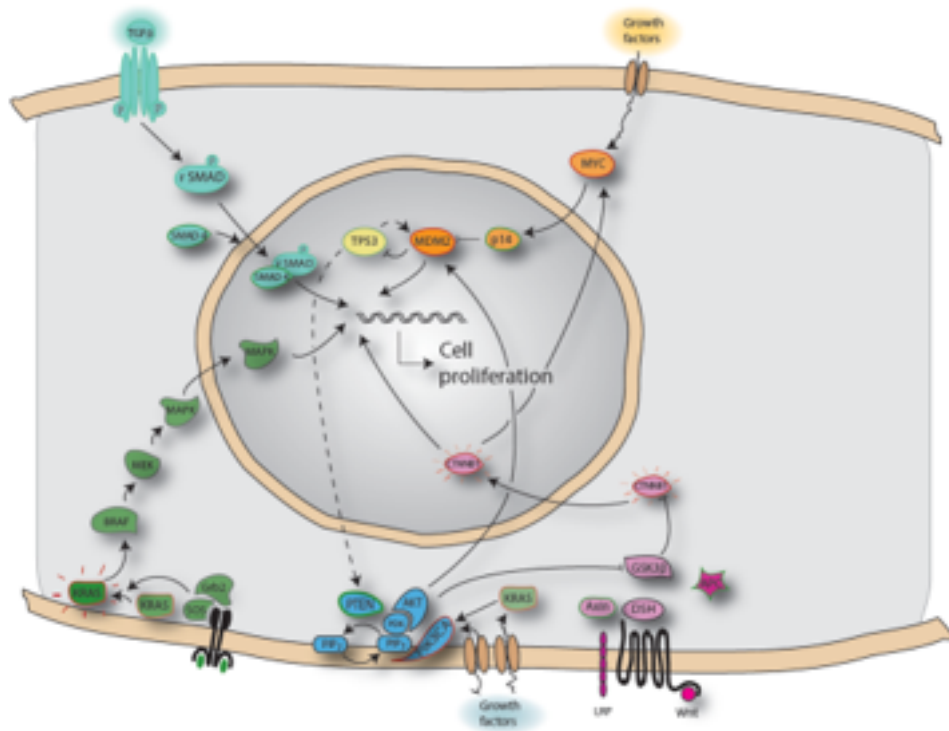
### **1.2.1. Các con đường tín hiệu trong ung thư đại trực tràng**

#### ***1.2.1.1. Con đường tín hiệu từ EGFR trong ung thư đại trực tràng***

Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR - Epidermal growth factor receptor) có trên bề mặt tế bào có ái lực cao với yếu tố phát triển biểu mô (EGF - Epidermal growth factor). Khi EGF gắn với EGFR sẽ kích hoạt hoạt tính tyrosine kinase nội bào của thụ thể. Tiếp theo, các tyrosine kinase sẽ khởi động một dòng thác tín hiệu để tác động lên nhiều quá trình hóa sinh trong tế bào như: tăng nồng độ  $Ca^{2+}$  nội bào, tăng cường quá trình đường phân và sinh tổng hợp protein, tăng quá trình biểu hiện một số gen kể cả gen mã hóa EGFR, thúc đẩy quá trình tái bản của DNA và quá trình phân chia tế bào [83]. EGFR đã được chứng minh có biểu hiện quá mức ở người bệnh ung thư đại trực tràng và cũng là đích nhắm đến của liệu pháp điều trị bằng kháng thể đơn dòng [83],[84].

### 1.2.1.2. Con đường tín hiệu Wnt (Wingless-integration)

Có hơn 20 yếu tố thuộc vào gia đình yếu tố phát triển Wnt ở con người. Đó là các protein có trọng lượng phân tử khoảng 40 kDa. Điểm quyết định của con đường này chính là sự liên kết và hoạt hóa  $\beta$ -catenin. Trong khi chất này bị ức chế bởi hoạt động phối hợp của một số protein gồm APC, axin và GSK3 $\beta$ . Hoạt động liên tục của con đường này đặc biệt có ý nghĩa trong ung thư đại trực tràng. Sự mất điều hòa của con đường Wnt là do mất chức năng của các chất điều hòa âm tính như APC hoặc axin hoặc bởi sự đột biến sinh ung thư hoạt hóa  $\beta$ -catenin. Vì vậy, APC và CTNNB1 (mã hóa cho  $\beta$ -catenin) được xem như chất ức chế khối u và chất sinh ung thư [83].



**Hình 1.11: Các con đường tín hiệu trong ung thư đại trực tràng (nguồn: Berg M, 2011) [85].**

### 1.2.1.3. Con đường tín hiệu ERK/MAPK (*Extracellular regulated kinases/ Mitogen activated protein kinase*)

Con đường ERK/MAPK là một trong những con đường tín hiệu quan trọng nhất cho sự phát triển tế bào. Các con đường MAPK nằm ở hạ lưu của nhiều thụ thể yếu tố tăng trưởng, trong đó có các yếu tố tăng trưởng biểu bì EGFR. Hoạt động quá mức và sự kích hoạt các thụ thể này thường được phát hiện trong ung thư đại trực tràng và cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự tiến triển của bệnh ung thư này. Con đường ERK/MAPK có thể được hoạt hóa thông qua protein Ras. Sự hoạt hóa con đường ERK/MAPK là yếu tố quyết định nhất đối với sự kích thích tăng sinh tế bào ung thư song song với sự biến đổi của Ras [83].



**Hình 1.12: Con đường tín hiệu RAS/MAPK từ EGFR** (nguồn: Berg M, 2012) [86] (Tín hiệu từ EGFR theo con đường tín hiệu nội bào KRAS/BRAF và con đường PI3K/AKT trong ung thư đại trực tràng).

### 1.2.1.4. Con đường tín hiệu phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

Enzym PI3K xúc tác quá trình phosphoryl hóa phosphatidylinositol và các dẫn chất của chất này để tạo ra các chất dẫn truyền thông tin thứ cấp điều hòa các hoạt động của tế bào như quá trình sao chép và sinh tổng hợp protein, quá trình phân chia và chết tế bào... PI3K được hoạt hóa bởi protein Ras,

nhưng chính enzym này cũng có khả năng tác động vào điểm then chốt của các con đường tín hiệu của Ras. Con đường tín hiệu PI3K là con đường tín hiệu ung thư, các chất ức chế con đường này như PTEN chính là chất ức chế khối u [83].

#### **1.2.1.5. Con đường tín hiệu TGF- $\beta$ (Transforming growth factor - beta)**

Con đường tín hiệu TGF- $\beta$  kiểm soát sự phân chia, biệt hóa tế bào và thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào bình thường nên được gọi là con đường ức chế khối u. Khi TGF- $\beta$  bị đột biến, các bộ phận của con đường tín hiệu TGF- $\beta$  bị biến đổi và mất chức năng, hậu quả là các tế bào ung thư sinh sôi nảy nở. TGF- $\beta$  còn thúc đẩy tế bào ung thư di căn và kích thích sự hình thành mạch máu của khối u [87],[88]. Đột biến TGF- $\beta$  xảy ra ở khoảng một phần ba số người bệnh ung thư đại trực tràng [13],[89].

#### **1.2.2. Đột biến gen trong ung thư đại trực tràng.**

Đột biến gen dẫn đến thay đổi cấu trúc và chức năng các phân tử protein của các con đường tín hiệu tế bào là nguyên nhân phát sinh và phát triển ung thư. Trong bệnh lý ung thư đại trực tràng, rất nhiều các đột biến gen đã được phát hiện bao gồm:

Đột biến các gen gây ung thư: KRAS, BRAF và PI3K.

Đột biến các gen ức chế khối u: APC, TP53, STK11(LKB1), PTEN, BMPR1A, SMAD4.

Đột biến các gen sửa chữa: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, MYH, POLD1 và POLE...

##### **1.2.2.1. Đột biến gen KRAS trong ung thư đại trực tràng**

Gen KRAS gồm 06 exon có 45.691 bp nằm trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể số 12 [90],[91].



**Hình 1.13: Vị trí gen KRAS trên nhiễm sắc thể số 12** (nguồn: NCBI, 2013) [92]

Gen KRAS mã hóa cho các protein K-ras đóng vai trò truyền tín hiệu nội bào xuôi dòng từ EGFR [83]. Protein này có hoạt tính kinase với chức năng truyền tín hiệu nội bào xuôi dòng từ các thụ thể bề mặt tế bào tới các mục tiêu nội bào thông qua các dòng thác tín hiệu (con đường RAS-MAPK).

Trong tế bào protein Ras được giữ cân bằng thông qua sự hình thành hai phức hợp tương ứng với các trạng thái hoạt hóa và ức chế của protein Ras: Phức hợp Ras-GTP (protein Ras được hoạt hóa) và phức hợp Ras-GDP (protein Ras bị bất hoạt). Protein Ras được hoạt hóa nhờ yếu tố chuyển nucleotid guanine (guanine nucleotid exchange factors-GEFs). Việc truyền tín hiệu của proteine Ras bị ức chế khi phức hợp Ras-GTP bị thủy phân thành phức hợp Ras-GDP nhờ một loại protein có chức năng hoạt hóa GTPase(GAPs). Trong điều kiện sinh lý bình thường, nồng độ Ras-GTP trong cơ thể được kiểm soát chặt chẽ nhờ sự hoạt động nhịp nhàng của 2 yếu tố GEFs và GAPs [93],[94],[95].



**Hình 1.14: Cân bằng của protein Ras** (nguồn: Lahoz, 2008) [96]  
(Ras-GTP/Ras-GDP được kiểm soát bởi GEFs và GAP).

Khi gen KRAS bị đột biến sẽ tạo ra những protein Ras mới có khả năng chống lại hoạt tính GTPase của GAPs. Protein Ras đột biến có thể gắn kết với

GAP nhưng không thể thủy phân GTP đã tạo ra cho protein Ras đột biến duy trì được tình trạng hoạt hóa trong một thời gian dài. Protein Ras đột biến kích hoạt vĩnh viễn các con đường tín hiệu nằm xuôi dòng nó bất kể có sự hoạt hóa của thụ thể EGFR hay không. Đây chính là cơ sở giải thích cho việc liệu pháp trúng đích EGFR bị thất bại khi gen KRAS có đột biến bởi lúc này protein Ras không còn phụ thuộc vào sự hoạt hóa từ EGFR [95],[97].

Theo thống kê, tỷ lệ đột biến gen KRAS gặp ở hơn 30% các trường hợp ung thư đại trực tràng. Đến nay có hơn 3000 đột biến điểm gen đã được báo cáo, trong đó đột biến hay gặp nhất là đột biến thay thế nucleotid ở codon 12 (chiếm 82%) và codon 13 (chiếm 17%) ở exon 2 trên gen KRAS [98]. Đột biến gen KRAS tại codon 12 và codon 13 đã được chứng minh đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tiến triển ung thư và nguy cơ kháng thuốc ức chế EGFR của khối u [97]. Đột biến gen KRAS tại các vị trí khác như tại codon 61 và codon 146 cũng đã được báo cáo nhưng thường chiếm tỷ lệ nhỏ và ảnh hưởng của những dạng đột biến này trên lâm sàng chưa được làm sáng tỏ [99],[100].

**Bảng 1.1. Dạng đột biến gen KRAS và vị trí nucleotid bị biến đổi [101]**

Codon	Dạng đột biến	Vị trí nucleotid biến đổi
12	G12D (Gly12Asp)	35G>A
	G12V (Gly12Val)	35G>T
	G12C (Gly12Cys)	34G>T
	G12S (Gly12Ser)	34G>A
	G12A (Gly12Ala)	35G>C
	G12R (Gly12Arg)	34G>C
	G12F (Gly12Phe)	34G>T, 35G>T
	G12I (Gly12Iso)	34G>A, 35G>T
13	G13D (Gly13Asp)	38G>A
	G13C (Gly13Cys)	37G>T
	G13R (Gly13Arg)	37G>C

### 1.2.2.2. Đột biến gen BRAF trong ung thư đại trực tràng

Gen BRAF gồm 18 exon có 208.816 bp nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 7 [102].



**Hình 1.15: Vị trí gen BRAF trên nhiễm sắc thể số 7 (nguồn: NCBI, 2013)** [92]

Gen BRAF mã hóa thông tin cho protein BRAF có trọng lượng phân tử 94 kDa là chất có hoạt tính kinase với chức năng truyền tín hiệu nội bào xuôi dòng phía sau protein KRAS của con đường tín hiệu RAS-MAPK [102].

Đối với gen BRAF có hơn 30 loại đột biến khác nhau được mô tả. Khoảng 13% đột biến gen BRAF được phát hiện trên những người bệnh ung thư đại trực tràng. Hơn 90% đột biến gen BRAF xảy ra ở codon 600 (V600E) chuyển acid amin Glycin thành acid amin Valin. Đột biến này gia tăng hoạt

tính kinase xuôi dòng từ protein BRAF đến MEK thúc đẩy phân chia tế bào ngay cả khi không có tín hiệu phía trước protein BRAF đến. Chính cơ chế này làm tăng khả năng kháng thuốc ức chế EGFR của tế bào ung thư [103],[104]. Ngoài ra, một số đột biến khác cũng được tìm thấy như: R461I, I462S, G463E, G463V, G465A, G465E, G465V, G468E, N580S, E585K, D593V, F594L, G595R, L596V, T598I, V599D, V599R, V599E, V599K, K600E, A727V...Tuy nhiên, những đột biến có tần suất xảy ra rất thấp và vai trò của chúng đối với sự kháng thuốc ức chế EGFR cũng chưa thật rõ ràng [29].

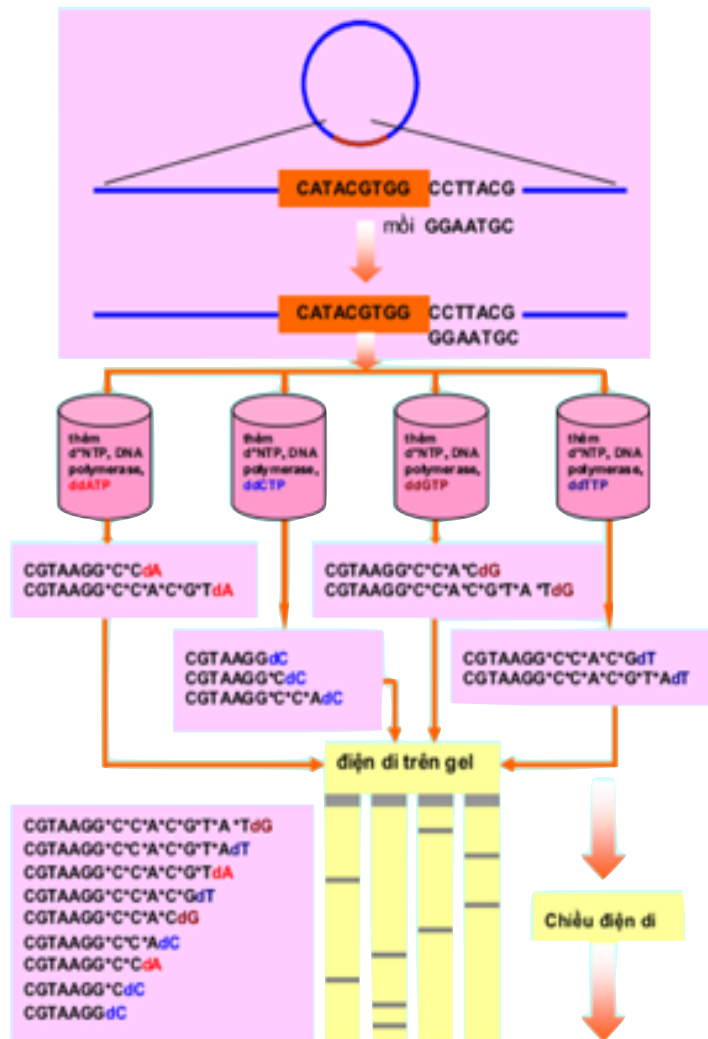
### **1.3. MỘT SỐ KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM GEN KRAS VÀ GEN BRAF TRONG UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG**

#### **1.3.1. Kỹ thuật giải trình tự trực tiếp.**

##### ***1.3.1.1. Nguyên tắc của kỹ thuật giải trình tự trực tiếp***

Năm 1975, Frederick Sanger đã phát minh ra phương pháp giải trình tự của DNA bằng enzym. Nguyên tắc của kỹ thuật giải trình tự trực tiếp là dùng một sợi DNA làm khuôn để tổng hợp sợi DNA bổ sung. Quá trình tổng hợp sợi DNA bổ sung dựa trên nguyên tắc của kỹ thuật PCR, kèm theo sự hiện diện của những dideoxynucleotid được đánh dấu bên cạnh các deoxynucleotid bình thường. Mỗi ddNTP được đánh dấu với một màu fluorochrome khác nhau và sự phân biệt các màu dựa trên độ dài bước sóng của các fluorochrome tương ứng. Sự gắn kết các ddNTP vào DNA đang kéo dài một cách ngẫu nhiên sẽ tạo ra các chuỗi DNA với độ dài hơn kém nhau 1 nucleotid, kết quả sẽ tạo ra hỗn hợp các sợi DNA có kích thước khác nhau. Thông qua điện di trên gel acrylamid có độ phân giải cao, các chuỗi DNA này sẽ được tách rời và ddNTP đã gắn kết vào từng chuỗi được xác định (A, T, C hay G). Tổng hợp thứ tự các ddNTP chính là trình tự chuỗi DNA thu được. Sau đó, trình tự chuỗi DNA thu được sẽ được chuyển vào máy vi tính để phân tích và so sánh với dữ liệu được lưu trong các ngân hàng dữ liệu gen (như GeneBank).





**Hình 1.16:** Sơ đồ kỹ thuật giải trình tự trực tiếp (nguồn: Bioinformatics.vn) [105]

### 1.3.1.2. Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp gen *KRAS* và *BRAF*

Sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp phân tích gen *KRAS* và *BRAF* ở người bệnh ung thư đại trực tràng, Arcila M và cộng sự phát hiện đột biến gen *KRAS* chiếm 36%, đột biến gen *BRAF* chiếm 5%. Gen *KRAS* đột biến xảy ra ở codon 12 có 7 dạng: G12S, G12C, G12L, G12D, G12A, G12R và G12V, ở codon 13 có 2 dạng: G13C và G13D, ở codon 61 có 3 dạng là Q61R, Q61L và Q61H. Gen *BRAF* đột biến phần lớn là dạng V600E, ngoài ra còn có 2 dạng đột biến nhưng với tỷ lệ rất thấp là K601E và D594G [106].

Neumann J và cộng sự nghiên cứu về tình trạng đột biến *KRAS* trên

1018 trường hợp ung thư đại trực tràng bằng kỹ thuật giải trình tự. Kết quả đột biến gen KRAS tại codon 12 và 13 đã xuất hiện trong 39,3% các mẫu được phân tích. Đột biến thường gặp nhất là dạng thay thế glycine bằng aspartate trên codon 12 (G12D, 36,0%), glycin bằng valin trên codon 12 (G12V, 21,8%), và glycin bằng aspartat trên codon 13 (G13D, 18,8%) [101].

Bisht S và cộng sự sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp gen KRAS và BRAF trên 204 mẫu ung thư đại trực tràng ở Ấn Độ, kết quả tần số đột biến của gen KRAS và BRAF là 23,5% và 9,8%. Năm dạng đột biến khác nhau tại codon 12 gen KRAS là: G12S, G12D, G12A, G12V, G12C và một dạng đột biến tại codon 13 là G13D đã được phát hiện. Đột biến gen KRAS có tỷ lệ cao hơn đáng kể ở những bệnh nhân trên 50 tuổi, có liên quan với biệt hóa tế bào mức độ kém và vừa. Tất cả các đột biến gen BRAF đều là dạng V600E, thường gặp ở những bệnh nhân dưới 50 tuổi. Không giống như đột biến KRAS, đột biến BRAF thường xảy ra trong các khối u có mức độ biệt hóa cao và các khối u ở đại tràng phải. Không phát hiện bệnh nhân có đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và BRAF [107]. Bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp, Wang và cộng sự phát hiện đột biến gen KRAS ở codon 12 là 25,3%, codon 13 là 6,8% và codon 61 là 2,1% [108]. Kalady và cộng sự phát hiện đột biến gen BRAF chiếm 12% số người bệnh ung thư đại trực tràng [109].

Trong các kỹ thuật xét nghiệm gen KRAS, kỹ thuật giải trình tự được coi là tiêu chuẩn cơ bản vì kỹ thuật này cho biết trình tự các nucleotid của gen KRAS và có thể xác định được tất cả các dạng đột biến, bao gồm cả các đột biến thay thế, chèn và xóa bỏ các nucleotid. Tuy nhiên, phương pháp này có độ nhạy thấp và mất nhiều thời gian thực hiện hơn.

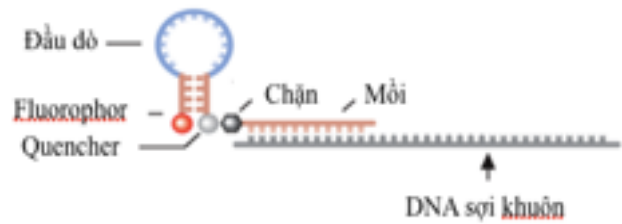
### **1.3.2. Kỹ thuật Scorpions amplification refractory mutation system (Scorpions ARMS)**

#### ***1.3.2.1. Nguyên lý của kỹ thuật Scorpions ARMS***

Kỹ thuật Scorpions ARMS là sự kết hợp của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (ARMS) và công nghệ Scorpions trong phản ứng Real time PCR để phát hiện các đột biến gen. Kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến dựa trên nguyên tắc của Taq DNA polymerase chỉ khuếch đại phân tử DNA khi đầu 3' của mồi và sợi khuôn bổ sung hoàn toàn với nhau. Phản ứng PCR bị ức chế hoàn toàn khi đầu 3' của mồi không bổ sung với sợi khuôn. Kỹ thuật cho phép khuếch đại đặc hiệu một trình tự đột biến ngay cả trong trường hợp alen đột biến đó chiếm một tỷ lệ rất nhỏ trong tổng số sợi khuôn DNA [110].

Scorpions là phân tử có hai chức năng với cấu tạo gồm hai đầu, một đầu mang trình tự của đoạn mồi đặc hiệu với alen đột biến cần khuếch đại, đầu còn lại là một đầu dò phát tín hiệu. Fluorophor phát tín hiệu huỳnh quang của đầu dò được gắn với quencher có nhiệm vụ dập tắt tín hiệu huỳnh quang của fluorophor. Trong phản ứng PCR, nếu có alen đột biến, phản ứng khuếch đại xảy ra, khi đầu dò bám với đoạn trình tự khuếch đại, fluorophor được giải phóng khỏi quencher, phát tín hiệu đến cảm biến của máy Realtime-PCR [111]. Nếu không có alen đột biến, phản ứng khuếch đại không xảy ra, không có đoạn trình tự khuếch đại để đầu dò bám vào và phân tử Scorpions tái lập như ban đầu, quencher sẽ dập tắt tín hiệu huỳnh quang của fluorophor, không có tín hiệu đến cảm biến của máy Realtime-PCR.

Bước 1: Mồi của Scorpions gắn với sợi khuôn DNA ở vùng mục tiêu thăm dò.



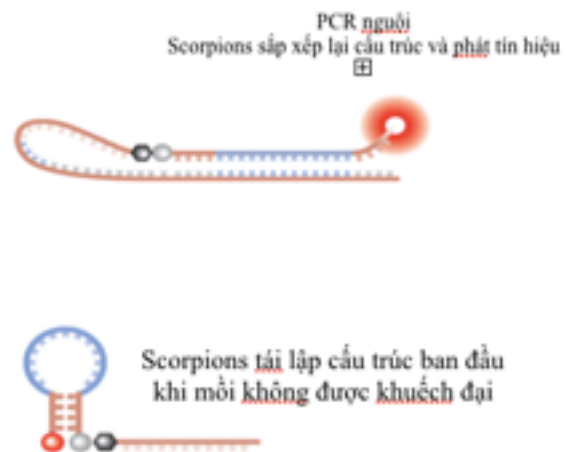
Bước 2: Mồi của Scorpions khuếch đại kéo dài bởi DNA polymerase và dừng lại bởi các nhóm chặn dừng sao chép.



Bước 3: Nhiệt độ phản ứng PCR và phần mồi mới kéo dài làm biến tính phân tử Scorpions.



Bước 4: Phản ứng PCR ngược, Scorpion với mồi mới đã kéo dài sắp xếp lại cấu trúc. Fluorophor không còn bị ức chế bởi quencher nên phát tín hiệu. Nếu mồi không được kéo dài, Scorpions sẽ tái lập cấu trúc ban đầu và tín hiệu của fluorophore bị dập tắt bởi quencher.



**Hình 1.17:** Các bước của kỹ thuật Scorpions ARMS (nguồn: Brown T, 2013) [112]

### 1.3.2.2. Ứng dụng kỹ thuật Scorpions ARMS trong xét nghiệm gen *KRAS*, *BRAF*

Kỹ thuật Scorpions ARMS cho phép phát hiện được bảy dạng đột biến hay gặp nhất nằm trên codon 12, 13 của gen *KRAS* và đột biến V600E trên codon 600 của gen *BRAF*. Rafael G A và cộng sự sử dụng kỹ thuật Scorpions

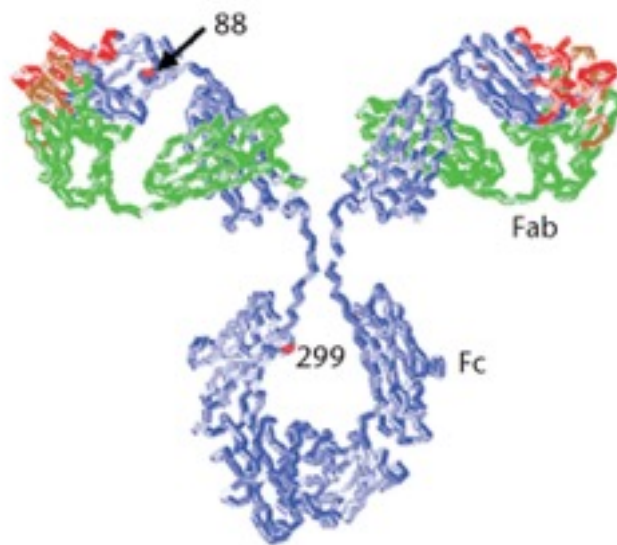
ARMS phát hiện được 7 dạng đột biến tại codon 12 và 13 gen KRAS là: G12D, G12A, G12V, G12S, G12R, G12C, và G13D chiếm 43% trong 427 người bệnh ung thư đại trực tràng [97].

Từ tháng 4 năm 2009 đến tháng 3 năm 2010, Bando H và cộng sự nghiên cứu trên 159 mẫu ung thư đại trực tràng sử dụng kỹ thuật Scorpions ARMS và giải trình tự trực tiếp. Trong đó 59 (37,0%) mẫu đột biến gen KRAS được phát hiện bởi kỹ thuật giải trình tự trực tiếp và 70 (44,0%) mẫu đột biến gen KRAS được phát hiện bởi kỹ thuật Scorpions ARMS. Tất cả các mẫu đột biến gen KRAS xác định bởi kỹ thuật giải trình tự trực tiếp cũng đã được xác định bởi kỹ thuật Scorpions ARMS. Tuy nhiên, 11 mẫu trong số 70 mẫu đột biến gen KRAS được xác định bởi kỹ thuật Scorpions ARMS không được phát hiện bởi kỹ thuật giải trình tự trực tiếp [113]. Franklin W A và cộng sự sử dụng cả hai kỹ thuật Scorpions ARMS và giải trình tự trực tiếp để xác định đột biến gen KRAS trên 59 mẫu mô ung thư đại trực tràng. Kết quả của kỹ thuật Scorpions ARMS phát hiện được 43% số mẫu có đột biến gen KRAS trong khi kỹ thuật giải trình tự phát hiện được 36% số mẫu có đột biến gen KRAS [114]. Krol và cộng sự sử dụng kỹ thuật Scorpions ARMS nghiên cứu so sánh đột biến gen KRAS và BRAF trên mẫu mô thu được bằng sinh thiết và mẫu mô thu được bằng phẫu thuật. Tần số đột biến gen KRAS phát hiện được là 33,9% và đột biến gen là BRAF 19,0%. Sự phù hợp của tình trạng đột biến gen KRAS giữa mẫu mô thu được bằng sinh thiết và mẫu mô thu được bằng phẫu thuật là 97,4% [115]. Kỹ thuật Scorpions ARMS có chi phí cao, chỉ phát hiện được các dạng đột biến có chủ định trước theo thiết kế của môi, nhưng thời gian thực hiện ngắn và nổi bật là có độ nhạy cao ngay cả với những mẫu có tỷ lệ tế bào đột biến rất thấp tới 1% [116].

## 1.4. ĐIỀU TRỊ ĐÍCH EGFR TRONG UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG

### 1.4.1. Cấu trúc của phân tử Cetuximab

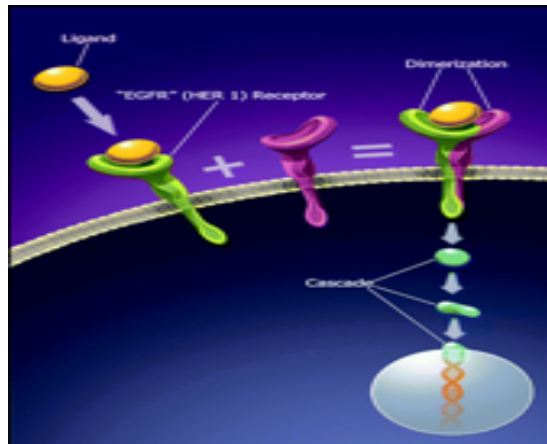
Cetuximab là một kháng thể đơn dòng của lớp IgG1 có tác dụng trên EGFR người và bao gồm 4 chuỗi polypeptide, hai chuỗi nặng giống hệt nhau, mỗi chuỗi gồm 449 axit amin và hai chuỗi nhẹ giống hệt nhau mỗi chuỗi gồm 214 axit amin [117].



**Hình 1.18:** Cấu trúc của phân tử Cetuximab (nguồn: Ayoub D, 2013) [117]

### 1.4.2. Cơ chế tác dụng của thuốc điều trị đích Cetuximab

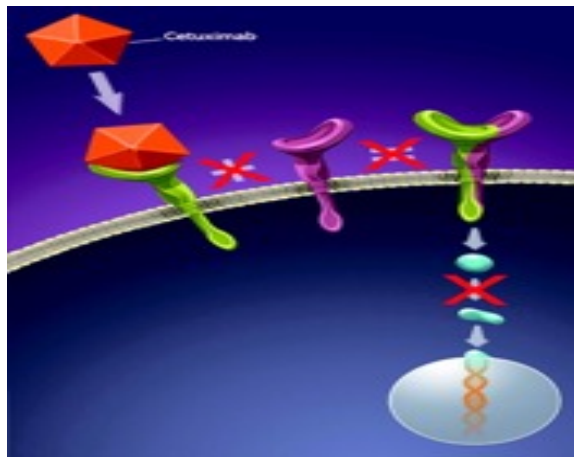
Yếu tố phát triển biểu mô EGF có ái lực cao với thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR) trên bề mặt tế bào. Yếu tố này có khả năng kích hoạt tính tyrosine kinase nội bào của thụ thể. Tiếp theo các tyrosine kinase sẽ khởi động dòng thác tín hiệu để tác động lên nhiều quá trình hóa sinh trong tế bào như: tăng nồng độ  $\text{Ca}^{2+}$  nội bào, tăng cường quá trình đường phân và sinh tổng hợp protein, tăng cường quá trình biểu hiện một số gen kể cả gen mã hóa EGFR, thúc đẩy quá trình tái bản DNA và quá trình phân chia tế bào [83].



**Hình 1.19: Quá trình gắn của yếu tố tăng trưởng với thụ thể EGFR** (nguồn: Bou-Assaly [118]) (khi yếu tố tăng trưởng (Ligand) gắn với thụ thể EGFR kích hoạt tín hiệu tăng trưởng từ EGRF vào trong nội bào).

Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô là nhóm thụ thể mang hoạt tính tyrosine kinase được phát hiện vào năm 1978 bởi Carpenter và cộng sự. EGFR là một phân tử glycoprotein bề mặt màng, trọng lượng phân tử 170 kDa gồm một vùng gắn kết với các phối tử nằm ngoài màng tế bào, một vùng xuyên màng đặc hiệu và một vùng trong bào tương có vai trò kích thích sự tăng sinh, biệt hóa của tế bào. Phần ngoài màng của EGFR có trọng lượng phân tử khoảng 100 kDa có hai vùng giàu Cystein là nơi để gắn kết các phối tử của EGF. Các phối tử này chính là yếu tố hoạt hóa hay ức chế thụ thể yếu tố phát triển biểu mô. Vùng xuyên màng có trọng lượng phân tử nhỏ 3 kDa, tập chung tại vùng phân cực phospholipid màng. Phần trong tế bào trọng lượng khoảng 60 kDa là protein kinase với đuôi tận cùng carboxyl nơi xảy ra phản ứng tự phosphoryl hóa của EGFR đóng vai trò chính điều hòa sự phát triển tăng sinh của tế bào [83]. Có bốn thành viên trong gia đình thụ thể yếu tố phát triển biểu mô: HER1(EHFR, ErbB1), HER2 (neu, ErbB2), HER3 (ErbB3) và HER4 (ErbB4). Các protein này có vai trò rất quan trọng trong việc điều hòa các quá trình sinh trưởng, phát triển, trao đổi chất và sinh lý của tế bào [119]. Khi các tín hiệu phân bào được tiếp nhận ở phần ngoài màng của

EGFR, tín hiệu này được truyền vào phần bên trong màng tế bào của thụ thể. Khi phần bên trong tế bào này được hoạt hóa sẽ khởi động một dòng thác tín hiệu lan tỏa khắp tế bào gây kích hoạt: con đường PI3K/Akt, sự tăng sinh mạch máu, di căn và ức chế quá trình chết theo chương trình (apoptosis), tín hiệu Ras/MAPK (Ras/mitogen-activated protein kinase), và các con đường dẫn truyền tín hiệu phiên mã. Phân tử Cetuximab khi gắn kết với thụ thể EGFR sẽ ức chế dòng tín hiệu tăng trưởng từ thụ thể EGFR vào trong tế bào dẫn đến ức chế quá trình tăng trưởng của tế bào [120].



**Hình 1.20: Cơ chế tác dụng của Cetuximab** (nguồn: Bou-Assaly [118]) (khi phân tử Cetuximab gắn với thụ thể EGFR ngăn chặn quá trình truyền tín hiệu từ EGRF vào trong nội bào).

#### 1.4.3. Ứng dụng điều trị đích EGFR trong ung thư đại trực tràng

Trong những năm gần đây, với sự tiến bộ của ngành sinh học phân tử đặc biệt là việc làm sáng tỏ cơ chế và vai trò của EGFR trong bệnh lý ung thư, các nhà khoa học đã tìm ra một số loại thuốc điều trị ung thư nhằm mục tiêu EGFR (liệu pháp điều trị đích). Năm 1985, Drebin và cộng sự lần đầu tiên đã dùng kháng thể đơn dòng mAbs p185<sup>her2/neu</sup> để phong tỏa EGFR làm ức chế quá trình phân bào của tế bào khối u trong môi trường thạch mềm. Nghiên cứu này đã đặt nền móng cho những nghiên cứu sử dụng kháng thể đơn dòng phong tỏa EGFR để điều trị ung thư [121].



Tháng 7 năm 2009, cơ quan quản lý dược phẩm và thực phẩm của Mỹ đã chấp nhận 02 loại thuốc điều trị ung thư có bản chất là kháng thể đơn dòng nhằm mục tiêu EGFR là cetuximab (Erbix) và panitumumab (Vectibix). Hai thuốc này được chỉ định để điều trị ung thư đại trực tràng di căn có gen KRAS và BRAF không đột biến. Cetuximab kết hợp với hóa trị cải thiện tỷ lệ đáp ứng khối u và thời gian sống còn so với hóa trị đơn thuần [15].

## **1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ ĐỘT BIẾN GEN KRAS, BRAF VÀ ĐIỀU TRỊ ĐÍCH**

### **1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới**

Nghiên cứu CRYSTAL của Van Cutsem E và cộng sự thực hiện trên 1.198 bệnh nhân ung thư đại trực tràng di căn được phân ngẫu nhiên thành hai nhóm với 599 nhận điều trị Cetuximab cộng phác đồ FOLFIRI và 599 nhận điều trị phác đồ FOLFIRI đơn thuần. Kết quả tỷ lệ bệnh nhân có gen KRAS đột biến phát hiện được chiếm 37% tổng số bệnh nhân. Việc bổ sung điều trị Cetuximab cùng phác đồ FOLFIRI ở bệnh nhân có gen KRAS không đột biến đã cải thiện đáng kể thời gian sống còn tổng thể (OS) trung bình 23,5 tháng ở nhóm điều trị Cetuximab so với 20,0 tháng ở nhóm không điều trị Cetuximab. Thời gian sống không bệnh (PFS) trung bình 9,9 tháng ở nhóm điều trị Cetuximab so với 8,4 tháng ở nhóm không điều trị Cetuximab. Tình trạng đột biến gen KRAS đã được xác nhận như một dấu ấn sinh học tiên đoán mạnh mẽ cho hiệu quả của Cetuximab cộng phác đồ FOLFIRI [15].

Bokemeyer C và cộng sự nghiên cứu trên 845 bệnh nhân ung thư đại trực tràng có gen KRAS không đột biến cho thấy Cetuximab kết hợp với hóa chất hỗ trợ cải thiện đáng kể thời gian sống tổng thể và thời gian sống không bệnh. Đột biến gen BRAF đã được phát hiện trong 70/800 khối u [122].

Jonker DJ và cộng sự nghiên cứu trên 572 bệnh nhân bị ung thư đại trực tràng được điều trị một liều ban đầu là 400 mg/m<sup>2</sup> da Cetuximab, tiếp theo là truyền hàng tuần 250 mg/m<sup>2</sup> da cộng với chăm sóc hỗ trợ tốt nhất (287

bệnh nhân) hoặc chăm sóc tốt nhất hỗ trợ đơn thuần (285 bệnh nhân). Thời gian sống còn tổng thể trung bình là 6,1 tháng ở nhóm điều trị Cetuximab và 4,6 tháng ở nhóm được phân công chăm sóc hỗ trợ đơn thuần. Đáp ứng một phần xảy ra ở 23 bệnh nhân (8,0%) trong nhóm điều trị Cetuximab nhưng không có bệnh nhân nào trong nhóm được phân công chăm sóc hỗ trợ đơn thuần ( $p < 0,001$ ); bệnh đã ổn định thêm ở 31,4% bệnh nhân được chỉ định Cetuximab và 10,9% bệnh nhân được phân công chăm sóc hỗ trợ đơn thuần ( $P < 0.001$ ) [123].

### **1.5.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam**

Nghiên cứu về đột biến gen trong ung thư đại trực tràng, năm 2010, Nguyễn Phương Anh và cộng sự nghiên cứu đột biến dòng mầm trên exon 15 của gen APC ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng thể đa polyp tuyến gia đình. Tỷ lệ đột biến gen APC phát hiện được ở 100% số bệnh nhân ung thư đại trực tràng thể đa polyp tuyến gia đình. Các đột biến dịch khung (cài, xóa: 1, 2, 4 nucleotid) là loại hay gặp nhất chiếm 70,7%, đột biến thay thế nucleotid (thay thế 1, 2, 4 nucleotid) chiếm 29,3%. Tỷ lệ đột biến gen APC ở người thân của bệnh nhân ung thư đại trực tràng thể đa polyp tuyến gia đình chiếm 63,6%. Không có đột biến gen APC ở nhóm người khỏe mạnh làm đối chứng [124].

Tại Việt Nam chưa có nhiều công trình nghiên cứu về đột biến gen KRAS và BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng được công bố. Năm 2013, Lê Văn Thiệu và cộng sự nghiên cứu trên 79 bệnh nhân ung thư đại trực tràng được phẫu thuật tại Bệnh viện Việt Tiệp Hải Phòng bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp gen KRAS. Kết quả tỷ lệ đột biến gen KRAS là 46/79 (58,2%), chỉ phát hiện 2 dạng đột biến gen KRAS tại codon 12 là GGT thành GAT(93,5%) và GGT thành GTT (6,5%), không có sự khác biệt về tỷ lệ đột biến gen KRAS ở bệnh nhân nam và nữ [125].

## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

##### 2.1.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 01 năm 2011 đến tháng 12 năm 2015 tại: Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội, Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện K trung ương, Bệnh viện Việt Đức, Bệnh viện Hữu Nghị, Bệnh viện Ung bướu Hà Nội và Bệnh viện 198 Bộ Công an.

##### 2.1.2. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân được chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng, điều trị tại: Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện K Trung ương, Bệnh viện Việt Đức, Bệnh viện Hữu Nghị, Bệnh viện Ung bướu Hà Nội và Bệnh viện 198, Bộ Công an.

##### 2.1.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn người bệnh nghiên cứu

Thỏa mãn đồng thời ba tiêu chuẩn sau:

- Được chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng bằng xét nghiệm mô bệnh học.

- Đồng ý xét nghiệm gen KRAS, BRAF.

- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

##### 2.1.2.2. Tiêu chuẩn loại trừ khỏi nghiên cứu

- Người bệnh có kèm ung thư cơ quan khác và/hoặc không đồng ý tham gia nghiên cứu.

##### 2.1.2.3. Tiêu chuẩn lựa chọn người bệnh điều trị đích

Thỏa mãn đồng thời ba tiêu chuẩn sau:

- Ung thư đại trực tràng không đột biến gen KRAS, BRAF;

- Ung thư đại trực tràng giai đoạn IV và/hoặc tái phát và/hoặc không đáp ứng với hóa chất hỗ trợ;

- Đồng ý điều trị đích.

#### **2.1.2.4. Tiêu chuẩn loại trừ điều trị đích**

- Ung thư đại trực tràng có đột biến gen KRAS, BRAF.
- Không đồng ý điều trị đích.

### **2.1.3. Vật liệu, hoá chất, máy thiết bị phục vụ cho nghiên cứu gen KRAS, BRAF**

#### **2.1.3.1. Vật liệu, hóa chất:**

Các hóa chất và vật tư tiêu hao đều được mua từ các công ty có uy tín với độ tinh khiết và chất lượng cao.

- *Hóa chất tách chiết DNA từ mô ung thư đại trực tràng:*

Ethanol 100%, dung dịch xylene, lysis buffer (50mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20), dung dịch SDS 10%, dung dịch Protein K (nồng độ 1 mg/ml).

- *Hóa chất tinh sạch DNA:*

Ethanol 100%, ethanol 70%, sodium acetate 3M, pH5,2, lysis buffer (50mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20), dung dịch SDS 10%, dung dịch Protein K (nồng độ 1 mg/ml), dung dịch phenol/chloroform/isoamyl tỷ lệ 25/24/1, dung dịch chloroform/isoamyl tỷ lệ 24/1.

- *Hóa chất PCR (In vitro):*

Dung dịch đệm 10X, hỗn hợp dNTP, Taq polymerase, Mg<sup>2+</sup>, nước cất; Môi đặc hiệu.

- *Vật liệu, hóa chất điện di sản phẩm PCR:*

Agarose, dung dịch TBE (boric acid EDTA); Ethidium bromide, loading dye, thước đo DNA.

- *Hóa chất tinh sạch sản phẩm PCR:*

Promega Wizard SV gel clean-up system (Promega Inc) gồm dung dịch gắn kết màng, dung dịch rửa màng, nước cất không có nuclease.

- *Hóa chất đọc trình tự gen: BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) gồm:*

BigDye Terminator v3.0 (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), BigDye buffer,  
Mồi đặc hiệu;

Dung dịch formamide.

- Hóa chất read-time PCR theo kỹ thuật Scorpion ARMS: KRAS PCR kit và BRAF PCR kit (Quiagen) gồm:

+ Hóa chất kiểm tra chất lượng DNA sử dụng cặp gen nội chuẩn GAPDH:

Master mix cho phản ứng PCR (dNTP, MgCl<sub>2</sub>, buffer, taq polymerase)

Cặp mồi GAPDH: 5' – ACA TGT TCC AAT ATG ATT CC – 3'

5' – TGG ACT CCA CGA CGT ACT CA – 3'

Marker 100, 50bp, thạch agarose 1,5% điện di kiểm tra kích thước sản phẩm PCR.

+ Hóa chất kiểm tra chất lượng DNA với cặp mồi nội chuẩn và các cặp mồi đột biến để xác định các đột biến đã biết sử dụng kỹ thuật Scorpions ARMS:

**Bảng 2.1. Danh mục hóa chất thực hiện phản ứng Scorpions ARMS xác định đột biến gen KRAS.**

Reagents Supplied	25 Reactions Volume	100 Reactions Volume	Tube
Control Reaction Mix	1300 µl	5200 µl	1
12ALA Reaction Mix	650 µl	2600 µl	2
12ASP Reaction Mix	650 µl	2600 µl	3
12ARG Reaction Mix	650 µl	2600 µl	4
12CYS Reaction Mix	650 µl	2600 µl	5
12SER Reaction Mix	650 µl	2600 µl	6
12VAL Reaction Mix	650 µl	2600 µl	7
13ASP Reaction Mix	650 µl	2600 µl	8
Mixed Standard	300 µl	1000 µl	9
Taq DNA polymerase	60 µl	240 µl	10

**Bảng 2.2. Danh mục hóa chất thực hiện phản ứng scorpions ARMS xác định đột biến gen BRAF**

<b>BRAF RGQ PCR Kit</b>			<b>(24)</b>
<b>Catalog no.</b>			<b>870801</b>
<b>Number of reactions</b>			<b>24</b>
Control Reaction Mix	Red	1 CTRL	2 x 720 $\mu$ l
V600E/Ec Reaction Mix	Purple	2 V600E/Ec	720 $\mu$ l
V600D Reaction Mix	Orange	3 V600D	720 $\mu$ l
V600K Reaction Mix	Pink	4 V600K	720 $\mu$ l
V600R Reaction Mix	Green	5 V600R	720 $\mu$ l
BRAF Positive Control	Beige	PC	250 $\mu$ l
Taq DNA Polymerase	Mint	Taq	138 $\mu$ l
Water for NTC	White	NTC	1.9 ml
Water for Sample Dilution	White	Dil.	1.9 ml
<i>BRAF RGQ PCR Kit Handbook</i>			1

### 2.1.3.2. Máy thiết bị:

Tủ lạnh âm sâu (-30°C, -80°C), máy hấp vô trùng, lò vi sóng, bồn ủ nhiệt, buồng hút, máy ly tâm thường, máy ly tâm lạnh, hệ thống điện di Mupid (Nhật Bản), máng đổ gel, lược tạo giếng, máy soi và chụp ảnh tự động thạch agarose đã điện di: Dolphin Chemic Wealtec (USA), máy đo quang phổ (định nồng độ DNA, RNA): Thermo Electron Corporation (Biomate), máy ly tâm nhiệt Gene Amp PCR System 9700 (USA), máy luân nhiệt định lượng Stratagen MX 3000P, máy đọc trình tự gen 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI PRISM).

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu trong đề tài là nghiên cứu mô tả, cắt ngang, tiến cứu, có theo dõi dọc thời gian sống thêm và theo dõi kết quả điều trị ở nhóm bệnh nhân điều trị đích.

### 2.2.2. Cỡ mẫu trong nghiên cứu

Cỡ mẫu trong nghiên cứu được tính toán dựa vào công thức tính cỡ mẫu xác định tỷ lệ:

$$n \geq Z^2 \times p(1-p)/d^2$$

- Trong đó:

Z: mức độ tin cậy.

p: tỷ lệ ung thư đại trực tràng có đột biến gen KRAS, BRAF.

d: mức sai số cho phép.

- Chọn:  $Z = 1,96$  (với mức độ tin cậy 95%)

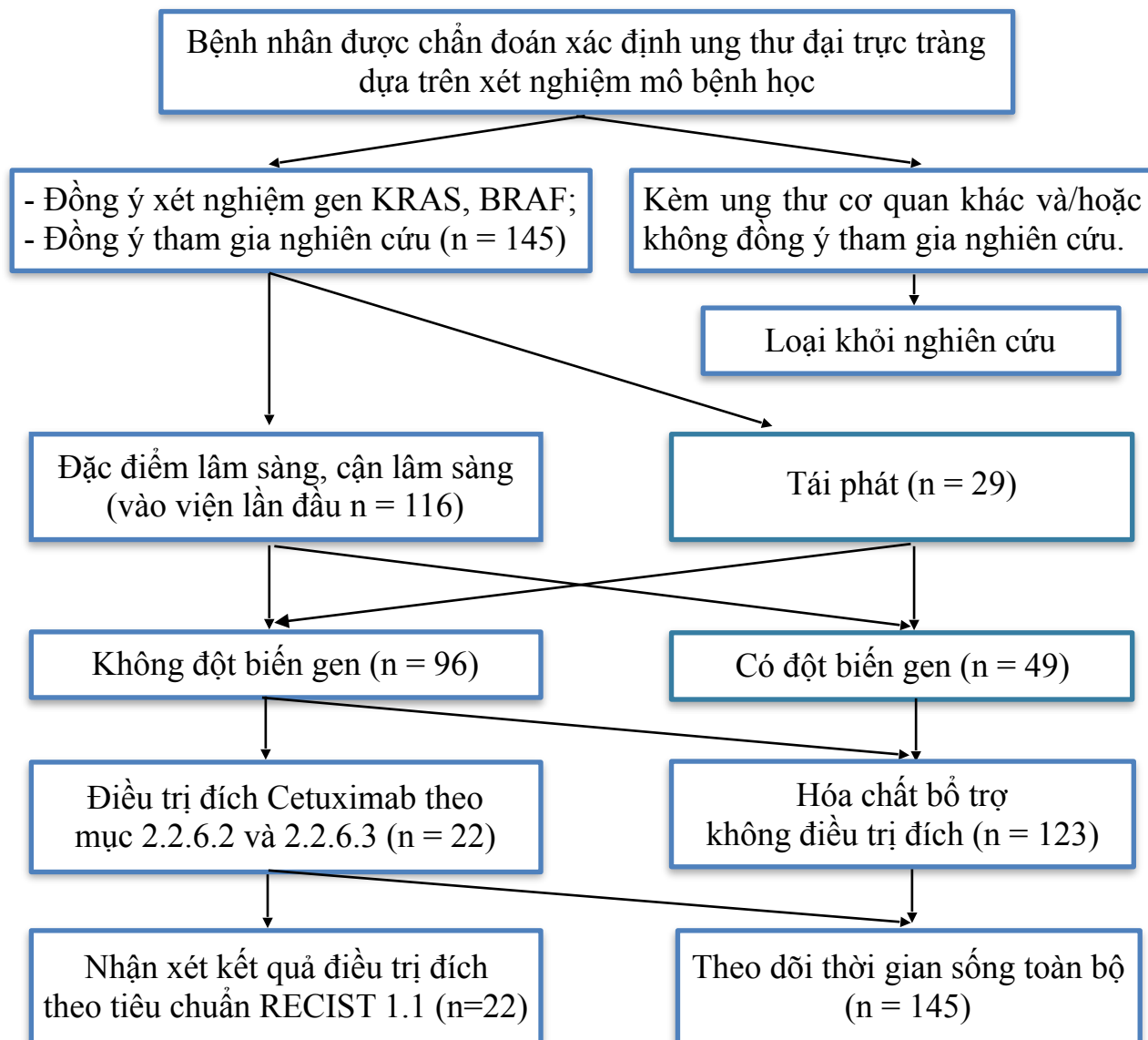
$p = 0,4$  lấy theo nghiên cứu gần đây [15].

$d = 0,1$

- Cỡ mẫu cần thiết cho nghiên cứu:  $n \geq 92$ .

Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi thu thập được 145 bệnh nhân thỏa mãn các tiêu chuẩn của nghiên cứu này.

### 2.2.3. Quy trình lựa chọn người bệnh vào nghiên cứu



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu



## **2.2.4. Nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng**

### **2.2.4.1. Khám lâm sàng**

*- Thời gian có triệu chứng đến khi chẩn đoán xác định:*

Khai thác bệnh sử thời gian bắt đầu có triệu chứng lâm sàng đến khi chẩn đoán xác định, được tính theo số tháng người bệnh có các triệu chứng lâm sàng đầu tiên đến khi có chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng.

*- Tình trạng cấp cứu khi vào viện:*

Người bệnh nhập viện trong tình trạng cấp cứu do các biến chứng của ung thư đại trực tràng gây lên như tắc ruột, xuất huyết tiêu hóa mức độ nặng, thủng ruột...

*- Một số triệu chứng lâm sàng:*

+ Đau bụng: mức độ đau bụng thay đổi tùy theo cá nhân có thể đau nhẹ, lâm râm, quặn từng cơn, có thể đau liên tục, co thắt, đau nhiều từng cơn khiến người bệnh phải vào viện trong tình trạng cấp cứu.

+ Phân lỏng: tình trạng phân nhão, lỏng hay nhiều nước.

+ Phân táo: tình trạng phân khô, thành cục nhỏ, khó đại tiện.

+ Phân có máu: tình trạng phân có lẫn máu hoặc nhầy máu.

+ Sụt cân: tình trạng mất đi từ 5 đến 10% trọng lượng cơ thể trong 1-12 tháng, hoặc mất đi 2,25kg trong vòng ba tháng.

+ Thiếu máu: người bệnh có biểu hiện mệt mỏi, hoa mắt chóng mặt, da xanh, niêm mạc nhợt, xét nghiệm huyết sắc tố thấp hơn 120g/l.

*- Đánh giá thời gian sống toàn bộ từ khi chẩn đoán xác định:*

Ghi nhận thời gian sống thêm toàn bộ tính theo tháng bắt đầu từ lúc chẩn đoán xác định cho đến khi người bệnh tử vong hoặc kết thúc nghiên cứu.

### **2.2.4.2. Vị trí khối u**

Vị trí khối u xác định dựa vào phẫu thuật, người bệnh không phẫu thuật dựa vào kết quả nội soi, chụp cắt lớp vi tính, chụp cộng hưởng từ.

Vị trí u chia theo 03 vị trí:

- Đại tràng phải: từ manh tràng đến giữa đại tràng ngang.
- Đại tràng trái: từ giữa đại tràng ngang đến hết đại tràng sigma.
- Trực tràng: từ rìa hậu môn đến điểm tiếp giáp với đại tràng sigma.

#### **2.2.4.3. Di căn**

Di căn đến các tạng được xác định dựa vào phẫu thuật, nội soi ổ bụng, chụp cắt lớp vi tính, chụp cộng hưởng từ, siêu âm. Di căn đến các tạng gan, phổi, tụy, thận, buồng trứng, não, xương, phúc mạc.

#### **2.2.4.4. Hình ảnh nội soi**

Người bệnh được nội soi đại trực tràng toàn bộ bằng ống soi mềm và ghi nhận các tổn thương về kích thước khối u và dạng tổn thương trên nội soi:

- Kích thước khối u so với chu vi đại trực tràng: chia làm 04 loại:
  - . Kích thước khối u dưới 1/4 chu vi đại trực tràng.
  - . Kích thước khối u từ 1/4 đến dưới 1/2 chu vi đại trực tràng.
  - . Kích thước khối u từ 1/2 đến dưới 3/4 chu vi đại trực tràng.
  - . Kích thước khối u từ 3/4 chu vi đại trực tràng trở lên.
- Dạng tổn thương khối u trên nội soi: chia làm 6 loại theo phân loại

Pari 2002 (hình 1.5) [65]:

- + Type 0: Tổn thương dạng ung thư dạng nhú lồi, phẳng;
- + Type 1: Tổn thương ung thư dạng sùi;
- + Type 2: Tổn thương ung thư dạng loét;
- + Type 3: Tổn thương ung thư dạng dạng loét và sùi kết hợp;
- + Type 4: Tổn thương ung thư dạng thâm nhiễm;
- + Type 5: Tổn thương ung thư dạng không thể phân loại được.

#### **2.2.4.5. Xét nghiệm CEA**

Định lượng CEA được thực hiện bằng kỹ thuật Miễn dịch enzym (ELISA) và Miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA). Xét nghiệm được tiến

hành tại các bệnh viện khi chẩn đoán xác định bệnh và trong quá trình theo dõi điều trị.

CEA bình thường < 5ng/ml.

CEA tăng khi  $\geq$  5ng/ml.

#### **2.2.4.6. Xét nghiệm CA19-9**

Định lượng CEA được thực hiện bằng kỹ thuật Miễn dịch enzym (ELISA) và Miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA). Xét nghiệm được tiến hành tại các bệnh viện khi chẩn đoán xác định bệnh và trong quá trình theo dõi điều trị.

CA19-9 bình thường < 37 U/ml.

CA19-9 tăng khi  $\geq$  37 U/ml.

#### **2.2.4.7. Xét nghiệm mô bệnh học**

Dựa trên sự hình thành cấu trúc tuyến của tổ chức ung thư, phân độ mô học của ung thư đại trực tràng thường được chia làm 04 độ: biệt hóa cao, biệt hóa vừa, biệt hóa thấp và không biệt hóa [75].

- Biệt hóa cao: Trên 95% có cấu trúc tuyến.
- Biệt hóa vừa: từ 50% đến 95% có cấu trúc tuyến.
- Biệt hóa kém: dưới 50% có cấu trúc tuyến.
- Không biệt hóa: không thấy cấu trúc tuyến.

#### **2.2.5. Nghiên cứu đột biến gen KRAS và gen BRAF**

Quá trình xác định đột biến gen KRAS và gen BRAF được tiến hành tại Trung tâm Nghiên cứu gen - protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

##### **2.2.5.1. Cách thức thu thập mẫu**

Thu thập mẫu mô: Các mẫu mô ung thư được lấy từ tổ chức khối u trong phẫu thuật hoặc qua sinh thiết bằng nội soi từ người bệnh ung thư đại trực tràng được thu thập, được bảo quản ở nhiệt độ -80<sup>0</sup>C cho đến khi được đưa ra phân tích.

### **2.2.5.2. Quy trình kỹ thuật phân tích gen**

*Kỹ thuật tách chiết DNA:*

DNA từ mô ung thư được tách chiết bằng QIAmp DNAMiniKit (Qiagen Inc., Hilden, Germany).

### **2.2.5.3. Kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp xác định đột biến gen KRAS và gen BRAF**

Với mật độ tế bào ung thư trong mô phân tích từ 30% trở lên thì việc xác định đột biến gen bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp có độ nhạy và độ đặc hiệu lên đến 99%.

DNA của bệnh nhân tách chiết từ mẫu mô được sử dụng để khuếch đại gen KRAS và gen BRAF bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

Sản phẩm PCR được tinh sạch từ agarose gel sử dụng Promega Wizard SV gel clean-up system (Promega, USA) hoặc phương pháp Ethanol precipitation.

Tách dòng sản phẩm PCR sử dụng KIT TA cloning vector.

Sản phẩm PCR sau tách dòng được đưa vào giải trình tự sử dụng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự của gen KRAS, BRAF hoang dại trên GeneBank (National center for biotechnology information, NCBI) và phân tích theo phương pháp ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems).

### **2.2.5.4. Kỹ thuật *Scorpions Amplification Refractory Mutation System (Scorpions ARMS)* xác định đột biến gen KRAS và BRAF**

**- Quy trình kiểm tra chất lượng DNA sử dụng cặp mồi gen nội chuẩn GAPDH:**

GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) là loại enzym có mặt ổn định ở tất cả các tế bào trong cơ thể cũng như trong những giai đoạn

phát triển, biệt hóa khác nhau của tế bào. Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này khuếch đại một đoạn gen mã hóa của GAPDH có chiều dài 300 bp.

+ Thành phần phản ứng PCR:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	DNA tinh khiết	2
2	Master mix PCR 2X	10
3	Mồi xuôi GAPDH 10pmol	0,5
4	Mồi ngược GAPDH 10pmol	0,5
5	Nước cất	7,0
	Tổng thể tích	20

+ Chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút

94°C trong 30 giây	} x 35 chu kỳ.
55°C trong 30 giây	
72°C trong 30 phút	
72°C trong 5 phút	
Giữ ở 4°C	

+ Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% cùng marker 100bp để kiểm tra kích thước sản phẩm.

**- Quy trình kiểm tra chất lượng DNA với cặp mồi gen nội chuẩn sử dụng kỹ thuật Scorpions ARMS:**

Sử dụng gen nội chuẩn nhằm kiểm tra chất lượng DNA sau khi tách chiết đồng thời xác định nồng độ DNA thích hợp cho mỗi phản ứng.

Chuẩn bị phản ứng Realtime PCR: chuẩn bị trên khay lạnh

<b>T T</b>	<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>	<b>Thể tích</b>	<b>Thể tích</b>
1	Master mix đối chứng	19,8	19,8	19,8
2	Taq DNA polymerase	0,2	0,2	0,2
3	DNA khuôn:			
3.1	Đối chứng dương: DNA khuôn dương tính trong kit	5,0		
3.2	Đối chứng âm: nước cất		5,0	
3.3	Bệnh phẩm: DNA bệnh phẩm			5,0
	<b>Tổng thể tích</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

*Lưu ý: Tất cả các hóa chất đều phải được làm tan hoàn toàn và trộn đều trước khi sử dụng.*

Trộn đều các thành phần sau đó ly tâm nhẹ cho toàn bộ dịch xuống đáy ống;

Đặt mẫu vào máy Realtime PCR đã được cài đặt sẵn chương trình chạy;

Chu trình nhiệt được cài đặt chạy Realtime PCR (Bảng 2.3):

**Bảng 2.3. Chu trình nhiệt cho phản ứng**

Temperature	Time	Cycles	Data Collection
<b>Stage 1</b>			
95°C	10 minutes	1 cycle	
<b>Stage 2</b>			
95°C	30 seconds		
61°C	1 minute	40 cycles	FAM, HEX

**- Quy trình chạy mẫu và chứng dương với các môi đột biến gen KRAS:**

Các môi đột biến sẽ được tiến hành phản ứng với khuôn là DNA đã xác định là các đột biến khác nhau tương ứng với từng môi đột biến và chứng âm là DNA được tách chiết từ mô lành không mang tế bào ung thư.

Các bước tiến hành:

Chuẩn bị Master mix cho phản ứng (7 môi đột biến): thực hiện trên khay lạnh.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	19,8							
G12D		19,8						
G12V			19,8					
G12A				19,8				
G12R					19,8			
G12C						19,8		
G12S							19,8	
G13D								19,8
Taq DNA polymerase	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
DNA khuôn	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Tổng thể tích	25	25	25	25	25	25	25	25

**Lưu ý:** Tất cả các hóa chất đều phải được làm tan hoàn toàn và trộn đều trước khi sử dụng.

DNA khuôn lần lượt là:

Chứng dương (PC): là DNA đã xác định có cả 7 đột biến trên khi chạy với cặp môi đột biến sẽ cho kết quả dương tính.

Chứng âm (NC): là nước PCR không chứa DNA khi chạy với các cặp môi đột biến cho kết quả âm tính.

DNA tách chiết từ mẫu mô đúc paraffin và đã được chuẩn nồng độ khi chạy với cặp môi nội chuẩn, tùy vào số lượng mẫu mà pha master mix cho phản ứng.

Trộn đều các thành phần sau đó ly tâm nhẹ cho toàn bộ dịch xuống đáy ống.

Đặt mẫu vào máy Realtime PCR đã được cài đặt sẵn chương trình chạy.

Chu trình nhiệt được cài đặt chạy Realtime PCR (Bảng 2.4):

**Bảng 2.4. Chu trình nhiệt cho phản ứng**

Temperature	Time	Cycles	Data Collection
<b>Stage 1</b>			
95°C	10 minutes	1 cycle	
<b>Stage 2</b>			
95°C	30 seconds		
61°C	1 minute	40 cycles	FAM, HEX

Các môi đột biến được sử dụng để xác định đột biến gen KRAS:

**Bảng 2.5. Danh sách các môi đột biến và sự thay đổi nucleotid trên codon 12, 13 gen KRAS**

Mutation	Base Change	Cosmic ID
Gly12Ala	(GGT>GCT)	522
Gly12Asp	(GGT>GAT)	521
Gly12Arg	(GGT>CGT)	518
Gly12Cys	(GGT>IGT)	516
Gly12Ser	(GGT>AGT)	517
Gly12Val	(GGT>GTT)	520
Gly13Asp	(GGC>GAC)	532

- Quy trình chạy mẫu và chứng dương với các môi đột biến gen **BRAF**: được thực hiện tương tự như quy trình chạy mẫu và chứng dương với các môi đột biến gen KRAS nhưng thay thế bằng môi đột biến gen BRAF.

## 2.2.6. Nghiên cứu hiệu quả điều trị đích

### 2.2.6.1. Theo dõi lâm sàng

Các thông tin về lâm sàng và cận lâm sàng của người bệnh được thu thập bao gồm: tình trạng toàn thân, triệu chứng lâm sàng, các tổn thương di căn tạng dựa trên khám lâm sàng, các xét nghiệm cận lâm sàng và hình ảnh học. Mỗi người bệnh điều trị đích sẽ được theo dõi dọc trong thời gian điều



trị, bắt đầu từ lúc tiếp nhận điều trị đích cho đến khi tử vong, mất theo dõi, hoặc xuất hiện tác dụng phụ không chấp nhận được hay người bệnh từ chối tiếp tục điều trị hoặc kết thúc nghiên cứu.

#### **2.2.6.2. Thuốc điều trị đích**

Cetuximab liều điều trị khởi đầu là 400mg/m<sup>2</sup> da (truyền tĩnh mạch trên 2 giờ), 250mg/m<sup>2</sup> da trong mỗi tuần tiếp theo (truyền tĩnh mạch chậm trên 1 giờ).

Cách dùng: dùng đơn độc hoặc phối hợp với các hóa chất khác theo phác đồ hóa chất điều trị ở mục 2.2.6.3.

#### **2.2.6.3. Hóa chất điều trị**

Hóa chất chống ung thư được sử dụng kết hợp với Cetuximab hoặc sử dụng đơn thuần theo một trong các phác đồ FOLFOX 4, XELOX hoặc FOLFIRI:

##### *- Phác đồ FOLFOX 4:*

Oxaliplatin 85 mg/m<sup>2</sup> truyền tĩnh mạch ngày 1,15.

Folinic acid 200 mg/m<sup>2</sup> truyền tĩnh mạch ngày 1, 2, 15, 16.

5 FU 400 mg/m<sup>2</sup> tiêm tĩnh mạch (liều bolus) ngày 1, 2, 15, 16.

5 FU 600 mg/m<sup>2</sup> truyền tĩnh mạch ngày 1, 2, 15, 16 (22 giờ)

Mỗi chu kỳ 4 tuần.

##### *- Phác đồ XELOX:*

Oxaliplatin 130 mg/m<sup>2</sup> truyền tĩnh mạch ngày 1 mỗi 3 tuần.

Capecitabine 1000 mg/m<sup>2</sup> uống 2 lần/ngày trong 2 tuần (sau đó 1 tuần nghỉ thuốc).

##### *- Phác đồ FOLFIRI:*

Irinotecan 180mg/m<sup>2</sup>da truyền tĩnh mạch trên 90 phút.

Lecovorin 400mg/m<sup>2</sup>da truyền tĩnh mạch trên 120 phút.

5 FU 400 mg/m<sup>2</sup> tiêm tĩnh mạch (liều bolus), sau đó 5 FU 2400-3000mg/m<sup>2</sup> truyền tĩnh mạch ngày trên 46 giờ.

Chu kỳ này được lặp đi lặp lại mỗi hai tuần.

#### 2.2.6.4. Đánh giá kết quả điều trị sau 03 tháng và sau 06 tháng

Đánh giá đáp ứng theo tiêu chuẩn RECIST 1.1:

**Bảng 2.6. Đánh giá đáp ứng điều trị theo tiêu chuẩn RECIST 1.1 với tổn thương đo lường [126]**

Tổn thương đo lường	Tổn thương không đo lường	Tổn thương mới	Đáp ứng tổng thể
CR (đáp ứng hoàn toàn)	CR (đáp ứng hoàn toàn)	Không	CR (đáp ứng hoàn toàn)
CR (đáp ứng hoàn toàn)	Non-CR/non-PD (không đáp ứng hoàn toàn/không tiến triển)	Không	CR (đáp ứng hoàn toàn)
CR (đáp ứng hoàn toàn)	NE (không xác định)	Không	PR (đáp ứng một phần)
PR (đáp ứng một phần)	Không thay đổi/không xác định	Không	PR (đáp ứng một phần)
SD (không thay đổi)	Không thay đổi/không xác định	Không	SD (không thay đổi)
Not all evaluated (không đánh giá)	Non-PD (không tiến triển)	Không	NE (không xác định)
PD (tiến triển)	Bất kỳ	Có/không	PD (tiến triển)
Bất kỳ	PD (tiến triển)	Có/không	PD (tiến triển)
Bất kỳ	Bất kỳ	Có	PD (tiến triển)

Tổn thương đo lường là những tổn thương đo được kích thước trên hình ảnh chụp cắt lớp vi tính hoặc chụp cộng hưởng từ.

Tổn thương không đo lường là những tổn thương không đo được kích thước trên hình ảnh chụp cắt lớp vi tính hoặc chụp cộng hưởng từ: dịch cổ chướng, dịch màng phổi, khối u tổ chức ống tiêu hóa, nồng độ CEA, nồng độ CA 19-9.

Tổn thương mới là những tổn thương xuất hiện trong quá trình điều trị

mà trước khi bắt đầu điều trị chưa có.

CR = Complete Response - đáp ứng hoàn toàn: các tổn thương biến mất.

PR = Partial Response - đáp ứng một phần: giảm ít nhất 30% tổng đường kính đo lường.

SD = Stable Disease - không thay đổi: không đủ điều kiện PR và PD.

PD = Progressive Disease - tiến triển: tăng ít nhất 20% tổng đường kính đo lường (ít nhất 5mm).

NE = Inevaluable - không xác định.

**Bảng 2.7. Đánh giá đáp ứng điều trị theo tiêu chuẩn RECIST 1.1 với tổn thương không đo lường [126]**

<b>Tổn thương không đo lường</b>	<b>Tổn thương mới</b>	<b>Đáp ứng tổng thể</b>
CR (đáp ứng hoàn toàn)	Không	CR (đáp ứng hoàn toàn)
SD (không thay đổi)	Không	SD (không thay đổi)
NE (không xác định)	Không	NE (không xác định)
PD (tiến triển)	Có hoặc không	PD (tiến triển)
Bất kỳ	Có	PD (tiến triển)

CR = Complete Response - đáp ứng hoàn toàn: các tổn thương biến mất, các dấu ấn ung thư trở về giới hạn bình thường.

SD = Stable Disease - không thay đổi: duy trì tổn thương không đủ điều kiện CR và PD, các dấu ấn ung thư duy trì trên mức giới hạn bình thường .

PD = Progressive Disease - tiến triển: tổn thương tiến triển rõ ràng, các dấu ấn ung thư tiếp tục tăng trên mức giới hạn bình thường.

NE = Inevaluable - không xác định.

- *Đánh giá thời gian sống bệnh không tiến triển khi điều trị đích:*

Ghi nhận thời gian sống bệnh không tiến triển (PFS, Progressive-Free

Survival) (tháng): bắt đầu từ lúc tiếp nhận điều trị đích cho đến khi bệnh có dấu hiệu tiến triển, người bệnh tử vong vì bất kỳ nguyên nhân nào, có thông tin cuối cùng trong trường hợp mất theo dõi hoặc kết thúc nghiên cứu.

- *Đánh giá thời gian sống thêm toàn bộ từ khi điều trị đích:*

Ghi nhận thời gian sống thêm toàn bộ từ khi điều trị đích (OS, Overall Survival) (tháng): bắt đầu từ lúc tiếp nhận điều trị đích cho đến khi người bệnh tử vong, có thông tin cuối cùng trong trường hợp mất theo dõi hoặc kết thúc nghiên cứu.

### **2.2.7. Xử lý số liệu**

- Thu thập số liệu theo bệnh án nghiên cứu.
- Thiết kế và nhập dữ liệu trên phần mềm R version 3.2.2. (2015.06).
- Phân tích, tính tần suất các biến trong nghiên cứu.
- Phân nhóm, kiểm định: tùy theo phân bố của biến số liệu để chọn các kiểm định phù hợp  $\chi^2$ , t-test, fisher's exact-test, wilcoxon-test, Mann Withney-test, Kruskal Walist test để so sánh sự khác biệt giữa các biến nghiên cứu.
- Thời gian PFS, OS, thời gian sống toàn bộ từ khi chẩn đoán xác định được ước tính bằng phương pháp Kaplan-Meier, kiểm định so sánh đơn biến bằng Log rank sum test và kiểm định so sánh đa biến bằng mô hình Cox.

### **2.2.8. Đạo đức trong nghiên cứu**

Nghiên cứu được tiến hành dựa trên sự tự nguyện tham gia của người bệnh ung thư đại trực tràng trên lâm sàng và giải phẫu bệnh. Các xét nghiệm phân tích gen chỉ thực hiện khi có sự đồng ý của người bệnh. Các thông tin về người bệnh, kết quả chẩn đoán được hoàn toàn giữ bí mật. Nghiên cứu được tiến hành vì mục đích khoa học, không vì bất kỳ mục đích nào khác.

### CHƯƠNG 3

#### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

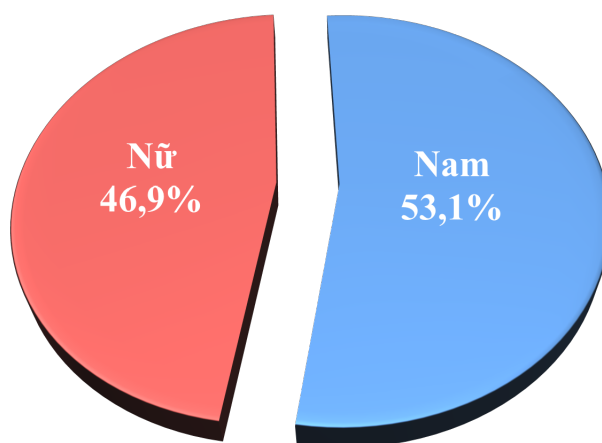
#### 3.1. ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG VÀ ĐỘT BIẾN GEN KRAS, BRAF Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG

Tổng số 145 bệnh nhân ung thư đại trực tràng được làm xét nghiệm tìm đột biến gen KRAS, BRAF tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, trường Đại Học Y Hà Nội từ 01/01/2011 và theo dõi điều trị đến 31/12/2015 tại các Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Việt Đức, Bệnh viện K Trung ương, Bệnh viện Hữu Nghị, Bệnh Viện Ung bướu Hà Nội và Bệnh viện 198 Bộ Công An đủ tiêu chuẩn chọn mẫu. Kết quả thu được như sau:

##### 3.1.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng bệnh nhân ung thư đại trực tràng

###### 3.1.1.1. Đặc điểm của nhóm bệnh nhân nghiên cứu

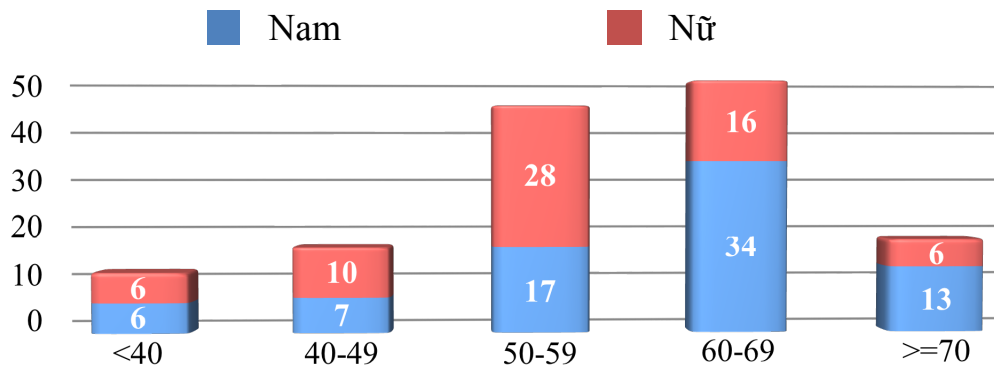
*\* Phân bố bệnh nhân theo giới tính*



#### **Biểu đồ 3.1. Phân bố của bệnh nhân nghiên cứu theo giới tính**

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân nam giới là 53,1% (77/145), tỷ lệ bệnh nhân nữ giới là 46,9% (68/145), tỷ lệ nam/nữ là  $77/68 = 1,13$ .

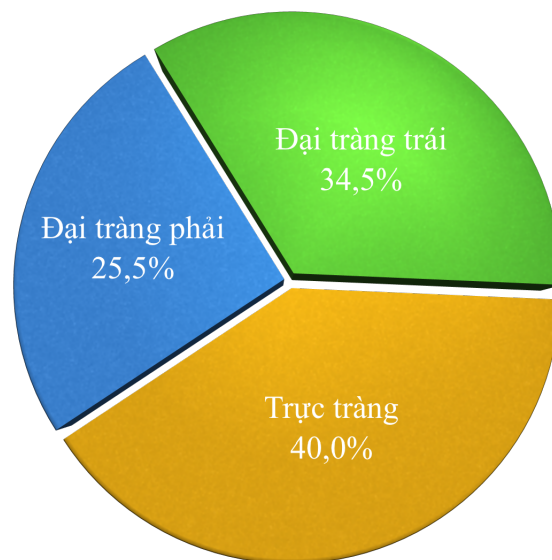
\* Phân bố bệnh nhân theo nhóm tuổi



**Biểu đồ 3.2. Phân bố của bệnh nhân nghiên cứu theo nhóm tuổi**

Nhận xét: Ở nam giới nhóm tuổi từ 60 đến 69 có tỷ lệ cao nhất là 23,4% (34/145); Ở nữ giới nhóm tuổi từ 50 đến 59 có tỷ lệ cao nhất là 19,3% (28/145); tuổi trung bình cả nam và nữ là 57,6 tuổi.

### 3.1.1.2. Vị trí ung thư đại trực tràng



**Biểu đồ 3.3. Vị trí ung thư đại trực tràng**

Nhận xét: Ung thư trực tràng có tỷ lệ cao nhất là 40,0% (58/145), ung thư đại tràng trái đứng thứ hai là 34,5% (50/145), ung thư đại tràng phải thấp nhất là 25,5% (37/145).

### 3.1.1.3. Thời gian có triệu chứng đến khi chẩn đoán xác định

**Bảng 3.1. Thời gian có triệu chứng đến khi chẩn đoán xác định**

Thời gian (tháng)	Đại tràng phải	Đại tràng trái	Trực tràng	Tổng (n = 116)	p
$\bar{X}$	2,93± 2,38	2,75 ± 2,49	3,59 ± 3,10	3,13 ± 2,74	0,1905
Min	1	1	1	1	
Median	2	2	3	2	
Max	12	12	12	12	

Nhận xét: Thời gian có triệu chứng đến khi chẩn đoán xác định trung bình là 3,13 tháng; sự khác biệt về thời gian có triệu chứng đến khi chẩn đoán xác định giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , Kruskal.test).

### 3.1.1.4. Tình trạng cấp cứu khi vào viện

**Bảng 3.2. Tình trạng cấp cứu khi vào viện**

Tình trạng khi vào viện	Đại tràng phải n (%)	Đại tràng trái n (%)	Trực tràng n (%)	Tổng n (%)	p
<b>Cấp cứu</b>	5 (17,2)	11 (27,5)	3 (6,4)	19 (16,4)	0,0233
<b>Không cấp cứu</b>	24(82,8)	29 (72,5)	44 (93,6)	97 (83,6)	
<b>Tổng</b>	29 (100)	40 (100)	47 (100)	116 (100)	

Nhận xét: Tỷ lệ cấp cứu khi vào viện là 16,4% (19/116); Tỷ lệ cấp cứu khi vào viện do ung thư đại tràng trái là 27,5% (11/40) cao hơn so với đại tràng phải là 17,2% (5/29) và trực tràng là 6,4% (3/47), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Fisher.test).

### 3.1.1.5. Một số triệu chứng lâm sàng

**Bảng 3.3. Một số triệu chứng lâm sàng**

<b>Dấu hiệu lâm sàng</b>	<b>Đại tràng phải n(%)</b>	<b>Đại tràng trái n(%)</b>	<b>Trực tràng n(%)</b>	<b>Tổng n(%)</b>	<b>p</b>
<b>Đau bụng</b>	25 (86,2)	30 (75,0)	24 (51,1)	79 (68,1)	0,0036*
<b>Phân có máu</b>	7 (24,1)	22 (55,0)	39 (82,9)	68 (58,6)	2,34e <sup>-6*</sup>
<b>Phân lỏng</b>	14 (48,3)	12 (30,0)	16 (34,0)	42 (36,2)	0,2737*
<b>Thiếu máu</b>	14 (48,3)	10 (25,0)	14 (29,8)	38 (32,8)	0,108*
<b>Sụt cân</b>	9 (31,0)	11 (27,5)	15 (31,9)	35 (30,2)	0,8987*
<b>Phân táo</b>	6 (20,7)	4 (10,0)	2 (4,3)	12 (10,3)	0,0896**
<b>Số bệnh nhân</b>	29 (100)	40 (100)	47 (100)	116 (100)	

Nhận xét: Dấu hiệu đau bụng phổ biến nhất là 68,1% (79/116); tỷ lệ đau bụng ở ung thư đại tràng phải là 86,2% (25/29) cao hơn đại tràng trái 75,0% (30/40) và trực tràng là 51,0% (24/47), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ , Chisq.test).

Phân có máu đứng thứ hai là 58,6% (68/116), phân có máu ở ung thư trực tràng là 83,0% (39/47) cao hơn đại tràng trái là 55,0% (22/40) và đại tràng phải là 24,1% (7/29), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Chisq.test).

Sự khác biệt về tỷ lệ bệnh nhân có triệu chứng phân lỏng, thiếu máu, sụt cân và phân táo giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , \* Chisq.test, \*\* Fisher.test).



### 3.1.1.6. Tôn thương di căn

**Bảng 3.4. Tỷ lệ bệnh nhân có di căn**

Di căn đến	Đại tràng phải n (%)	Đại tràng trái n (%)	Trực tràng n (%)	Tổng n (%)	p
<b>Gan</b>	11 (61,1)	14 (56,0)	17 (68,0)	42 (61,8)	0,6816*
<b>Phổi</b>	3 (16,7)	4 (16,0)	4 (16,0)	11 (16,2)	1**
<b>Buồng trứng</b>	0 (0)	3 (12,0)	2 (8,0)	5 (7,4)	0,4259**
<b>Xương</b>	1 (5,6)	1 (4,0)	0 (0)	2 (2,9)	0,7256**
<b>Tụy</b>	2 (11,1)	0 (0)	0 (0)	2 (2,9)	0,0671**
<b>Thận</b>	0 (0)	1 (4,0)	0 (0)	1 (1,5)	1**
<b>Dạ dày</b>	0 (0)	1 (4,0)	0 (0)	1 (1,5)	1**
<b>Phúc mạc</b>	8 (44,4)	6 (24,0)	5 (20,0)	19 (27,9)	0,1995**
<b>Số có di căn</b>	18 (100)	25 (100)	25 (100)	68 (100)	0,6183*

Nhận xét: Di căn đến gan có tỷ lệ cao nhất là 61,8% (42/68); tỷ lệ bệnh nhân nữ có di căn buồng trứng chiếm 7,4% (5/68) tổng số bệnh nhân có di căn và chiếm 14,7% (5/34) số người bệnh nữ có di căn. Sự khác biệt về tỷ lệ có di căn đến gan, phổi, buồng trứng, xương, tụy, thận, dạ dày, phúc mạc giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , \*Chisq.test, \*\* Fisher.test).

### 3.1.1.7. Đặc điểm nội soi

\* Kích thước u so với chu vi đại trực tràng trên nội soi

**Bảng 3.5. Đặc điểm kích thước u so với chu vi đại trực tràng trên nội soi**

Kích thước u	Đại tràng phải n(%)	Đại tràng trái n(%)	Trực tràng n(%)	Tổng n(%)	p
$\leq 1/4$	1 (4,2)	1 (3,5)	2 (4,6)	4 (4,2)	0,3956
$>1/4-1/2$	5 (20,8)	2 (6,9)	10 (23,3)	17 (17,7)	
$>1/2-3/4$	6 (25,0)	7 (24,1)	14 (32,6)	27 (28,1)	
$>3/4$	12 (50,0)	19 (65,5)	17 (39,5)	48 (50,0)	
<b>Tổng</b>	24 (100)	29 (100)	43 (100)	96 (100)	

Nhận xét: Khối u có kích thước trên 3/4 chu vi đại trực tràng có tỷ lệ cao nhất là 50% (48/96), sự khác biệt về kích thước khối u trên nội soi ở đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , Fisher.test).

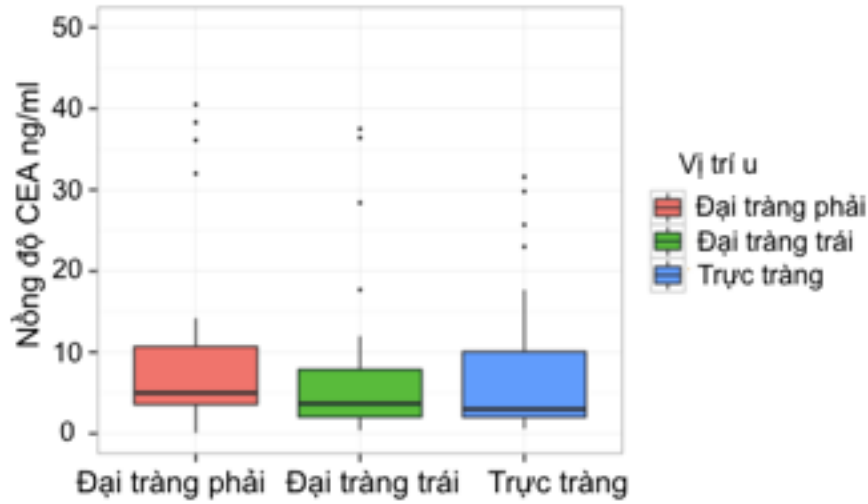
\* Dạng tổn thương trên nội soi

**Bảng 3.6. Dạng tổn thương trên nội soi**

Dạng tổn thương trên nội soi	Đại tràng phải n(%)	Đại tràng trái n(%)	Trực tràng n(%)	Tổng n(%)	p
<b>Sùi</b>	23 (95,8)	29 (100)	40 (93,1)	92 (95,9)	0,9461
<b>Loét</b>	0 (0)	0 (0)	1 (2,3)	1 (1,0)	
<b>Loét sùi</b>	1 (4,2)	0 (0)	1 (2,3)	2 (2,1)	
<b>Thâm nhiễm</b>	0 (0)	0 (0)	1 (2,3)	1 (1,0)	
<b>Tổng</b>	24 (100)	29 (100)	43(100)	96 (100)	

Nhận xét: Dạng tổn thương sùi chiếm 95,9% (92/96), sự khác biệt về tỷ lệ dạng tổn thương giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , Fisher.test).

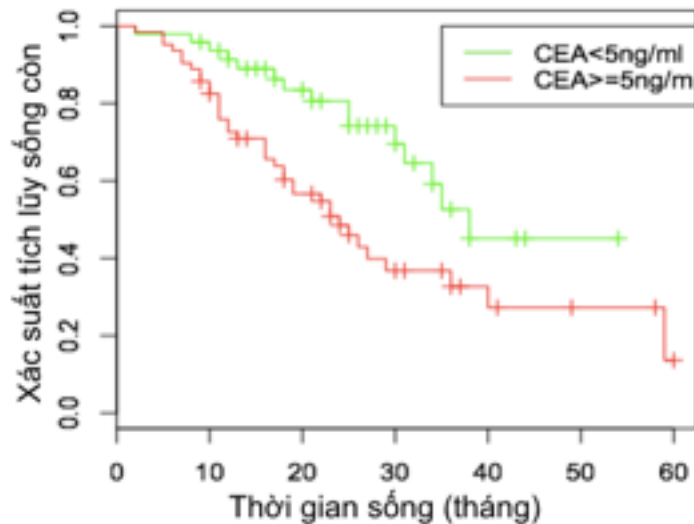
### 3.1.1.8. Đặc điểm chỉ số hóa sinh CEA



**Biểu đồ 3.4. Nồng độ CEA**

Nhận xét: Trung vị nồng độ CEA bệnh nhân ung thư đại tràng phải là 7,10 ng/ml, đại tràng trái là 8,20 ng/ml và trực tràng là 4,8 ng/ml, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , Chisq.test).

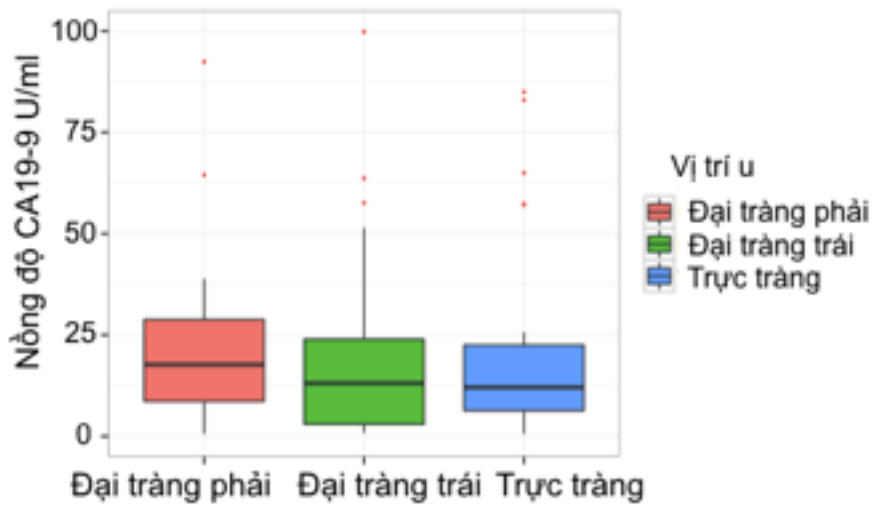
\*Liên quan nồng độ CEA với xác suất tích lũy sống còn



**Biểu đồ 3.5. Liên quan nồng độ CEA với xác suất tích lũy sống còn**

Nhận xét: Xác suất tích lũy sống còn của bệnh nhân có nồng độ CEA < 5 ng/ml cao hơn bệnh nhân có nồng độ CEA  $\geq$  5 ng/ml, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Log rank test).

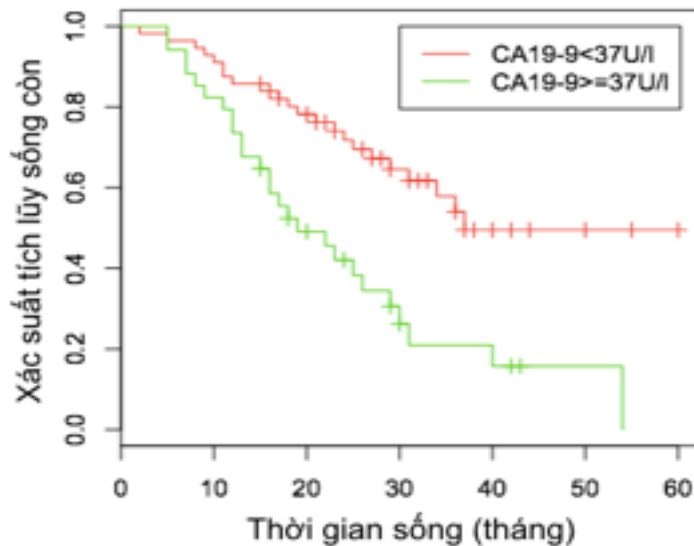
### 3.1.1.9. Đặc điểm chỉ số hóa sinh CA 19-9



**Biểu đồ 3.6. Nồng độ CA19-9**

Nhận xét: Trung vị nồng độ CA19-9 bệnh nhân ung thư đại tràng phải là 20,0 U/ml, đại tràng trái là 22,9 U/ml và trực tràng là 17,2 U/ml, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , Chisq.test).

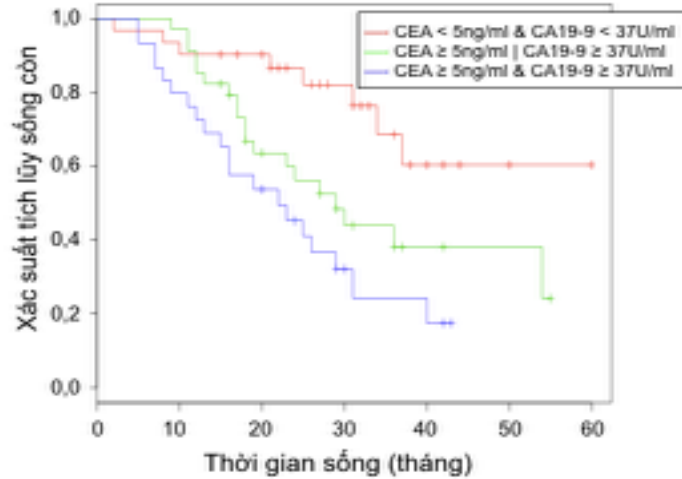
\*Liên quan nồng độ CA19-9 với xác suất tích lũy sống còn



**Biểu đồ 3.7. Liên quan nồng độ CA19-9 với xác suất tích lũy sống còn**

Nhận xét: Xác suất tích lũy sống còn của bệnh nhân có CA19-9 < 37 U/ml cao hơn bệnh nhân có CA19-9  $\geq$  37 U/ml, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với ( $p < 0,05$ , Log rank test).

**3.1.1.10. Liên quan xác suất tích lũy sống còn với nồng độ CEA và CA19-9 điều chỉnh theo giai đoạn bệnh khi phân tích đa biến bằng mô hình Cox.**



**Biểu đồ 3.8. Xác suất tích lũy sống còn với nồng độ CEA và CA19-9 điều chỉnh theo giai đoạn bệnh khi phân tích đa biến bằng mô hình Cox**

Nhận xét: Xác suất tích lũy sống còn cao nhất ở nhóm có CEA < 5 ng/ml và CA19-9 < 37 ng/ml, tiếp theo là nhóm có CEA ≥ 5ng/ml hoặc CA19-9 ≥ 37 ng/ml và thấp nhất là nhóm có CEA ≥ 5ng/ml và CA19-9 ≥ 37 ng/ml, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , Coxph.test).

**3.1.1.11. Xét nghiệm mô bệnh học**

**Bảng 3.7. Phân độ mô học**

Phân độ mô học	Đại tràng phải n (%)	Đại tràng trái n (%)	Trực tràng n (%)	Tổng n (%)	p
<b>Cao</b>	3 (8,1)	6 (12,6)	6 (10,3)	15 (10,3)	0,644
<b>Vừa</b>	29 (78,4)	41 (82,0)	49 (84,5)	119 (82,1)	
<b>Kém</b>	5 (13,5)	3 (6,0)	3 (5,2)	11 (7,6)	
<b>Tổng</b>	37 (100)	50 (100)	58 (100)	145 (100)	

Nhận xét: Mức độ biệt hóa vừa là 82,1% (119/145), biệt hóa cao là 10,3% (15/145), biệt hóa thấp có tỷ lệ thấp nhất là 7,6% (11/145); phân độ mô học không liên quan với vị trí u ( $p > 0,05$ , Fisher.test).

### 3.1.2. Tỷ lệ và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng

#### 3.1.2.1. Kết quả tách chiết DNA, khuếch đại exon 2 gen KRAS và exon 15 gen BRAF từ mẫu mô ung thư

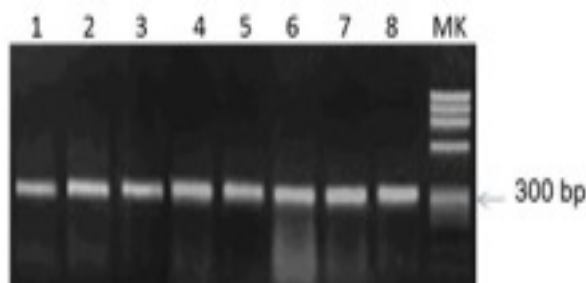
\* Kết quả tách chiết DNA từ mẫu mô ung thư:

**Bảng 3.8. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được tách chiết từ mẫu mô**

Số mẫu DNA = 145	Nồng độ DNA (ng/ $\mu$ l)	Độ tinh sạch ( $A_{260/280}$ )
$\bar{X} \pm SD$	$46,7 \pm 14,0$	$1,81 \pm 0,06$
Min	23	1,68
Max	95	1,98

Nhận xét: Kết quả bảng 3.8 cho thấy các mẫu DNA đều có độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang là  $1,81 \pm 0,06$  khi đo trên máy Nano-drop ở bước sóng 260/280 nm.

Kiểm tra chất lượng DNA bằng gen nội chuẩn GAPDH:

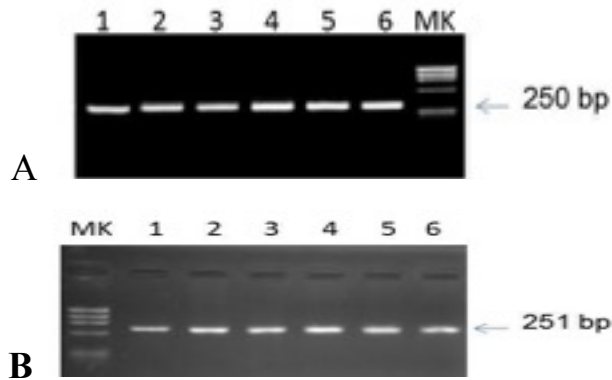


**Hình 3.1: Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng nội chuẩn GAPDH**

(Giếng 1-8 sản phẩm PCR của các mẫu DNA khác nhau, giếng MK: marker)

Nhận xét: Sản phẩm PCR của quá trình khuếch đại gen GAPDH gồm một băng 300 bp đặc hiệu chứng tỏ rằng chất lượng DNA tách chiết được của các mẫu tốt, không bị đứt gãy.

\* Kết quả khuếch đại exon 2 gen KRAS và exon 15 gen BRAF:



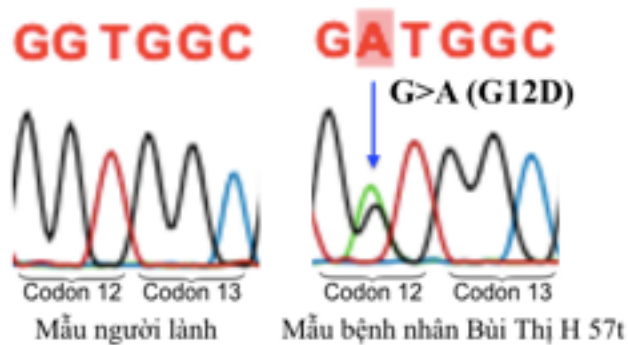
**Hình 3.2: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại exon 2 của gen KRAS (A) và exon 15 của gen BRAF (B) (1-6 sản phẩm PCR khuếch đại từ mẫu DNA của bệnh nhân, MK: marker)**

Nhận xét: Sản phẩm PCR sau điện di cho một băng đặc hiệu đúng kích thước (chiều dài sản phẩm khuếch đại của exon 2 gen KRAS là 250 bp; của exon 15 gen BRAF là 251 bp) không có sản phẩm phụ.

### 3.1.2.2. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen

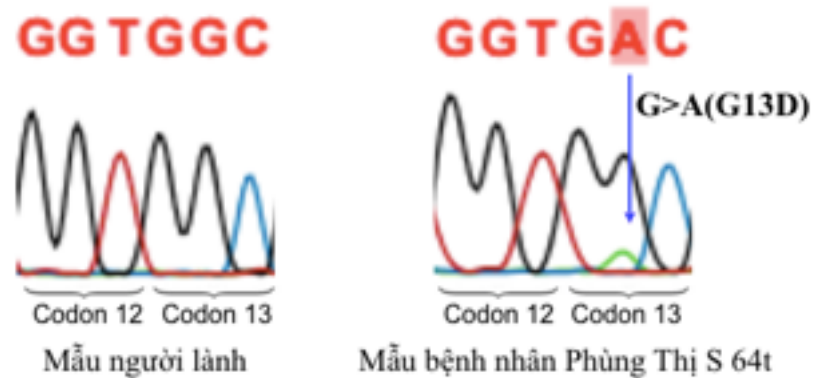
#### \* Kết quả giải trình tự gen KRAS

Sử dụng mẫu mô lành tính để đối chiếu so sánh. Kết quả đã phát hiện các dạng đột biến khác nhau ở trên exon 2 của gen KRAS.



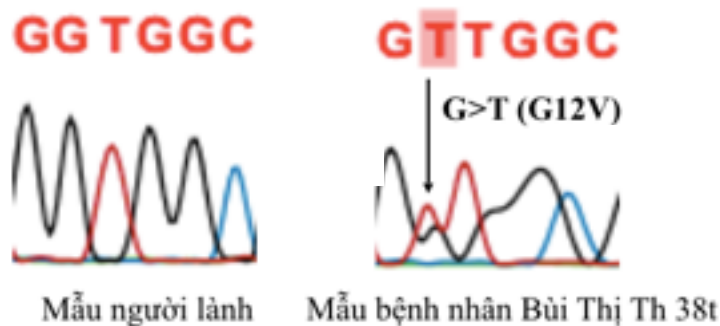
**Hình 3.3: Đột biến G12D tại exon 2 trên gen KRAS**

Nhận xét: Hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G12D tại exon 2 gen KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh trình tự DNA lành tính với DNA ung thư, tại vị trí nucleotid 35, exon 2: G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycin (G) tại codon 12 bị biến thành Aspartate (D), gây nên đột biến G12D.



**Hình 3.4: Đột biến G13D tại exon 2 trên gen KRAS**

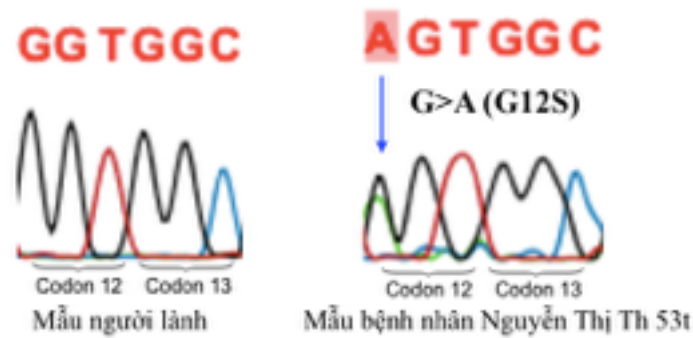
Nhận xét: Hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G13D tại exon 2 gen KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh trình tự DNA lành tính với DNA ung thư, tại vị trí nucleotid 38, exon 2: G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycin (G) tại codon 13 bị biến thành Aspartate (D), gây nên đột biến G13D.



**Hình 3.5: Đột biến G12V tại exon 2 trên gen KRAS**

Nhận xét: Hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G12V tại exon 2 gen KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh trình tự DNA lành tính với DNA ung thư, tại vị trí nucleotid 35, exon 2: G bị biến đổi thành T, làm cho acid amin Glycin (G) tại codon 12 bị biến thành Valine (V), gây nên đột biến G12V.



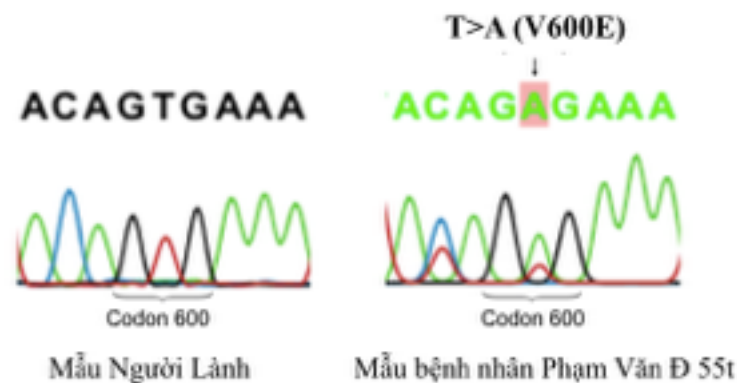


**Hình 3.6: Đột biến G12S tại exon 2 trên gen KRAS**

Nhận xét: Đây là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G12S tại exon 2 gen KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Tại vị trí nucleotid 34, exon 2: G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycin (G) tại codon 12 bị biến thành Serine (S), gây nên đột biến G12S.

\* *Kết quả giải trình tự gen BRAF:*

Tương tự như xác định đột biến gen KRAS, mẫu mô lành tính sẽ được sử dụng để đối chiếu so sánh. Kết quả cho thấy đã phát đột biến V600E ở trên exon 15 của gen BRAF.



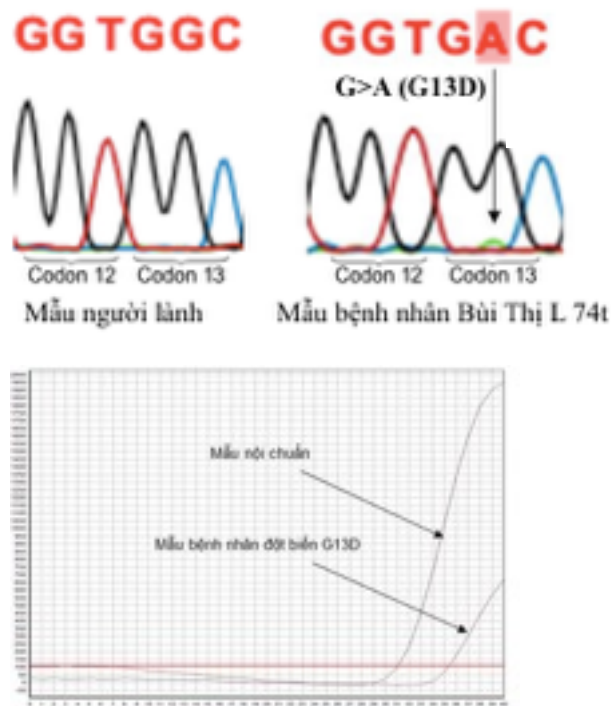
**Hình 3.7: Đột biến V600E tại exon 15 trên gen BRAF**

Nhận xét: Đây là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến V600E tại exon 15 gen BRAF bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh trình tự DNA lành tính với DNA ung thư, tại vị trí nucleotid 1799, exon 15: T bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Valine tại codon 600 bị biến thành Glutamate (E), gây nên đột biến V600E.

### 3.1.2.3. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật Scorpions ARMS

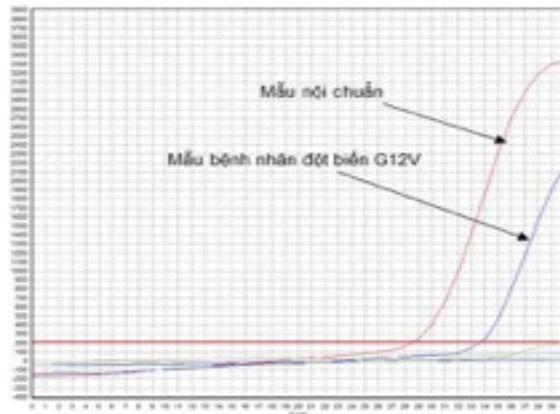
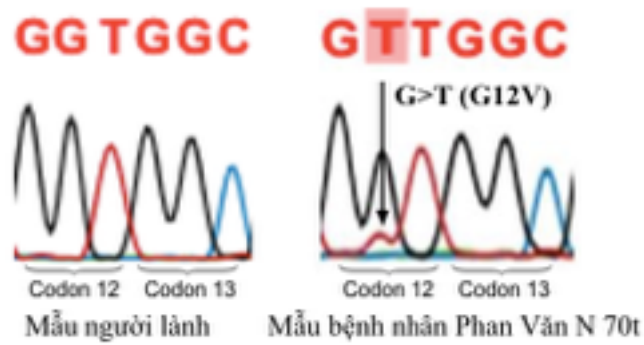
#### \* Kết quả xác định đột biến gen KRAS

DNA mẫu mô ung thư sau khi được tách chiết sẽ được tiến hành phản ứng real-time PCR với các môi Scorpions đặc hiệu cho 7 dạng đột biến G12C, G12A, G12D, G12S, G12V, G12R và G13D. Phản ứng có sử dụng mẫu chứng nội chuẩn.



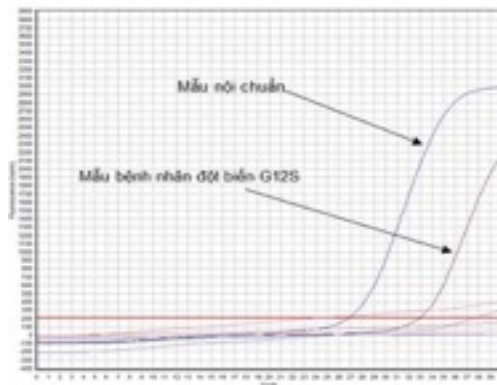
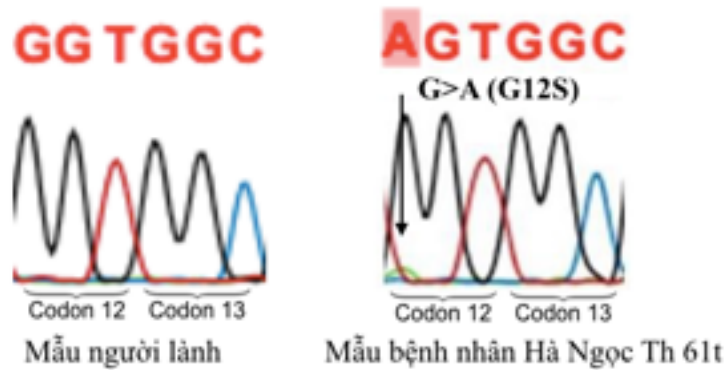
**Hình 3.8: Đột biến G13D (codon 13) trên gen KRAS**

Nhận xét: Ở mẫu DNA này, khi xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen, tại vị trí nucleotid 38, thuộc codon 13 là vị trí nucleotid G xuất hiện thêm một đỉnh tín hiệu tương trưng cho nucleotid A. Tuy nhiên, đỉnh tín hiệu này rất thấp, dẫn đến nghi ngờ đây là đột biến G13D ở mẫu mô có nồng độ DNA ung thư thấp hoặc chỉ là tín hiệu nhiễu khi thực hiện kỹ thuật. Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpions ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của cặp môi đột biến G13D bên cạnh đường cong tín hiệu của cặp môi trong mẫu chứng. Như vậy có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến G13D exon 2 gen KRAS.



**Hình 3.9: Đột biến G12V (codon 12) trên gen KRAS**

Nhận xét: Tương tự, ở mẫu DNA này, khi tìm đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen, tại codon 12 gen KRAS, tại vị trí nucleotid 35 là vị trí nucleotid G xuất hiện thêm một đỉnh tín hiệu tương trưng cho nucleotid T. Tuy nhiên, đỉnh tín hiệu này rất thấp, dẫn đến nghi ngờ đây là đột biến G12V ở mẫu mô có nồng độ DNA ung thư thấp hoặc chỉ là tín hiệu nhiễu khi thực hiện kỹ thuật. Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpions ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của cặp môi đột biến G12V bên cạnh đường cong tín hiệu của cặp môi trong mẫu chứng. Như vậy có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến G12V exon 2 gen KRAS.

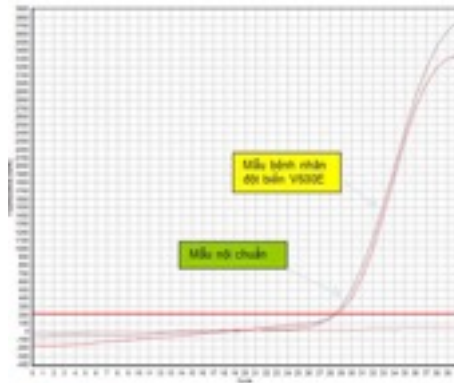


**Hình 3.10: Đột biến G12S (codon 12) trên gen KRAS**

Nhận xét: Ở mẫu DNA này, khi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để xác định đột biến gen, nghi ngờ có mang đột biến tại vị trí nucleotid 34, thuộc codon 12. Tại vị trí này, bên cạnh đỉnh tín hiệu cho nucleotid G, còn xuất hiện thêm một đỉnh nucleotid A tín hiệu thấp. Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpions ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của cặp môi đột biến G12S bên cạnh đường cong tín hiệu của cặp môi trong mẫu chứng. Như vậy có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến G12S exon 2 gen KRAS.

\* *Kết quả xác định đột biến gen BRAF*

DNA mẫu mô ung thư sau khi được tách chiết sẽ được tiến hành phản ứng real-time PCR với các môi ARMS đặc hiệu cho 4 loại đột biến V600E, V600D, V600K, V600R. Phản ứng có sử dụng mẫu chứng nội chuẩn.



Mẫu bệnh nhân Thiều Thị Đ 69t

### Hình 3.11: Đột biến V600E (codon 600) trên gen BRAF

Nhận xét: Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpions ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của cặp mỗi đột biến V600E bên cạnh đường cong tín hiệu của cặp mỗi trong mẫu chứng. Đây là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến V600E tại exon 15 gen BRAF.

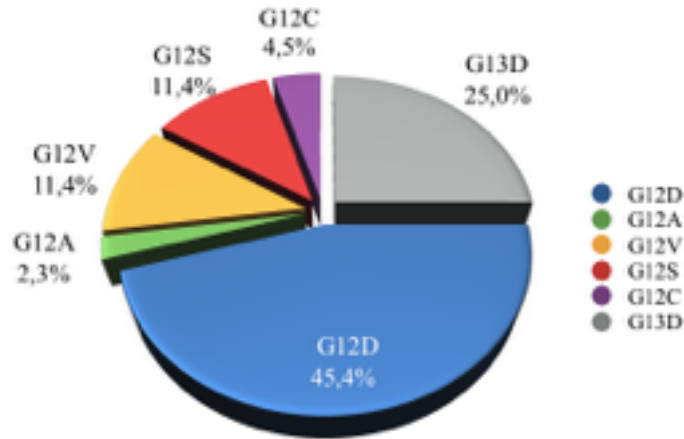
#### 3.1.2.4. Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng

Bảng 3.9. Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF

Đột biến	KRAS		BRAF		Tổng	
	n	%	n	%	n	%
<b>Có đột biến</b>	44	30,4	5	3,4	49	33,8
<b>Không đột biến</b>	101	69,6	140	96,6	96	66,2
<b>Tổng</b>	145	100	145	100	145	100

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến gen KRAS ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng là 30,4% (44/145), đột biến gen BRAF là 3,4% (4/145), tỷ lệ đột biến cả hai gen là 33,8% (49/145), không đột biến cả hai gen chiếm 66,2%.

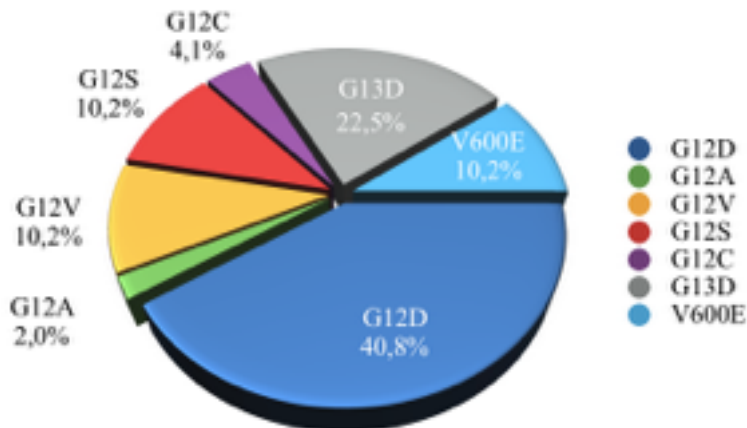
### 3.1.2.5. Tỷ lệ các dạng đột biến gen KRAS ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng



**Biểu đồ 3.9. Tỷ lệ các dạng đột biến gen KRAS**

Nhận xét: Đột biến gen KRAS tại codon 12 dạng G12D chiếm tỷ lệ cao nhất là 45,4% (20/44), đứng thứ hai là đột biến gen KRAS tại codon 13 dạng G13D là 25,0% (11/44), đột biến tại codon 12 dạng G12A có tỷ lệ thấp nhất là 2,3% (1/44), không có bệnh nhân đột biến dạng G12R.

### 3.1.2.6. Tỷ lệ dạng đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng



**Biểu đồ 3.10. Tỷ lệ các dạng đột biến gen KRAS và BRAF**

Nhận xét: Đột biến gen KRAS tại codon 12 dạng G12D có tỷ lệ cao nhất là 40,8% (20/49), đứng thứ hai là đột biến gen KRAS tại codon 13 dạng G13D là 22,5% (11/49), đột biến gen BRAF chiếm tỷ lệ 10,2% (5/49).

### 3.2. LIÊN QUAN CỦA ĐỘT BIẾN GEN KRAS, BRAF VỚI ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG VÀ NHẬN XÉT BƯỚC ĐẦU KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ ĐÍCH Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG

#### 3.2.1. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với giới tính

##### 3.2.1.1. Liên quan tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF với giới tính

**Bảng 3.10. Liên quan tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF với giới tính**

Gen KRAS và BRAF	Nam n (%)	Nữ n (%)	Tổng n (%)	p
Không đột biến	57 (74,0)	39 (57,4)	96 (66,2)	0,0521
Đột biến KRAS	18 (23,4)	26 (38,2)	44 (30,4)	0,0700
Đột biến BRAF	2 (2,6)	3 (4,4)	5 (3,4)	0,6655
Tổng	77 (100)	68 (100)	145 (100)	

Nhận xét: Ở nam giới tỷ lệ đột biến gen KRAS là 23,4% (18/77) và gen BRAF là 2,6% (2/77); ở nữ giới tỷ lệ đột biến gen KRAS là 38,2% (26/68) và gen BRAF là 4,4% (3/68); Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với giới tính ( $p > 0,05$ , Chisq.test).

##### 3.2.1.2. Liên quan dạng đột biến gen KRAS, BRAF với giới tính

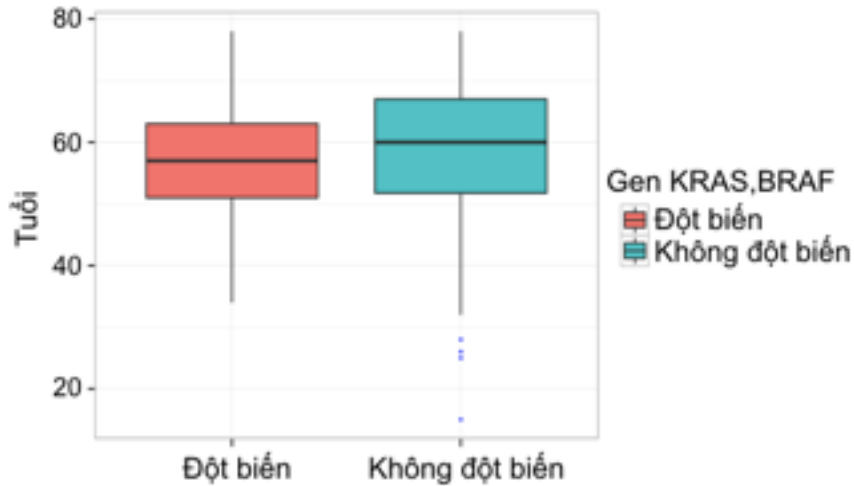
**Bảng 3.11. Liên quan dạng đột biến gen KRAS, BRAF với giới tính**

Dạng đột biến gen KRAS, BRAF	Nam n (%)	Nữ n (%)	Tổng n (%)	p
G12D	7 (35,0)	13 (44,8)	20 (40,8)	0,8775
G12A	0 (0)	1 (3,5)	1 (2,0)	
G12V	3 (15,0)	2 (6,9)	5 (10,2)	
G12S	3 (15,0)	2 (6,9)	5 (10,2)	
G12C	1 (5,0)	1 (3,5)	2 (4,1)	
G13D	4 (20,0)	7 (24,1)	11 (22,5)	
V600E	2 (10,0)	3 (10,3)	5 (10,2)	
Tổng	20 (100)	29 (100)	49 (100)	

Nhận xét: Đột biến G12D cao nhất ở nữ là 44,8% và ở nam là 35,0%; dạng đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với giới tính ( $p > 0,05$ , Chisq.test).

### 3.2.2. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với tuổi

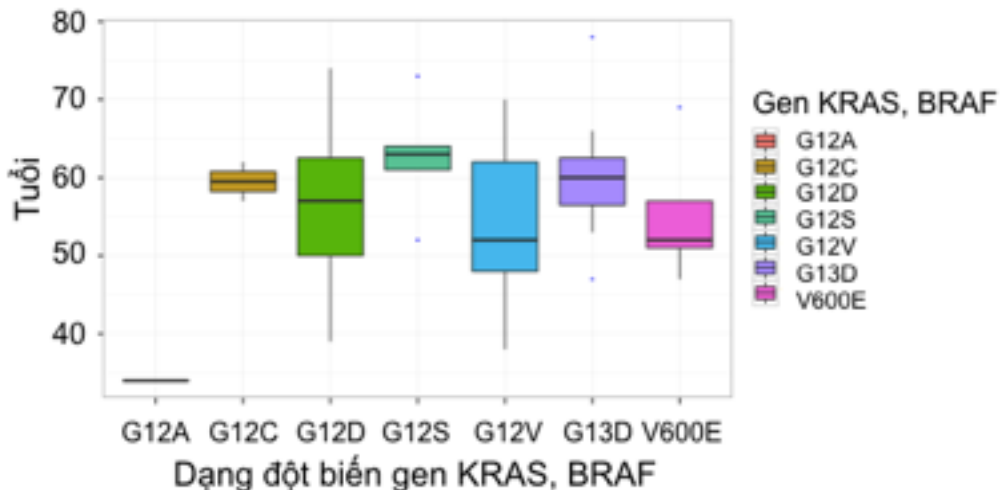
#### 3.2.2.1. Liên quan tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF với tuổi



**Biểu đồ 3.11. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với tuổi**

Nhận xét: Tuổi trung vị nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 57 tuổi, Tuổi trung vị nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 60 tuổi; tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với tuổi ( $p > 0,05$ , Wilcox.test).

#### 3.2.2.2. Liên quan dạng đột biến gen KRAS, BRAF với tuổi



**Biểu đồ 3.12. Dạng đột biến gen KRAS, BRAF với tuổi**

Nhận xét: Tuổi trung vị cao nhất ở dạng đột biến G12S là 63 tuổi, Tuổi trung vị thấp nhất ở dạng đột biến G12A là 34 tuổi; dạng đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với tuổi ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis rank sum test).



### 3.2.3. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh

**Bảng 3.12. Đột biến gen KRAS, BRAF với thời gian có triệu chứng**

Thời gian (tháng)	Gen KRAS, BRAF			p
	Đột biến	Không đột biến	Chung	
$\bar{x}$	3,35 ± 3,08	3,03 ± 2,57	3,13 ± 2,74	0,8934
Min	1	1	1	
Median	3	2	2	
Max	12	12	12	

Nhận xét: Thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh ở nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 3,35 ± 3,08 tháng tương tự nhóm không đột biến là 3,03 ± 2,57 tháng ( $p > 0,05$ , Wilcox.test).

### 3.2.4. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với tình trạng cấp cứu khi vào viện

**Bảng 3.13. Đột biến gen KRAS, BRAF với tình trạng cấp cứu**

Gen KRAS, BRAF	Cấp cứu n (%)	Không cấp cứu n (%)	Tổng n (%)	p
<b>Đột biến</b>	9 (47,4)	28 (28,9)	37 (31,9)	0,1891
<b>Không đột biến</b>	10 (52,6)	69 (71,1)	79 (68,1)	
<b>Tổng</b>	19 (100)	97 (100)	116 (100)	

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân đột biến gen KRAS, BRAF nhập viện trong tình trạng cấp cứu là 47,4% (9/19), không cấp cứu là 28,9% (28/97), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$  - Chisq.test).

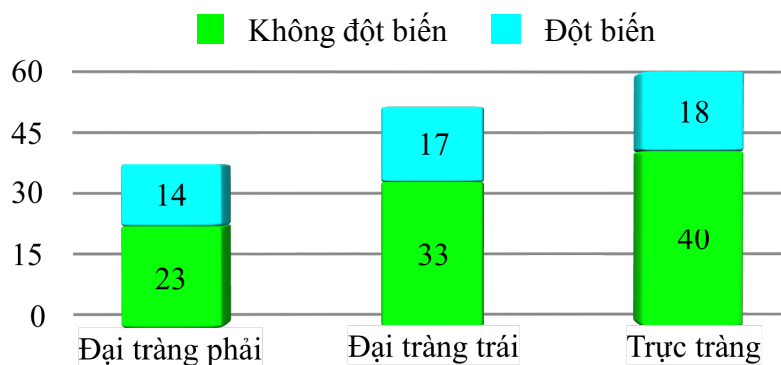
### 3.2.5. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với một số triệu chứng lâm sàng

**Bảng 3.14. Đột biến gen KRAS, BRAF với một số triệu chứng lâm sàng**

Dấu hiệu lâm sàng	Đột biến n(%)	Không đột biến n(%)	Tổng n(%)	p
Đau bụng	26 (70,3)	53 (67,1)	79 (68,1)	0,832
Phân có máu	24 (64,9)	44 (55,7)	68 (58,6)	0,4205
Phân lỏng	11 (29,7)	31 (39,2)	42 (36,2)	0,4081
Thiếu máu	10 (27,0)	28 (35,4)	38 (32,8)	0,4038
Sụt cân	7 (18,9)	28 (35,4)	35 (30,2)	0,0847
Phân táo	2 (5,4)	10 (12,7)	12 (10,3)	0,3333
<b>Số bệnh nhân</b>	<b>37 (100)</b>	<b>79 (100)</b>	<b>116 (100)</b>	

Nhận xét: Đau bụng là triệu chứng lâm sàng chiếm tỷ lệ cao nhất ở cả nhóm có đột biến 70,3% (26/37) và không đột biến 67,1% (53/79); đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với các triệu chứng lâm sàng đau bụng, phân có máu, phân lỏng, thiếu máu, sụt cân và phân táo ( $p > 0,05$ , Fisher.test).

### 3.2.6. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với vị trí u



**Biểu đồ 3.13. Đột biến gen KRAS, BRAF với vị trí u**

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF ở đại tràng phải là 37,8% (14/37), ở đại tràng trái 34,0% (17/50) và trực tràng 31,0% (18/58), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , Chisq.test).

### 3.2.7. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với tổn thương di căn

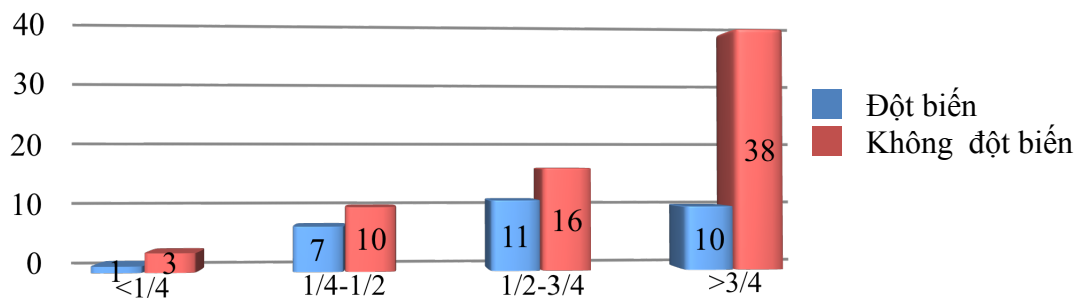
**Bảng 3.15. Đột biến gen KRAS, BRAF với tổn thương di căn**

Di căn đến	Đột biến n (%)	Không đột biến n (%)	Tổng n (%)	p
<b>Gan</b>	10 (47,6)	32 (68,1)	42 (61,8)	0,2139
<b>Phổi</b>	5 (23,8)	7 (14,9)	11 (16,2)	0,517
<b>Buồng trứng</b>	3 (14,3)	3 (6,4)	5 (7,4)	0,3817
<b>Xương</b>	1 (4,8)	1 (2,1)	2 (2,9)	0,5381
<b>Tụy</b>	0 (0)	2 (4,3)	2 (2,9)	1
<b>Thận</b>	0 (0)	1 (2,1)	1 (1,5)	1
<b>Dạ dày</b>	0 (0)	1 (2,1)	1 (1,5)	1
<b>Phúc mạc</b>	7 (33,3)	12 (25,5)	19 (27,9)	0,6014
<b>Số có di căn</b>	21 (100)	47 (100)	68 (100)	

Nhận xét: Di căn đến gan có tỷ lệ lớn nhất ở nhóm không đột biến 68,1% (32/47), đột biến 47,6% (10/21); Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với di căn đến gan, phổi, buồng trứng, xương, phúc mạc ( $p > 0,05$ , Fisher.test).

### 3.2.8. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF đặc điểm nội soi

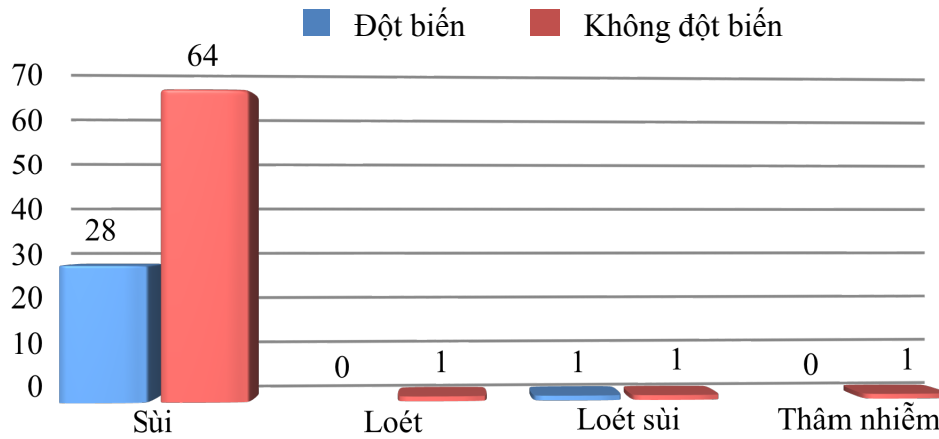
#### 3.2.8.1. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF và kích thước u so với chu vi đại trực tràng trên nội soi



**Biểu đồ 3.14. Đột biến gen KRAS, BRAF và kích thước u trên nội soi**

Nhận xét: Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với kích thước u trên nội soi ( $p > 0,05$ , Fisher.test).

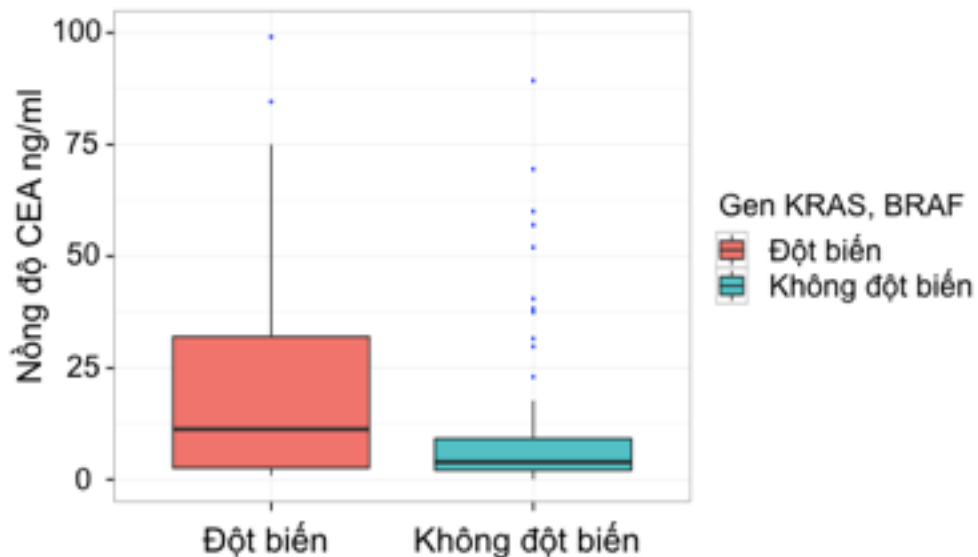
### 3.2.8.2. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với dạng tổn thương trên nội soi



#### Biểu đồ 3.15. Đột biến gen KRAS, BRAF với dạng tổn thương trên nội soi

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF ở tổn thương dạng sùi là 30,4% (28/92), dạng loét sùi là 50% (1/2); Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với dạng tổn thương trên nội soi ( $p > 0,05$ , Fisher.test).

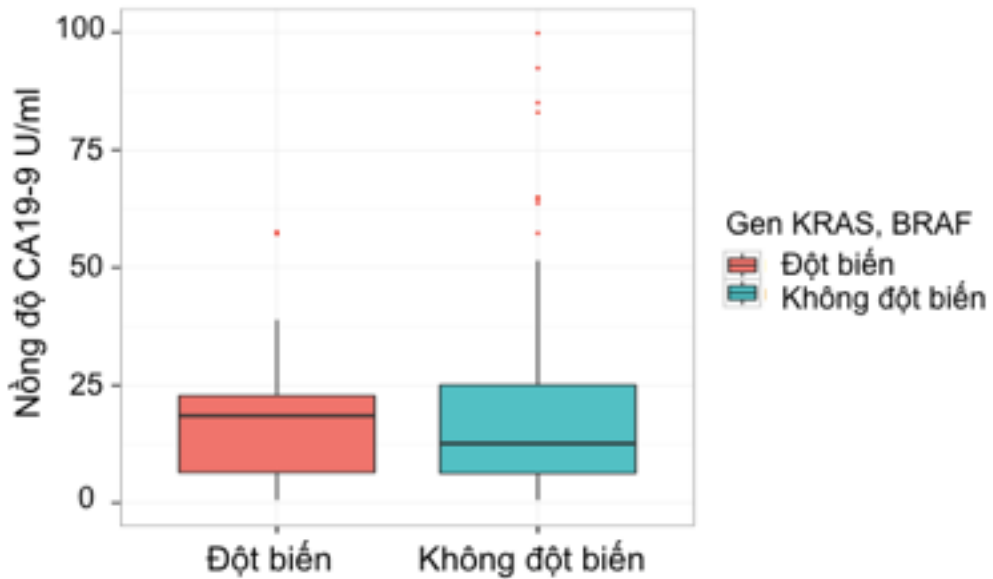
### 3.2.9. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CEA



#### Biểu đồ 3.16. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CEA

Nhận xét: Trung vị nồng độ CEA nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 14,2 ng/ml, nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 5,2 ng/ml, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$  Chisq.test).

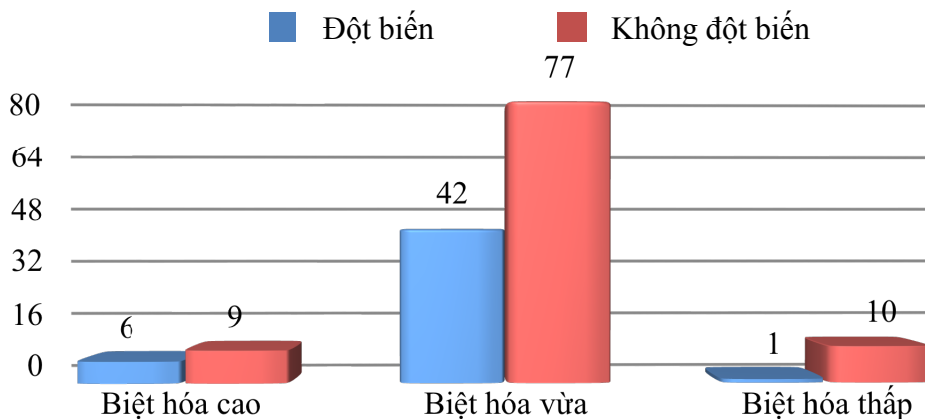
### 3.2.10. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CA 19-9



**Biểu đồ 3.17. Đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CA 19-9**

Nhận xét: Trung vị nồng độ CA19-9 nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 22,9 U/ml, nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 17,7 U/ml, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , Chisq.test).

### 3.2.11. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với phân độ mô bệnh học



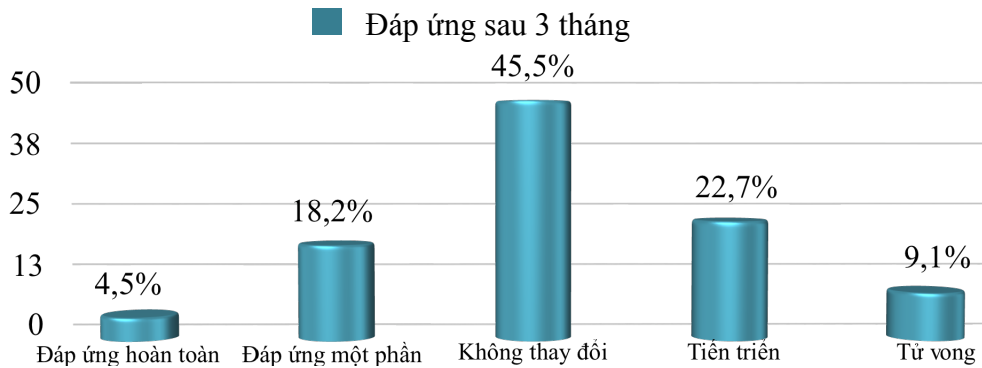
**Biểu đồ 3.18. Đột biến gen KRAS, BRAF với phân độ mô bệnh học**

Nhận xét: Đột biến gen KRAS, BRAF ở nhóm biệt hóa cao là 40,0% (6/15), biệt hóa vừa là 35,3% (42/119), biệt hóa thấp là 9,1% (1/11). Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với phân độ mô bệnh học ( $P > 0,05$ , Fisher.test).

### 3.2.12. Nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

Nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở 22 bệnh nhân sau 03 tháng và 21 bệnh nhân sau 06 tháng (01 bệnh nhân mới điều trị được 3 tháng) như sau:

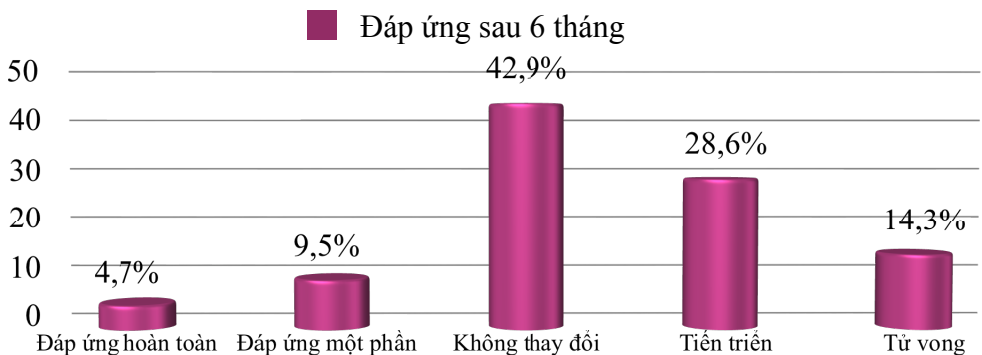
#### 3.2.12.1. Đáp ứng điều trị đích sau 03 tháng



**Biểu đồ 3.19. Đáp ứng điều trị đích sau 03 tháng**

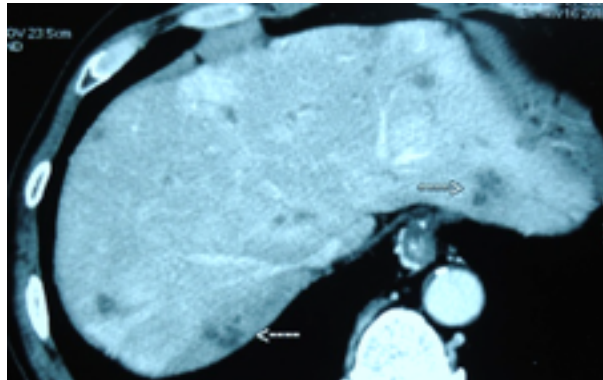
Nhận xét: Sau 03 tháng điều trị có 4,5% (01/22) bệnh nhân có đáp ứng hoàn toàn, 18,2% (04/22) bệnh nhân đáp ứng một phần, 45,5% (10/22) bệnh nhân bệnh không thay đổi, 22,7% (05/22) bệnh nhân tiến triển và 9,1% (02/22) bệnh nhân tử vong.

#### 3.2.12.2. Đáp ứng điều trị đích sau 06 tháng

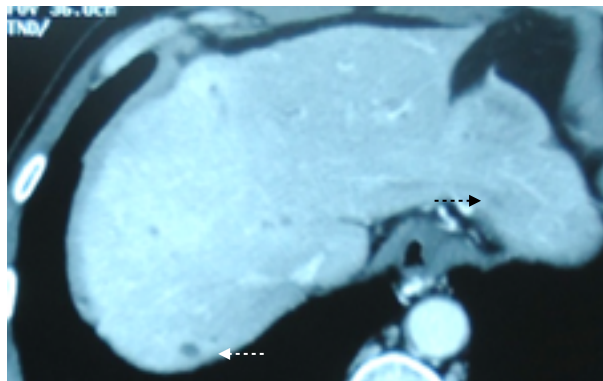


**Biểu đồ 3.20. Đáp ứng điều trị đích sau 06 tháng**

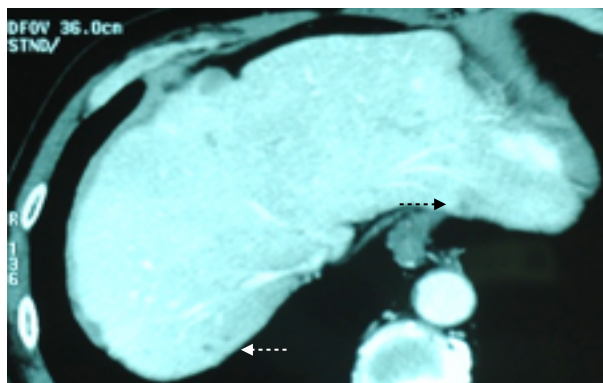
Nhận xét: Sau 06 tháng điều trị có 4,7% (01/21) bệnh nhân có đáp ứng hoàn toàn, 9,5% (02/21) bệnh nhân đáp ứng một phần, 42,9% (9/21) bệnh nhân bệnh không thay đổi, 28,6% (06/21) bệnh nhân tiến triển và 14,3% (03/21) bệnh nhân tử vong.



**Hình 3.12:** Hình ảnh chụp cắt lớp vi tính (Bn Ng.L.B) tổn thương di căn gan của bệnh nhân trước điều trị đích (mũi tên).

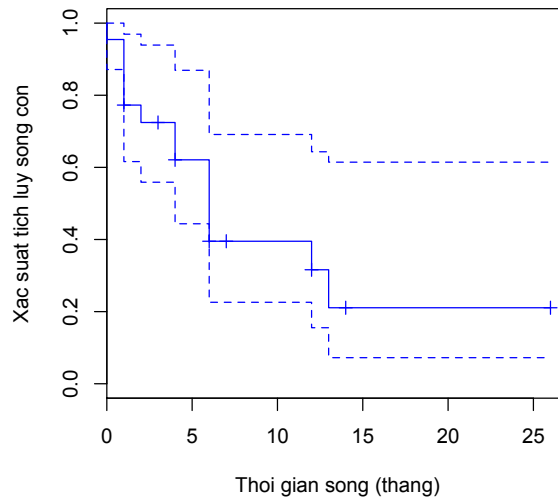


**Hình 3.13:** Hình ảnh chụp cắt lớp vi tính (Bn Ng.L.B) tổn thương di căn gan của bệnh nhân thu nhỏ sau điều trị đích 03 tháng (mũi tên).



**Hình 3.14:** Hình ảnh chụp cắt lớp vi tính (Bn Ng.L.B) tổn thương di căn gan của bệnh nhân thu nhỏ sau điều trị đích 06 tháng (mũi tên).

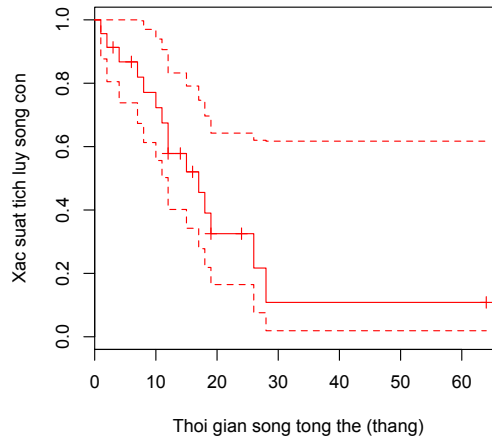
### 3.2.12.3. Thời gian sống bệnh không tiến triển (PFS) từ khi điều trị đích



**Biểu đồ 3.21. Thời gian sống bệnh không tiến triển (PFS) và CI95% của (PFS) từ khi điều trị đích**

Nhận xét: Trung vị thời gian sống bệnh không tiến triển từ khi điều trị đích là 06 tháng, thời gian sống bệnh không tiến triển từ khi điều trị đích thấp nhất là 01 tháng và cao nhất là 26 tháng.

### 3.2.12.4. Thời gian sống tổng thể (OS) từ khi điều trị đích



**Biểu đồ 3.22. Thời gian sống tổng thể (OS) và CI95% của (OS) từ khi điều trị đích**

Nhận xét: Trung vị thời gian sống tổng thể từ khi điều trị đích là 17 tháng, thời gian sống tổng thể từ khi điều trị đích thấp nhất là 01 tháng và cao nhất là 64 tháng.



## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG VÀ ĐỘT BIẾN GEN KRAS, BRAF Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG

##### 4.1.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng

###### 4.1.1.1. Đặc điểm của nhóm bệnh nhân nghiên cứu

Các nghiên cứu về ung thư đại trực tràng thường thấy tỷ lệ bệnh nhân nam giới cao hơn nữ giới [40],[127],[41]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh nhân nam giới là 53,1% (77/145), tỷ lệ bệnh nhân nữ giới là 46,9% (68/145), tỷ lệ nam/nữ là  $77/68 = 1,13$  (biểu đồ 3.1). Ở nam giới nhóm tuổi từ 60 đến 69 có tỷ lệ cao nhất là 23,4% (34/145); ở nữ giới nhóm tuổi từ 50 đến 59 có tỷ lệ cao nhất là 19,3% (28/145); tuổi trung bình cả nam và nữ là 57,6 tuổi (biểu đồ 3.2). Kết quả của nghiên cứu này tương tự như một số tác giả đã công bố. Theo nghiên cứu của Trần Thắng năm 2012, ung thư đại tràng có tỷ lệ nam giới là 56,9%, nữ giới chiếm 43,1% tỷ lệ nam/nữ là 1,3/1, lứa tuổi từ 41 đến 70 chiếm trên 80% [128]. Trong nghiên cứu của Neumaan và cộng sự: tuổi trung bình là 63,8 tuổi, 62,4% bệnh nhân là nam giới, và 37,6% là nữ giới [101]. Chalya và cộng sự nghiên cứu 332 bệnh nhân ung thư đại trực tràng tại Tanzania thấy tỷ lệ nam giới chiếm 60,8% và tỷ lệ nữ giới chiếm 39,2%, tỷ lệ nam/nữ 1,6/1. Tuổi thấp nhất là 15 và cao nhất là 82, tuổi trung bình là 46, nhóm tuổi gặp nhiều nhất là 41-50 [41].

Với sự phát triển của các phương pháp khám sàng lọc, bệnh lý ung thư đại trực tràng đã được phát hiện ngày càng nhiều và lứa tuổi phát hiện ngày càng trẻ hơn. Tuy nhiên, lứa tuổi mắc bệnh ung thư đại trực tràng hay gặp nhiều nhất là từ 50 đến 70, tuổi trung bình thường trên 60 tuổi, tỷ lệ bệnh nhân nam giới thường cao hơn nữ giới [40],[127],[41]. Trên thực tế lâm sàng, việc lựa chọn các phương pháp điều trị ung thư đại trực tràng trong đó có

phẫu thuật liên quan đến tuổi tác của người bệnh nhất là người cao tuổi. Nhiều người cao tuổi mắc ung thư đại trực tràng thường không được lựa chọn phẫu thuật là biện pháp điều trị ưu tiên và tử vong vì các bệnh lý khác. Nhưng kết quả điều trị ung thư đại trực tràng ở người cao tuổi không khác biệt với nhóm trẻ tuổi mặc dù tuổi cao và có nhiều bệnh đi kèm [129]. Chính vì vậy việc lựa chọn các biện pháp điều trị ung thư đại trực tràng không nên xem tuổi tác làm căn cứ [130].

#### **4.1.1.2. Vị trí ung thư đại trực tràng**

Ung thư đại trực tràng có thể gặp ở bất kỳ vị trí nào của đại trực tràng. Vị trí khối u có liên quan đến các triệu chứng lâm sàng của ung thư đại trực tràng [44]. Các nghiên cứu ở Việt Nam và nước ngoài cho thấy ung thư trực tràng chiếm tỷ lệ từ 27% đến 53% trong các trường hợp ung thư đại trực tràng [5],[131],[132]. Trong nghiên cứu này, ung thư trực tràng chiếm tỷ lệ cao nhất là 40,0% (58/145), tỷ lệ ung thư đại tràng trái đứng thứ hai là 34,5% (50/145), tỷ lệ ung thư đại tràng phải thấp nhất là 25,5% (37/145) (biểu đồ 3.3). Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Kodaz và cộng sự thấy trong 189 bệnh nhân ung thư đại trực tràng, ung thư trực tràng chiếm 34,4% (65/189), ung thư đại tràng chiếm 65,6% (124/189) [133].

#### **4.1.1.3. Thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh**

Phần lớn những bệnh nhân phát hiện ung thư đại trực tràng sau khi đã có các triệu chứng lâm sàng. Rất ít bệnh nhân được phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm nhờ các biện pháp khám sàng lọc có hệ thống. Sự chậm trễ trong chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng hiện nay vẫn còn phổ biến làm tăng thêm sự trầm trọng của bệnh khi được phát hiện. Trong nghiên cứu này, thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh trung bình là 3,13 tháng; thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh ở nhóm ung thư đại tràng phải là  $2,93 \pm 2,38$  tháng, ung thư đại tràng trái là  $2,75 \pm 2,49$  tháng, ung thư trực tràng là  $3,59 \pm 3,10$  tháng. Sự khác biệt về thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện

bệnh giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê (bảng 3.1). Trong nghiên cứu của Stephen và cộng sự thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh trung bình trong giai đoạn I là 10,0 tuần, Giai đoạn II là 14,0 tuần, Giai đoạn III là 18,5 tuần, và giai đoạn IV là 26,0 tuần. Có mối liên quan giữa thời gian để chẩn đoán sau khi có triệu chứng bệnh ung thư đại trực tràng và giai đoạn bệnh. Hầu hết những bệnh nhân chậm trễ vì cho rằng triệu chứng của họ là do một nguyên nhân ít quan trọng hơn ung thư đại trực tràng. Một phần của sự chậm trễ là do các thầy thuốc không thực hiện đầy đủ các biện pháp sàng lọc một cách kịp thời. Việc tuân thủ các biện pháp sàng lọc sẽ rút ngắn thời gian để chẩn đoán trong phần lớn bệnh nhân ung thư đại trực tràng [134]. Trong nghiên cứu của Saidi và cộng sự, thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh trung bình là  $26,6 \pm 43$ ,  $20 \pm 25$  và  $33,7 \pm 42$  tuần tương ứng cho đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng ( $p = 0,092$ ) [44].

#### ***4.1.1.4. Tình trạng cấp cứu khi vào viện***

Trên lâm sàng có một số người bệnh mắc ung thư đại trực tràng không có bất kỳ triệu chứng nào cho đến khi bệnh đã có biến chứng và phải nhập viện trong tình trạng cấp cứu. Tỷ lệ bệnh nhân ung thư ĐTT phải nhập viện trong tình trạng cấp cứu từ 6% đến 34% [135],[136]. Nguyên nhân khiến bệnh nhân phải nhập viện trong tình trạng cấp cứu là tắc ruột, xuất huyết tiêu hóa và thủng ruột. Những bệnh nhân nhập viện trong tình trạng cấp cứu có tiên lượng xấu hơn những bệnh nhân nhập viện vì lý do không cấp cứu [135]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ bệnh nhân nhập viện trong tình trạng cấp cứu là 16,4% (19/116), đa số ca bệnh nhập viện trong tình trạng cấp cứu là ung thư đại tràng trái chiếm 57,9% (11/19) số ca cấp cứu. Tỷ lệ bệnh nhân nhập viện trong tình trạng cấp cứu ở ung thư đại tràng trái là 27,5% (11/40) cao hơn so với ung thư đại tràng phải là 17,2% (5/29) và ung thư trực tràng là 6,4% (3/47) (bảng 3.2). Nguyên nhân có thể do đặc điểm giải phẫu của đại tràng

sigma dài và di động nên dễ gây tắc ruột hơn so với các đoạn khác của đại tràng. Khi có khối u là điều kiện thuận lợi cho biến chứng gây tắc ruột xảy ra. Nghiên cứu của Wallace và cộng sự thấy tỷ lệ nhập viện trong tình trạng cấp cứu cao hơn ở nhóm bệnh nhân lớn tuổi, phụ nữ, da màu, và ở nhóm có điều kiện kinh tế xã hội thiếu thốn hơn [137].

#### **4.1.1.5. Một số triệu chứng lâm sàng**

Chẩn đoán sớm là yếu tố quan trọng cải thiện thời gian sống của bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Phần lớn bệnh nhân được phát hiện ở giai đoạn muộn là do chậm trễ thực hiện các biện pháp khá sàng lọc ngay từ khi khởi phát các triệu chứng. Các triệu chứng hay gặp trên lâm sàng bao gồm đau bụng, phân lỏng, phân táo, phân có máu, sụt cân và tình trạng thiếu máu. Các triệu chứng lâm sàng nổi bật của bệnh nhân có liên quan đến vị trí khối u. Thay đổi thói quen đi ngoài và đau bụng là dấu hiệu thường gặp ở ung thư đại tràng nhưng ở trực tràng thì dấu hiệu phân có máu là hay gặp nhất [44].

Trong nghiên cứu này, dấu hiệu đau bụng là triệu chứng lâm sàng phổ biến nhất chiếm 68,1% (79/116); ung thư đại tràng phải có tỷ lệ đau bụng chiếm 86,2% (25/29) cao hơn ung thư đại tràng trái 75,0% (30/40) và ung thư trực tràng là 51,0% (24/47). Dấu hiệu phân có máu là triệu chứng lâm sàng phổ biến thứ hai chiếm 58,6% (68/116), ung thư trực tràng có tỷ lệ phân có máu là 83,0% (39/47) cao hơn ung thư đại tràng trái 55,0% (22/40) và ung thư đại tràng phải 24,1% (7/29). Tiếp theo là các dấu hiệu phân lỏng chiếm 36,2% (42/116), thiếu máu 32,8% (38/116), sụt cân 30,2% (35/116) và phân táo là dấu hiệu ít gặp nhất chiếm 10,3% (12/116). Sự khác biệt về tỷ lệ các dấu hiệu lâm sàng phân lỏng, thiếu máu, sụt cân và phân táo giữa ung thư đại tràng và ung thư trực tràng không có ý nghĩa thống kê (bảng 3.3). Kết quả nghiên cứu này tương tự như nghiên cứu của một số nghiên cứu trong nước đã công bố. Trần Thắng nghiên cứu 127 bệnh nhân ung thư đại tràng: đau bụng chiếm 81,7%, phân có máu 51,4%, gầy sút 29,2% [128]. Nghiên cứu của Luy và

cộng sự thấy trong ung thư đại tràng đau bụng chiếm đa số 59,4% và cao hơn hẳn so với ung thư trực tràng; trong ung thư trực tràng phân có máu chiếm 29,2% cao hơn so với ung thư đại tràng [48]. Lê Quang Minh nghiên cứu 110 bệnh nhân ung thư biểu mô đại trực tràng thấy số bệnh nhân có đau bụng chiếm 65,4%, phân có máu 66,3%, gầy sút 62,7%, thiếu máu 22,7% và u ổ bụng 16,7% [138]. Nghiên cứu của Leis và cộng sự trên 202 người bệnh thấy các biểu hiện lâm sàng chảy máu 65%, phân có máu 64%, đau bụng 60%, và thay đổi thói quen đi cầu 53% [43].

#### **4.1.1.6. Tổn thương di căn**

Trong nghiên cứu này, ung thư đại trực tràng có di căn đến gan có tỷ lệ lớn nhất là 61,8% (42/68), đứng thứ hai là di căn đến phổi chiếm 16,2% (11/68); Tỷ lệ bệnh nhân nữ có di căn buồng trứng chiếm 7,4% (5/68) tổng số bệnh nhân có di căn và chiếm 14,7% (5/34) số người bệnh nữ có di căn. Sự khác biệt về tỷ lệ có di căn đến gan, phổi, buồng trứng, xương, phúc mạc giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (bảng 3.4). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự như nghiên cứu của Huguenot và cộng sự thấy trong số bệnh nhân có di căn tạng, di căn gan chiếm tỷ lệ cao nhất là 73%, đứng thứ hai là di căn phổi chiếm 34% số bệnh nhân có di căn, 23% số bệnh nhân có di căn cả gan và phổi, 27,6% số bệnh nhân ung thư đại trực tràng có di căn tạng khi phát hiện bệnh [139]. Bokemeyer và cộng sự thấy: Khoảng một phần tư số bệnh nhân ung thư đại trực tràng khi phát hiện đã có di căn xa và trên một nửa số bệnh nhân này có di căn gan. Khoảng 50% những bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn sớm nhưng cuối cùng cũng có di căn và phần lớn là di căn gan, tiếp đến là di căn phổi, màng bụng, buồng trứng, tuyến thượng thận, xương, não...[122].

#### **4.1.1.7. Đặc điểm nội soi**

Nội soi là phương pháp thăm khám trực tiếp rất quan trọng được sử dụng trong khám sàng lọc và chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng.

Nghiên cứu này khảo sát hình ảnh nội soi dựa trên kích thước khối u so với chu vi đại trực tràng: Khối u có kích thước trên 3/4 chu vi đại trực tràng có tỷ lệ cao nhất là 50% (48/96), sự khác biệt về kích thước khối u trên nội soi ở đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (bảng 3.5). Dạng tổn thương sùi chiếm đa số 95,9% (92/96), sự khác biệt về tỷ lệ dạng tổn thương giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (bảng 3.6). Trong nghiên cứu của Lê Quang Minh (2012), khối u có kích thước chiếm 3/4 và toàn bộ chu vi đại trực tràng có tỷ lệ cao nhất 63,6% (70/110), khối u 1/4 chu vi đại trực tràng có tỷ lệ thấp nhất chiếm 13,6%, tổn thương dạng sùi chiếm đa số là 53,6%, tổn thương sùi loét là 32,7% [138]. Theo nghiên cứu của Nguyễn Văn Hiếu, khi soi trực tràng bằng ống cứng, tỷ lệ khối ung thư chiếm toàn bộ chu vi trực tràng là 38,0%, bằng 3/4 chu vi trực tràng là 22,3%, bằng 1/2 chu vi trực tràng là 30,7%, bằng 1/4 chu vi trực tràng là 8,8% [140].

#### **4.1.1.8. Chỉ số hóa sinh CEA**

Kháng nguyên CEA là dấu ấn sinh học được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay trong chẩn đoán, theo dõi tái phát sau phẫu thuật và theo dõi đáp ứng điều trị ung thư đại trực tràng [141],[142]. Nồng độ CEA tăng cao trước phẫu thuật có giá trị tiên lượng xấu về nguy cơ tử vong chung ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng [143]. Mức CEA trên 5ng/ml trước phẫu thuật có tác động xấu đến thời gian sống còn độc lập với giai đoạn bệnh [144]. Trong nghiên cứu này, trung vị nồng độ CEA bệnh nhân ung thư đại tràng phải là 7,10 ng/ml, đại tràng trái là 8,20 ng/ml và trực tràng là 4,8 ng/ml, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.4); Xác suất tích lũy sống còn của bệnh nhân có CEA < 5 ng/ml cao hơn bệnh nhân có CEA  $\geq$  5 ng/ml (biểu đồ 3.5). Tỷ lệ bệnh nhân có CEA  $\geq$  5 ng/ml trong nghiên cứu của Trịnh Hồng Sơn và cộng sự là 40,7% [145] và Selcukbiriclik F là 50,2% [146], nghiên cứu của Hoàng Mạnh Thắng 62,8% [147]. Sự khác biệt về xác suất tích lũy sống còn

giữa hai nhóm không tăng và tăng CEA trong nghiên cứu này góp thêm phần khẳng định giá trị tiên lượng của chỉ số CEA trong ung thư đại trực tràng. Nhiều nghiên cứu cho thấy những bệnh nhân có nồng độ CEA huyết thanh ban đầu cao thì tỷ lệ tái phát cao hơn hoặc thời gian tái phát ngắn hơn so với người bệnh có nồng độ CEA huyết thanh ban đầu bình thường [148],[149], [71],[70].

#### **4.1.1.9. Chỉ số hóa sinh CA19-9**

Kháng nguyên CA19-9 thường được các thầy thuốc lâm sàng chỉ định giống như kháng nguyên CEA để chẩn đoán và theo dõi đáp ứng điều trị trong ung thư đại trực tràng. Tuy nhiên, xét nghiệm kháng nguyên CA 19-9 có độ nhạy trong chẩn đoán, giá trị tiên lượng và theo dõi đáp ứng điều trị thấp hơn so với xét nghiệm kháng nguyên CEA ở tất cả các giai đoạn của ung thư đại trực tràng [69],[71],[72],[73],[150]. Tại nghiên cứu này, trung vị nồng độ CA19-9 bệnh nhân ung thư đại tràng phải là 20,0 U/ml, đại tràng trái là 22,9 U/ml và trực tràng là 17,2 U/ml, sự khác biệt về nồng độ CA19-9 giữa đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.6). Tương tự chỉ số CEA, xác suất tích lũy sống còn của bệnh nhân ung thư đại trực tràng có CA19-9  $< 37$  U/ml cao hơn những bệnh nhân có CA19-9  $\geq 37$  U/ml (biểu đồ 3.7). Trong nghiên cứu của Trịnh Hồng Sơn và cộng sự có 24% số người bệnh có CA19-9 tăng trên 37 ng/ml [145], nhưng trong nghiên cứu của Selcukbiriclik F tỷ lệ này là 41,8% [146].

#### **4.1.1.10. Liên quan xác suất tích lũy sống còn với nồng độ CEA và CA19-9 điều chỉnh theo giai đoạn bệnh khi phân tích đa biến bằng mô hình Cox**

Thời gian sống của bệnh nhân ung thư đại trực tràng phụ thuộc vào giai đoạn bệnh khi phát hiện. Tỷ lệ bệnh nhân có nồng độ CEA  $> 5$ ng/ml, CA19-9  $> 37$  ng/ml có liên quan đến giai đoạn bệnh theo TNM [145],[150]. Theo nghiên cứu này, khi phân tích đa biến bằng mô hình Cox có điều chỉnh theo

giai đoạn bệnh, xác suất tích lũy sống còn cao nhất ở nhóm có chỉ số CEA < 5 ng/ml và CA19-9 < 37 ng/ml, tiếp theo là nhóm tăng một trong hai chỉ số CEA  $\geq$  5ng/ml hoặc CA19-9  $\geq$  37 ng/ml và thấp nhất là nhóm tăng cả hai chỉ số CEA  $\geq$  5ng/ml và CA19-9  $\geq$  37 ng/ml (biểu đồ 3.8). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa ba nhóm bệnh nhân nói trên cho thấy chỉ số CEA và CA19-9 có giá trị để tiên lượng thời gian sống còn từ khi phát hiện bệnh ung thư đại trực tràng. Chỉ định xét nghiệm đồng thời cả hai chỉ số CEA và CA19-9 là cần thiết ngay khi chẩn đoán xác định cho người bệnh.

#### **4.1.1.11. Phân độ mô bệnh học**

Phân độ mô bệnh học trong bệnh lý ung thư đại trực tràng đã được báo cáo là yếu tố độc lập không liên quan đến tuổi, giới tính, vị trí ung thư cũng như giai đoạn bệnh [151]. Trong bệnh lý ung thư đại trực tràng, tỷ lệ bệnh nhân có phân độ mô bệnh học mức độ ác tính thấp (gồm thể biệt hóa vừa và biệt hóa cao) chiếm trên 80% cao hơn tỷ lệ bệnh nhân có tế bào mức độ ác tính cao (gồm thể biệt hóa kém và không biệt hóa) chiếm khoảng 20% [77], [78],[75]. Trong nghiên cứu này, mức độ biệt hóa vừa có tỷ lệ cao nhất là 82,1% (119/145), biệt hóa cao chiếm 10,3% (15/145), biệt hóa mức độ thấp có tỷ lệ thấp nhất là 7,6% (11/145); phân độ mô bệnh học không liên quan với vị trí khối u (bảng 3.9).

#### **4.1.2. Tỷ lệ và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.**

##### **4.1.2.1. Kết quả tách chiết DNA, khuếch đại exon 2 gen KRAS và exon 15 gen BRAF từ mẫu mô ung thư**

Tách chiết DNA từ mẫu mô là một khâu quan trọng trong quá trình xét nghiệm gen tại các phòng thí nghiệm sinh học phân tử. Có nhiều phương pháp khác nhau để tách chiết DNA từ tế bào [152]. Tất cả các phương pháp đều nhằm phá vỡ và ly giải các tế bào ban đầu tiếp theo là loại bỏ các RNA,



protein và một số thành phần khác và cuối cùng là chiết xuất DNA. Với những mẫu bệnh phẩm được lấy từ mô tươi sau phẫu thuật có vùng tế bào ung thư phong phú thì kỹ thuật được tiến hành thuận lợi hơn những mẫu bệnh phẩm nhỏ được thu thập bằng kim [153],[154]. Lewandowska và cộng sự thấy rằng tỷ lệ tế bào ung thư từ 10% là đủ tốt để phát hiện các đột biến gen KRAS, BRAF ở mẫu mô cố định bằng formalin và nhúng parafin(FFPE) [155]. Để thu được DNA có nồng độ cao nhiều nghiên cứu lựa chọn vùng tập trung tế bào ung thư trong mẫu mô tươi hoặc mẫu mô đúc nén qua kính hiển vi [101],[154]. DNA thu được phải nguyên vẹn, đạt nồng độ cao và đảm bảo độ tinh sạch thì kết quả xét nghiệm mới đảm bảo chính xác.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn vùng tập trung tế bào ung thư có mật độ cao trong mẫu mô tươi hoặc mẫu mô đúc nén qua kính hiển vi. DNA từ các mẫu mô đúc trong khối nén hoặc mẫu mô sinh thiết được tách chiết bằng xylen và ethanol. Đây là kỹ thuật tách chiết DNA được sử dụng phổ biến tại các phòng xét nghiệm sinh học phân tử [153],[156],[157]. Sau khi tách chiết, dung dịch DNA được tinh sạch bằng phương pháp phenol/chloroform. Độ tinh sạch của phân tử DNA được xác định bằng các chỉ số hấp thụ quang phổ, dựa vào tỷ lệ A260/A280. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm (A260) của các mẫu DNA cho phép xác định nồng độ DNA trong dung dịch. Protein có độ hấp thụ ánh sáng tử ngoại cao nhất ở bước sóng 280 nm (A280) và độ hấp thụ ánh sáng tử ngoại thấp ở bước sóng 260 nm. Do vậy, tỷ lệ A260/A280 biểu thị mức độ protein còn lại trong dịch chiết. DNA được coi là tinh sạch khi giá trị  $A260/A280 = 1,8 - 2,0$  [158]. Kết quả nghiên cứu này (bảng 3.8) cho thấy các mẫu DNA có độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang là  $1,81 \pm 0,06$  khi đo trên máy Nano-drop ở bước sóng 260/280 nm. Như vậy, những mẫu DNA được tách chiết đảm bảo chất lượng, đủ điều kiện cho các thí nghiệm tiếp theo.

Trước khi tiến hành kỹ thuật giải trình tự gen, Scorpions ARMS để xác

định đột biến, chất lượng DNA được kiểm tra bằng cách sử dụng gen nội chuẩn GAPDH. Gen GAPDH đã được khuếch đại nhằm mục đích đánh giá chất lượng của sản phẩm DNA tổng hợp được. Sau phản ứng khuếch đại, nếu chất lượng DNA không tốt, bị đứt gãy hay tạp nhiễm thì băng điện di trên agarose sẽ mờ, nhòe, bờ không đều, hoặc xuất hiện các băng phụ [159]. Trong nghiên cứu này, sản phẩm PCR của quá trình khuếch đại gen GAPDH chỉ gồm một băng 300 bp đặc hiệu chứng tỏ rằng chất lượng DNA tách chiết được của các mẫu tốt, không bị đứt gãy, đảm bảo đủ tiêu chuẩn cho kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS tiếp theo để xác định đột biến gen (hình 3.1).

#### ***4.1.2.2. Xác định đột biến KRAS, BRAF bằng kỹ thuật giải trình tự gen***

Phân tử Deoxyribonucleic acid (DNA) được nhà bác học người Thụy Sĩ Friedrich Meiescher lần đầu tiên phát hiện có trong nhân tế bào vào năm 1869 [160]. Năm 1944, Oswald Avery, Colin Macleod và Maclyn McCarty chứng minh DNA mang thông tin di truyền của tế bào [161]. Đến năm 1953, James Watson và Francis Crick phát hiện ra cấu trúc xoắn kép của DNA. Kể từ khi phát hiện ra cấu trúc phân tử DNA đã có nhiều phương pháp xét nghiệm để xác định trình tự phân tử DNA nhằm ứng dụng trong lâm sàng. Năm 1975, Frederick Sanger đã phát minh ra phương pháp giải trình tự của DNA bằng enzym. Nguyên tắc của kỹ thuật giải trình tự trực tiếp là dùng một sợi DNA làm khuôn để tổng hợp sợi DNA bổ sung. Sự ra đời của phương pháp giải trình tự đã nhanh chóng thúc đẩy nhiều nghiên cứu ứng dụng phát hiện các đột biến gen KRAS, BRAF trong điều trị ung thư đại trực tràng. Có rất nhiều nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật giải trình tự phát hiện đột biến gen KRAS tại codon 12 và codon 13 trong ung thư đại trực tràng [101],[162], [163]. Maria A và cộng sự dùng kỹ thuật giải trình tự phát hiện đột biến gen KRAS xảy ra ở codon 12 có 7 dạng: G12S, G12C, G12L, G12D, G12A,

G12R và G12V, ở codon 13 có 2 dạng G13C và G13D và ở codon 61 có 3 kiểu là Q61R, Q61L và Q61H [106]. Chang và cộng sự sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp và kỹ thuật Multiplex PCR để phát hiện đột biến gen KRAS ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng, kết quả phát hiện đột biến ở hai phương pháp giống nhau nhưng số lượng công việc và thời gian thực hiện của kỹ thuật Multiplex PCR ít hơn kỹ thuật giải trình tự trực tiếp [164]. Ahlquist và cộng sự phát hiện được 04 dạng đột biến gen BRAF là V600E, D594G, L597Q, và G1406C bằng kỹ thuật giải trình tự [165]. Lopez và cộng sự so sánh kỹ thuật giải trình tự với một số kỹ thuật khác trong xét nghiệm gen BRAF thấy kỹ thuật giải trình tự có độ nhạy thấp hơn [166].

Trong nghiên cứu này, sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp gen KRAS, BRAF đối chiếu với mẫu mô lành tính, chúng tôi đã phát hiện các dạng đột biến khác nhau ở trên exon 2 của gen KRAS. Tại vị trí nucleotid 35, exon 2: khi G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycin (G) tại codon 12 bị biến thành Aspartate (D), gây nên đột biến G12D (hình 3.3); khi G bị biến đổi thành T, làm cho acid amin Glycin (G) tại codon 12 bị biến thành Valine (V), gây nên đột biến G12V (hình 3.5). Tại vị trí nucleotid 34, exon 2: khi G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycin (G) tại codon 12 bị biến thành Serine (S), gây nên đột biến G12S (hình 3.6). Tại vị trí nucleotid 38, exon 2: G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycin (G) tại codon 13 bị biến thành Aspartate (D), gây nên đột biến G13D (hình 3.4). Tại vị trí nucleotid 1799, exon 15 gen BRAF, T bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Valine (V) tại codon 600 biến thành Glutamic (E), gây nên đột biến V600E (hình 3.7). Chúng tôi không thấy các dạng đột biến được Neumann và cộng sự phát hiện: G12F, G12I, G13C, G13R [101].

Với sự tiến bộ của các kỹ thuật xét nghiệm gen hiện nay, kỹ thuật giải trình tự trực tiếp có độ nhạy thấp hơn một số kỹ thuật xét nghiệm khác [164], [166],[167]. Tuy nhiên giải trình tự trực tiếp vẫn được coi là kỹ thuật tiêu

chuẩn vì nó cho biết trình tự các nucleotid của gen KRAS, BRAF và có thể xác định được tất cả các dạng đột biến có thể có, bao gồm cả các đột biến thay thế, chèn và xóa bỏ các nucleotid.

#### ***4.1.2.3. Xác định đột biến gen KRAS, BRAF bằng kỹ thuật Scorpions ARMS***

Hiện nay có nhiều kỹ thuật xét nghiệm sinh học phân tử ra đời nhằm phát hiện đột biến gen KRAS, BRAF. Tuy nhiên chỉ một vài kỹ thuật được các cơ quan quản lý Y Dược của Châu Âu và Hoa Kỳ cấp giấy phép công nhận đạt tiêu chuẩn ứng dụng trong chẩn đoán lâm sàng. Kỹ thuật Scorpions ARMS là một trong số ít những kỹ thuật đó [168].

Scorpions ARMS là sự kết hợp của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (ARMS) và công nghệ Scorpions trong phản ứng Real time PCR để phát hiện các đột biến. Phân tử Scorpions có chứa cả môi PCR và phần đầu dò tín hiệu huỳnh quang. Các fluorophore của đầu dò tương tác với một quencher ức chế tín hiệu huỳnh quang. Trong phản ứng PCR, các fluorophore của đầu dò thoát khỏi sự ức chế của quencher làm phát tín hiệu huỳnh quang. Sự khác biệt quan trọng giữa Scorpions và TaqMan là trong một phản ứng Scorpions đầu dò và mục tiêu cùng trong một phân tử, tín hiệu được tạo ra thông qua sự sắp xếp lại của phân tử. Ngược lại, một phản ứng của TaqMan đòi hỏi sự kết hợp giữa hai phân tử là môi và sợi DNA đích. Sự sắp xếp lại của phân tử Scorpions là phản ứng diễn ra nhanh và chính xác hơn so với TaqMan. Kỹ thuật Scorpions ARMS cho phép phát hiện đột biến ngay cả trong trường hợp alen đột biến đó chiếm một tỷ lệ rất nhỏ trong tổng số sợi khuôn DNA [110], [116]. Đây là kỹ thuật xác định đột biến nhanh chóng và có độ tin cậy cao nên có thể thực hiện khám sàng lọc ở quy mô lớn [114],[169]. Chính nhờ ưu điểm có độ nhạy cao, kỹ thuật Scorpions ARMS đã giúp phát hiện đột biến khi không phát hiện được bằng kỹ thuật giải trình tự gen [113]. Rafael G A và cộng sự sử dụng kỹ thuật Scorpions ARMS phát hiện được 7 dạng đột biến tại

codon 12 và codon 13 gen KRAS là: G12D, G12A, G12V, G12S, G12R, G12C, và G13D [97].

Trong nghiên cứu này, khi sử dụng kỹ thuật giải trình tự, ở một số mẫu DNA tại vị trí nucleotid của codon 12, 13 gen KRAS và codon 600 gen BRAF xuất hiện thêm một đỉnh tín hiệu tương trưng. Tuy nhiên, đỉnh tín hiệu này rất thấp, dẫn đến nghi ngờ đây là đột biến do mẫu mô có nồng độ DNA ung thư thấp hoặc chỉ là tín hiệu nhiễu khi thực hiện kỹ thuật. Khi phân tích những mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpions ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của cặp mỗi đột biến bên cạnh đường cong tín hiệu của cặp mỗi trong mẫu chứng (hình 3.8, 3.9, 3.10, 3.11). Kỹ thuật Scorpions ARMS có nhược điểm là chi phí cao, chỉ phát hiện được các dạng đột biến có chủ định trước theo thiết kế của mỗi, nhưng có ưu điểm là thời gian thực hiện ngắn và nổi bật là có độ nhạy cao ngay cả với những mẫu có tỷ lệ tế bào đột biến rất thấp tới 1% [116].

#### ***4.1.2.4. Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng***

Trong điều trị ung thư đại trực tràng, xác định tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF đã trở thành chỉ định bắt buộc trước khi có chỉ định sử dụng thuốc điều trị đích cho bệnh nhân [15],[101],[170],[171],[172]. Hiện nay, có nhiều kỹ thuật xác định đột biến gen khác nhau được sử dụng ở các phòng xét nghiệm trên toàn thế giới. Phổ biến nhất là kỹ thuật giải trình tự gen, bên cạnh đó còn có các kỹ thuật Scorpions ARMS, PCR-RLFP... với độ nhạy và độ đặc hiệu khác nhau. Kết quả xét nghiệm đột biến gen trong mẫu mô ung thư phụ thuộc vào nhiều yếu tố kỹ thuật như kỹ thuật lấy mô sinh thiết, loại mẫu mô xét nghiệm và chất lượng mẫu, quy trình tách chiết và tinh sạch DNA từ mẫu mô và loại kỹ thuật dùng để xác định đột biến. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hai kỹ thuật giải trình tự và Scorpions ARMS để xác định đột biến gen KRAS, BRAF giúp nâng cao độ nhạy, tránh bỏ sót đột biến do kỹ thuật

giải trình tự có độ nhạy thấp, đồng thời tránh bỏ sót những đột biến mới do kỹ thuật Scorpions được thiết kế mỗi với từng loại đột biến có sẵn. Tổng hợp cả hai phương pháp phát hiện đột biến gen KRAS là 30,4% (44/145) và đột biến gen BRAF ở 3,4% (4/145) bệnh nhân ung thư đại trực tràng (bảng 3.9). Tỷ lệ đột biến gen KRAS trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn một số tác giả khác như: Bisht S và cộng sự sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp trên 204 mẫu ung thư đại trực tràng ở Ấn Độ, kết quả tần số đột biến của gen KRAS là 23,5% và gen BRAF là 9,8%; không có đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và gen BRAF [107]. Nghiên cứu của Artale phát hiện đột biến gen KRAS chiếm 27%, đột biến gen BRAF chiếm 4% số người bệnh ung thư đại trực tràng [173].

Tỷ lệ đột biến gen KRAS trong nghiên cứu của chúng tôi tương đương với một số tác giả khác: Krol và cộng sự sử dụng kỹ thuật Scorpions ARMS nghiên cứu so sánh đột biến gen KRAS và gen BRAF trên mẫu mô thu được bằng sinh thiết và mẫu mô thu được bằng phẫu thuật. Tần số đột biến gen KRAS phát hiện được là 33,9% [115]. Berg và cộng sự phát hiện đột biến gen KRAS chiếm 32% số người bệnh [162]. Wang và cộng sự dùng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp phát hiện đột biến gen KRAS ở codon 12 là 25,3%, codon 13 là 6,8% và codon 61 là 2,1% [108]. Chretien và cộng sự sử dụng ba kỹ thuật khác nhau đã phát hiện được 38% đột biến gen KRAS trong tổng số 674 trường hợp ung thư đại trực tràng, có 2% các trường hợp có sự khác biệt về kết quả xét nghiệm giữa các kỹ thuật [174]. Nghiên cứu của Van và cộng sự sử dụng phương pháp giải trình tự phát hiện được 37% số người bệnh ung thư đại trực tràng có đột biến gen KRAS [15]. Kết quả tỷ lệ đột biến KRAS trong nghiên cứu này thấp hơn nghiên cứu của một số tác giả: Nghiên cứu của Amado và cộng sự, tỷ lệ đột biến KRAS đã được tìm thấy ở 43% bệnh nhân [97]. Theo nghiên cứu của Neumann và cộng sự tỷ lệ này là 39,3% [101]. Arcila M và cộng sự sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp phát hiện được

39% đột biến gen KRAS [106]. Maria D và cộng sự đã sử dụng kỹ thuật PCR-RLFP và pyrosequencing phát hiện được 46,4% số mẫu có đột biến gen KRAS [175]. Sử dụng kỹ thuật Scopions ARMS và giải trình tự trực tiếp nghiên cứu trên 159 mẫu ung thư đại trực tràng, Bando H và cộng sự phát hiện được 59 (37,0%) mẫu đột biến gen KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp và 70 (44,0%) mẫu bằng kỹ thuật Scopions ARMS. Kỹ thuật Scopions ARMS phát hiện được tất cả những mẫu đột biến gen KRAS xác định bởi kỹ thuật giải trình tự trực tiếp. Nhưng trong số 70 mẫu đột biến gen KRAS mà kỹ thuật Scopions ARMS phát hiện được thì có 11 mẫu kỹ thuật giải trình tự trực tiếp không phát hiện được [113]. Nghiên cứu của Franklin W A và cộng sự thấy kỹ thuật Scorpions ARMS phát hiện được 43% số mẫu có đột biến gen KRAS trong khi kỹ thuật giải trình tự phát hiện được 36% số mẫu có đột biến gen KRAS [114]. Richman SD thấy 308/711 (43,3%) bệnh nhân có đột biến gen KRAS và 56/711 (7,9%) có đột biến gen BRAF. Đột biến KRAS, BRAF, hoặc cả hai đã có mặt ở 360/711 (50,6%) số bệnh nhân [176]. Ahlquist phân tích đột biến của gen BRAF thấy rằng 14 (22%) của 64 mẫu mô đột biến. Cao nhất trong số này là các đột biến V600E điển hình; còn lại ba trường hợp là các đột biến D594G, L597Q, và G1406C [165].

Tỷ lệ đột biến gen BRAF thấp hơn nhiều so với đột biến gen KRAS nhưng hậu quả gây kháng thuốc điều trị đích trên lâm sàng của đột biến hai gen này tương tự nhau. Mặt khác nghiên cứu của chúng tôi và một số tác giả khác đã công bố cho thấy không gặp trường hợp đột biến cả hai gen KRAS và BRAF. Vì vậy việc chỉ định xét nghiệm gen BRAF chỉ nên thực hiện khi đã có kết quả gen KRAS không đột biến.

#### ***4.1.2.5. Tỷ lệ dạng đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng***

Với sự phát triển mạnh mẽ của các kỹ thuật xét nghiệm gen, đã có hơn 3000 đột biến điểm gen KRAS đã được báo cáo, trong đó hay gặp nhất là đột biến thay thế nucleotid ở exon 2: codon 12 (chiếm 82%) và codon 13 (chiếm 17%) [98],[177]. Đột biến tại codon 12 và 13 đã được chứng minh đóng vai trò quan trọng trong quá trình tiến triển ung thư và nguy cơ kháng thuốc ức chế EGFR của khối u [14],[97]. Đột biến ở các vị trí khác như các codon 61 và 146, cũng đã được báo cáo. Tuy nhiên, những dạng đột biến này chiếm một tỷ lệ nhỏ (1- 4%) trong tổng số đột biến gen KRAS [99],[100],[175].

Trong nghiên cứu này, các xét nghiệm đột biến gen KRAS ở người bệnh ung thư đại trực tràng được xác định bằng cả 2 kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS. Trong số những bệnh nhân ung thư đại trực tràng có đột biến gen KRAS, có 75% (33/44) trường hợp đột biến xảy ra tại codon 12 và 25,0% (11/44) trường hợp đột biến xảy ra tại codon 13 (biểu đồ 3.9). Tỷ lệ này có cao hơn so với với một số nghiên cứu trước đây (Bảng 4.1). Kết quả nghiên cứu này phát hiện đột biến gen KRAS tại codon 12 dạng G12D chiếm tỷ lệ cao nhất 45,4% (20/44), đứng thứ hai là đột biến gen KRAS tại codon 13 dạng G13D chiếm tỷ lệ là 25,0% (11/44), đột biến tại codon 12 dạng G12A có tỷ lệ thấp nhất là 2,3% (1/44) tương tự như nghiên cứu của một số tác giả khác (bảng 4.1) [97],[101],[106],[178]. Nhưng chúng tôi chỉ phát hiện được 05 dạng đột biến tại codon 12 là G12D, G12V, G12S, G12A, G12C và 01 dạng đột biến tại codon 13 là G13D. Nghiên cứu của Artale và cộng sự thấy đột biến codon 12 chiếm 63,6%, codon 13 chiếm 36,4% gen KRAS, dạng đột biến G13D chiếm tỷ lệ 4/11 (36,4%) cao nhất trong các dạng đột biến gen KRAS, không có đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và BRAF [173]. Trong nghiên cứu của Amado tiến hành trên 185 mẫu mô ung thư đại trực tràng phát



hiện được 06 dạng đột biến tại codon 12 và 01 dạng đột biến tại codon 13 là G13D [97].

**Bảng 4.1. Tỷ lệ dạng đột biến gen KRAS theo một số nghiên cứu**

<b>Dạng đột biến</b>	<b>Tỷ lệ dạng đột biến theo nghiên cứu</b>					
	Rafael G và cs (2008) , (Amado, Wolf et al. 2008)	Artale và cs (2008) (Artale, Sartore-Bianchi et al. 2008)	Maria A và cs (2011) (Arcila, Lau et al. 2011).	Wangefjor d và cs (2013)	Zahrani A và cs (2014) (Zahrani, Kandil et al. 2014)	Nghiên cứu này (2016)
<b>G12A</b>	8,2%	0	9,7%	5,2%	2,3%	2,3%
<b>G12D</b>	38,0%	27,3%	28,9%	29,8%	31,0%	45,4%
<b>G12R</b>	1,6%	0	0,6%	1%	3,6%	0
<b>G12V</b>	21,7%	9,1%	20,1%	31,4%	31,0%	11,4%
<b>G12C</b>	7,6%	9,1%	9,7%	7,9%	7,1%	4,5%
<b>G12S</b>	7,6%	18,1%	3,9%	6,8%	11,9%	11,4%
<b>G13D</b>	15,8%	36,4%	18,1%	17,3%	11,9%	25,0%
<b>Khác</b>	-	-	9%	0,5%	1,2%	-

Trong quá trình điều trị bằng thuốc nhắm đích EGFR cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng, các nhà lâm sàng phát hiện ra có một số bệnh nhân có gen KRAS không đột biến nhưng không đáp ứng với thuốc điều trị đích như mong đợi [179]. Nhiều nghiên cứu khác đã chứng minh đột biến gen BRAF là nguyên nhân gây kháng thuốc điều trị đích ở những bệnh nhân này giống như những bệnh nhân có đột biến gen KRAS [14],[15],[16],[180]. Nghiên cứu này phát hiện được 05 bệnh nhân có đột biến gen BRAF dạng V600E chiếm tỷ lệ 3,4% (5/145) tổng số người bệnh, chiếm 10,2% (5/49) tổng số bệnh nhân có đột biến cả hai gen và chiếm 5% (5/101) tổng số bệnh nhân không có đột biến gen

KRAS, không phát hiện trường hợp nào đột biến cả hai gen KRAS và BRAF (biểu đồ 3.10). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Artale và cộng sự thấy: đột biến gen BRAF chiếm 2/48 (4,2%) tổng số bệnh nhân và 2/13 (15,4%) tổng số đột biến cả hai gen, không phát hiện bệnh nhân nào đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và BRAF [173]. Về tỷ lệ đột biến gen BRAF, nghiên cứu này có thấp hơn nhưng về dạng đột biến thì tương tự như một số tác giả đã công bố. Stec và cộng sự thấy tỷ lệ đột biến gen BRAF dạng V600E là 7,7% [181]. Trong nghiên cứu của Nicolantonio và cộng sự phát hiện được 11 trường hợp đột biến BRAF trong tổng số 79 người bệnh không có đột biến gen KRAS và tất cả đều là dạng đột biến V600E [182]. Ahlquist và đồng nghiệp phân tích đột biến của gen BRAF thấy 14 mẫu chiếm 22% trong 64 người bệnh có đột biến, cao nhất trong số này là đột biến dạng V600E có 11 trường hợp chiếm 17,2%; còn lại 03 mẫu đột biến dạng D594G, L597Q, và G1406C [165]. Bisht S và cộng sự sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp gen KRAS và BRAF trên 204 mẫu ung thư đại trực tràng ở Ấn Độ, phát hiện năm dạng đột biến khác nhau tại codon 12 gen KRAS là: G12S, G12D, G12A, G12V, G12C và một dạng đột biến tại codon 13 là G13D đã được phát hiện [107].

Hiện nay chưa thấy nghiên cứu nào công bố về sự liên quan giữa tiến triển của ung thư đại trực tràng với các dạng đột biến gen KRAS và gen BRAF. Sự khác nhau về mức độ kháng thuốc điều trị đích EGFR của các dạng đột biến gen KRAS, BRAF có rất ít nghiên cứu đã công bố và còn là vấn đề gây tranh cãi [183],[184],[185]. Nhưng bệnh nhân ung thư đại trực tràng có một trong các dạng đột biến này đều có chung một hậu quả là không được hưởng lợi từ thuốc điều trị đích EGFR [15],[17],[97],[101]. Tejpar và cộng sự nghiên cứu trong 533 bệnh nhân (39%) có đột biến gen KRAS, 83 (16%) có đột biến dạng G13D, 125 (23%) có đột biến dạng G12V, và 325 (61%) có những đột biến khác. Sự khác biệt đáng kể trong hiệu quả điều trị đã được tìm

thấy ở bệnh nhân có gen KRAS đột biến dạng G13D so với tất cả các đột biến khác. Trong số bệnh nhân có các dạng đột biến gen KRAS khác nhau, Cetuximab cộng hóa trị so với hóa trị một mình cải thiện đáng kể PFS ở những bệnh nhân có đột biến gen KRAS dạng G13D [184],[185]. Bệnh nhân có các dạng đột biến gen KRAS khác không được hưởng lợi từ sự kết hợp điều trị này. Bệnh nhân có gen KRAS đột biến dạng G13D được hóa trị một mình kết quả kém hơn so với những bệnh nhân có dạng đột biến gen KRAS khác [185].

#### **4.2. LIÊN QUAN CỦA ĐỘT BIẾN GEN KRAS, BRAF VỚI ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG VÀ NHẬN XÉT BƯỚC ĐẦU KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ ĐÍCH Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG**

Trong nghiên cứu y khoa, giá trị tiên lượng của các dấu hiệu lâm sàng và cận lâm sàng luôn là mối quan tâm hàng đầu của các thầy thuốc. Tình trạng đột biến gen KRAS và gen BRAF đã được khẳng định có giá tiên lượng trong điều trị ung thư đại trực tràng [15],[17]. Vì vậy trong nghiên cứu này khảo sát sự liên quan của tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF tham chiếu với các đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng để tìm hiểu thêm các yếu tố có ý nghĩa tiên lượng.

##### **4.2.1. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với giới tính**

Hiện nay, chưa có phát hiện nào cho thấy tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF khác nhau giữa hai giới nam và nữ. Trong nghiên cứu này, ở nam giới tỷ lệ đột biến gen KRAS là 23,4% (18/77) và gen BRAF là 2,6% (2/77); ở nữ giới tỷ lệ đột biến gen KRAS là 38,2% (26/68) và gen BRAF là 4,4% (3/68). Kết quả này cũng tương tự như một số tác giả đã công bố. Nghiên cứu của Barault và cộng sự thấy đột biến gen KRAS ở nam giới là 35,6% không khác biệt so với ở nữ giới là 32,8% [186]. Wangefjord và cộng sự phát hiện đột biến gen KRAS ở nam giới chiếm 36,2% tương tự như ở nữ giới 36,3% [187].

Trong những năm gần đây, một số tác giả nghiên cứu về mối liên hệ dạng đột biến gen KRAS với một số dấu hiệu lâm sàng trong đó có giới tính tuy nhiên kết quả còn khác nhau [133],[187]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ đột biến tại codon 12 gen KRAS ở nam là 70,0% (14/20), ở nữ giới là 65,5% (19/29); tỷ lệ đột biến tại codon 13 gen KRAS ở nam là 20,0% (4/20), ở nữ là 24,1% (7/29); không phát hiện trường hợp nào đột biến xảy ra ở cả hai codon 12 và 13 (bảng 3.11). Dạng đột biến G12D gen KRAS cao nhất ở nữ giới là 44,8% (13/29) và nam giới là 35,0% (7/20); dạng đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với giới tính (bảng 3.11). Nghiên cứu của Wangefjord cho thấy 82,2% trong số những đột biến xảy ra ở codon 12, 17,3% xảy ra ở codon 13, và 0,5% trường hợp có đột biến ở cả hai codon; tỷ lệ các dạng đột biến gen KRAS không liên quan đến giới tính [187]. Tejpar và cộng sự thấy tỷ lệ đột biến gen KRAS ở nam giới là 57,8%, nữ giới là 42,2%; trong đó đột biến dạng G13D ở nam giới là 56,6%, nữ giới là 43,3%, các dạng đột biến khác ở nam giới là 58%, nữ giới là 42%; không có sự khác biệt về tỷ lệ các dạng đột biến gen KRAS ở hai giới nam và nữ [185].

Trong số những bệnh nhân không có đột biến gen KRAS thì tình trạng có hay không đột biến gen BRAF rất được quan tâm. Vì hậu quả của đột biến gen BRAF cũng tương tự như tình trạng đột biến gen KRAS trên lâm sàng. Trong 5 trường hợp đột biến gen BRAF của nghiên cứu này có 3 bệnh nhân nữ giới (chiếm 4,5% (3/68) tổng số nữ) và 2 bệnh nhân nam giới (chiếm 2,6% (2/77) tổng số nam). Tỷ lệ đột biến gen BRAF trong nghiên cứu này thấp hơn một số tác giả đã công bố [100],[186],[187]. Nghiên cứu của Wangefjord và cộng sự thấy tỷ lệ nữ giới là 64,1% cao hơn tỷ lệ nam giới 35,9% trong tổng số 78 bệnh nhân có đột biến gen BRAF [187]. Brault và cộng sự phát hiện trong số 78 trường hợp đột biến gen BRAF thì nữ giới chiếm 70,5% cao hơn tỷ lệ nam giới là 29,5% [186]. Tỷ lệ đột biến gen BRAF cao hơn ở nữ so với ở

nam giới, cho thấy rằng con đường tín hiệu RAS-RAF-MAPK có thể liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến hormon [52].

#### **4.2.2. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với tuổi**

Với sự phát triển của các phương pháp khám sàng lọc, bệnh lý ung thư đại trực tràng đã được phát hiện ngày càng nhiều và lứa tuổi phát hiện ngày càng trẻ hơn. Tuy nhiên, lứa tuổi mắc bệnh ung thư đại trực tràng hay gặp nhiều nhất là từ 50 đến 70, tuổi trung bình thường trên 60 tuổi, tỷ lệ bệnh nhân nam giới thường cao hơn nữ giới [40],[127],[41]. Trong nghiên cứu này, tuổi trung vị nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 57 tuổi, tuổi trung vị nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 60 tuổi; tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với tuổi ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.11). Tuổi trung vị cao nhất ở dạng đột biến G12S là 63 tuổi, tuổi trung vị thấp nhất ở dạng đột biến G12A là 34 tuổi; dạng đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với tuổi ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.12). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khác với kết quả của một số tác giả đã công bố. Tuy nhiên kết quả của các nghiên cứu đã công bố này cũng có nhiều khác biệt. Trong một nghiên cứu của Berg và cộng sự, 181 bệnh nhân ung thư đại trực tràng được phân tích và chia thành ba nhóm tuổi, trẻ hơn 50, 51-70, và lớn hơn 70 tuổi. Đột biến gen KRAS đã được xác định chiếm 32%, gen BRAF 16%. Trong nhóm bệnh nhân lớn tuổi nhất, tỷ lệ đột biến BRAF tăng cao đáng kể so với các nhóm tuổi khác. Tần số đột biến gen KRAS và gen BRAF tăng theo tuổi bệnh nhân [162]. Không giống như kết quả của Berg, một nghiên cứu khác của Kodaz và cộng sự cho thấy: Khi bệnh nhân được phân nhóm theo độ tuổi dưới và trên 40, đột biến gen KRAS gặp ít hơn trong số những người ở độ tuổi  $< 40$  tuổi ( $P = 0,02$ ), nhưng không có sự khác biệt về tỷ lệ đột biến gen giữa hai nhóm theo độ tuổi dưới và trên 50 ( $P = 0,057$ ) và dưới và trên 70 ( $P = 0,08$ ). Khi so sánh dạng đột biến gen KRAS thấy rằng đột biến codon 12 thường gặp hơn ở những bệnh nhân ở độ tuổi trên 50 ( $P = 0,03$ ) so với nhóm dưới 50 và phổ biến hơn ở những người trong độ

tuổi dưới 70 tuổi ( $P = 0,04$ ) so với nhóm trên 70 tuổi [133]. Bisht S và cộng sự phát hiện đột biến gen KRAS có tỷ lệ cao hơn đáng kể ở những bệnh nhân đã trên 50 tuổi, tất cả các đột biến gen BRAF đều là dạng V600E, thường gặp ở những bệnh nhân dưới 50 tuổi [107].

#### **4.2.3. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh**

Phần lớn những bệnh nhân phát hiện ung thư đại trực tràng sau khi đã có các triệu chứng lâm sàng. Không có nhiều bệnh nhân được phát hiện bệnh sớm nhờ các biện pháp khám sàng lọc có hệ thống. Trong nghiên cứu này, trung bình thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh ở nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 3,35 tháng, ở nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 3,03 tháng. Tỷ lệ đột biến gen và dạng đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh ( $p > 0,05$ ) (bảng 3.12).

#### **4.2.4. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với tình trạng cấp cứu khi vào viện**

Các nguyên nhân khiến bệnh nhân phải nhập viện trong tình trạng cấp cứu là tắc ruột, xuất huyết tiêu hóa và thủng ruột. Những bệnh nhân nhập viện trong tình trạng cấp cứu có tiên lượng xấu hơn những bệnh nhân nhập viện vì lý do không cấp cứu [135]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ bệnh nhân đột biến gen KRAS, BRAF nhập viện trong tình trạng cấp cứu là 47,4% (9/19), không cấp cứu là 28,9% (28/97), sự khác biệt tỷ lệ cấp cứu khi vào viện giữa hai nhóm đột biến và không đột biến gen KRAS, BRAF không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (bảng 3.13).

#### **4.2.5. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với một số triệu chứng lâm sàng**

Theo nghiên cứu của Koo H.Y và cộng sự, số bệnh nhân có triệu chứng trước khi chẩn đoán ung thư đại trực tràng là 63,7%. Phân có máu, đau

bụng, thiếu máu và phân táo thường được tìm thấy ở phụ nữ trong khi thay đổi thói quen đi ngoài là phổ biến hơn ở bệnh nhân nam [40]. Các triệu chứng thay đổi thói quen đi ngoài và đau bụng thường gặp ở ung thư đại tràng, nhưng ở trực tràng thì dấu hiệu phân có máu là hay gặp nhất [44]. Hiện có rất ít các thông tin được công bố về tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF với các dấu hiệu lâm sàng. Trong nghiên cứu này, đau bụng là triệu chứng lâm sàng có tỷ lệ cao nhất ở cả nhóm có đột biến và không đột biến gen KRAS, BRAF; đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với các triệu chứng đau bụng, phân có máu, phân lỏng, thiếu máu, sụt cân và phân táo ( $p > 0,05$ ) (bảng 3.14).

#### **4.2.6. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với vị trí u**

Vị trí khối u có liên quan đến các triệu chứng lâm sàng của ung thư đại trực tràng. Tuy nhiên liên quan của vị trí khối u với tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF còn chưa rõ ràng. Nghiên cứu của Bleeker và cộng sự thấy đột biến gen KRAS gặp nhiều hơn ở ung thư đại tràng phải trong khi Zulhabri và cộng sự gặp nhiều hơn ở đại tràng trái [188],[189]. Zahrani và cộng sự thấy đột biến codon 12 gặp nhiều hơn ở các khối u trực tràng, các đột biến kiểu G12V gen KRAS liên quan đáng kể với khối u đại tràng sigma và đại tràng trái [178]. Bisht S và cộng sự thấy đột biến BRAF thường xảy ra trong các khối u ở đại tràng phải [107]. Nghiên cứu này, tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF ở đại tràng phải là 37,8% (14/37), tương tự như ở đại tràng trái 34,0% (17/50) và trực tràng 31,0% (18/58) ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.13). Kết quả này tương tự một số nghiên cứu đã công bố như: Brink và cộng sự, nghiên cứu của Artale và nghiên cứu của Kodaz đều không thấy có sự liên quan về tỷ lệ và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF với vị trí khối ung thư đại trực tràng. [100],[133],[173].

#### **4.2.7. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với tổn thương di căn**

Việc xác định đột biến gen KRAS, BRAF ở khối u nguyên phát ngay từ khi chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng là rất cần thiết cho quá trình điều trị về sau khi có di căn. Hơn nữa, so sánh tình trạng đột biến của khối u nguyên phát và khối u thứ phát giúp đánh giá sự ổn định hoặc biến đổi của gen trong quá trình tiến triển của bệnh. Nhiều nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt về các dạng đột biến trên khối u nguyên phát và khối u di căn, điều đó có nghĩa là sử dụng khối u di căn để xác định đột biến có giá trị như khối u nguyên phát [101],[133],[173],[190].

Trong nghiên cứu này, số bệnh nhân có di căn đến gan có tỷ lệ lớn nhất ở nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 68,1% (32/47) và đột biến gen là 47,6% (10/21); Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với di căn đến gan, phổi, buồng trứng, xương, phúc mạc ( $p > 0,05$ ) (bảng 3.15). Kết quả nghiên cứu này tương tự như một số tác giả khác về tần số các tạng có di căn [122],[191]. Bokemeyer và cộng sự nghiên cứu 800 bệnh nhân không có đột biến gen KRAS có 22,4% có di căn gan, trong 179 trường hợp di căn gan có 14 (7,8%) bệnh nhân đột biến gen BRAF, tình trạng đột biến gen BRAF không liên quan đến di căn gan [122]. Feng Q và cộng sự thấy đột biến gen KRAS tại codon 13 có liên quan đến di căn xa ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng [192].

#### **4.2.8. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm nội soi**

Giá trị của phương pháp nội soi trong khám sàng lọc và chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng đã được khẳng định. Sử dụng nội soi sinh thiết trong xét nghiệm gen KRAS, BRAF đảm bảo tính chính xác cao đến 97% nếu tổ chức sinh thiết đáp ứng được yêu cầu về mô bệnh học [115],[193]. Khảo sát mối liên quan giữa biến đổi di truyền với hình thái nội soi có thể cung cấp những hiểu biết sâu hơn về ung thư đại trực tràng. Nghiên cứu này khảo sát mối liên quan giữa đột biến gen KRAS, BRAF với hình ảnh nội soi ung thư



đại trực tràng dựa trên các đặc điểm: kích thước khối u so với chu vi đại tràng và dạng tổn thương. Về kích thước khối u so với chu vi đại tràng: Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với kích thước u trên nội soi ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.14). Đột biến gen KRAS, BRAF ở tổn thương dạng sùi là 30,4% (28/92), dạng loét sùi là 50% (1/2); Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với dạng tổn thương trên nội soi ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.15). Kết quả nghiên cứu này tương tự như nghiên cứu của Lê Văn Thiệu, không thấy sự liên quan khi khảo sát dạng đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm kích thước khối u so với chu vi đại trực tràng [125]. Về dạng tổn thương, kết quả của nghiên cứu này khác với kết quả nghiên cứu của Metz và cộng sự thấy đột biến gen KRAS nhiều hơn ở nhóm tổn thương dạng sùi so với tổn thương dạng không sùi [194]. Nghiên cứu của Chang LC và đồng nghiệp thấy đột biến gen KRAS ở nhóm tổn thương dưới 10 mm so với bề mặt niêm mạc chiếm 13/36 (36,1%) cao hơn nhóm có tổn thương trên 10mm 5/34 (14,7%); trong nhóm tổn thương dưới 10mm so với bề mặt niêm mạc, đột biến gen KRAS ở nhóm tổn thương dạng lõm gấp 9/16 (56,3%) nhiều hơn nhóm tổn thương dạng phẳng và lõm 4/20 (20%); không có sự khác biệt về đột biến gen BRAF ở nhóm có tổn thương trên và dưới 10 mm; không có trường hợp nào đột biến cả hai gen KRAS và gen BRAF [195]. Sự khác biệt giữa nghiên cứu này với một số tác giả trên có thể do sự khác nhau về điều kiện chăm sóc sức khỏe cộng đồng giữa các nước. Ở những quốc gia có điều kiện chăm sóc y tế tốt hơn, bệnh lý ung thư đại trực tràng thường được phát hiện ở giai đoạn sớm nhờ những chương trình khám sàng lọc định kỳ có hệ thống. Trong nghiên cứu này, đa số số bệnh nhân được phát hiện ở giai đoạn rất muộn, tổn thương ung thư đại trực tràng có kích thước lớn và phần nhiều đã có xâm lấn hoặc di căn xa. Vì vậy hình ảnh nội soi của bệnh nhân ít có giá trị tiên lượng tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF.

#### 4.2.9. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CEA

Giá trị tiên lượng của chỉ số kháng nguyên CEA trong chẩn đoán, theo dõi tái phát sau phẫu thuật và theo dõi đáp ứng điều trị ung thư đại trực tràng đã được khẳng định qua nhiều nghiên cứu lâm sàng [141],[142],[143],[144]. Tương tự như kết quả của một số nghiên cứu khác, nghiên cứu này không thấy có sự liên quan giữa đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CEA ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Trung vị nồng độ CEA nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 14,2 ng/ml, nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 5,2 ng/ml, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.16). Trong nghiên cứu của Munteanu và cộng sự, CEA tăng ở 74,1% ở nhóm đột biến gen KRAS tương tự như nhóm không đột biến gen KRAS là 63,6% [196]. Kawada K và cộng sự thấy CEA tăng ở 43,5% nhóm bệnh nhân có đột biến gen KRAS tương tự ở 50% nhóm bệnh nhân không có đột biến gen KRAS [197]. Feng Q và cộng sự thấy trong số bệnh nhân tăng CEA, đột biến codon 12 gen KRAS chiếm 41,8%, đột biến codon 13 gen KRAS chiếm 10,3%, đột biến gen BRAF chiếm 8,8%, tỷ lệ này tương tự ở những bệnh nhân không tăng CEA [192]. Gần đây có tác giả khuyến cáo đếm tế bào khối u tuần hoàn trong máu để theo dõi đáp ứng điều trị ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng vì thấy chỉ số này tăng cao tương quan với CEA. Đếm tế bào khối u tuần hoàn trong máu được dùng để theo dõi ở những bệnh nhân CEA không tăng. Tế bào khối u tuần hoàn trong máu có tương quan với tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF [198].

#### 4.2.10. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với nồng độ CA19-9

Cùng với chỉ số kháng nguyên CEA, tuy độ nhạy có thấp hơn, kháng nguyên CA19-9 cũng được dùng trong chẩn đoán, tiên lượng và theo dõi đáp ứng điều trị ở tất cả các giai đoạn của ung thư đại trực tràng [69],[73],[150]. Trong nghiên cứu này, trung vị nồng độ CA19-9 nhóm đột biến gen KRAS,

BRAF là 22,9 U/ml, nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 17,7 U/ml, tuy nhiên sự khác biệt về nồng độ CA19-9 giữa nhóm đột biến và không đột biến gen KRAS, BRAF không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (biểu đồ 3.17). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự như nghiên cứu của Meantenu và cộng sự: có 59,3% trường hợp tăng CA19-9 trong số bệnh nhân đột biến gen KRAS, 52,3% trường hợp tăng CA19-9 trong số bệnh nhân không đột biến gen KRAS. Chỉ số kháng nguyên CA 19-9 có một giá trị tiên đoán độc lập không bị ảnh hưởng bởi tình trạng đột biến gen KRAS [196]. Trong khi nghiên cứu của Narita Y và cộng sự thấy tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF gặp nhiều hơn ở nhóm có tăng CA19-9 so với nhóm không tăng CA19-9 [199].

#### **4.2.11. Liên quan đột biến gen KRAS, BRAF với phân độ mô bệnh học**

Các đặc điểm lâm sàng như tuổi, giới tính, vị trí ung thư cũng như giai đoạn bệnh không liên quan đến phân độ mô bệnh học trong ung thư đại trực tràng [151]. Tỷ lệ bệnh nhân có phân độ ác tính thấp (gồm thể biệt hóa vừa và biệt hóa cao) chiếm trên 80% cao hơn tỷ lệ người bệnh có tế bào phân độ ác tính cao (gồm thể biệt hóa kém và không biệt hóa) chiếm khoảng 20% trong bệnh lý ung thư đại trực tràng [75],[77],[78]. Trong nghiên cứu này, đột biến gen KRAS, BRAF ở nhóm biệt hóa cao là 40,0% (6/15), biệt hóa vừa là 35,3% (42/119), biệt hóa thấp là 9,1% (1/11). Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với phân độ mô bệnh học ( $P > 0,05$ ) (biểu đồ 3.18). Kết quả của chúng tôi tương tự như một số nghiên cứu khác như Munteanu và cộng sự thấy biệt hóa mức độ cao có ở 39% (11/28) bệnh nhân đột biến KRAS và 61% (17/28) bệnh nhân không đột biến KRAS, biệt hóa mức độ vừa có ở 39% (14/36) bệnh nhân đột biến KRAS và 61% (22/36) bệnh nhân không đột biến KRAS, biệt hóa mức độ thấp có 29% (2/7) bệnh nhân đột biến KRAS và 71% (5/7) bệnh nhân không đột biến KRAS [196]. Nghiên cứu của Feng và đồng nghiệp cũng không thấy đột biến gen KRAS, BRAF liên quan đến phân độ mô bệnh học của khối u [192]. Bisht S và cộng sự phát hiện đột biến gen

KRAS có liên quan với biệt hóa tế bào mức độ kém và vừa. Không giống như đột biến KRAS, đột biến BRAF thường xảy ra trong các khối u có phân độ biệt hóa cao và các khối u ở đại tràng phải [107].

#### **4.2.12. Nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng**

Hiện nay việc điều trị thành công ung thư đại trực tràng dựa trên chẩn đoán sớm, phẫu thuật triệt để và điều trị hóa chất hỗ trợ đầy đủ. Giai đoạn của bệnh khi phát hiện có giá trị tiên lượng quan trọng nhất. Ung thư đại trực tràng là bệnh ung thư có thể giảm được tỷ lệ tử vong nếu được phát hiện sớm. Mặc dù đã có nhiều khuyến cáo nhằm phòng ngừa và phát hiện sớm được đưa ra, nhưng vẫn còn một số lượng đáng kể bệnh nhân phát hiện bệnh khi đã ở giai đoạn cuối. Khoảng 20% đến 25% số bệnh nhân có biểu hiện di căn xa lúc chẩn đoán [200]. Mục tiêu điều trị cho những bệnh nhân này thường là những biện pháp nhằm làm giảm nhẹ những triệu chứng của bệnh ngoại trừ một số ít có di căn đến những vị trí có thể được phẫu thuật. Các phác đồ hóa chất hỗ trợ làm tăng thời gian sống sót cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng di căn khoảng 11 đến 12 tháng [201]. Những hóa chất thường được sử dụng cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng di căn là fluoropyrimidines, irinotecan và oxaliplatin với các phác đồ phổ biến FOLFOX, XELOX hoặc FOLFIRI. Một số nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về hiệu quả điều trị giữa các phác đồ và những tác dụng không mong muốn của hóa chất hỗ trợ khiến một số bệnh nhân không thể chấp nhận [202],[203].

Với sự ra đời của nhiều loại thuốc điều trị mới trong đó có thuốc điều trị đích EGFR đã cải thiện hiệu quả điều trị bệnh nhân ung thư đại trực tràng giai đoạn muộn. Việc bổ sung các thuốc nhắm đích EGFR cùng các phác đồ hóa chất hỗ trợ đã làm tăng hiệu quả điều trị trong phần lớn số bệnh nhân. Các thuốc điều trị đích kết hợp với điều trị hóa chất hỗ trợ đã làm tăng thời gian sống sót cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng di căn đến hơn 24 tháng [204],

[205]. Các dấu ấn sinh học phân tử ngày càng có giá trị để chẩn đoán và tiên lượng trên lâm sàng. Tình trạng đột biến gen KRAS và BRAF là thông tin quan trọng người thầy thuốc lâm sàng cần có trước khi chỉ định điều trị thuốc nhắm đích EGFR cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Kiểu đột biến gen KRAS, BRAF khác nhau không liên quan đến kết quả điều trị đích bằng cetuximab [206].

Nghiên cứu này được thực hiện trên 145 bệnh nhân ung thư đại trực tràng có đánh giá tình trạng đột biến hai gen KRAS và gen BRAF, trong số 96 bệnh nhân không có đột biến cả hai gen KRAS và gen BRAF, có 22 bệnh nhân đồng ý điều trị bằng Cetuximab kết hợp hóa chất hỗ trợ khác. Sau 03 tháng điều trị có 4,5% (01/22) bệnh nhân có đáp ứng hoàn toàn, 18,2% (04/22) bệnh nhân bệnh đáp ứng một phần, 45,5% (10/22) bệnh nhân bệnh không thay đổi, 22,7% (05/22) bệnh nhân bệnh tiến triển và 9,1% (02/22) bệnh nhân tử vong (biểu đồ 3.19). Có 01 bệnh nhân mới điều trị được 3 tháng, nên chỉ có 21 bệnh nhân theo dõi sau 06 tháng. Kết quả sau 06 tháng điều trị: có 4,7% (01/21) bệnh nhân có bệnh đáp ứng hoàn toàn, 9,5% (02/21) bệnh nhân bệnh đáp ứng một phần, 42,9% (9/21) bệnh nhân bệnh không thay đổi, 28,6% (06/21) bệnh nhân bệnh tiến triển và 14,3% (03/21) bệnh nhân tử vong (biểu đồ 3.20). Trung vị thời gian sống bệnh không tiến triển (PFS) từ khi điều trị đích là 06 tháng, PFS từ khi điều trị đích thấp nhất là 01 tháng và cao nhất là 26 tháng (biểu đồ 3.21). Trung vị thời gian sống tổng thể (OS) từ khi điều trị đích là 17 tháng, OS thấp nhất là 01 tháng và cao nhất là 64 tháng (biểu đồ 3.22).

Jonker DJ và cộng sự nghiên cứu trên 572 bệnh nhân bị ung thư đại trực tràng được điều trị Cetuximab thấy thời gian sống còn tổng thể trung bình là 6,1 tháng ở nhóm Cetuximab và 4,6 tháng ở nhóm không nhận Cetuximab. Đáp ứng một phần xảy ra ở 23 bệnh nhân (8,0%) trong nhóm Cetuximab nhưng không có bệnh nhân nào trong nhóm không nhận

Cetuximab ( $p < 0,001$ ); bệnh đã ổn định thêm ở 31,4% bệnh nhân được chỉ định cho Cetuximab và 10,9% bệnh nhân ở nhóm không nhận Cetuximab ( $P < 0,001$ ) [123]. Cunningham và cộng sự nghiên cứu hiệu quả điều trị của thuốc nhắm đích EGFR (Cetuximab) kết hợp với irinotecan so với sử dụng Cetuximab đơn thuần thấy: Thời gian trung bình để bệnh tiến triển lớn hơn đáng kể ở nhóm phối hợp điều trị (4,1 so với 1,5 tháng,  $P < 0,001$  bằng test log-rank). Thời gian sống tổng thể trung bình là 8,6 tháng ở nhóm phối hợp điều trị và 6,9 tháng ở nhóm đơn trị ( $P = 0,48$ ). Tác dụng gây độc nhiều hơn ở nhóm phối hợp điều trị, nhưng mức độ nghiêm trọng và tỷ lệ là tương tự như với irinotecan một mình [207].

**Bảng 4.2. Kết quả điều trị bằng Cetuximab của một số nghiên cứu**

Tác giả (năm)	Số bệnh nhân	Phác đồ	PFS (tháng)	OS (tháng)
Cunningham (2004)	329	Cetuximab + Irinotecan	4,1	8,6
Folprecht (2006)	21	Irinotecan/5FU/ FA + cmab	9,9	
Tabernero (2006)	62	Folfiri + cmab	7,2	
Tabernero (2007)	43	Folfox4	10,2	
Van Cutsem (2007)	1217	Folfiri versus Folfiri + cmab	8 và 8,9	
Jonk DJ (2007)	572	Cetuximab + hóa chất bổ trợ		6,1
Van Cutsem 2011	599	Cetuximab + Folfiri	9,9	23,5
Nghiên cứu này (2015)	22	Cetuximab + hóa chất bổ trợ	6,0 (trung vị)	17,0 (trung vị)

Trong nghiên cứu CRYSTAL của Van Cutsem E và cộng sự so sánh

hiệu quả điều trị giữa nhóm sử dụng thuốc nhắm đích EGFR kết hợp với hóa chất hỗ trợ và nhóm sử dụng hóa chất hỗ trợ đơn thuần. Kết quả ở nhóm bệnh nhân có gen KRAS không đột biến, bổ sung điều trị Cetuximab cùng FOLFIRI dẫn đến cải thiện đáng kể thời gian sống tổng thể (trung bình 23,5 ở nhóm có Cetuximab so với 20,0 tháng ở nhóm không có Cetuximab) và thời gian sống không bệnh (trung bình 9,9 tháng ở nhóm có Cetuximab so với 8,4 tháng ở nhóm không có Cetuximab). Tình trạng đột biến gen KRAS đã được xác nhận như một dấu ấn sinh học tiên đoán mạnh mẽ cho hiệu quả của Cetuximab cộng FOLFIRI [15].

Martinelli E và cộng sự thấy hiệu quả điều trị của thuốc nhắm đích EGFR (Cetuximab) cùng với irinotecan cải thiện đáng kể thời gian sống bệnh không tiến triển và thời gian sống tổng thể so với sử dụng Cetuximab đơn thuần ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng di căn [208]. Hướng điều trị kết hợp Vemurafenib với cetuximab có hiệu quả tốt ở những bệnh nhân có đột biến BRAF mới được báo cáo [209].

Do gặp khó khăn về bệnh nhân và giá thuốc cao nên số lượng bệnh nhân được điều trị đích không nhiều, phác đồ điều trị lại khác nhau (điều trị đích đơn thuần và phối hợp), thời gian điều trị đích phụ thuộc vào điều kiện kinh tế của bệnh nhân nên các nhận xét kết quả điều trị đích trong nghiên cứu này chỉ ở mức độ hạn chế.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng chúng tôi đưa ra kết luận sau:

### **1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.**

Đau bụng là triệu chứng lâm sàng phổ biến nhất chiếm 68,1% (79/116); phân có máu đứng thứ hai chiếm 58,6% (68/116), tỷ lệ phân có máu ở ung thư trực tràng là 82,9% (39/47) cao hơn ung thư đại tràng trái 55,0% (20/40) và ung thư đại tràng phải 24,1% (7/29). Xác suất tích lũy sống còn cao nhất ở nhóm không tăng cả hai chỉ số CEA và CA19-9, tiếp theo là nhóm tăng một trong hai chỉ số CEA và CA19-9 và thấp nhất là nhóm tăng cả hai chỉ số CEA và CA19-9.

Tỷ lệ đột biến cả hai gen KRAS và gen BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng là 33,7% (49/145), tỷ lệ đột biến gen KRAS là 30,3% (44/145), tỷ lệ đột biến gen BRAF là 3,4% (5/145) và chiếm 4,9% (5/101) số bệnh nhân không đột biến gen KRAS. Đột biến gen KRAS dạng G12D có tỷ lệ cao nhất là 40,8% (20/49), thứ hai là dạng G13D là 22,5% (11/49). Không phát hiện bệnh nhân nào có đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và BRAF.

### **2. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.**

Đột biến gen KRAS và gen BRAF không liên quan với các đặc điểm lâm sàng: giới tính, nhóm tuổi, thời gian có triệu chứng, tình trạng cấp cứu, các triệu chứng đau bụng, phân lỏng, táo bón, phân có máu, thiếu máu, đặc điểm nội soi, hóa sinh CEA, CA19-9, phân độ mô bệnh học.

Đáp ứng điều trị đích sau 03 tháng là: tỷ lệ bệnh đáp ứng hoàn toàn là 4,5% (1/22), tỷ lệ bệnh đáp ứng một phần là 18,2% (4/22), tỷ lệ bệnh không thay đổi là 45,5% (10/22), tỷ lệ bệnh tiến triển là 22,7% (5/22), tỷ lệ tử vong



là 9,1% (2/22). Đáp ứng điều trị đích sau 06 tháng là: tỷ lệ bệnh đáp ứng hoàn toàn là 4,7% (1/21), tỷ lệ bệnh đáp ứng một phần là 9,5% (2/21), tỷ lệ bệnh không thay đổi là 42,9% (9/21), tỷ lệ bệnh tiến triển là 28,6% (6/21), tỷ lệ tử vong là 14,3% (3/21). Trung vị thời gian sống bệnh không tiến triển từ khi điều trị đích là 06 tháng, thời gian sống bệnh không tiến triển từ khi điều trị đích thấp nhất là 01 tháng và cao nhất là 26 tháng. Trung vị thời gian sống tổng thể từ khi điều trị đích là 17 tháng, thời gian sống tổng thể từ khi điều trị đích thấp nhất là 01 tháng và cao nhất là 64 tháng.

## **KIẾN NGHỊ**

1- Xét nghiệm gen KRAS và gen BRAF là cần thiết cho người bệnh ung thư đại trực tràng trước khi chỉ định điều trị đích. Xét nghiệm gen BRAF chỉ thực hiện với những người bệnh có kết quả xét nghiệm gen KRAS không đột biến.

2- Thực hiện nghiên cứu hiệu quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng với số lượng lớn hơn để đánh giá đáp ứng điều trị đích đối với bệnh nhân người Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mai Trọng Khoa (2016). Kháng thể đơn dòng và phân tử nhỏ trong điều trị bệnh ung thư, Nhà xuất bản Y học; Hà Nội, 285.
2. Yiu H.Y., A.S. Whittemore A. Shibata (2004). Increasing colorectal cancer incidence rates in Japan. *Int J Cancer*, 5, 109, 777-81.
3. Yang L., D.M. Parkin, L.D. Li, et al (2004). Estimation and projection of the national profile of cancer mortality in China: 1991-2005. *Br J Cancer*, 11, 90, 2157-66.
4. Ferlay J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, et al (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 5, 136, E359-86.
5. Siegel R., D. Naishadham A. Jemal (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 1, 63, 11-30.
6. Siegel R.L., K.D. Miller A. Jemal (2015). Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 1, 65, 5-29.
7. Edwards B.K., E. Ward, B.A. Kohler, et al (2010). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*, 3, 116, 544-73.
8. Zavoral M., S. Suchanek, F. Zavada, et al (2009). Colorectal cancer screening in Europe. *World J Gastroenterol*, 47, 15, 5907-15.
9. Rhodes J.M. (2000). Colorectal cancer screening in the UK: Joint Position Statement by the British Society of Gastroenterology, The Royal College of Physicians, and The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. *Gut*, 6, 46, 746-8.
10. Mandel J.S., T.R. Church, J.H. Bond, et al (2000). The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 22, 343, 1603-7.

11. (2001). Colorectal cancer screening. Recommendation statement from the Canadian Task Force on Preventive Health Care. *Cmaj*, 2, 165, 206-8.
12. (2002). Screening for colorectal cancer: recommendation and rationale. *Ann Intern Med*, 2, 137, 129-31.
13. Markowitz S.D. M.M. Bertagnolli (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 25, 361, 2449-60.
14. Van Cutsem E., C.H. Kohne, E. Hitre, et al (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 14, 360, 1408-17.
15. Van Cutsem E., C.H. Kohne, I. Lang, et al (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*, 15, 29, 2011-9.
16. Douillard J.Y., K.S. Oliner, S. Siena, et al (2013). Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 11, 369, 1023-34.
17. Van Cutsem E., M. Peeters, S. Siena, et al (2007). Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 13, 25, 1658-64.
18. <http://pennstatehershey.adam.com/pages/guide/reftext/images/19854.jpg>.
19. Gulwani H. (2013). <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg4/GI208.jpg>.
20. Ursula M S., Hull T (2011). *Colonic Physiology*, Springer; Hardcover, 23-29.

21. Sandle G.I. (1998). Salt and water absorption in the human colon: a modern appraisal. *Gut*, 2, 43, 294-9.
22. Moran Bj J.A. (1990). <sup>15</sup>N-urea metabolism in the functioning human colon: luminal hydrolysis and mucosal permeability. *Gut.*, 4, 31, 454-457.
23. Den Besten G V.E.K., Groen Ak, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker Bm (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 9, 54, 2325-2340.
24. Tazoe H., Y. Otomo, I. Kaji, et al (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 2, 251-62.
25. Hamer H.M., D. Jonkers, K. Venema, et al (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*, 2, 27, 104-19.
26. Fuchs C.S., E.L. Giovannucci, G.A. Colditz, et al (1994). A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 25, 331, 1669-74.
27. Pariente A., C. Milan, J. Lafon, et al (1998). Colonoscopic screening in first-degree relatives of patients with 'sporadic' colorectal cancer: a case-control study. The Association Nationale des Gastroenterologues des Hopitaux and Registre Bourguignon des Cancers Digestifs (INSERM CRI 9505). *Gastroenterology*, 1, 115, 7-12.
28. Cross A.J., J.R. Pollock S.A. Bingham (2003). Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res*, 10, 63, 2358-60.
29. Otani T., M. Iwasaki, S. Yamamoto, et al (2003). Alcohol consumption, smoking, and subsequent risk of colorectal cancer in middle-aged and

- elderly Japanese men and women: Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 12, 1492-500.
30. Akhter M., Y. Nishino, N. Nakaya, et al (2007). Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer among men: a prospective study in Japan. *Eur J Cancer Prev*, 2, 16, 102-7.
  31. Fedirko V., I. Tramacere, V. Bagnardi, et al (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol*, 9, 22, 1958-72.
  32. Moghaddam A.A., M. Woodward R. Huxley (2007). Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 16, 2533-47.
  33. Anand P., A.B. Kunnumakara, C. Sundaram, et al (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res*, 9, 25, 2097-116.
  34. Bonnet M., E. Buc, P. Sauvanet, et al (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res*, 4, 20, 859-67.
  35. Bernstein C.N., J.F. Blanchard, E. Kliwer, et al (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 4, 91, 854-62.
  36. Lee H.S., S.H. Park, S.K. Yang, et al (2015). The risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: a hospital-based cohort study from Korea. *Scand J Gastroenterol*, 2, 50, 188-96.
  37. Amersi F., M. Agustin C.Y. Ko (2005). Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg*, 3, 18, 133-40.
  38. Lynch H.T., T.C. Smyrk, P. Watson, et al (1993). Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*, 5, 104, 1535-49.

39. Gryfe R. (2009). Inherited colorectal cancer syndromes. *Clin Colon Rectal Surg*, 4, 22, 198-208.
40. Koo H.Y., K.J. Park, J.H. Oh, et al (2013). Investigation of clinical manifestations in korean colorectal cancer patients. *Ann Coloproctol*, 4, 29, 139-43.
41. Chalya P.L., M.D. Mchembe, J.B. Mabula, et al (2013). Clinicopathological patterns and challenges of management of colorectal cancer in a resource-limited setting: a Tanzanian experience. *World J Surg Oncol*, 11, 88.
42. Kullavanijaya P., R. Rerknimitr J. Amornrattanakosol (2002). A retrospective study of colorectal cancer patients in King Chulalongkorn Memorial Hospital. *J Med Assoc Thai*, 85 Suppl 1, S85-90.
43. Leis V.M., M.L. Hughes, C.B. Williams, et al (2001). Risk factors predictive of positive findings at colonoscopy(1). *Curr Surg*, 2, 58, 227-229.
44. Saidi H.S., D. Karuri E.O. Nyaim (2008). Correlation of clinical data, anatomical site and disease stage in colorectal cancer. *East Afr Med J*, 6, 85, 259-62.
45. Majumdar S.R., R.H. Fletcher A.T. Evans (1999). How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol*, 10, 94, 3039-45.
46. Ballinger A.B. C. Anggiansah (2007). Colorectal cancer. *Bmj*, 7622, 335, 715-8.
47. Nguyễn Văn Hiếu (2009). *Ung thư học đại cương*, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam; Hà Nội, 52-72.
48. Luy Lossio G., G. Maldonado Landa, E. Chinga Alayo, et al (2000). [CLINICAL CHARACTERISTICS IN COLON CANCER E.

- REBAGLIATI MARTINS HOSPITAL 1995-1999]. *Rev Gastroenterol Peru*, 4, 20, 406-413.
49. Adelstein B.A., P. Macaskill, S.F. Chan, et al (2011). Most bowel cancer symptoms do not indicate colorectal cancer and polyps: a systematic review. *BMC Gastroenterol*, 11, 65.
  50. Flashman K., D.P. O'leary, A. Senapati, et al (2004). The Department of Health's "two week standard" for bowel cancer: is it working? *Gut*, 3, 53, 387-91.
  51. Johnson C.D., M.H. Chen, A.Y. Toledano, et al (2008). Accuracy of CT colonography for detection of large adenomas and cancers. *N Engl J Med*, 12, 359, 1207-17.
  52. Zhu X.L., X. Cai, L. Zhang, et al (2012). [KRAS and BRAF gene mutations in correlation with clinicopathologic features of colorectal carcinoma in Chinese]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 9, 41, 584-9.
  53. Halligan S., K. Wooldrage, E. Dadswell, et al (2013). Computed tomographic colonography versus barium enema for diagnosis of colorectal cancer or large polyps in symptomatic patients (SIGGAR): a multicentre randomised trial. *Lancet*, 9873, 381, 1185-93.
  54. Huh J.W., Y.Y. Jeong, H.R. Kim, et al (2012). Prognostic value of preoperative radiological staging assessed by computed tomography in patients with nonmetastatic colon cancer. *Ann Oncol*, 5, 23, 1198-206.
  55. Dighe S., S. Purkayastha, I. Swift, et al (2010). Diagnostic precision of CT in local staging of colon cancers: a meta-analysis. *Clin Radiol*, 9, 65, 708-19.
  56. Akasu T., G. Iinuma, M. Takawa, et al (2009). Accuracy of high-resolution magnetic resonance imaging in preoperative staging of rectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 10, 16, 2787-94.



57. Mulla M., R. Deb R. Singh (2010). MRI in T staging of rectal cancer: How effective is it? *Indian J Radiol Imaging*, 2, 20, 118-21.
58. Iannicelli E., S. Di Renzo, M. Ferri, et al (2014). Accuracy of high-resolution MRI with lumen distention in rectal cancer staging and circumferential margin involvement prediction. *Korean J Radiol*, 1, 15, 37-44.
59. Sarikaya I., M. Bloomston, S.P. Povoski, et al (2007). FDG-PET scan in patients with clinically and/or radiologically suspicious colorectal cancer recurrence but normal CEA. *World J Surg Oncol*, 5, 64.
60. Mai Trọng Khoa (2013). Nghiên cứu giá trị của PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn bệnh ung thư đại trực tràng trước điều trị. *Y học thực hành*, 1 (857), 7-11.
61. Bu W., R. Wei, J. Li, et al (2014). Association between carcinoembryonic antigen levels and the applied value of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in post-operative recurrent and metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett*, 6, 8, 2649-2653.
62. Bressler B., L.F. Paszat, Z. Chen, et al (2007). Rates of new or missed colorectal cancers after colonoscopy and their risk factors: a population-based analysis. *Gastroenterology*, 1, 132, 96-102.
63. Pickhardt P.J., C. Hassan, S. Halligan, et al (2011). Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis. *Radiology*, 2, 259, 393-405.
64. Atkin W., E. Dadswell, K. Wooldrage, et al (2013). Computed tomographic colonography versus colonoscopy for investigation of patients with symptoms suggestive of colorectal cancer (SIGGAR): a multicentre randomised trial. *Lancet*, 9873, 381, 1194-202.

65. Workshop P.I.T.P. (2003). The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon November 30 to December 1, 2002. *Gastrointestinal Endoscopy*, 6, 58, 3-43.
66. Hiroyuki Kato T.S., Hiroko Otsuka, Rieko Yamada and Kiyoko Watanabe, (2012). Endoscopic Diagnosis and Treatment for Colorectal Cancer, Colorectal Cancer - From Prevention to Patient Care, Dr. Rajunor Ettarh (Ed.);
67. Soetikno R.M., T. Kaltenbach, R.V. Rouse, et al (2008). Prevalence of nonpolypoid (flat and depressed) colorectal neoplasms in asymptomatic and symptomatic adults. *Jama*, 9, 299, 1027-35.
68. Duffy M.J. (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem*, 4, 47, 624-30.
69. Eche N., M.F. Pichon, V. Quillien, et al (2001). [Standards, options and recommendations for tumor markers in colorectal cancer]. *Bull Cancer*, 12, 88, 1177-206.
70. Lindmark G., R. Bergstrom, L. Pahlman, et al (1995). The association of preoperative serum tumour markers with Dukes' stage and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 5, 71, 1090-4.
71. Forones N.M. M. Tanaka (1999). CEA and CA 19-9 as prognostic indexes in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 26, 46, 905-8.
72. Diez M., F.J. Cerdan, M. Pollan, et al (1994). Prognostic significance of preoperative serum CA 19.9 assay in patients with colorectal carcinoma. *Anticancer Res*, 6b, 14, 2819-25.
73. Reiter W., P. Stieber, C. Reuter, et al (2000). Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res*, 6d, 20, 5195-8.
74. Who (World Health Organization) (2010). Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System (4th

- edition). Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH and Theise ND. IARC Press, Lyon.
75. Fleming M., S. Ravula, S.F. Tatishchev, et al (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 3, 3, 153-73.
  76. C C.C. (2000). Colon and Rectal Cancer: Pathology and Staging. in: Willett CG, editor, Hamilton; Ontario, Canada, 53-81.
  77. Sudarshan V., N. Hussain, R. Gahine, et al (2013). Colorectal cancer in young adults in a tertiary care hospital in Chhattisgarh, Raipur. *Indian J Cancer*, 4, 50, 337-40.
  78. Aljebreen A.M., N.A. Azzam, A.M. Alzubaidi, et al (2013). The accuracy of multi-detector row computerized tomography in staging rectal cancer compared to endoscopic ultrasound. *Saudi J Gastroenterol*, 3, 19, 108-12.
  79. Compton C.C., L.P. Fielding, L.J. Burgart, et al (2000). Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 7, 124, 979-94.
  80. Compton C.C. (2000). Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med*, 7, 124, 1016-25.
  81. Edge S.B. C.C. Compton (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 6, 17, 1471-4.
  82. Haq A.I., J. Schneeweiss, V. Kalsi, et al (2009). The Dukes staging system: a cornerstone in the clinical management of colorectal cancer. *Lancet Oncol*, 11, 10, 1128.

83. Tạ Thành Văn (2010). Con đường tín hiệu tế bào và dấu ấn sinh học trong chẩn đoán, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật; Hà Nội, 96-107.
84. Venook A.P. (2005). Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma. *Cancer*, 12, 103, 2435-46.
85. Berg M. K. Soreide (2011). Genetic and epigenetic traits as biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 12, 12, 9426-39.
86. Berg M. K. Soreide (2012). EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov Med*, 76, 14, 207-14.
87. Blobel G.C., W.P. Schiemann H.F. Lodish (2000). Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. *New England Journal of Medicine*, 18, 342, 1350-1358.
88. Xu Y. B. Pasche (2007). TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet*, 16 Spec No 1, R14-20.
89. Bellam N. B. Pasche (2010). Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat Res*, 155, 85-103.
90. Carta C., F. Pantaleoni, G. Bocchinfuso, et al (2006). Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet*, 1, 79, 129-35.
91. Popescu N.C., S.C. Amsbaugh, J.A. Dipaolo, et al (1985). Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somat Cell Mol Genet*, 2, 11, 149-55.
92. NCBI (2013). [http://genome.ucsc.edu/trash/hgtIdeo/hgtIdeo\\_genome\\_1653\\_d1f3c0.png](http://genome.ucsc.edu/trash/hgtIdeo/hgtIdeo_genome_1653_d1f3c0.png).
93. Lievre A., H. Blons P. Laurent-Puig (2010). Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene*, 21, 29, 3033-43.

94. Lurje G. H.J. Lenz (2009). EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*, 6, 77, 400-10.
95. Jancik S., J. Drabek, D. Radzioch, et al (2010). Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 150960.
96. Lahoz A. A. Hall (2008). DLC1: a significant GAP in the cancer genome. *Genes Dev*, 13, 22, 1724-30.
97. Amado R.G., M. Wolf, M. Peeters, et al (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 10, 26, 1626-34.
98. Aoki Y., T. Niihori, Y. Narumi, et al (2008). The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat*, 8, 29, 992-1006.
99. Andreyev H.J., A.R. Norman, D. Cunningham, et al (2001). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*, 5, 85, 692-6.
100. Brink M., A.F. De Goeij, M.P. Weijnenberg, et al (2003). K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*, 4, 24, 703-10.
101. Neumann J., E. Zeindl-Eberhart, T. Kirchner, et al (2009). Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract*, 12, 205, 858-62.
102. Eychene A., J.V. Barnier, F. Apiou, et al (1992). Chromosomal assignment of two human B-raf(Rmil) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94Braf/Rmil and B-raf-2, a processed pseudogene. *Oncogene*, 8, 7, 1657-60.
103. Mao C., R.Y. Liao Q. Chen (2010). BRAF mutation predicts resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 8, 136, 1293-4.

104. Mao C., R.Y. Liao, L.X. Qiu, et al (2011). BRAF V600E mutation and resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 4, 38, 2219-23.
105. ) . [http://bioinformatics.vn/images/phuong\\_phap\\_enzyme\\_giai\\_trinh\\_tu\\_DNA\\_h1.png](http://bioinformatics.vn/images/phuong_phap_enzyme_giai_trinh_tu_DNA_h1.png).
106. Arcila M., C. Lau, K. Nafa, et al (2011). Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping. *J Mol Diagn*, 1, 13, 64-73.
107. Bisht S., F. Ahmad, S. Sawaimoon, et al (2014). Molecular spectrum of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutation: determination of frequency, distribution pattern in Indian colorectal carcinoma. *Med Oncol*, 9, 31, 124.
108. Wang J., H. Yang, Y. Shen, et al (2013). Direct sequencing is a reliable assay with good clinical applicability for KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Cancer Biomark*, 2, 13, 89-97.
109. Kalady M.F., K.L. Dejulius, J.A. Sanchez, et al (2012). BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *Dis Colon Rectum*, 2, 55, 128-33.
110. Newton C.R., A. Graham, L.E. Heptinstall, et al (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, 7, 17, 2503-16.
111. Thelwell N., S. Millington, A. Solinas, et al (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*, 19, 28, 3752-61.
112. Brown T. (2013). <http://research.chem.ox.ac.uk/Data/Sites/4/media/brown-t/t-brown-fig2.png>.

113. Bando H., T. Yoshino, K. Tsuchihara, et al (2011). KRAS mutations detected by the amplification refractory mutation system-Scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *Br J Cancer*, 3, 105, 403-6.
114. Franklin W.A., J. Haney, M. Sugita, et al (2010). KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J Mol Diagn*, 1, 12, 43-50.
115. Krol L.C., N.A. T Hart, N. Methorst, et al (2012). Concordance in KRAS and BRAF mutations in endoscopic biopsy samples and resection specimens of colorectal adenocarcinoma. *Eur J Cancer*, 7, 48, 1108-15.
116. Jimeno A., W.A. Messersmith, F.R. Hirsch, et al (2009). KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol*, 7, 27, 1130-6.
117. Ayoub D., W. Jabs, A. Resemann, et al (2013). Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques. *MAbs*, 5, 5, 699-710.
118. Bou-Assaly W. S. Mukherji (2010). Cetuximab (erbitux). *AJNR Am J Neuroradiol*, 4, 31, 626-7.
119. Kumar A., E.T. Petri, B. Halmos, et al (2008). Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol*, 10, 26, 1742-51.
120. Li S., K.R. Schmitz, P.D. Jeffrey, et al (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, 4, 7, 301-11.

121. Drebin J.A., V.C. Link, D.F. Stern, et al (1985). Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell*, 3, 41, 697-706.
122. Bokemeyer C., E. Van Cutsem, P. Rougier, et al (2012). Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer*, 10, 48, 1466-75.
123. Jonker D.J., C.J. O'callaghan, C.S. Karapetis, et al (2007). Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 20, 357, 2040-8.
124. Nguyễn phương Anh (2010). Nghiên cứu đột biến của gen APC ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng thể đa polyp tuyến gia đình, Trường Đại học Y khoa Hà Nội.
125. Lê Văn Thiệu (2013). Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, Học Viện Quân Y.
126. Eisenhauer E.A., P. Therasse, J. Bogaerts, et al (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 2, 45, 228-47.
127. Cleary J., T.J. Peters, D. Sharp, et al (2007). Clinical features of colorectal cancer before emergency presentation: a population-based case-control study. *Fam Pract*, 1, 24, 3-6.
128. Trần Thắng (2012). Nghiên cứu áp dụng hóa trị hỗ trợ phác đồ FURA trong điều trị ung thư biểu mô tuyến đại tràng, Tiến Sĩ, Trường Đại Học Y Hà Nội.
129. Neuman H.B., E.S. O'connor, J. Weiss, et al (2013). Surgical Treatment of Colon Cancer in Patients Eighty Years of Age and Older: Analysis of 31,574 Patients in the SEER-Medicare Database. *Cancer*, 3, 119, 639-47.



130. Devon K.M., O. Vergara-Fernandez, J.C. Victor, et al (2009). Colorectal cancer surgery in elderly patients: presentation, treatment, and outcomes. *Dis Colon Rectum*, 7, 52, 1272-7.
131. Đinh Quý Minh (2012). Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ và hình ảnh nội soi ung thư đại trực tràng tại bệnh viện Hữu Nghị. *Y học thực hành*, (804) Số 1, 16-19.
132. Siegel R., D. Naishadham A. Jemal (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 1, 62, 10-29.
133. Kodaz H., I. Hacibekiroglu, B. Erdogan, et al (2015). Association between specific KRAS mutations and the clinicopathological characteristics of colorectal tumors. *Mol Clin Oncol*, 1, 3, 179-184.
134. Ristvedt S.L., E.H. Birnbaum, D.W. Dietz, et al (2005). Delayed Treatment for Rectal Cancer. *Dis Colon Rectum*, 9, 48, 1736-41.
135. Hwang H. (2012). Emergency presentation of colorectal cancer at a regional hospital: An alarming trend? *BCMJ*, 2, 54, 83-87.
136. Caglar Bilgin B., S. Kahramanca, T. Akin, et al (2015). Factors influencing cost, length of hospital stay and mortality in colorectal cancer. *J buon*, 4, 20, 1023-9.
137. Wallace D., K. Walker, A. Kuryba, et al (2014). Identifying patients at risk of emergency admission for colorectal cancer. *Br J Cancer*, 3, 111, 577-80.
138. Lê Quang Minh (2012). Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, nội soi, mô bệnh học và biến đổi biểu hiện gen bằng phương pháp Microarray trong ung thư biểu mô đại trực tràng, Học viện Quân Y.
139. Hugen N., C.J. Van De Velde, J.H. De Wilt, et al (2014). Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol*, 3, 25, 651-7.

140. Nguyễn Văn Hiếu (2002). Nghiên cứu độ xâm lấn của ung thư trực tràng qua lâm sàng nội soi và siêu âm nội trực tràng, *Tiến Sĩ*, Trường Đại học Y Hà Nội.
141. Banaszekiewicz Z., P. Jarmocik, J. Frasz, et al (2011). Usefulness of CEA concentration measurement and classic colonoscopy in follow-up after radical treatment of colorectal cancer. *Pol Przegl Chir*, 6, 83, 310-8.
142. Walker A.S., N.P. Zwintscher, E.K. Johnson, et al (2014). Future directions for monitoring treatment response in colorectal cancer. *J Cancer*, 1, 5, 44-57.
143. Thirunavukarasu P., S. Sukumar, M. Sathaiyah, et al (2011). C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst*, 8, 103, 689-97.
144. Park Y.J., K.J. Park, J.G. Park, et al (1999). Prognostic factors in 2230 Korean colorectal cancer patients: analysis of consecutively operated cases. *World J Surg*, 7, 23, 721-6.
145. Trịnh Hồng Sơn Q.V.K., Bùi Trung Nghĩa, Nguyễn Thành Kiên (2011). Vai trò chất chỉ điểm khối u (CEA, CA19-9) trong chẩn đoán và điều trị ung thư biểu mô trực tràng. *Y học thực hành*, (792) 11/2011, 130-132.
146. Selcukbiricik F., A. Bilici, D. Tural, et al (2013). Are high initial CEA and CA 19-9 levels associated with the presence of K-ras mutation in patients with metastatic colorectal cancer? *Tumour Biol*, 4, 34, 2233-9.
147. Hoàng Mạnh Thắng(2009). Nhận xét đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị ung thư trực tràng giai đoạn T3-T4 tại bệnh viện K. Luận văn bác sỹ nội trú bệnh viện, Trường đại học Y Hà Nội.
148. Filella X., R. Molina, J.M. Pique, et al (1994). CEA as a prognostic factor in colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2b, 14, 705-8.

149. Wang J.Y., R. Tang J.M. Chiang (1994). Value of carcinoembryonic antigen in the management of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 3, 37, 272-7.
150. Vukobrat-Bijedic Z., A. Husic-Selimovic, A. Sofic, et al (2013). Cancer Antigens (CEA and CA 19-9) as Markers of Advanced Stage of Colorectal Carcinoma. *Med Arch*, 6, 67, 397-401.
151. Linares Santiago E., J.A. Sanchez Calzado, L. Capitan Morales, et al (2002). Relationship between degree of cellular differentiation in colorectal cancer and topographical distribution. *Rev Esp Enferm Dig*, 2, 94, 78-87.
152. Phipps A.I., D.D. Buchanan, K.W. Makar, et al (2012). BRAF mutation status and survival after colorectal cancer diagnosis according to patient and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 21, 1792-8.
153. Cao W., M. Hashibe, J.Y. Rao, et al (2003). Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev*, 5, 27, 397-404.
154. Anthony N Snow A.a.S., Jonathan a Pruessner (2014). A simple and cost-effective method of DNA extraction from small formalin-fixed paraffin- embedded tissue for molecular oncologic testing. *BMC Clinical Pathology*, 14, 30.
155. Lewandowska M.A., W. Jozwicki B. Zurawski (2013). KRAS and BRAF mutation analysis in colorectal adenocarcinoma specimens with a low percentage of tumor cells. *Mol Diagn Ther*, 3, 17, 193-203.
156. Coura R., J.C. Prolla, L. Meurer, et al (2005). An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol*, 8, 58, 894-5.

157. Pikor L.A., K.S. Enfield, H. Cameron, et al (2011). DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp*, 49,
158. Desjardins P. D. Conklin (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J Vis Exp*, 45,
159. Tạ Thành Văn (2010). PCR và một số kỹ thuật Y Sinh học phân tử, NXB Y Học; Hà Nội, 81-82.
160. Dahm R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet*, 6, 122, 565-81.
161. Reichard P. (2002). Oswald T. Avery and the Nobel Prize in medicine. *J Biol Chem*, 16, 277, 13355-62.
162. Berg M., S.A. Danielsen, T. Ahlquist, et al (2010). DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset. *PLoS One*, 11, 5, e13978.
163. Liu X., M. Jakubowski J.L. Hunt (2011). KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis. *Am J Clin Pathol*, 2, 135, 245-52.
164. Chang Y.S., K.T. Yeh, N.C. Hsu, et al (2010). Detection of N-, H-, and KRAS codons 12, 13, and 61 mutations with universal RAS primer multiplex PCR and N-, H-, and KRAS-specific primer extension. *Clin Biochem*, 3, 43, 296-301.
165. Ahlquist T., I. Bottillo, S.A. Danielsen, et al (2008). RAS Signaling in Colorectal Carcinomas through Alteration of RAS, RAF, NF1, and/or RASSF1A. *Neoplasia*, 7, 10, 680-6.
166. Lopez-Rios F., B. Angulo, B. Gomez, et al (2013). Comparison of testing methods for the detection of BRAF V600E mutations in malignant melanoma: pre-approval validation study of the companion diagnostic test for vemurafenib. *PLoS One*, 1, 8, e53733.

167. Domagala P., J. Hybiak, V. Sulzyc-Bielicka, et al (2012). KRAS mutation testing in colorectal cancer as an example of the pathologist's role in personalized targeted therapy: a practical approach. *Pol J Pathol*, 3, 63, 145-64.
168. Directive E.P.a.C. (1998). Directive of the European Parliament and Council Directive 98/79 / EC on in vitro diagnostic medical devices in vitro, 319-355.
169. Thelwell N., S. Millington A. Solinas (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. 19, 28, 3752-61.
170. Plesec T.P. J.L. Hunt (2009). KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol*, 4, 16, 196-203.
171. Network N.C.C. (2012). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Colon Cancer, National Comprehensive Cancer Network;
172. Trojan J., L. Mineur, J. Tomasek, et al (2015). Panitumumab Use in Metastatic Colorectal Cancer and Patterns of KRAS Testing: Results from a Europe-Wide Physician Survey and Medical Records Review. *PLoS One*, 10, 10, e0140717.
173. Artale S., A. Sartore-Bianchi, S.M. Veronese, et al (2008). Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 25, 26, 4217-9.
174. Chretien A.S., A. Harle, M. Meyer-Lefebvre, et al (2013). Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Med*, 1, 2, 11-20.
175. Dobre M., M. Comanescu, D. Arsene, et al (2013). K-ras gene mutation status in colorectal cancer: comparative analysis of pyrosequencing and PCR-RFLP. *Rom J Morphol Embryol*, 3, 54, 567-74.

176. Richman S.D., M.T. Seymour, P. Chambers, et al (2009). KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*, 35, 27, 5931-7.
177. Bos J.L., E.R. Fearon, S.R. Hamilton, et al (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 6120, 327, 293-7.
178. Zahrani A., M. Kandil, T. Badar, et al (2014). Clinico-pathological study of K-ras mutations in colorectal tumors in Saudi Arabia. *Tumori*, 1, 100, 75-9.
179. Wilson P.M., M.J. Labonte H.J. Lenz (2010). Molecular markers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer J*, 3, 16, 262-72.
180. Berlin J. (2013). Beyond exon 2--the developing story of RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 11, 369, 1059-60.
181. Stec R., A. Semeniuk-Wojtas, R. Charkiewicz, et al (2015). Mutation of the gene as a prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett*, 3, 10, 1423-1429.
182. Di Nicolantonio F., M. Martini, F. Molinari, et al (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 35, 26, 5705-12.
183. Chen J., F. Guo, X. Shi, et al (2014). BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients. *BMC Cancer*, 14,
184. Yokota T. (2012). Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers? *Anticancer Agents Med Chem*, 2, 12, 163-71.
185. Tejpar S., I. Celik, M. Schlichting, et al (2012). Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic

- colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol*, 29, 30, 3570-7.
186. Barault L., N. Veyrie, V. Jooste, et al (2008). Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer*, 10, 122, 2255-9.
  187. Wangefjord S., M. Sundstrom, N. Zendeirokh, et al (2013). Sex differences in the prognostic significance of KRAS codons 12 and 13, and BRAF mutations in colorectal cancer: a cohort study. *Biol Sex Differ*, 1, 4, 17.
  188. Bleeker W.A., V.M. Hayes, A. Karrenbeld, et al (2000). Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer. *Am J Gastroenterol*, 10, 95, 2953-7.
  189. Zulhabri O., J. Rahman, S. Ismail, et al (2012). Predominance of G to A codon 12 mutation K-ras gene in Dukes' B colorectal cancer. *Singapore Med J*, 1, 53, 26-31.
  190. Crumley S.M., K.L. Pepper, A.T. Phan, et al (2015). Next-Generation Sequencing of Matched Primary and Metastatic Rectal Adenocarcinomas Demonstrates Minimal Mutation Gain and Concordance to Colonic Adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med*,
  191. Patanaphan V. O.M. Salazar (1993). Colorectal cancer: metastatic patterns and prognosis. *South Med J*, 1, 86, 38-41.
  192. Feng Q., L. Liang, L. Ren, et al (2015). A specific KRAS codon 13 mutation is an independent predictor for colorectal cancer metachronous distant metastases. *Am J Cancer Res*, 2, 5, 674-88.
  193. Saridaki Z., X. Saegart, V. De Vriendt, et al (2015). KRAS, NRAS, BRAF mutation comparison of endoscopic and surgically removed

- primary CRC paired samples: is endoscopy biopsy material adequate for molecular evaluation? *Br J Cancer*, 6, 113, 914-20.
194. Metz A.J., M.J. Bourke, A. Moss, et al (2013). A correlation of the endoscopic characteristics of colonic laterally spreading tumours with genetic alterations. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 3, 25, 319-26.
195. Chang L.C., H.M. Chiu, C.T. Shun, et al (2014). Mutational profiles of different macroscopic subtypes of colorectal adenoma reveal distinct pathogenetic roles for KRAS, BRAF and PIK3CA. *BMC Gastroenterol*, 14, 221.
196. Munteanu I., B. Mastalier, M.L. Munteanu, et al (2015). THE RELATIONSHIP BETWEEN K-RAS GENE MUTATION, SOME DEGREE OF DIFFERENTIATION AND TUMOR MARKERS IN ADVANCED COLORECTAL CANCER. *Management in Health*, 4, 18,
197. Kawada K., Y. Nakamoto, M. Kawada, et al (2012). Relationship between 18F-fluorodeoxyglucose accumulation and KRAS/BRAF mutations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 18, 1696-703.
198. Das A., M. Kunkel, J. Joudeh, et al (2015). Clinico-pathological correlation of serial measurement of circulating tumor cells in 24 metastatic colorectal cancer patients receiving chemotherapy reveals interpatient heterogeneity correlated with CEA levels but independent of KRAS and BRAF mutation. *Cancer Biol Ther*, 5, 16, 709-13.
199. Narita Y., H. Taniguchi, A. Komori, et al (2014). CA19-9 level as a prognostic and predictive factor of bevacizumab efficacy in metastatic colorectal cancer patients undergoing oxaliplatin-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2, 73, 409-16.
200. Van Cutsem E. J. Oliveira (2009). Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 20 Suppl 4, 61-3.



201. Thirion P., S. Michiels, J.P. Pignon, et al (2004). Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J Clin Oncol*, 18, 22, 3766-75.
202. Colucci G., V. Gebbia, G. Paoletti, et al (2005). Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol*, 22, 23, 4866-75.
203. Goldberg R.M., D.J. Sargent, R.F. Morton, et al (2006). Randomized controlled trial of reduced-dose bolus fluorouracil plus leucovorin and irinotecan or infused fluorouracil plus leucovorin and oxaliplatin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: a North American Intergroup Trial. *J Clin Oncol*, 21, 24, 3347-53.
204. Heinemann V., L.F. Von Weikersthal, T. Decker, et al (2014). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 10, 15, 1065-75.
205. Cremolini C., F. Loupakis, C. Antoniotti, et al (2015). Early tumor shrinkage and depth of response predict long-term outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy plus bevacizumab: results from phase III TRIBE trial by the Gruppo Oncologico del Nord Ovest. *Ann Oncol*, 6, 26, 1188-94.
206. Hong D.S., J.C. Patel, J. Wheler, et al (2012). Outcomes in 144 patients with colorectal cancer treated in a phase I clinic: the MD Anderson Cancer Center experience. *Clin Colorectal Cancer*, 4, 11, 297-303.
207. Cunningham D., Y. Humblet, S. Siena, et al (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 4, 351, 337-45.

208. Martinelli E., R. De Palma, M. Orditura, et al (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol*, 1, 158, 1-9.
209. Connolly K., D. Brungs, E. Szeto, et al (2014). Anticancer activity of combination targeted therapy using cetuximab plus vemurafenib for refractory BRAF (V600E)-mutant metastatic colorectal carcinoma. *Curr Oncol*, 1, 21, e151-4.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ**

1. Nguyễn Kiến Dụ, Trần Văn Khánh, Phạm Huy Tân, Nguyễn Tuyết Mai, Nguyễn Thị Vân Hồng, Trần Huy Thịnh, Tạ Thành Văn (2013). Phát hiện đột biến gen KRAS và bước đầu đánh giá hiệu quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. *Tạp chí Y Học Việt Nam*, 4(2), 37-41.
2. Nguyễn Kiến Dụ, Trần Huy Thịnh, Trịnh Thị Thanh Hương, Trần Thị Oanh, Trần Văn Khánh, Nguyễn Thị Vân Hồng, Tạ Thành Văn (2014). Đột biến gen KRAS, BRAF và mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. *Tạp chí Y Học Việt Nam*, 8(1), 93-97.