BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO **BỘ Y TẾ**

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG MAI

NGHIÊN CỨU GENOTYPE CỦA *HUMAN PAPILLOMAVIRUS* TRÊN MỘT SỐ UNG THƯ SINH DỤC NỮ

Chuyên ngành: Hóa sinh y học

Mã số: 62720112

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

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

Người hướng dẫn khoa học:
GS.TS. Tạ Thành Văn

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sỹ cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.
Vào hồi ..... giờ ..... ngày ..... tháng ..... năm 2020

Có thể tìm luận án tại thư viện:
Thư viện Quốc gia
Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư cổ tử cung (UTCTC) là loại ung thư thường gặp, đứng thứ 3 về tỉ lệ mắc và tử vong trong số các bệnh ung thư ở phụ nữ. Ung thư âm hộ (UTAH) và ung thư âm đạo (UTAD) là hai loại ung thư ít gặp, có tỉ lệ mắc và tử vong ít hơn 10 lần so với UTCTC. Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra khoảng 90% mô UTCTC, 66% mô UTAD và 60% mô UTAH nhiễm HPV.

Vắc xin phòng nhiễm HPV6, 11, 16, 18 ngăn cản protein L1 của HPV nhận diện tế bào chủ đã được sử dụng tại Việt Nam. Vắc xin E6E7 của HPV16 với tác dụng tăng đáp ứng các tế bào miễn dịch với tổn thương CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia) do nhiễm HPV đang được nghiên cứu và sử dụng trên thế giới.

Nghiên cứu trước đã công bố HPV52 phổ biến ở gái mại dâm Việt Nam. Liệu vắc xin phòng nhiễm HPV trên thị trường Việt Nam có khả năng phòng nhiễm các type HPV tại mô UTCTC, UTAH và UTAD? Hơn nữa, nghiên cứu kỳ vọng sẽ cung cấp những dữ liệu về biến thể HPV16E6, E7 tại các loại tế bào ung thư là cơ sở cho chiến lược vắc xin phòng ung thư do nhiễm HPV.

Với những lý do trên, đề tài: **"Nghiên cứu genotype của *Human Papillomavirus* trên một số ung thư sinh dục nữ"** được tiến hành với hai mục tiêu:

1. ***Xác định genotype của HPV tại các mô UTCTC, UTAH, UTAD.***
2. ***Đánh giá liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào tại mô ung thư.***

1. Tính cấp thiết của nghiên cứu:

Vắc-xin thương mại đang lưu hành tại Việt Nam chỉ có khả năng phòng nhiễm HPV6, 11, 16, 18. Công bố từ việc xác định HPV16, 18 bằng 2 cặp mồi đặc hiệu E6, E7 cho 4 loại HPV6, 11, 16, 18 tại mô UTCTC đúc nến không chỉ ra được phân bố chính xác genotype của HPV. Công bố từ nhóm nhà khoa học Việt Nam và Nhật Bản chỉ ra HPV52 phổ biến tại dịch phết cổ tử cung của gái mại dâm. Cho đến nay, vấn đề phân bố xác thực

genotype của HPV tại mô UTCTC, UTAH, UTAD chưa được sáng tỏ. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này.

2. Những đóng góp mới của luận án

Nghiên cứu chỉ ra phân bố chính xác về genotype của HPV tại mô ung thư sinh dục. Nhiễm HPV16 chiếm tỉ lệ cao nhất (43,5%) tiếp theo là HPV18 (23%), đồng nhiễm HPV16, 18 (16,2%); nhiễm HPV52 chỉ chiếm 4,2%. Lineage European chiếm 94% (94/100) các trường hợp nhiễm HPV16; sublineage Asian chiếm tỉ lệ cao nhất, 80% (80/100); European prototype - 14%, Asian-American a - 5% và African 2-1%.

Ung thư biểu mô chiếm 99,5% (213/214) các trường hợp ung thư sinh dục, trong đó, ung thư tế bào vảy chiếm tỉ lệ cao nhất (79,8%-170/213). Sublineage Asian của HPV16 xuất hiện ở tất cả các loại tế bào ung thư biểu mô và ở ung thư tế bào vảy chiếm 90%. Ung thư tế bào vảy nhiễm tất cả các sublineage của HPV16, nhiễm sublineage Asian chiếm 78,3%.

3. Bố cục của luận án

- Luận án được trình bày 111 trang bao gồm: đặt vấn đề 2 trang, tổng quan 36 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 15 trang, kết quả 33 trang, bàn luận 23 trang, kết luận 1 trang, khuyến nghị 1 trang
- Luận án có 21 bảng, 32 hình, gồm 166 tài liệu tham khảo được xếp theo thứ tự xuất hiện trong luận án.

Chương I
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Human Papillomavirus

Human Papillomavirus là loại virus lây qua con đường tiếp xúc trực tiếp, đặc biệt qua quan hệ tình dục. Chuỗi xoắn kép DNA của HPV dài khoảng 8000 bp, gồm 02 gen muộn (late) L1, L2; 06 gen sớm (early) E1, E2, E4, E5, E6, E7.

HPV được phân loại theo theo cấu tạo và nguy cơ gây bệnh. Trình tự DNA của L1 khác biệt 10% so với loại gần nhất đã biết được gọi là loại HPV mới; nếu sự khác biệt từ 1-10% là lineage,

từ 0,5-1% là sublineage. Theo khả năng gây bệnh, HPV được chia thành 3 nhóm: nhóm nguy cơ cao (gồm HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 và 82), nhóm có khả năng gây ung thư (gồm HPV26, 53 và 66), nhóm nguy cơ thấp (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 và CP6108). HPV16 lại được phân chia dưới nhóm thành lineage European gồm các sublineage European prototype (có biến thể E-T350 và E-G350), sublineage Asian (đột biến T178 với các As-a, As-b, As-c). Lineage Non-European gồm sublineage Asian American (AA) (có đột biến G145T và T350G) và sublineage African1 (Af1) (gồm các đột biến C143G và G145T); Afican 2 (Af2) có đột biến C143G, G145T và C335T.

Sau khi virus xâm nhập vào lớp tế bào biểu mô đáy và biến nạp vào nhiễm sắc thể tế bào chủ tạo thể nhẫn, protein E6, E7 được biểu hiện, ức chế protein áp chế khối u pRb và p53. Giai đoạn này, HPV được nhân lên với số lượng thấp. Tới lớp thượng bì, các protein L1, L2 được biểu hiện để tạo hạt virus hoàn chỉnh. Các hạt virus được giải phóng khỏi tế bào chủ cùng với sự bong ra của các tế bào biểu mô.

Các "zinc finger" (acid amin 33-63, 109-139) trên gen E6 HPV16, vùng gen bảo tồn (acid amin từ 37-49 và 116-137) trên gen của E7 của HPV16 liên quan tới p53, pRb. Các vị trí D25, L83 trên E6 thuộc vùng nhận diện của hệ thống miễn dịch.

Các công bố trên thế giới đã chỉ ra rằng hầu hết các HPV bị loại bỏ sau 2 năm lây nhiễm; HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 tồn tại dai dẳng ở mô tổn thương loạn sản CIN và ung thư.

1.2. Ung thư sinh dục nữ

Năm 2018, WHO đã phân loại giải phẫu bệnh về ung thư sinh dục nữ (UTSDN) thành: ung thư biểu mô (gồm ung thư tế bào vảy, ung thư tế bào tuyến và các ung thư biểu mô khác như ung thư tế bào đáy, ung thư tế bào hỗn hợp tuyến vảy, ung thư tế bào kính, ung thư thần kinh nội tiết...), ung thư hắc tố và các loại khác. Ung thư biểu mô liên quan tới HPV, ung thư hắc tố không liên quan tới HPV. Hàm lượng cao NO và nitro từ các phản ứng

viêm làm bổ sung 1 vài nucleotide trên chuỗi DNA khiến chuỗi DNA bị đứt gãy hoặc hình thành liên kết chéo giữa 2 mạch đơn. Sự gia tăng bản sao gen E6, E7 của HPV16 làm giảm có ý nghĩa protein p53 và pRb, làm giảm số lượng tế bào chết, tăng tần suất đột biến, làm mất tính ổn định hệ gen tế bào chủ. Sự biến nạp của gen E6, E7 vào bộ nhiễm sắc thể chủ dẫn đến tổn thương ở mức độ nặng hơn, thậm chí ung thư tại chỗ và ung thư xâm lấn

Phẫu thuật cắt bỏ kết hợp hóa trị liệu hoặc tia xạ là phương pháp điều trị UTCTC, UTAH, UTAD. Vắc-xin L1HPV phòng nhiễm HPV 6, 11, 16, 18 làm giảm tỉ lệ loạn sản cổ tử cung ở mức độ CIN2, CIN3. Liệu pháp vắc-xin E7HPV16 có hiệu quả giảm tổn thương loạn sản cổ tử cung CIN3, xuống CIN2 sau 9 tuần điều trị, giảm đường kính loạn sản âm đạo VAIN2 tới 40%.

1.3. Nghiên cứu trong, ngoài nước và bệnh lý liên quan HPV

Kết quả nghiên cứu trên thế giới đều chỉ ra tỉ lệ nhiễm HPV tại cộng đồng không cao (<20%) nhưng tăng ở nhóm gái mại dâm (50-60% với HPV52 là phổ biến) và tăng rất cao ở nhóm phụ nữ có UTCTC (>80% với HPV16 là phổ biến). Nhiễm sublineage European prototype của HPV16 phổ biến ở bệnh nhân UTCTC tại Italy và Ma-rốc, Bắc Trung Quốc; gái mại dâm Philippin. Sublineage Asian của HPV16 phổ biến ở bệnh nhân UTCTC tại Thái Lan và gái mại dâm Nhật Bản. Tương tự như vậy, tại Việt Nam, tỉ lệ nhiễm HPV tại cổ tử cung tăng dần từ cộng đồng (6,1-10,2%) tới đối tượng gái mại dâm miền Bắc (49,5% với HPV52 phổ biến), bệnh nhân UTCTC (84,4% cho riêng HPV6, 11, 16, 18 và HPV16 chiếm phổ biến). Sublineage Asian của HPV16 phổ biến ở gái mại dâm Việt Nam (95,8%).

Nhiễm HPV ở tổn thương tiền ung thư (80-95%) cao hơn tại mô ung thư âm hộ (30-60%) và ung thư âm đạo (50-75%). Tuy nhiên, HPV16 vẫn là phổ biến nhất; HPV18 không phải là loại phổ biến thứ 2 tại cả mô UTAH và UTAD.

Ung thư tế bào vảy chiếm tỉ lệ cao nhất trong các loại tế bào UTSDN. Ung thư tế bào tuyến đứng thứ 2 tại mô UTCTC và âm đạo, ung thư tế bào đáy đứng thứ hai tại mô UTAH. Tỉ lệ nhiễm

HPV và HPV16 tại ung thư tế bào vảy luôn chiếm ưu thế hơn so với ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào hỗn hợp tuyến vảy.

1.4 Các kỹ thuật phát hiện, xác định genotyep của HPV và xét nghiệm mô bệnh học

Bằng cặp mồi $GP5^+/6^+$, kỹ thuật PCR khuếch đại đoạn gen 140 bp của L1 đã phát hiện nhiều loại HPV như 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, và 74. Cặp mồi bổ sung $MGP5^+/6^+$ được thiết kế thay thế 1 nucleotid và tăng kích thước lên 10 bp so với cặp mồi gốc đã tăng khả năng phát hiện HPV nguy cơ cao (từ 0,7 lên 17,2%). Các cặp mồi $GP5^+/6^+$ và $MGP5^+/6^+$; HPV16-E6 và HPV16-E7 được công bố từ các nghiên cứu trước.

Kỹ thuật lai trên màng genoarrays phát hiện 15 HPV nguy cơ cao (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68) và 6 HPV nguy cơ thấp (6, 11, 42, 43, 44, CP8304 (81)).

Xét nghiệm mô bệnh học là xét nghiệm chẩn đoán xác định loại tổn thương. Các mô sau khi đúc nến được cắt lạnh, nhuộm HE và quan sát dưới kính hiển vi vật kính 100.

Chương 2
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 214 bệnh nhân UTCTC, UTAH, UTAD tại Khoa Khám bệnh, Bệnh viện K Trung ương; Khoa Ngoại 1, Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh và Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

Các bệnh nhân được lựa chọn theo tiêu chuẩn: bệnh nhân mắc UTCTC, UTAH, UTAD nguyên phát; có thể mắc 01, 02 hoặc cả 03 UTCTC, UTAH, UTAD; chưa được điều trị bằng hóa chất hoặc tia xạ; được chẩn đoán ung thư bằng kết quả xét nghiệm mô bệnh học. Những bệnh nhân mắc UTCT, UTAH, UTAD thứ phát hoặc nguyên phát nhưng đang điều trị tia xạ hoặc hóa chất sẽ không được đưa vào nghiên cứu.

2.2 Phương pháp nghiên cứu:

Nghiên cứu mô tả cắt ngang được thu thập bằng cách lấy mẫu thuận tiện.

Các chỉ số trong nghiên cứu gồm thông tin tuổi; kết quả loại tê bào ung thư; kết quả về tỉ lệ nhiễm HPV, genotype của HPV, lineage, sublineage E6, E7 của HPV16.

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

**** Địa điểm phân tích mẫu nghiên cứu***

Khoa Y, Trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản và Trung tâm Nghiên cứu Gen và Protein, Đại học Y Hà Nội.

****Thời gian nghiên cứu:*** Từ tháng 6/2013 đến tháng 10/2018.

2.4 Trang thiết bị, hóa chất: của các hàng Sigma-Alderich (Đức), Hydri-bio (Hongkong), Applied Biosystems.

2.5 Qui trình nghiên cứu

* ***Tách chiết DNA từ mẫu mô***: sử dụng enzym proteinase K và phenol, chloroform, isoamyl alcohol

**** Khuếch đại gen L1 của HPV phát hiện nhiễm HPV***

Trình tự nucleotid của các cặp mồi:

Mồi xuôi $GP5^+$: tttgttactgtggtagatactac

Mồi ngược $GP6^+$: cttatactaaatgtacaaataaaaag

Mồi xuôi $GP5^+$M1: tttRactgttgtWgatactac

Mồi xuôi $GP5^+$M2: tgtWactgttgtWgataccac

Mồi xuôi $GP5^+$M3: gtWactgttgtRgacaccac

Mồi ngược $GP6^+$M1: cttatactWaatgtcaaataWaaagttaa

Mồi ngược $GP6^+$M2: cttaWactaaatgtYaaatacaaag

Mồi ngược $GP6^+$M3: ctcaWactaaacgtYaaataaaaag.

Thành phần phản ứng 30µL: Đệm 10X-3,0 µL; NTPs 2mM: 3,0µL; $MgCl_2$ 25mM: 4,2µL; mồi: 0,375µL (cặp mồi $GP5^+/6^+$)/ 0,3µL (cặp mồi $MGP5^+/6^+$); Ampli *Taq* Gold 5U/µL-0,3µL; nước cất: 16,125µL (cặp mồi $GP5^+/6^+$)/ 16,2 µL (cặp mồi $MGP5^+/6^+$); DNA khuôn: 3,0 µL.

Chu kỳ nhiệt phản ứng: 94^{o}C - 10 phút; 45 chu kỳ [94^{o}C-45 giây, 48^{o}C-4 giây, 38^{o}C-30 giây, 42^{o}C-5 giây; 66^{o}C-5 giây cho

cặp mồi $GP5^+/6^+$ và 95°C-30 giây, 45°C-30 giây cho cặp mồi $MGP5^+/6^+$]; 71°C-90 giây; bảo quản mẫu ở 4°C**.**

**** Điện di xác định sản phẩm gen L1 sau khuếch đại*:** cùng với thang chuẩn 100bp trên gel agarose 2%, các băng DNA được nhuộm ethidium bromide và chụp ảnh bằng hệ thống máy EC3 Imaging system

**** Giải trình tự gen L1 xác định sản phẩm sau khuếch đại***

Mồi $GP5^+/6^+$.

Thành phần phản ứng 20µL: Big Dye term.V3.1 (2,5X): 1,0µL; Big Dye buffer 5X: 3,5µL; mồi (5pmol/µL): 1,5µL; nước cất: 12,0 µL; sản phẩm PCR tinh sạch: 2,0µL.

Chu kỳ nhiệt phản ứng: 96°C-5 phút; 25 chu kỳ [95°C-10 giây, 50°C-5 giây]; 60°C–4 phút; bảo quản mẫu ở 4°C.

**** Kỹ thuật lai trên màng genoarrays***

Khuếch đại gen L1 HPV với nucleotide biotin hóa

Thành phần phản ứng 25µL: Master mix PCR -23,25µL; DNA *Taq* polymerase: 0,75µL; DNA khuôn: 1µL.

Chu trình nhiệt phản ứng: 96°C-phút; 40 chu kỳ [96°C-20 giây, 55°C-30 giây]; 72°C-30 giây; bảo quản mẫu ở 4°C

Lai trên màng

**** Xác định phân nhóm dưới nhóm (lineage) của HPV16***

Khuếch đại gen E6, E7 của HPV16:

Trình tự các cặp mồi

Mồi xuôi HPV16-E6: gaaatcggttgaaccgaaac

Mồi ngược HPV16-E6: acctctatgtggatgtaacg

Mồi xuôi HPV16-E7: gaccggtcgatgtatgtcttg

Mồi ngược HPV16-E7: cttctcccatgccctacattac.

Thành phần phản ứng 40µL: đệm 10X: 4,0 µL; dNTPs 2mM: 4,0µL; $MgCl_2$ 25mM: 5,6µL; mồi: 1,0µL; DNA *Taq* polymerase: 0,4; nước cất: 20µL; DNA khuôn: 4,0µL.

Chu kỳ nhiệt phản ứng: 95°C-10 phút; 40 chu kỳ [95°C-30 giây, 50°C cho E6/ 53°C cho E7-30 giây]; 72°C-45 giây; bảo quản mẫu ở 4°C

Điện di xác định sản phẩm với thang 100bp trên gel agarose 2%.

Giải trình tự gen E6, E7 bằng cặp mồi E6, E7 của HPV16; so sánh trình tự các gen E6, E7 với trình tự trên GenBank.

2.6. Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Bioedit và MEGA để phân tích trình tự gen; thuật toán thống kê Khi bình phương (Chi-square) của phần mềm SPSS 20.0 để so sánh genotype của HPV với các loại tổn thương tế bào tại mô ung thư.

2.7. Đạo đức trong nghiên cứu: được thông qua bởi Hội đồng Y đức của trường Đại học Y Hải Phòng theo quyết định số 7/2011 HĐĐĐ-YHP.

2.8. Kinh phí thực hiện đề tài: được hỗ trợ từ kinh phí của đề tài cấp Nhà nước: "Hợp tác nghiên cứu tỉ lệ nhiễm và phân bố genotype của *Human Papillomavirus* trên một số bệnh ung thư ở phía Bắc, Việt Nam".

Chương 3
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Qua nghiên cứu 188 mẫu UTCTC, 2 mẫu UTAD và 24 mẫu UTAH chúng tôi thu được những kết quả sau:

3.1. Đặc điểm về tuổi của đối tượng nghiên cứu

Tuổi trung bình của đối tượng nghiên cứu là 52,7 ± 12,5 (17-87 tuổi), nhóm UTCTC: 50,9 ± 11,4; nhóm UTAH: 63,0 ± 7,0. 64,2% bệnh nhân UTSDN, 100% bệnh nhân UTAD, 95,8% bệnh nhân UTAH và 60,1% bệnh nhân UTCTC trên 50.

3.2. Phân bố genotype của HPV

3.2.1. Độ tinh sạch của DNA sau tách chiết

Tỉ lệ mật độ quang trung bình (OD) tại bước sóng 260/280 nm của các mẫu DNA sau tách chiết (1,81 ± 0,06; (1,62-1,96)) trong giới hạn cho phép.

3.2.2. Tỉ lệ nhiễm HPV

80,4% (172/214) mô UTSDN và 89,4% (168/188) mô UTCTC, 12,5% (3/24) mô UTAH và 01 trong số 02 mô UTAD

nhiễm HPV; trong đó, 10 mẫu UTCTC/52 mô ung thư âm tính với gặp mồi gốc được phát hiện bằng cặp mồi bổ sung MGP5$^+$/6$^+$. Tình trạng nhiễm HPV tại mô UTCTC cao hơn so mô UTAH có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Trình tự của 05 sản phẩm PCR ngẫu nhiên lựa chọn hoàn toàn tương đồng với trình tự của đoạn gen 140 bp L1 của HPV trên GenBank.

Tỉ lệ nhiễm HPV theo độ tuổi sinh sản được thể hiện ở bảng 3.1.

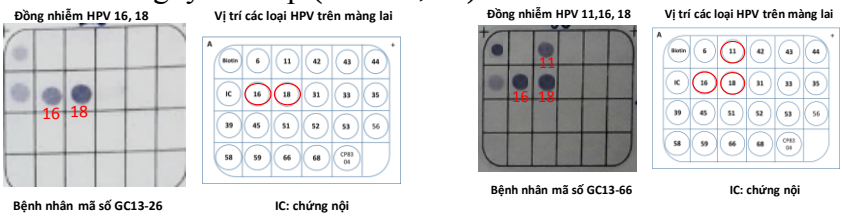
Bảng 1: Phân bố tỉ lệ nhiễm HPV theo độ tuổi sinh sản

Độ tuổi	HPV dương tính		HPV âm tính		p
	n	%	n	%	
< 30 tuổi (n=7)	6	85,7	1	14,3	
30-50 tuổi (n=69)	63	91,3	6	8,7	0,016
≥ 50 tuổi (n=138)	103	74,6	35	25,4	
Tổng số (n=214)	172	80,4	42	19,6	

Nhận xét: Tỉ lệ nhiễm HPV ở nhóm bệnh nhân ở độ tuổi ≥ 50 tuổi thấp hơn nhóm bệnh nhân 30-50 tuổi có ý nghĩa thống kê với p = 0,016 (p<0,05).

3.2.3. Phân bố genotype của HPV

100% (172/172) mẫu UTSDN xác định được genotype của HPV với 10 loại HPV nguy cơ cao (HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59), 02 loại có khả năng gây ung thư (HPV53 và 66) và 02 HPV nguy cơ thấp (HPV11, 81).



Hình 1: Hình ảnh phát hiện các loại HPV bằng phương pháp màng lai. *Biotin: ô gắn biotin; IC: chứng nội dương; ô có màu tím: HPV dương tính.*

Nhận xét: Các chấm tròn màu tím thể hiện kết quả lai dương tính rõ nét. Ô chứng nội và ô biotin có chấm tròn màu tím rõ nét dương tính là chứng tỏ kết quả lai hoàn toàn chính xác.

Kết quả phân bố genotype HPV tại mô UTSDN được thể hiện qua bảng 3.2. Khi phân tích theo chủng, nhiễm HPV16 chiếm 43,5% (83/191); tiếp theo HPV18-23% (44/191); đồng nhiễm HPV16,18 chiếm 16,2% (31/191). Nhiễm HPV52 đứng thứ 4, chiếm 4,2% (8/191).

Tỉ lệ nhiễm HPV16 tăng dần theo độ tuổi và đạt cao nhất ở nhóm từ 40-50 tuổi. Nhiễm HPV18 đạt tỉ lệ cao nhất ở độ tuổi 20-40 tuổi. Đồng nhiễm HPV16,18 xảy ra ở tất cả bệnh nhân nhiễm HPV dưới 20 tuổi.

Bảng 2: Phân bố genotype của HPV tại mô UTSD

HPV genotype	**Đơn nhiễm HPV**								**Đồng nhiễm HPV**															
	16	18	31	33	45	52	58	59	11 16	11 16 18	11 35 81	16 18	16 18 53 66	16 31	16 33	16 45	16 45 51	16 52	16 66	18 52	18 58	35 58 59
UTCTC (n=168)	70	42	2	1	1	3	2	3	1	1	0	29	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1
UTAH (n=3)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UTAD (n=1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng số (n=172)	73	42	2	1	1	3	2	3	1	1	1	29	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1
%	42,4	24,4	1,2	0,6	0,6	1,7	1,2	1,7	0,6	0,6	0,6	16,8	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	2,3	0,6	0,6	0,6	0,6

Nhận xét: Đơn nhiễm HPV đều thuộc nhóm HPV nguy cơ cao, chiếm 73,4% (127/172) UTSDN. Nhiễm HPV16 chiếm 57,5 % (73/127) và 42,4% (73/172); nhiễm HPV18 chiếm 33,1% (42/127) và 24,4% (42/172) các trường hợp đơn nhiễm và tổng số các trường hợp nhiễm HPV. Đồng nhiễm HPV16,18 hoặc đồng nhiễm HPV16,18 với loại khác chiếm 18% (31/172) trường hợp nhiễm HPV và 68,8% (31/45) các trường hợp đồng nhiễm; tiếp theo là đồng nhiễm HPV16, HPV18.

3.2.4. Phân nhóm dưới nhóm và sublineage của HPV16

Từ 100/114 mẫu bệnh phẩm UTCTC cho trình tự nucleotid E6, E7 HPV16 đầy đủ và rõ rang; so sánh với trình tự trên GenBank; sử dụng phần mềm MEGA Genetyx tree; căn cứ vào tiêu chí chẩn đoán của Huertas-Salgado thu được 02 phân nhóm dưới nhóm (lineage) HPV16 gồm European (94%-94/100), trong đó có sublineage Asian (85,1%-80/94) và European prototype (14,9%-14/94); Non European (6%-6/100) gồm sublineage Asian American (83,3%-5/6) và African sublineage (16,7%-1/6). Có 14 đột biến sai nghĩa trên gen E6 và 2 đột biến sai nghĩa trên gen E7 (bảng 3.3)

Bảng 33: Phân bố đột biến nucleotide và acid amin thay thế trên gen E6, E7 của HPV16

Lineage	Sublineage	n		Gen E6 của HPV16															Gen E7 của HPV16		
				*Nucleotide															Acid amin	*Nu.		A. a
				132	143	145	176	178	182	183	276	277	293	315	350	370	571	647		576	647	
European	European prototype	E350T	Ref	G	C	G	G	T	A	T	A	T	G	C	C	T	A			G	A	
		E350G (5)	1	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	G	-		I27L/L83V	-	-	
			3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-		L83V	-	-	
			1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-		L83V	C	-	D4H
		E350T (9)	1	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-		N58S	-	-	
			8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	
	Asian	Asian a (44)	40	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-		D25E	-	G	N29S
			1	-	-	-	-	G	-	G	-	-	-	-	-	-	-		D25E/I27R	-	G	N29S
			1	-	-	-	-	G	-	G	-	-	A	-	-	-	-		D25E/I27R/D64N	-	G	N29S
			1	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	G	-	-	-		D25E/S71C	-	G	N29S
			1	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-		D25K	-	G	N29S
		Asian b (36)	35	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-		D25E	-	-	
			1	-	-	-	-	A	-	-	-	G	-	-	-	-	T		D25E/N58K/E89D	-	-	
Non-European	Asian-American (5)		5	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	-		Q14H/H78Y/L83V	-	-	
	African2 (1)		1	T	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-		R10L/Q14D/H78Y	-	G	N29S

*Ref: trình tự gen E6, E7 tham khảo tải từ GeneBank, mã số HQ644236, *:Trình tự nucleotide tương ứng với các vị trí: 132, 143, 145, 176, 178, 182, 183, 276, 277, 293, 315, 350, 370 trên gen E6 và 571, 647 trên gen E7*

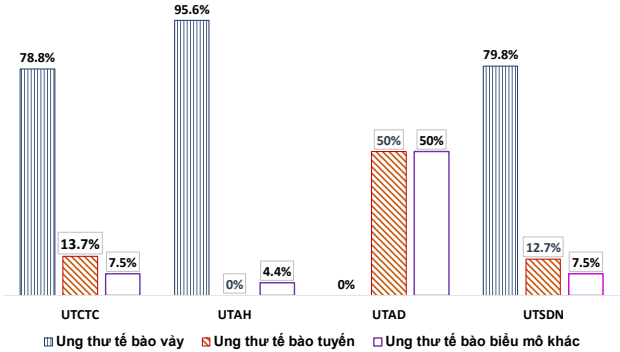
Nhận xét: Tại gen E6, 80% (80/100) là sublineage Asian với đột biến tại nucleotid vị trí 178, dẫn đến thay thế acid amin Aspartic bằng Glutamic hoặc Lysin (D25E, D25K). Sublineage European prototype với đột biến thay thế nucleotid 350 dẫn tới thay thế acid amin Leucin bằng acid amin Valine (L83V) xuất hiện 5% (5/100). Sublineage Asian American xuất hiện thêm đột biến nucleotid 145, 315. Duy nhất 1 trường hợp có 4 điểm đột biến thay thế nucleotid: 132 143, 145, 335 dẫn tới thay đổi bộ 3 mã hóa cho acid amin số 10 Arginin thành Isoleucin, Glutamin số 14 thay thế bằng Aspartic và Histidin số 78 thay bằng Tyrosin ở sublineage African2. Sublineage E-350T không có đột biến thay thế nucleotid tại vị trí 350, 178, 350 và 355.

Tại gen E7, chỉ có 2 vị trí đột biến thay thế nucleotid tại vị trí 571 (1%-1/100) và 647 (45%-45/100) dẫn tới thay đổi bộ ba mã hóa cho acid amin số 4 Aspartic thành Histidin và acid amin Asparagin thành Serin tại vị trí 29.

3.3. Liên quan giữa genotype của HPV và loại tế bào ung thư

3.3.1. Loại tế bào tại mô ung thư

Có 02 loại tế bào ung thư gồm ung thư biểu mô (99,5%-213/214) và ung thư hắc tố (0,5%). Ung thư tế bào vảy chiếm -79,8% (170/213), ung thư tế bào tuyến chiếm 12,7% (27/213). Ung thư các tế bào khác như tế bào tuyến vảy, tế bào kính, tế bào thần kinh nội tiết, tế bào đáy cũng xuất hiện 7,5% (16/213).



Hình 2:Phân bố từng loại tế bào ung thư tại mô UTSDN

Nhận xét: ung thư tế bào vảy chiếm 78,8% (148/188) và 95,6% (22/23) ở mô UTCTC và UTAH. Ung thư tế bào tuyến ít gặp hơn ở mô UTCTC (13,8%-26/188), không xuất hiện ở mô UTAH nhưng xuất hiện ở 1 trong 2 bệnh nhân mắc UTAD.

3.3.2. Liên quan giữa genotype của HPV và loại tế bào ung thư

3.3.2.1 Liên quan giữa tỉ lệ nhiễm HPV với loại tế bào ung thư

Toàn bộ số bệnh nhân nhiễm HPV mắc ung thư biểu mô (172/172). Bệnh nhân mắc ung thư hắc tố không nhiễm HPV.

Bảng 44:Liên quan giữa tình trạng nhiễm HPV với loại tế bào ung thư biểu mô

Nhiễm HPV	Ung thư tế bào vảy	Ung thư tế bào tuyến	Ung thư tế bào khác	p
HPV dương tính n=172	140	19	13	0,34
HPV âm tính (n=41)	30	8	3	
Tổng số (n=213)	170	27	16	

Nhận xét: Trong nhóm nhiễm HPV có 81,4% (140/172) bệnh nhân ung thư tế bào vảy; 11% (19/172) ung thư tế bào tuyến và 7,5 % (13/172) ung thư tế bào khác.

3.3.2.2 Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư biểu mô

Bảng 55: Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư biểu mô

Nhiễm HPV	Ung thư tế bào vảy	Ung thư tế bào tuyến	Ung thư tế bào khác	p
HPV16 (n = 83)	**76**	4	3	0,007
HPV16.18 (n =31)	23	5	3	
HPV18 (n = 44)	28	**10**	**6**	
Type khác (n =14)	13	0	1	
Tổng (n =172)	140	19	13	

Nhận xét: HPV16, HPV18 và HPV16,18 phân bố cao nhất ở loại ung thư tế bào vảy. Tỉ lệ nhiễm HPV16 ở ung thư tế bào vảy cao hơn ở ung thư tế bào tuyến; nhiễm HPV18 ở ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào khác cao hơn ung thư tế bào vảy có ý nghĩa thống kê với p=0,007 (<0,05).

3.3.2.3 Liên quan giữa phân nhóm dưới nhóm của HPV16 với loại tế bào ung thư

Bảng 6: Liên quan giữa phân nhóm dưới nhóm của HPV16 với loại tế bào ung thư biểu mô

Phân nhóm dưới nhóm (lineage)	Ung thư tế bào vảy	Ung thư tế bào tuyến	Ung thư tế bào khác
European (n = 94)	**86**	5	3
Asian (n=80)	**72**	5	3
E-pro (14)	**14**	0	0
Non European (n =6)	**6**	0	0
AsianAsmerican (n=5)	**5**	0	0
African (n=1)	**1**	0	0
Tổng số (n = 100)	**92**	5	3

Nhận xét*:* Lineage European phân bố ở tất cả các loại tế bào ung thư biểu mô; 91,5% (86/92) lineage European và 100% Non – European được xác định tại ung thư tế bào vảy. Sublineage Asian xuất hiện ở tất cả các dạng loại tế bào ung thư biểu mô. Tất cả các sublineage đều xuất hiện ở ung thư tế bào vảy.

Chương 4
BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm về tuổi của đối tượng nghiên cứu

Tuổi trung bình chung của bệnh nhân UTSDN khá cao (52,7 ± 12,5); hơn 3/5 số bệnh nhân ở độ tuổi ≥50. Tỉ lệ mắc UTCTC tăng dần theo lứa tuổi. Kết quả về độ tuổi trung bình mắc UTSDN của nghiên cứu cũng hoàn toàn tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới. Như vậy, UTCTC, UTAH hay UTAD đa số đều ở phụ nữ trong độ tuổi mãn dục.

Dưới tác động của các yếu tố như: tia tử ngoại, thuốc lá, hóa chất và các phản ứng viêm... đã hình thành các gốc tự do, gây đột biến trên chuỗi đơn DNA. Trước mỗi lần phân bào, các tế bào luôn tự sửa chữa các DNA. Protein p53, được hoạt hóa do

sự đứt gãy DNA, áp chế khối u bằng hoạt động làm chậm lại chu trình phân bào, cho phép các DNA tổn thương được sửa chữa đồng thời khởi động chu trình chết tế bào có lập trình nếu DNA bị tổn thương nặng nhằm duy trì tính ổn định của bộ gen. Do đó, bất hoạt p53 dẫn tới tích lũy tế bào chứa gen đột biến qua các lần phân bào dẫn tới biểu hiện ung thư của hầu hết bệnh nhân đã ở độ tuổi khá cao.

4.2. Phân bố genotype của HPV

4.2.1. Độ tinh sạch DNA của HPV sau tách chiết

OD của DNA/protein ở bước sóng 260/280 nm là 1,81 ± 0,06 (1,62-1,96) cho thấy DNA thu hồi đủ tinh sạch và nồng độ DNA đủ lớn để sử dụng cho các kỹ thuật phân tích gen tiếp theo .

4.2.2. Tỉ lệ nhiễm HPV

Trong số 172/214 các mẫu bệnh phẩm UTSDN nhiễm HPV, nhiễm HPV cao nhất tại mô UTCTC (89,4%), thấp nhất tại UTAH (12,5%). Kết quả về tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC của nghiên cứu cũng tương tự như các nghiên cứu trên thế giới.

Với lối sống khác nhau, có lẽ đã dẫn tới tỉ lệ nhiễm HPV khác nhau ở các vùng địa lý khác nhau. Thực nghiệm đã chứng minh khói thuốc lá làm tăng khả năng sao chép của gen E6 HPV, tăng tần suất đột biến DNA trong các dòng tế bào CIN nhiễm HPV. NO sinh ra từ các phản ứng viêm làm thay đổi đáng kể tỉ lệ UTCTC trên thực nghiệm. Protein p53 và Rb bị bất hoạt hoặc giáng hóa bởi protein E6, E7 của HPV, vai trò sửa chữa DNA tế bào của chúng mới bị vô hiệu hóa, dẫn tới hình thành khối u.

Ngay tại Việt Nam, nghiên cứu xác định HPV từ khối nến, với cặp mồi đặc hiệu E6, E7 của 4 loại HPV đã bỏ qua nhiều loại HPV nhiễm tại bệnh phẩm. Ưu thế vượt trội của nghiên cứu là sử dụng mẫu bệnh phẩm tươi (sinh thiết), cặp mồi có độ nhạy, độ chính xác ở thời điểm hiện tại, do đó tỉ lệ nhiễm HPV của nghiên cứu phản ánh chính xác tỉ lệ nhiễm HPV và phân bố các loại HPV tại mô UTCTC của phụ nữ Việt Nam.

Tại mô UTAH, tỉ lệ nhiễm HPV của nghiên cứu chỉ là 12,5% (3/24) thấp hơn so với các nghiên cứu trên thế giới (34,6%-

60,4%). Số lượng cỡ mẫu, loại bệnh phẩm trong các nghiên cứu có lẽ đã dẫn tới tỉ lệ nhiễm HPV khác nhau.

Yếu tố cấu tạo mô học có lẽ là lý giải cho tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTAH thấp hơn rất nhiều so với UTCTC. Âm hộ được cấu tạo từ lớp biểu mô vảy sừng hóa trong khi toàn bộ niêm mạc cổ tử cung được bao phủ bởi biểu mô vảy không sừng hóa dẫn tới mức độ tổn thương khác nhau, tỉ lệ nhiễm HPV khác nhau. Zannoni đã phát hiện receptor ostrogen ERα mất hoàn toàn, ERβ giảm và protein E-cadherin cũng giảm ở những bệnh nhân UTAH âm tính với HPV. Estrogen tác động đến biểu hiện gen p53 bằng việc gắn vào điểm đầu sao mã của p53. Ở những phụ nữ mắc UTAH, lượng ostrogen giảm làm giảm quá trình tổng hợp p53, giảm sửa chữa DNA tổn thương. Cùng với thụ thể ostrogen khiến protein tiền ung thư E-cadherin giảm, làm giảm liên kết giữa các tế bào. Có lẽ, hormon ostrogen là yếu tố chủ yếu tác động chính đến UTAH.

Dù chỉ có 01 trong số 02 mẫu bệnh phẩm đã xác định được HPV nhưng tỉ lệ nhiễm HPV ở mô UTAD cũng tương đương so với nghiên cứu tại Thụy Điển - 53,6%.

Mặc dù tỉ lệ UTSDN ở độ tuổi ≥ 50 cao nhất nhưng tỉ lệ nhiễm HPV ở độ tuổi ≥ 50 thấp hơn các nhóm tuổi <30, 30-50 có ý nghĩa thống kê với p<0,001. Có lẽ nhiễm HPV dai dẳng từ tuổi trẻ cùng với sự suy giảm hormon sinh dục nữ và các tác động của yếu tố môi trường khiến cho ung thư phát triển ở độ tuổi ≥ 50. Sự không tương đồng về tỉ lệ nhiễm HPV tại mô UTCTC, UTAD và UTAH có lẽ bắt nguồn từ sự khác biệt về cấu tạo mô học, tính chất tổn thương.

4.2.3. Phân bố genotype của HPV

Tất cả các mẫu nhiễm HPV trong nghiên cứu đều thuộc nhóm HPV nguy cơ cao, đơn nhiễm HPV chiếm đa số (73,4 %). Kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu tại mô ung thư nhưng ngược lại với những nghiên cứu trên gái mại dâm. HPV nhóm nguy cơ cao sẽ bỏ lại vỏ protein, chỉ sợi DNA được khi xâm nhập, biến nạp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ tạo thể nhẫn và

cũng được nhân lên cùng với nhiễm sắc thể trong mỗi chu kỳ tế bào. Protein E6 tăng giáng hóa protein p53, ngăn chặn sự tự sửa chữa DNA, duy trì sự biến nạp ổn định của HPV trên DNA của tế bào chủ. Protein E7 gắn với protein áp chế khối u pRb, ức chế chu trình chết của tế bào. Các protein của HPV ác tính có chức năng duy trì bộ gen HPV trong tế bào chủ và tốc độ phân bào không kiểm soát dẫn tới sự hình thành khối u. Hầu hết các HPV nguy cơ thấp sẽ bị nhận diện tại các vị trí acid amin trên E6 như: 3, 11, 14, 25, 27, 55, 58, 60, 78, 83 và trên E7 như 22- 26 sau đó bị loại bỏ bởi hệ thống miễn dịch. Có lẽ đột thay thế các acid amin tương ứng với các vị trí trên khiến hệ thống miễn dịch của cơ thể chủ không nhận diện được. Đó cũng là lý do khiến HPV loại nguy cơ cao tồn tại và gây các bệnh lý u trên cơ thể chủ.

Tỉ lệ nhiễm HPV16 tại mô UTSDN, UTCTC là cao nhất, tiếp đến HPV18, đồng nhiễm HPV16,18 và đứng thứ 4 là HPV52. Tương tự như tính trên số chủng HPV. Nhiễm HPV16 là phổ biến nhất tại UTAH, UTAD. HPV35 phổ biến thứ 2 tại mô UTAH. Sự phân bố genotype của HPV tại mô UTSDN của nghiên cứu cũng tương đồng với các nghiên cứu khác trên thế giới.

Nếu như nhiễm HPV52 phổ biến nhất tại gái mại dâm, thì tại mô UTSDN tỉ lệ nhiễm HPV16 và 18 lại phổ biến hơn. Có lẽ, HPV52 đã được loại bỏ trong quá trình nhiễm bởi hệ thống miễn dịch của cơ thể chủ. HPV16, 18 với độ ác tính cao và sự tồn tại dai dẳng, đặc trưng cho UTSDN, nguy cơ ung thư hóa của HPV16, 18 cao hơn rất nhiều so với HPV52.

Đồng nhiễm HPV16,18 tại mô UTCTC của 100% bệnh nhân dưới 20 tuổi; nhiễm HPV16 tăng dần từ độ tuổi 30, đạt tối đa ở độ tuổi tiền mãn kinh 40-50; nhiễm HPV18 cũng xuất hiện ở nhóm trong độ tuổi sinh đẻ và giảm dần sau 40 tuổi đã thể hiện sự ác tính của HPV16 và HPV18. Phải mất 10 năm, sự tích lũy các đột biến nhiễm sắc thể qua các lần phân bào mà 17,2% số phụ nữ nhiễm HPV16; 13,6% nhiễm HPV18; 3,0% đồng nhiễm

HPV16 hoặc HPV18 có kết quả mô bệnh học bình thường phát triển thành CIN3 và ung thư.

Khi xâm nhập vào lớp tế bào đáy, HPV nhân lên với số lượng bản sao mã rất thấp giúp HPV đã không bị hệ thống miễn dịch chủ phát hiện. Các protein muộn chỉ được biểu hiện khi tế bào mang virus phân chia đến lớp tế bào sừng, nơi các tế bào thẩm quyền miễn dịch khó có thể kiểm soát. Như vậy, những HPV nguy cơ cao không bị loại bỏ sẽ tác động lên quá trình phân bào của tế bào chủ dẫn đến hình thành bệnh lý ác tính. Chính vì vậy, ở độ tuổi hoạt động tình dục, nguy cơ nhiễm HPV rất cao, sự tích lũy các tổn thương đến khi biểu hiện bệnh hầu hết ở độ tuổi mãn dục.

4.2.4. Phân nhóm dưới nhóm của HPV16

Phân tích từ 100/114 mẫu bệnh phẩm UTCTC cho thấy (94%-94/100) trường hợp nhiễm HPV16 thuộc nhóm European. Sublineage Asian là phổ biến nhất với 2 loại Asian a và Asian b, tiếp theo lần lượt là European prototype, Asian-American và African2. Kết quả nghiên cứu cũng tương đồng với nghiên cứu ở Thái Lan và miền Nam Trung Quốc. Trong khi European prototype là sublineage phổ biến nhất tại mô UTCTC ở Maroc, Italy và miền Bắc Trung Quốc.

Trên gen E6, đột biến nucleotid T178 tương ứng với bộ 3 mã hóa acid amin số 25 aspartic (D25- 80%), vùng motif trên gen E6, có ái lực với HLA - A2 làm giảm khả năng nhận diện của hệ thống miễn dịch, giúp HPV16 tồn tại dai dẳng trong cơ thể chủ. Đột biến tại nucleotid 350 tương ứng với acid amin Leucin số 83 (L83 - chiếm 10%) liên quan với việc nhiễm HPV16 dai dẳng có ý nghĩa thống kê. Đột biến L83V tác động lên cả quá trình giáng hóa p53, ức chế sao chép p53. Các đột biến tại vị trí acid amin số 10, 14, 27, 58, 78, 83 đơn lẻ hay phối hợp đều có tác dụng ức chế hoạt động sao chép của p53. Các vùng motif tạo zinc finger trên E6 của HPV16 liên kết bền vững E6-AP và u p53 không bị đột biến để bảo toàn hoạt động của E6 HPV16. Duy chỉ có đột biến

D64N thuộc về vùng "zinc finger" nhưng chưa có nghiên cứu nào công bố về tác động của các đột biến này tới vai trò của protein E6.

So với gen E6, gen E7 dường như bền vững hơn với đột biến N29S xảy ra phổ biến. Kết quả của nghiên cứu cũng tương đồng với nghiên cứu tại Thái Lan và Trung Quốc. Đột biến N29S xảy ra ở vùng nhận diện của lympho T độc. Zhang đã chứng minh đột biến N29S không có ý nghĩa thống kê với sự nhiễm dai dẳng HPV16. Có lẽ đột biến N29S trên protein E7 giúp cho HPV16 thoát khỏi sự kiểm soát của tế bào T độc khiến cho HPV16 có thể trốn thoát khỏi hệ thống miễn dịch. Trên thực nghiệm, các đột biến D25E, L83V và N29S đều có khả năng tạo vùng quyết định kháng nguyên mới trên tế bào lympho T và B là cơ sở thiết kế kháng thể kháng E6, E7.

Như vậy, kết quả về phân bố genotype, phân nhóm dưới nhóm của HPV16 và các đột biến trên E6, E7 là cơ sở dữ liệu cho liệu pháp vắc-xin điều trị tiền ung thư ở những bệnh nhân nhiễm HPV sinh dục có loạn sản tế bào biểu mô.

4.3. Liên quan giữa genotype và loại tế bào ung thư

4.3.1. Loại tế bào ung thư

Nghiên cứu đã chỉ ra 99,5% số bệnh nhân mắc ung thư biểu mô; trong đó, ung thư tế bào vảy chiếm tỉ lệ cao nhất, tiếp theo là ung thư tế bào tuyến. Riêng UTAD chỉ có ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào kính.

So sánh với kết quả của các nghiên cứu trước, chúng tôi thấy có sự tương đồng về ưu thế mắc ung thư tế bào vảy tại mô UTCTC, UTAH. Với UTAD, sự xuất hiện ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào kính nguyên nhân có lẽ do cỡ mẫu UTAD của nghiên cứu quá ít.

Xét về phương diện mô học, âm hộ được cấu tạo từ các tế bào biểu mô vảy tầng sừng hóa. Các tuyến của âm hộ cũng cấu tạo từ các tế bào biểu mô trụ tiết nhày ở vùng nang ống và biểu mô vảy ở vùng mở của ống tuyến. Bao phủ niêm mạc âm đạo là lớp biểu mô vảy tầng glycogen hóa không sừng hóa kéo dài tới tận cổ tử cung có các thụ thể steroid. Cổ ngoài của tử cung được cấu

tạo từ lớp tế bào vảy không sừng hóa giống như âm đạo, cổ trong cấu tạo từ biểu mô trụ tiết nhày. Có lẽ chính sự tiết nhày các tế bào biểu mô tiết nhày, lớp glycogen trong nội bào đã giúp loại trừ các tác nhân xâm nhập vào tế bào, do đó, tỉ lệ ung thư tế bào tuyến thấp hơn ung thư tế bào vảy.

4.3.2. Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư

4.3.2.1 Liên quan giữa tỉ lệ nhiễm HPV với loại tế bào ung thư

Toàn bộ các tế bào nhiễm HPV đều là tế bào ung thư biểu mô; 80,8% (172/213) tế bào ung thư biểu mô nhiễm HPV. Ung thư hắc tố không nhiễm HPV. Trong nhóm nhiễm HPV, ung thư tế bào vảy chiếm tỉ lệ cao nhất, tiếp đến ung thư tế bào tuyến, ung thư tế bào khác. Kết quả của nghiên cứu hoàn toàn tương tự với kết quả của các nghiên cứu trên thế giới.

Theo Gonzalez, số bạn tình, tuổi bắt đầu quan hệ tình dục, thời gian sử dụng thuốc tránh thai đều có nguy cơ gây ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào tuyến. Thụ thể tế bào heparan sulfate proteoglycan đóng vai trò quan trọng trong việc tiếp nhận L1 HPV và cho phép HPV xâm nhập vào tế bào biểu mô. IgA được tiết bởi các tương bào, chịu tác động của tế bào tuyến trong cổ tử cung có tác dụng loại bỏ HPV. Chất nhày do tế bào tuyến sinh dục tiết ra làm tăng hiệu quả của đáp ứng miễn dịch của các IgA. Có lẽ đây chính là lý do dẫn tới sự khác biệt rõ rệt giữa nhiễm HPV tại tế bào vảy và tế bào tuyến.

Chưa có nhiều công bố về yếu tố liên quan với ung thư tế bào đáy âm hộ; tuy nhiên, HPV cũng không phải là yếu tố liên quan. Mặc dù nghiên cứu trên thế giới chỉ ra ung thư hắc tố liên quan tới đồng nhiễm HPV16, nhưng có lẽ, chỉ có 01 trường hợp ung thư hắc tố nên không thể kết luận được có khác biệt hay không so với các nghiên cứu trên thế giới.

4.3.2.2 Liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào ung thư

Nghiên cứu phát hiện 10 loại HPV nguy cơ cao tại ung thư tế bào vảy. Ung thư tế bào tuyến, ung thư tế bào khác chỉ phát hiện

được đơn nhiễm hoặc đồng nhiễm HPV16, HPV18 với loại HPV khác; chỉ duy nhất 1 trường hợp đồng nhiễm HPV33, 58, 59 ở ung thư tế bào khác. HPV16 phân bố tại tất cả các dạng tổn thương tế bào. Tỉ lệ nhiễm HPV16 tại ung thư tế bào vảy cao hơn ung thư tế bào tuyến và ngược lại, nhiễm HPV18 tại ung thư tế bào tuyến cao hơn ung thư tế bào vảy có ý nghĩa thống kê với p=0.007. Các công bố trên thế giới cũng có kết quả tương đồng với kết quả của nghiên cứu.

Sự khác biệt về tỉ lệ nhiễm HPV16 tại ung thư tế bào vảy và HPV18 tại ung thư tế bào tuyến có thể do HPV16 vượt qua các matrix ngoại bào bao quanh lớp tế bào đáy sừng hóa bằng việc sử dụng các receptor ngoại bào heparan sulfat và receptor không heparan sulfat trong khi HPV18 chỉ có khả năng xâm nhập qua các receptor heparan sulfat. Điều đó chỉ cho thấy sự ác tính vượt trội của HPV16 với các HPV khác.

4.3.2.3 Liên quan giữa lineage của HPV16 với loại tế bào ung thư

Với 4 sublineage của HPV16, sublineage Asian xuất hiện ở ung thư tế bào vảy (90%), ung thư tế bào tuyến và ung thư tế bào khác. Ung thư tế bào vảy nhiễm cả 4 sublineage của HPV16. Kết quả của nghiên cứu cũng tương tự như của Chopjitt từ Thái Lan nhưng khác biệt với kết quả từ Italy và Mexico. Sự phân bố các sublineage tại UTSDN và liên quan của các sublineage với các loại tế bào ung thư rất khác nhau giữa các châu lục. Sự khác biệt về yếu tố địa lý, nhân chủng học dẫn đến sự khác nhau về các loại sublineage HPV16 xác định tại nơi tổn thương, sự phân bố khác nhau ở các tế bào tổn thương.

Sublineage Asian có đột biến tại nucleotid 178 mã hóa cho acid amin aspartic, thuộc vùng nhận diện miễn dịch của các tế bào thẩm quyền miễn dịch, giúp HPV16 đang biến nạp trong DNA của tế bào biểu mô trốn thoát khỏi sự nhận diện của các tế bào miễn dịch. Các sublineage mang đột biến tại vị trí nucleotid 350 thuộc vùng mã hóa cho acid amin Leucin, làm tăng khả năng sừng hóa tại tế bào biểu mô sừng. Có lẽ vì vậy mà trong

nghiên cứu, sublineage European prototype và Asian American a không xuất hiện ở ung thư tế bào tuyến.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu genotype của *Human Papillomavirus* trên 214 bệnh nhân ung thư sinh dục nữ đề tài đã đưa ra một số kết luận sau:

1. ***Genotype của HPV tại các mô UTCTC, âm hộ, âm đạo***

- 80,4% (172/214) bệnh nhân UTSDN, 89,4% (168/188) bệnh nhân UTCTC, 50% (1/2) bệnh nhân UTAH và 12,5% (3/24) UTAD nhiễm HPV.
- 73,4% (127/172) các trường hợp UTSDN đơn nhiễm HPV; 10 loại HPV nguy cơ cao được xác định từ mô UTSDN gồm HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59.
- Nhiễm HPV16 chiếm tỉ lệ cao nhất-43,5%, tiếp theo là HPV18-23%, đồng nhiễm HPV16, 18-16,2%. Nhiễm HPV52 chỉ chiếm 4,2%.
- 94% (94/100) các trường hợp nhiễm HPV16 thuộc lineage European; sublineage Asian chiếm tỉ lệ cao nhất, 80% (80/100); European prototype-14%, Asian-American a 5% và African 2-1%.

2. ***Mối liên quan giữa genotype của HPV với loại tế bào tại mô ung thư***

- Ung thư biểu mô chiếm 99,5% (213/214), trong đó, ung thư biểu mô vảy chiếm tỉ lệ cao nhất (79,8%-170/213).
- 100% trường hợp nhiễm HPV thuộc loại ung thư biểu mô. Bệnh nhân có ung thư tế bào vảy liên quan tới nhiễm HPV16, ung thư tế bào tuyến liên quan tới HPV18 có ý nghĩa thống kê với p=0,007.
- Sublineage Asian xuất hiện ở tất cả các loại tế bào ung thư, 90% ở ung thư tế bào vảy. Ung thư tế bào vảy nhiễm tất cả các sublineage của HPV16, riêng sublineage Asian chiếm 78,3%.

KHUYẾN NGHỊ

- Vắc-xin L1 phòng nhiễm HPV cần được bổ sung các loại HPV31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59.
- Vắc-xin sublineage Asian E6E7 HPV16 điều trị cho loạn sản ung thư sinh dục nữ cho cần được nghiên cứu và áp dụng

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Phương Mai, Phạm Văn Thức, Hiroshi Ichimura, Phạm Văn Hán, Tạ Thành Văn (2014). Phân bố genotype của *Human Papillomavirus* trên bệnh nhân ung thư cổ tử cung ở phía Bắc, Việt Nam. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, số 6 (92), 1-8.
2. Nguyễn Thị Phương Mai, Nguyễn Phi Hùng, Nguyễn Hùng Cường, Nguyễn Bảo Trân, Nguyễn Thị Minh Ngọc, Hoàng Thị Thanh Huyền, Hiroshi Ichimura, Tạ Thành Văn (2014). Liên quan giữa genotype của *Human Papillomavirus* và tổn thương mô bệnh học trên bệnh nhân ung thư cổ tử cung ở phía Bắc, Việt Nam. Tạp chí Y học Việt Nam, số 1, 1-4.
3. Nguyễn Thị Phương Mai, Phạm Văn Thức, Phạm Văn Hán, Nguyễn Hùng Cường, Hoàng Thị Thanh Huyền, Hiroshi Ichimura, Tạ Thành Văn (2015). Sublineage E6, E7 của *Human Papillomavirus* 16 trên bệnh nhân ung thư cổ tử cung ở phía Bắc, Việt Nam. *Tạp chí Y học thực hành*, số 966, 423-426.
4. Nguyễn Thị Phương Mai, Trần Vân Khánh, Lê Quang Vinh, Tạ Thành Văn (2019). Bước đầu đánh giá genotype của *Human Papillomavirus* tại mô ung thư âm hộ. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, số 7, 33-40.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING

STUDYING *HUMAN PAPILLOMAVIRUS* GENOTYPE ON SOME FEMALE GENITAL CANCERS

Major: Biochemistry

Code: 62720112

ABSTRACT OF MEDICAL DOCTERAL THESIS

HA NOI – 2020

Thesis has been completed at:

HA NOI MEDICAL UNIVERSITY

Supervisors: Prof. PhD. Ta Thanh Van

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The thesis will be present in front of the Board of university examiner and reviewer

Held at: Hanoi Medical University at ....., ...th August, 2020

This thesis can be found at:

National Library

Library of Hanoi Medical University

GENERAL

Cervical cancer (CC) is the most common cancer, ranking the 3rd in the incidence and death among female cancers. Vaginal cancer (VC) and vaginal cancer (VAC) are two less common types of cancer, with 10 times lower incidence and death than CC. The previous studies shown that about 90% of cervical, 66% of VAC and 60% of VC tissue are infected by HPV.

Vaccines for the prevention of HPV6, 11, 16 and 18 infection through preventing the L1 protein of HPV from identifying by host cells have been used in Vietnam. The E6E7 HPV16 vaccine treats CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia) lesions caused by HPV infection by increasing the responsiveness of immune cells being studied and used around the world.

Previous research published HPV52 is the most common at Vietnamese prostitutes. Is the HPV vaccine in the Vietnamese market capable of preventing HPV types in CC, VC and VAC? Moreover, the study expected to provide database on HPV16E6 and E7 variants in different types of cancer cells as well as for the vaccine strategy for prevention cancer caused by HPV infection.

For the above reasons, the "studying *Human Papillomavirus* genotype on some female genital cancers" was conducted with two objectives:

1. Identify HPV genotype in CC, VAC, VC tissues.
2. Assess the relationship between genotype of HPV and the type of cell at cancer tissue.

1. The urgency of the study:

Commercial vaccines currently circulating in Vietnam are only capable of preventing HPV6, 11, 16 and 18 HPV infection. Announcement from the identification of HPV16, 18 by two pairs of specific primers E6, E7 for 4 HPV 6, 11, 16, 18 on paraffin block of cervical tissue did not indicate the exact distribution of HPV genotype. Published from a group of

Vietnamese and Japanese scientists indicated that HPV52 is the most common at the cervix of prostitutes. So far, the issue of authentic genotype distribution of HPV in cervical tissue, VC, VAC has not been clarified. Therefore, we conduct research on this topic.

2. New contributions of the thesis

The study indicated the exact distribution of HPV genotype in genital cancer tissues. HPV16 infection accounted for the highest proportion (43.5%) followed by HPV18 (23%), co-infection with HPV16, 18 (16.2%); HPV52 infection accounts for only 4.2%. Lineage European accounted for 94% (94/100) of HPV16 infection cases; Asian sublineage accounted for the highest percentage, 80% (80/100); European prototype - 14%, Asian-American a - 5% and African 2-1%.

Epithelial cancer accounted for 99.5% (213/214) of female genital cancer cases, in which, squamous cell cancer accounted for the highest proportion (79.8% -170 / 213). Asian Sublineage of HPV16 appeared in all types of epithelial cancer cells and in squamous cell cancer accounted for 90%. Squamous cell carcinoma were infected with all subtypes of HPV16, Asian sublineage accounted for 78.3%.

3. Layout of the thesis

- The thesis is presented with 111 pages including: 2 pages of general, 36 pages of literature review, 15 pages of research object and method, 33 pages of results, 23 pages of discussion, 1 pages of conclusion, and a page of recommendation.
- The thesis had 21 tables, 32 pictures, 166 references arranged in the order of appearance in the thesis.

Chapter I
LITERATURE REVIEW

1.1 *Human Papillomavirus*

Human Papillomavirus is a virus that transmitted by direct contact, especially through sex. The DNA double strand of HPV

is about 8000 bp long, including 02 late genes (late) L1, L2; 06 genes early (early) E1, E2, E4, E5, E6, E7.

HPV is classified according to its structure and risk. The DNA sequence of L1 is 10% different from the nearest known type called new HPV type; lineage if the difference is 1-10%, sublineage if the difference is 0.5-1%. According to their ability to cause disease, HPV is divided into 3 groups: high-risk groups (including HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82), probably cause cancer (including HPV26, 53 and 66), low-risk group (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 and CP6108). HPV16 is again sub-grouped into European lineage including the European prototype sublineage (with variants of E-T350 and E-G350), Asian sublineage (mutations T178 with AS-a, As-b, As-c). Non-European lineage includes Asian American sublineage (AA) (with mutations G145T and T350G) and African sublineage (Af1) (including mutations C143G and G145T); African 2 (Af2) has mutations C143G, G145T and C335T.

After entering the basal epithelial cell layer, DNA virus transformed into the host chromosome, E6 and E7 proteins were expressed, inhibited tumor suppressor proteins pRb and p53. At this stage, HPV was synthesized with low quantity. At the epidermis, L1 and L2 proteins are expressed to produce complete viral particles released. Those released from host by desquamation of the epithelial cell.

The "zinc finger" (amino acids 33-63, 109-139) on the E6 HPV16 gene, the conserved region (amino acids 37-49 and 116-137) on the E7 gene of HPV16 are related to p53, pRb. The positions D25, L83 on E6 belong to the identification area of the immune system.

International publications showed that most HPV is removed after 2 years of infection; HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 persist in CIN dysplastic tissue and cancer.

1.2. Female genital cancer

In 2018, the WHO classified the anatomy of female genital cancer (GFC) into: epithelial carcinoma (including squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and other carcinoma (carcinoma) basal, squamous cell carcinoma, vitreous cell cancer, endocrine neurological cancer ...)), melanoma and others. Epithelial carcinoma relates to HPV, melanoma is not related to HPV. High levels of NO and nitro from inflammatory reactions insert some nucleotides in the DNA sequence causing the DNA sequence to break or form cross-linking between the two single strain. The increase in copies of E6 and E7 genes of HPV16 significantly reduces p53 and pRb proteins, reduces cell death, increases mutation frequency, destabilizes host cell genome. The transformation of E6 and E7 genes into the host chromosome leads to more severe lesions, even in-stu and invasive cancers.

Operation combines chemotherapy or radiation therapy is the most common method of treating CC, VC, VAC. The L1HPV vaccination prevent HPV 6, 11, 16 and 18 infection, reducing the incidence of cervical dysplasia at CIN2 and CIN3 levels. E7HPV16 vaccine therapy effectively reduced CIN3 cervical dysplasia, to CIN2 after 9 weeks of treatment, reduced VAIN2 vaginal dysplasia diameter by 40%.

1.3. Domestic, foreign research and HPV related pathologies

Results from previous studies showed that the prevalence of HPV in the community is not high (<20%) but increases in prostitutes (50-60% with HPV52 is common) and very high in CC (> 80% with HPV16 is common). Sublineage European – prototype of HPV16 is common in CC patients in Italy and Morocco, Northeast Chinese; Philippian prostitutes. Sublineage Asian of HPV16 is common among CC patients in Thailand and Japanese prostitutes. Similarly, in Vietnam, the incidence of HPV infection in cervix increased from the community (6.1-10, 2%) to northern prostitutes (49.5% with common HPV52), CC (84.4% for HPV6, 11, 16, 18 and HPV16 are common). Asian

Sublineage of HPV16 is common among Vietnamese prostitutes (95.8%).

HPV infection in precancerous lesions (80-95%) is higher than that in VC (30-60%) and VAC (50-75%). However, HPV16 is still the most common; HPV18 is not the second most common type in both VC and VAC tissue.

Squamous cell cancer accounts for the highest percentage at FGC tissue. Adenocarcinoma is the second in CC, VAC; and basal cell carcinoma is second in VC. The prevalence of HPV and HPV16 at squamous cell carcinoma always predominates over adenocarcinoma and adeno-squamous carcinoma cell

1.4 Techniques for detection, identification of genotypes of HPV and histopathological testing

PCR technique of amplifying 140 bp gene segment of L1 using $GP5^{+}/6^{+}$ primers, has detected many types of HPV such as 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, and 74. $MGP5^{+}/6^{+}$ modified primer is replaced a nucleotide and increased in size to 10 bp compared to the original primer, which increases detection High-risk HPV (from 0.7 to 17.2%). The primer pairs $GP5^{+}/6^{+}$and $MGP5^{+}/6^{+}$; HPV16-E6 and HPV16-E7 published from previous studies.

Genoarrays- hybridization technology detects 15 high-risk HPVs (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68) and 6 low-risk HPVs (6, 11, 42, 43, 44, CP8304 (81)).

Histopathological test is a diagnostic test that identifies the type of injury. The tissue after paraffin embedding was cold-cut, HE stained and observed under a microscope objective 100.

Chapter 2
SUBJECTS AND RESEACHMETHODOLOGY

2.1 Subject of research

The subjects of the study were 214 patients with cervical cancer, VC, and VAC at the Department of Clinic, National Cancer Hospital; Department of Surgery 1, Ho Chi Minh City

Oncology Hospital; Department of Anaphathology, National Obstetrics and Gynecology Hospital.

Patients were selected according to criteria: primary CC, VC, VAC; can have 01, 02 or all 3 CC, VC, VAC; have not been treated with chemicals or radiation therapy; be diagnosed with cancer by histopathological results. Patients with secondary or primary CC, VC, VAC but undergoing radiotherapy or chemotherapy will not be included in the study.

2.2 Method of research:

Cross-sectional descriptive studies were collected by convenient sampling.

Indicators in the study included: age information; results of type of cancer cell; results of HPV infection rate, HPV genotype, lineage, sublineage E6, E7 of HPV16.

2.3. Location and study time

*** Location for sample analysis**

Faculty of Medicine, Kanazawa University, Japan; Gene and Protein Research Center, Hanoi Medical University.

*** Research time:** from June 2013 to October 2018

2.4 Equipment, chemicals: from Sigma-Alderich (Germany), Hydri-bio (Hong Kong), Applied Biosystems.

2.5 Research process

* **DNA extraction from tissue samples**: using proteinase K and phenol enzymes, chloroform, isoamyl alcohol

* **Amplifying the L1 gene of HPV** to detect HPV infection

Nucleotide sequence of primer pairs:

Forward primer $GP5^+$: tttgttactgtggtagatactac

Reverse primer $GP6^+$: cttatactaaatgtacaaataaaaag

Forward primer $GP5^+$M1: tttRactgttgtWgatactac

Forward primer $GP5^+$M2: tgtWactgttgtWgataccac

Forward primer $GP5^+$M3: gtWactgttgtRgacaccac

Reverse primer $GP6^+$M1: cttatactWaatgtcaaataWaaagttaa

Reverse primer $GP6^+$M2: cttaWactaaatgtYaaatacaaag

Reverse primer $GP6^+$M3: ctcaWactaaacgtYaaataaaaag.

Reaction components 30µL: Buffer 10X-3.0 µL; NTPs 2mM: 3.0µL; MgCl2 25mM: 4.2µL; primer: 0,375µL (for $GP5^+/6^+$) / 0.3µL (for $MGP5^+/6^+$); Amq Gold Amplifier 5U/µL-0.3µL; distilled water: 16,125µL (for $GP5^+/6^+$)/ 16,2 µL (for $MGP5^+/6^+$); Template DNA: 3.0µL.

Thermal reaction cycle: 94^{o}C - 10 minutes; 45 cycles [94^{o}C - 45 seconds, 48^{o}C - 4 seconds, 38^{o}C - 30 seconds, 42^{o}C - 5 seconds; 66^{o}C - 5 seconds for $GP5^+/6^+$; and 95^{o}C - 30 seconds, 45oC - 30 seconds for $MGP5^+/6^+$); 71^{o}C - 90 seconds; store samples at 4°C.

*__Electrophoresis to identify L1 gene products after amplification:__ using a 100bp ladder marker on 2% agarose gel, ethidium bromide-stained DNA bands and photographed by EC3 Imaging system

__L1 gene sequencing to identify products after amplification__

Primer: $GP5^+/6^+$.

Reaction component 20µL: Big Dye term.V3.1 (2.5X): 1.0µL; Big Dye buffer 5X: 3.5µL; priming (5 pmol/µL): 1.5µL; Distilled water: 12.0 µL; Purified PCR products: 2.0µL.

Thermal reaction cycle: 96oC - 5 minutes; 25 cycles [95^{o}C - 10 seconds, 50^{o}C - 5 seconds]; 60^{o}C - 4 minutes; store the sample at 4 ° C protected from light

*** Hybrid technology on genoarrays**

Amplification of L1 HPV gene with nucleotide biotinization

Reaction component 25µL: Master mix PCR -23,25µL; DNA Taq polymerase: 0.75µL; Mold DNA: 1µL.

Thermal reaction cycle: 96^{o}C - 9 minutes; 40 cycles [96^{o}C - 20 seconds, 55^{o}C - 30 seconds]; 72^{o}C - 30 seconds; Store samples at 4°C

Hybrid on membrance

* **Identify lineage of HPV16**

Amplification of genes E6, E7 of HPV16:

The sequence of primer:

Forward primer HPV16-E6: gaaatcggttgaaccgaaac

Reversed primer HPV16-E6: acctctatgtggatgtaacg
Forward primer HPV16-E7: gaccggtcgatgtatgtcttg
Reversed primer HPV16-E7: cttctcccatgccctacattac.

Reaction component 40µL: buffer 10X: 4.0 µL; dNTPs 2mM: 4.0µL; MgCl2 25mM: 5.6µL; bait: 1.0µL; DNA Taq polymerase: 0.4; distilled water: 20µL; Mold DNA: 4.0µL.

Thermal reaction cycle: 95^{o}C - 10 minutes; 40 cycles [95^{o}C - 30 seconds, 50^{o}C for E6 / 53^{o}C for E7 - 30 seconds]; 72^{o}C - 45 seconds; Store samples at 4°C

Electrophoresis identifies the product with using a 100bp ladder marker on 2% agarose gel

Genome sequencing E6, E7 by primers E6, E7 of HPV16; The sequence of genes E6 and E7 was compared with the sequence on Genebank.

2.6. Data processing

Using Bioedit and MEGA software to analyze gene sequences; Chi-square statistical algorithm of SPSS 20.0 software to compare the genotype of HPV with the type of cell damage in cancer tissue.

2.7. Ethics in research: approved by the Medical Ethics Council of Hai Phong Medical University according to the Decision No. 7/2011 HDĐ-YHP.

2.8. Fund for project : supported by Government project's funding: "Collaborating on researching the prevalence and distribution of *Human Papillomavirus* genotype on some cancers at the North of Vietnam".

Chapter 3
RESEARCH RESULTS

Through study of 188 CC, 2 VAC and 24 VC samples, we obtained the following results:

3.1. Age characteristics of the study subjects

The average age of the subjects was 52.7 ± 12.5 (17-87 years), CC group: 50.9 ± 11.4; VC group: 63.0 ± 7.0. 64.2% of

FGC patients, 100% of VC, 95.8% of VAC patients and 60.1% of CC patients were over 50 years old.

3.2. Distribution of HPV genotype

3.2.1. DNA purity after extraction

The ratio of the average optical density (OD) at 260/280 nm at the extracted DNA samples was (1.81 ± 0.06; (1.62-1.96)) within the permitted limits.

3.2.2. Prevalence of HPV infection

80.4% (172/214) of FGC, 89.4% (168/188) of CC, 12.5% (3/24) of VC and 1 of 02 VAC tissues were infected with HPV; of which, 10 of 52 CC samples, which were negative with the original primer, detected by modified primers $MGP5^{+}/6^{+}$. There was statistically significant difference between prevalence of HPV infection at CC and VC tissue at $p < 0.001$.

The sequence of 05 randomly selected FGC PCR products were completely similar to the sequence of the 140 bp L1 gene segment of HPV at GenBank.

The distribution of prevalence of HPV infection and reproductive age were showed at table 3.1.

Table 3.1: Distribution of HPV infection prevalence by reproductive age

Age	HPV positive		HPV negative		p
	n	%	n	%	
< 30 age (n=7)	6	85,7	1	14,3	
30-50 age (n=69)	63	**91,3**	6	8,7	0,016
≥ 50 age (n=138)	103	74,6	35	25,4	
Total (n=214)	172	80,4	42	19,6	

Comment: The prevalence of HPV infection at patients aged ≥ 50 years old were statistically significant lower than that of patients aged 30-50 at $p = 0.016$ ($p < 0.05$).

3.2.3. Genotype distribution of HPV

From 100% (172/172) of FGC samples identified 10 types of high-risk HPV genotype (HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58,

59), 02 probably cause cancer types (HPV53 and 66) and 02 low-risk HPV types (HPV11, 81).

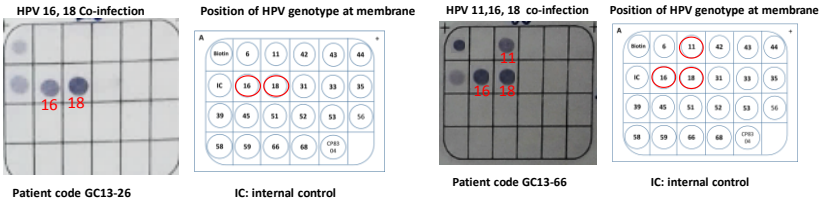


Figure 3.1: **Images of HPV types detected by hybrid membrane method**. Biotin: biotinzation; IC: internal control; purple circle: positive HPV.

Comments: The purple circle showed a clear positive hybrid result. Positive control cells and biotin cells with clear purple circle show that the hybrid results are completely accurate.

The distribution of HPV genotype at FGC tissue were shown in Table 3.2. When analyzed by strain, HPV16 infection accounted for 43.5% (83/191); followed by HPV18-23% (44/191); co-infection with HPV16.18 accounted for 16.2% (31/191). HPV52 infection ranked fourth, accounting for 4.2% (8/191).

The prevalence of HPV16 increased with age and was highest at the age of 40-50 years. HPV18 infection was highest at the age of 20-40 years. Co-infection with HPV16.18 occurred at all patients with HPV infection under age 20.

Table 7: The distribution of HPV at FGC tissues

HPV genotype	Single HPV infection								Multiple HPV infection															
	16	18	31	33	45	52	58	59	11 16	11 16 18	11 35 81	16 18	16 18 53 66	16 31	16 33	16 45	16 45 51	16 52	16 66	18 52	18 58	35 58 59
CC (n=168)	70	42	2	1	1	3	2	3	1	1	0	29	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1
VC (n=3)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VAC (n=1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total (n=172)	73	42	2	1	1	3	2	3	1	1	1	29	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1
%	42,4	24,4	1,2	0,6	0,6	1,7	1,2	1,7	0,6	0,6	0,6	16,8	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	2,3	0,6	0,6	0,6	0,6

Comments: The single HPV infection belonged to the high-risk HPV group, accounting for 73.4% (127/172) of FGC. HPV16 infection accounted for 57.5% (73/127) and 42.4% (73/172); HPV18 infection accounted for 33.1% (42/127) and 24.4% (42/172) single infection and the total number of HPV infections. Co-infection with HPV16.18 or co-infection with HPV16.18 with other types accounted for 18% (31/172) cases of HPV infection and 68.8% (31/45) cases of co-infection; followed by co-infection with HPV16 and HPV18.

3.2.4. Lineage and sublineage of HPV16

From 100/114 successful E6 and E7 HPV16 nucleotide sequences; compared with the sequences on GenBank; using MEGA Genetyx tree software; based on Huertas-Salgado's diagnostic criteria, there were two lineages of HPV16, European (94% -94/100) and Non European (6% -6/100). Two sublineages of European included Asian sublineage (85.1% -80/94) and European prototype sublineage (14.9% -14/94). The two sublineages of Non European included the Asian American

sublineage (83.3% -5/6) and the African sublineage. (16.7% -1/6). There were 14 nucleotides mutations at E6 gene and 2 ones at E7 gene (Table 3.3)

Table 83: The distribution of nucleotide mutation and amino acid changed at HPV16E6, E7 gene

Lineage	**Sublineage**	n		*HPV16E6 gene*															*HPV16E7 gene*		
				***Nucleotide**															**Acid amin**	***Nu.**		**A. a**
				1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3		5	6	
				3	4	4	7	7	8	8	7	7	9	1	3	5	7		7	4	
				2	3	5	6	8	2	3	6	7	3	5	5	0	0		1	7	
European	European	E350T	Ref	G	C	G	G	T	A	T	A	T	G	C	C	T	A		G	A	
	prototype	E350G	1	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	G	-	I27L/L83V	-	-	
		(5)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	L83V	-	-	
			1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	L83V	C	-	D4H
		E350T	1	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	N58S	-	-	
		(9)	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	
	Asian	Asian a	40	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D25E	-	G	N29S
		(44)	1	-	-	-	-	G	-	G	-	-	-	-	-	-	-	D25E/I27R	-	G	N29S
			1	-	-	-	-	G	-	G	-	-	A	-	-	-	-	D25E/I27R/D64N	-	G	N29S
			1	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	G	-	-	-	D25E/S71C	-	G	N29S
			1	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D25K	-	G	N29S
		Asian b	35	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D25E	-	-	
		(36)	1	-	-	-	-	A	-	-	-	G	-	-	-	-	T	D25E/N58K/E89D	-	-	
Non-European	Asian-American (5)		5	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	-	Q14H/H78Y/L83V	-	-	
	African2 (1)		1	T	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	R10L/Q14D/H78Y	-	G	N29S

*Ref: sequence of genes E6, E7 refer to download from Genbank, code HQ644236, *: Nucleotide sequence corresponding to positions: 132, 143, 145, 176, 178, 182, 183, 276, 277 , 293, 315, 350, 370 at E6 and 571, 647 at E7 gene*

Comment: At E6 gene, 80% (80/100) mutations at the 178th nucleotide belonged to Asian sublineage, lead to the replacement of Aspartate by Glutamate or Lysin (D25E, D25K). Sublineage European prototype with mutation at the 350th nucleotide lead to the replacement of Leucin by Valine (L83V) appeared 5% (5/100). Sublineage Asian American appeared two more nucleotide mutations 145, 315. There were 4 mutations at one case with replacing nucleotides at position 132 143, 145, 335 lead to change the 10th amino acid Arginine to Isoleucine , the 14th Glutamine to Aspartic and the 78th Histidine to Tyrosine at sublineage African2. There was no nucleotide mutations at positions 350, 178, 350 and 355 at sublineage E-350T.

At E7 gene, there were mutations at the 571st nucleotide (1% -1/100) and the 647th (45%-45/100) lead to change Aspartat to Histidin at the 4th and Asparagin to Serin at the 29th of E7 gene.

3.3. Relationship between HPV genotype and cancer cell type

3.3.1. Cell type at cancerous tissue

There were two types of cancer cells including epithelial carcinoma (99.5% -213 / 214) and melanoma (0.5%). Squamous cell carcinoma accounted for - 79.8% (170/213), adenocarcinoma accounted for 12.7% (27/213). Other cancer cells such as adeno-squamous carcinoma, glasses cell carcinoma, endocrine neurons carcinoma, basal cells carcinoma also appeared 7.5% (4/213).

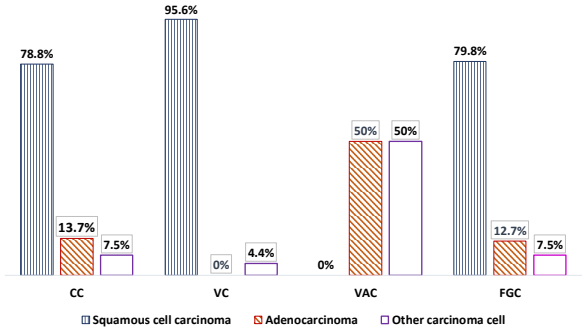


Figure 3.4: Distribution of cancer cell type at FGC tissue

Comment: squamous cell carcinoma accounted for 78.8% (148/188) and 95.6% (22/23) at CC and VC. Adenocarcinoma was less common at CC (13.8% -26/188) and did not appear at VC but occurred in 1 of 2 VAC tissue.

3.3.2. Relationship between HPV genotype and cancer cell type

3.3.2.1 Relationship between HPV infection prevalence and cancer cell type

All of the HPV-infected patients had epithelial carcinoma (172/172). Patients with melanoma was not infected HPV.

Table 3.4: Relationship between HPV infection and epithelial carcinoma type

HPV infection	Squamous cell carcinoma	Adeno-carcinoma	Other carcinoma cell	p
HPV positive n=172	140	19	13	0,34
HPV negative (n=41)	30	8	3	
Total (n=213)	170	27	16	

Comment: HPV, 81.4% (140/172) of squamous cell cancer patients; 11% (19/172) of adenocarcinoma and 7.5% (13/172) of other cell cancers were infected HPV**.**

3.3.2.2 Relationship between HPV genotype and cancer cell type

Table 3.5: Relationship between HPV genotype and epithelial carcinoma cell type

HPV infection	Squamous cell carcinoma	Adeno-carcinoma	Other carcinoma cell	p
HPV16 (n = 83)	**76**	4	3	0,007
HPV16.18 (n =31)	23	5	3	
HPV18 (n = 44)	28	**10**	**6**	
Other type (n =14)	13	0	1	
Total (n =172)	140	19	13	

Comments: HPV16, HPV18 and HPV16.18 were the highest infection prevalence at squamous cell carcinoma. There was statistically significant difference between prevalence of HPV16

and HPV18 infection at squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, other carcinoma cell at p = 0.007 (<0.05).

3.3.2.3 Relationship between HPV16 lineage and epithelial cancer cell type

Table 3.7: Relationship between HPV16 lineage/sublineage and epithelial cancer cell type

Lineage/sublineage	Squamous cell carcinoma	Adeno-carcinoma	Other carcinoma cell
European (n = 94)	**86**	5	3
Asian (n=80)	**72**	5	3
E-pro (14)	**14**	0	0
Non European (n =6)	**6**	0	0
Asian American (n=5)	**5**	0	0
African2 (n=1)	**1**	0	0
Total (n = 100)	**92**	5	3

Comments: European Lineage was at all types of epithelial carcinoma; 91.5% (86/92) European lineage and 100% Non-European were determined in squamous cell carcinoma. Asian sublineage appeared in all types of epithelial carcinoma. All sublineages appeared in squamous cell cancer.

Chapter 4
DISCUSSION

4.1. Age characteristics of the study subjects

The average age of FGC patients was quite high (52.7 ± 12.5); More than 3/5 patients were over 50 years old. The prevalence of CC increased with age. The results of the average age of FGC are completely similar with the results of the other authors in the world. Thus, CC, VC, VAC were mostly in women of sexual maturity.

Free radical formed by the influence of such as factors: ultraviolet rays, cigarettes, chemicals and inflammatory reactions… caused mutations at the single DNA strain. Before

each cell division, the DNA always repair themselves. The p53 protein, activated by DNA breakage, suppresses tumors by slowing down the cell division process, allowing damaged DNA to be repaired and initiating apoptosis if DNA was damaged seriously to maintain the genome's stability**.** Therefore, inactivation of p53 leads to the accumulation mutated genes through cell division, leading to the expression of cancer in most patients who are quite advanced.

4.2. Genotype distribution of HPV

4.2.1. DNA purity of HPV after extraction

The OD ration of DNA/protein at 260/280 nm was 1.81 ± 0.06 (1.62-1.96), showing that the extracted DNA was pure enough and the DNA concentration was large enough to be used for further genetic analysis.

4.2.2. Prevalence of HPV infection

Among 172/214 samples of FGC were infected with HPV, HPV infection was highest at CC (89.4%), lowest at VC tissues (12.5%). The results of the HPV prevalence at the CC tissue were similar to those of the other studies in the world.

Different lifestyles may lead to different prevalence of HPV infection in different geographical areas. Experiments showed that cigarette smoke increased the replication ability of the HPVE6 gene, increased the frequency of DNA mutations in HPV-infected CIN cell lines. NO resulting from inflammatory reactions significantly changes the rate of experimental CC. Proteins p53 and Rb are inactivated or degraded by HPV E6 and E7 proteins, the repairing DNA cells is inactivated, leading to tumor formation.

Even in Vietnam, the study identified HPV from paraffin blocks, with specific primers E6,E7 of 4 types of HPV may ignored many types of HPV infection in the specimen. The dominant advantage of the study is the use of fresh specimens (biopsies), primers with sensitivity and accuracy at the present time, so the HPV infection rate of the study accurately reflects

the infection rate. HPV and distribution of types of HPV in cervical tissue of Vietnamese women.

At VC tissue, the HPV infection prevalence was only 12.5% (3/24), lower than that of the previous studies in the world (34.6% - 60.4%). The number of sample sizes and types of specimens in the studies probably led to different prevalence of HPV infection.

Histological structure may be a explanation for the prevalence of HPV infection in VC tissue was much lower than that of CC in the world and this study. The vulva is composed of keratinized squamous epithelium while the entire cervical mucosa is covered by nonkeratinized squamous epithelium resulting in varying degrees of damage and different prevalence of HPV infection. Zannoni discovered that ERα estrogen receptor is completely lost, ERβ was reduced and E-cadherin protein is also reduced at VC negative HPV patients. Estrogen affects p53 gene expression by attaching to the p53 transcription start point. In women with VC, decreased levels of estrogen reduce p53 synthesis, and repair damaged DNA. Together with the estrogen receptor, the precancerous protein E-cadherin decreases, reducing the link between cells. Perhaps, the hormone estrogen is the main factor affecting VC. Although only 1 out of 2 specimens were infected HPV, the prevalence of HPV infection at VC tissue was similar to the one in Sweden - 53.6%.

Although the prevalence of FGC at the age over 50 is highest, the rate of HPV infection at the age of ≥ 50 was lower than that of age groups <30, 30-50 statistical significance at $p < 0.001$. Perhaps the persistent HPV infection from a young age together with the decline of female sex hormones and the effects of environmental factors caused the cancer to develop at age ≥ 50. The inadequacy of HPV infection rate at CC, VC, VAC tissues probably caused by the differences in histological structure, lesion properties.

4.2.3. Genotype distribution of HPV

All of the HPV infection samples were in the high-risk HPV group, single HPV infection were majority (73.4%). This result was similar to the studies in cancerous tissue but contrary to the that of prostitutes. High-risk HPVs will leave their protein envelope, only DNA strands penetration, transform into the chromosome as the ring in host cell and are also multiplied with chromosomes in each cell cycle. The E6 protein increases the breakdown of the p53 protein, prevents DNA repair, maintains a stable transformation of HPV in the host cell's DNA. The E7 protein binds to the tumor suppressor pRb protein, which inhibits the cell's death cycle. High risk HPV proteins are responsible for maintaining the HPV genome in the host cell and uncontrolled cell division leading to tumor formation. Most low-risk HPVs will be identified at amino acid sites on E6 gene such as: 3, 11, 14, 25, 27, 55, 58, 60, 78, 83 and on E7 as 22-26, after that removed by the immune system. Perhaps suddenly replacing amino acids corresponding to the above positions makes the host's immune system unrecognized. That is also the reason why high-risk type HPV exists and causes tumors on the host.

The prevalence of HPV16 infection in FGC and cervical tissue is the highest, followed by HPV18, co-infection with HPV16.18 and the 4^{th} rank was HPV52. Same as calculated on the number of HPV strains. HPV16 infection is most common in VC, VAC. HPV35 is the 2^{nd} most common at VC tissue. The genotype distribution of HPV in FGC tissue was similar to previous studies in the world. If HPV52 infection is most common among prostitutes, the prevalence of HPV16 and 18 is more common in FGC tissue. Perhaps, HPV52 was removed during infection by the host's immune system. HPV16, 18 with high malignancy and persistence, typical for FGC, the risk of cancer of HPV16, 18 is much higher than that of HPV52.

HPV16.18 co-infection occurred at 100% of CC patients under 20 years of age; HPV16 infection gradually increased from the age of 30, reaching the maximum at the age of menopause

40-50; HPV18 infection also appeared at the reproductive age group and declines after age of 40, showing the malignancy of HPV16 and HPV18. It took 10 years, the accumulation of chromosome mutations through cell division, that 17.2% of women were infected HPV16; 13.6% had HPV18 infection; 3.0% co-infection with HPV16 or HPV18 results in normal histopathology develop into CIN3 and cancer.

When invading the basal cell layer, HPV replicates with a very low number of copies to prevent HPV from being detected by the host immune system. Late proteins are expressed only when the virus-carrying cell divides to the stratum corneum, where immune-competent cells cannot be controlled. Thus, high-risk HPVs that are not removed will affect the cell division process of the host cell leading to malignancy. Therefore, at the age of sexual activity, the risk of HPV infection is very high, the accumulation of lesions until the manifestation of the disease is mostly in the sexual maturity.

4.2.4. Lineage of HPV16

Analysis of 100/114 CC specimens showed that (94% -94 / 100) cases of HPV16 infection were in the European group. Asian sublineage was the most popular with Asian a and Asian b, followed by European prototypes, Asian-American and African2. This findings was similar to those in Thailand and southern China. While the European prototype is the most common sublineage at cervical tissue in Morocco, Italy and Northern China.

In the E6 gene, the nucleotide mutation T178 corresponds to the coding amino acid Aspartic number 25 (D25-80%), the motif region on the E6 gene, has affinity for HLA - A2 which reduces the recognition of the immune system, helping HPV16 persist in the host body. The mutation at the 350^{th} nucleotide corresponds to the coding amino acid Leucin number 83 (L83 - 10%) associated with statistically significant persistent HPV16 infection. The L83V mutation affects the p53 degradation

process and inhibits p53 replication. Mutations at amino acid positions 10, 14, 27, 58, 78, 83 singly or in combination all inhibit the replication activity of p53. Motif areas create zinc finger on E6 of HPV16, the E6-AP link is stable and p53 is not mutated to preserve HPV16E6 activity. Only the D64N mutation belongs to the "zinc finger" region, but there is no publish on the effect of these mutations to the E6 protein.

Compared to the E6 gene, the E7 gene seems to be more stable with the common occurrence of the N29S mutation. The results of the study were similar to those in Thailand and China. The N29S mutation occurred in the recognition region of toxic T lymphocytes. Zhang demonstrated that the N29S mutation was not statistically significant with persistent HPV16 infection. Perhaps the N29S mutation on the E7 protein helps HPV16 escape the control of toxic T cells so that HPV16 can escape the immune system. In experiments, the mutations D25E, L83V and N29S are all capable of creating new antigen-determining regions on T and B lymphocytes, the basis for designing antibodies to HPV16E6, E7.

Thus, the results of genotype distribution, lineage of HPV16 and mutations on E6, E7 are the database for vaccine therapy for precancerous treatment in patients with genital HPV infection. epithelial cell production.

4.3. Relationship between HPV genotypes and cancer cell type

4.3.1. Type of cancer cell

Results showed that 99.5% of patients got epithelial carcinoma; among them, squamous cell carcinoma accounted for the highest proportion, followed by adenocarcinoma. Particularly for VAC, there was only a adenocarcinoma and a glasses cell carcinoma.

Compared with previous studies, we found a similarity in the advantage of squamous cell carcinoma in CC, VC. With VC, the occurrence of adenocarcinoma and glasses cell carcinoma may be due to our small sample size of VC.

Histologically, the vulva is composed of keratinized squamous epithelial cells. The glands of the vulva also consist of mucous epithelial cells at the cystic region and squamous epithelium in the open area of the gland duct. Covering the vaginal mucosa is a stratified non-keratinized squamous epithelium that extends down to the cervix with steroid receptors. The outer neck of the cervix is a non-keratinized squamous cell layer like the that of vagina, the inner neck is composed of mucous secretory epithelium. Perhaps the secretion of mucous epithelial cells, the intracellular glycogen layer, which eliminates the invading agents, so the prevalence of adenocarcinoma was lower than that of squamous cell carcinoma.

4.3.2. Relationship between HPV genotype and cancer cell type

4.3.2.1 Relationship between HPV infection prevalence and cancer cell type

All HPV-infected cells were epithelial carcinoma; 80.8% (172/213) of total epithelial carcinoma cells were infected HPV. Melanoma was not infected HPV. Among HPV infection cases, squamous cell carcinoma accounted for the highest proportion, followed by adenocarcinoma and the other cancer cell. The results of this study were completely similar to the results of the other studies in the world.

According to Gonzalez, the number of sexual partners, the age at intercourse, the duration of contraceptive usage, all are the risk of developing squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. The heparan sulfate proteoglycan receptor plays an important role in the reception of HPV L1and allows HPV to invade epithelial cells. IgA is secreted by the cytoplasm, under the influence of gland cells in the cervix that removes HPV. The mucus secreted by gonadocytes increases the effectiveness of the immune response of the IgA. Perhaps this is the reason for the difference HPV infection between in squamous cells carcinoma and adenocarcinoma.

There have not been many published on factors related to vulvar basal cell carcinoma; however, HPV is also not a related factor. The previous research indicates that melanoma is associated with HPV16 co-infection; perhaps, there was only one case of melanoma so it is impossible to conclude whether it is different from the previous studies.

4.3.2.2 Relationship between HPV genotype and cancer cell type

There were 10 high-risk types of HPV in squamous cell cancer. Adenocarcinoma, other carcinoma cell detected only single or co-infected HPV16, HPV18 with other types of HPV; only 1 case of co-infection with HPV33, 58, 59 in other cell cancer. HPV16 is distributed in all type of cancer cell. The prevalence of HPV16 in squamous cell carcinoma is higher than that of adenocarcinoma and HPV18 infection in adenocarcinoma is significantly higher than squamous cell cancer at $p = 0.007$. International publications have similar results to this results. Differences in the incidence of HPV16 infection in squamous cell carcinoma and HPV18 infection in adenocarcinoma may be due to HPV16 crossing the extracellular matrix surrounding the keratinized basal cell layer by using extracellular heparan sulfate receptors and non heparan sulfate receptors, while HPV18 is only accessible through heparan sulfate receptors. That just shows the superior malignancy of HPV16 to other HPVs.

4.2.3.3 Relationship between HPV16 lineage and cancer cell type

With 4 sublineages of HPV16, Asian sublineage appeared at squamous cell carcinoma (90%), adenocarcinoma and other cancer cell. Squamous cell cancer was infected all 4 sublineages of HPV16. This results were similar to those of from Thailand, northern China but differed from the results from Italy and Mexico, southern China. The distribution of sublineage at FGC and the relationship between sublineage and cancer cell types vary from continent to continent. Differences geographic and anthropological factors lead to differences types of HPV16

sublineage identified at the site of the lesion, and the varies distribution among the damaged cells. Asian sublineage has a mutation at nucleotide 178, which codes for the Aspartic amino acid, belongs to the immune recognition region of immune-competent cells, helping HPV16 transforming in the epithelial DNA and escape the recognition of immune cells. The sublineage carrying mutation at the nucleotide position 350 of the coding region for amino acid Leucin, increases the ability to keratinize keratinocytes. This might be the explanation for absence of the European prototype sublineage and Asian American sublineage in adenocarcinoma.

CONCLUSION

Through the studying on *Human Papillomavirus* genotype among 214 female genital cancer patients, there were following conclusions:

1. **HPV Genotype at CC, VC, VAC**
   - 80.4% (172/214) of FGC, 89.4% (168/188) of CC, 50% (1/2) of VAC and 12.5% (3/24) of VC patients were infected HPV.
   - 73.4% (127/172) of FGC were infected single HPV. Ten high-risk types of HPV identified from FGC tissues included: HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59.
   - HPV16 infection accounted for the highest proportion, 43.5%, followed by HPV18 - 23%; HPV16, 18 co-infection - 16.2%; HPV52 infection - 4.2%.
   - Belong to HPV16 lineage, European lineage was 94% (94/100); Asian sublineage accounted for 80% (80/100); European prototype - 14%, Asian-American a - 5% and African 2-1%.

2. The relationship between genotype of HPV and the type of cell in cancer tissue

- Epithelial carcinoma accounted for 99.5% (213/214), in which, squamous cell carcinoma accounted for the highest proportion (79.8% -170/213).

- 100% of HPV infections were epithelial carcinoma. There was statistically significant difference between prevalence of HPV16 and HPV18 infection at squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and other carcinoma cell at $p = 0.007$.
- Asian sublineage occurred in all types of cancer cells, 90% at squamous cell carcinoma. Squamous cell carcinoma were infected all subtypes of HPV16, Asian sublineage alone accounted for 78.3%.

RECOMMENDATION

- The HPV vaccine against HPV infection needs to be supplemented with HPV31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59.
- The E6E7 HPV16 Asian sublineage treatment vaccine for female genital cancer dysplasia for the needs to be investigated and application

LIST OF RESEARCH
RELATED TO THE THESIS

5. Nguyen Thi Phuong Mai, Pham Van Thuc, Hiroshi Ichimura, Pham Van Han, Ta Thanh Van (2014). Distribution of *Human Papillomavirus* genotype on cervical cancer patients in the North of Vietnam. *Journal of Medical Research,* **6** (92), 1-8.
6. Nguyen Thi Phuong Mai, Nguyen Phi Hung, Nguyen Hung Cuong, Nguyen Bao Tran, Nguyen Thi Minh Ngoc, Hoang Thi Thanh Huyen, Hiroshi Ichimura, Ta Thanh Van (2014). Relationship between *Human Papillomavirus* genotype and histopathological lesions in cervical cancer patients in Northern Vietnam. *Journal of Vietnamese Medicine*, **1**, 1-4.
7. Nguyen Thi Phuong Mai, Pham Van Thuc, Pham Van Han, Nguyen Hung Cuong, Hoang Thi Thanh Huyen, Hiroshi Ichimura, Ta Thanh Van (2015). Sublineage E6, E7 of *Human Papillomavirus* 16 on cervical cancer patients in Northern Vietnam. *Journal of Practical Medicine*, **966**, 423-426.
8. Nguyen Thi Phuong Mai, Tran Van Khanh, Le Quang Vinh, Ta Thanh Van (2019). Prelimitary estimation of Human Papillomavirus genotype in vulvar cancer tissues. *Journal of*

Medical Research, **7** (123), 33-40.