

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN VĂN HÙNG

**NGHIÊN CỨU MỨC XÂM LẤN VÀ
BỘC LỘ GEN *TP53*, Ki-67 TRONG UNG THƯ
TẾ BÀO ĐÁY VÀ TẾ BÀO VỎY
DA ĐẦU MẶT CỔ**

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 VĂN HÙNG

**NGHIÊN CỨU MỨC XÂM LẤN VÀ
BỘC LỘ GEN *TP53*, Ki-67 TRONG UNG THƯ
TẾ BÀO ĐÁY VÀ TẾ BÀO VỎ
DA ĐẦU MẶT CỔ**

Chuyên ngành : UNG THƯ

Mã số : 62720149

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. TẠ VĂN TỜ

HÀ NỘI - 2017

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo sau đại học, Bộ môn Ung thư - Trường Đại học Y Hà Nội, Ban Giám đốc, Phòng Kế hoạch Tổng hợp, Khoa Ngoại Đầu Cổ, Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện K đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin trân trọng bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

PGS.TS. Tạ Văn Tờ - người Thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, động viên tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án, bổ sung cho tôi nhiều kiến thức chuyên môn và những kinh nghiệm quý báu trong nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn sâu sắc đến:

PGS.TS. Nguyễn Văn Hiếu, PGS.TS. Lê Văn Quảng, PGS.TS. Vũ Hồng Thăng, TS. Nguyễn Phi Hùng đã đóng góp cho tôi nhiều ý kiến quý báu để tôi hoàn thành luận án này.

Các Thầy Cô, anh chị đồng nghiệp cùng toàn thể cán bộ nhân viên trong Bộ môn Ung thư - Trường Đại học Y Hà Nội đã nhiệt tình giảng dạy và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập tại Bộ môn. Các đồng nghiệp tại Khoa GPB, Phòng Xét nghiệm SHPT đã tận tình giảng dạy, hướng dẫn, hỗ trợ và giúp đỡ tôi thực hiện kỹ thuật trong phân tích giải phẫu bệnh và xét nghiệm gen. Các đồng nghiệp tại Khoa Ngoại Đầu Cổ đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình hoàn thành luận án này.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn và chia sẻ thành quả nhỏ bé này với tất cả những người thân trong gia đình tôi, bè bạn đã luôn động viên, giúp đỡ, tạo những điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành tốt chương trình học tập và thực hiện thành công luận án này. Đặc biệt, tôi xin được cảm ơn những bệnh nhân - những người không may mắn bị mắc bệnh nhưng đã giúp tôi có được những thông tin quý báu để tiến hành nghiên cứu này.

Hà Nội, ngày 10 tháng 7 năm 2017

Nguyễn Văn Hùng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Văn Hùng, nghiên cứu sinh khóa 30 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Ung thư, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy Tạ Văn Tờ.
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 30 tháng 6 năm 2017

Người viết cam đoan

Nguyễn Văn Hùng

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. MÔ HỌC CỦA DA.....	3
1.1.1. Thượng bì.....	3
1.1.2. Trung bì	3
1.1.3. Hạ bì.....	4
1.1.4. Phần phụ của da.....	4
1.2. DỊCH TỄ HỌC UNG THƯ DA.....	4
1.2.1. Ung thư tế bào đáy.....	4
1.2.2. Ung thư tế bào vảy.....	5
1.3. SINH BỆNH HỌC UTTB ĐÁY VÀ UTTB VẢY	5
1.3.1. Ung thư tế bào đáy.....	5
1.3.2. Ung thư tế bào vảy.....	7
1.4. ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG UNG THƯ DA	8
1.4.1. Triệu chứng lâm sàng	8
1.4.2. Phân loại giai đoạn theo TNM.....	11
1.5. MÔ BỆNH HỌC UNG THƯ DA	13
1.5.1. Phân loại mô bệnh học UTTB đáy	13
1.5.2. Mô bệnh học và độ mô học UTTB vảy	16
1.6. ĐIỀU TRỊ UNG THƯ DA.....	18
1.6.1. Phẫu thuật	18
1.6.2. Xạ trị	21
1.6.3. Hóa trị liệu	21
1.7. NGHIÊN CỨU VỀ GEN <i>TP53</i> TRONG UNG THƯ DA.....	22
1.7.1. Cấu trúc gen <i>TP53</i>	22

1.7.2. Chức năng gen <i>TP53</i>	24
1.7.3. Cơ chế bệnh sinh ung thư da	26
1.7.4. Phương pháp phát hiện đột biến gen <i>TP53</i>	30
1.8. NGHIÊN CỨU VỀ KI-67 TRONG UNG THƯ DA	34
1.8.1. Vai trò và chức năng trong cơ chế bệnh sinh liên quan đến Ki-67....	34
1.8.2. Phương pháp phát hiện và một số nghiên cứu liên quan đến Ki-67	34
1.9. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI	35
1.9.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	35
1.9.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam	37
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	38
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân	38
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	38
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	38
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:	38
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu.....	38
2.2.3. Kỹ thuật thu thập số liệu.....	39
2.2.4. Cách thức tiến hành	40
2.3. XỬ LÝ SỐ LIỆU	54
2.4. KHÍA CẠNH ĐẠO ĐỨC CỦA ĐỀ TÀI	54
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	56
3.1. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG	56
3.1.1. Tuổi và giới tính	56
3.1.2. Tỷ lệ của UTTB đáy và UTTB vảy	57
3.1.3. Vị trí tổn thương	58
3.1.4. Kích thước u	59
3.1.5. Tính chất u	59

3.2. ĐẶC ĐIỂM MÔ BỆNH HỌC	60
3.2.1. Phân loại hình thái học UTTB đáy	60
3.2.2. Phân độ mô học UTTB vảy	60
3.3. ĐÁNH GIÁ MỨC XÂM LẤN CỦA UT DA.....	62
3.3.1. Khoảng cách tới rìa u.....	62
3.3.2. Liên quan giữa diện cắt dương tính với thể GPBL	63
3.3.3. Diện cắt dương tính ở các hình thái UTTB đáy	63
3.3.4. Diện cắt dương tính ở các độ mô học UTTB vảy.....	64
3.3.5. Diện cắt dương tính ở các vị trí u	65
3.3.6. Diện cắt dương tính ở các kích thước u.....	66
3.4. KẾT QUẢ NHUỘM HMMD VỚI P53 VÀ KI-67	67
3.4.1. Liên quan giữa mức độ dương tính p53 và Ki-67 với thể GPBL... 67	
3.4.2. Đối chiếu bộc lộ p53, Ki-67 với thể lâm sàng UTTB đáy	70
3.4.3. Đối chiếu bộc lộ p53, Ki-67 với độ mô học UTTB vảy.....	72
3.4.4. Mối liên quan giữa bộc lộ p53, Ki-67 và kích thước u	73
3.5. KẾT QUẢ GIẢI TRÌNH TỰ GEN <i>TP53</i>	74
3.5.1. Phân loại đột biến gen <i>TP53</i>	74
3.5.2. Các loại đột biến <i>TP53</i>	75
3.5.3. Tình trạng đột biến gen <i>TP53</i> trên các exon.....	76
3.5.4. Biểu hiện tình trạng đột biến gen <i>TP53</i> UTTB đáy và UTTB vảy 78	
3.5.5. Tình trạng đột biến <i>TP53</i> ở các thể lâm sàng UTTB đáy.....	78
3.5.6. Tình trạng đột biến <i>TP53</i> theo độ mô học UTTB vảy.....	79
3.5.7. Liên quan giữa bộc lộ p53 bằng HMMD và đột biến gen <i>TP53</i>	79
3.5.8. Liên quan giữa bộc lộ Ki-67 bằng HMMD và đột biến gen <i>TP53</i>	80
Chương 4. BÀN LUẬN	81
4.1. ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG	81
4.1.1. Tuổi và giới tính	81

4.1.2. Tỷ lệ của UTTB đáy và UTTB vảy	82
4.1.3. Phân bố theo vị trí tổn thương	83
4.1.4. Phân bố theo kích thước tổn thương.....	85
4.1.5. Tính chất u	86
4.2. ĐẶC ĐIỂM GIẢI PHẪU BỆNH.....	88
4.2.1. Đặc điểm đại thể UTTB đáy.....	88
4.2.2. Đặc điểm mô bệnh học UTTB vảy.....	90
4.3. ĐÁNH GIÁ MỨC XÂM LẤN CỦA UT DA	91
4.3.1. Khoảng cách tới rìa u.....	93
4.3.2. Liên quan giữa diện cắt dương tính xa nhất với thể GPBL.....	94
4.3.3. Diện cắt dương tính theo vị trí u.....	95
4.3.4. Diện cắt dương tính theo kích thước u	96
4.3.5. Mức xâm lấn đáy u	98
4.4. ĐẶC ĐIỂM BỘC LỘ P53 VÀ KI-67 BẰNG HÓA MÔ MIỄN DỊCH....	98
4.4.1. Mối tương quan giữa HMMD với thể GPBL ung thư da.....	98
4.4.2. Mối liên quan giữa HMMD và kích thước u.....	102
4.5. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM ĐỘT BIẾN GEN <i>TP53</i>	103
4.5.1. Các loại đột biến gen <i>TP53</i>	103
4.5.2. Tình trạng đột biến gen <i>TP53</i> ở UTTB đáy và UTTB vảy	107
4.5.3. Mối liên quan giữa đột biến gen <i>TP53</i> và dấu ấn HMMD.....	108
KẾT LUẬN	110
KIẾN NGHỊ.....	112
DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN	
ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Phần viết tắt	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
AJCC	American Joint Committee on Cancer	Ủy ban liên ngành của Hoa kỳ về ung thư
CS		Cộng sự
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô
EMA	Epithelial membrane antigen	Kháng nguyên màng biểu mô
GPBL	Pathology	Giải phẫu bệnh lý
HE	Hematoxylin-Eosin	Nhuộm Hematoxylin-Eosin
HMMD	Immunohistochemistry	Hóa mô miễn dịch
MBH		Mô bệnh học
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng tổng hợp chuỗi
TCYTTG	WHO	Tổ chức Y tế Thế giới
<i>TP53</i>	Tumor p53	Gen <i>TP53</i>
UT	Cancer	Ung thư
UTTB		Ung thư tế bào

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1:	Các dấu ấn miễn dịch dùng trong nhuộm HMMD	46
Bảng 2.2:	Trình tự môi	48
Bảng 2.3:	Thành phần phản ứng PCR.....	50
Bảng 2.4:	Chu trình nhiệt phản ứng PCR.....	50
Bảng 2.5:	Thành phần phản ứng	52
Bảng 2.6:	Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR giải trình tự:.....	53
Bảng 3.1:	Phân bố bệnh nhân theo nhóm tuổi	56
Bảng 3.2:	Tỷ lệ UTTB đáy và UTTB vảy.....	57
Bảng 3.3:	Phân bố theo vị trí tổn thương	58
Bảng 3.4:	Phân bố kích thước u	59
Bảng 3.5:	Phân bố theo tính chất u.....	59
Bảng 3.6:	Khoảng cách tới rìa u.....	62
Bảng 3.7:	Mối liên quan giữa diện cắt dương tính xa nhất và thể GPBL ..	63
Bảng 3.8:	Đối chiếu diện cắt dương tính xa nhất với các thể lâm sàng UTTB đáy	63
Bảng 3.9:	Đối chiếu diện cắt dương tính xa nhất với độ mô học UTTB vảy ..	64
Bảng 3.10:	Đối chiếu diện cắt dương tính xa nhất với vị trí u.....	65
Bảng 3.11:	Diện cắt dương tính xa nhất ở các kích thước u	66
Bảng 3.12:	Mức xâm lấn của đáy u với thể GPBL	66
Bảng 3.13:	Mối liên quan giữa mức độ dương tính p53 với thể GPBL.....	67
Bảng 3.14:	Mối liên quan giữa mức độ dương tính Ki-67 với thể GPBL ..	70
Bảng 3.15:	Đối chiếu bộc lộ p53 và Ki-67 với thể lâm sàng UTTB đáy....	70
Bảng 3.16:	Đối chiếu bộc lộ p53, Ki-67 với độ mô học UTTB vảy	72
Bảng 3.17:	Mối liên quan giữa bộc lộ p53 và kích thước u.....	73
Bảng 3.18:	Mối liên quan giữa HMMD Ki-67 và kích thước u.....	73

Bảng 3.19:	Phân loại đột biến gen <i>TP53</i>	74
Bảng 3.20:	Các loại đột biến <i>TP53</i>	75
Bảng 3.21:	Tình trạng đột biến gen <i>TP53</i> trên các exon.....	76
Bảng 3.22:	Tình trạng đột biến gen <i>TP53</i> trên 2 loại UT	78
Bảng 3.23:	Tình trạng đột biến <i>TP53</i> ở các thể lâm sàng UTTB đáy.....	78
Bảng 3.24:	Tình trạng đột biến <i>TP53</i> theo độ mô học UTTB vảy.....	79
Bảng 3.25:	Mối liên quan bộc lộ p53 bằng HMMD và đột biến gen <i>TP53</i>	79
Bảng 3.26:	Liên quan giữa bộc lộ Ki-67 bằng HMMD và đột biến <i>TP53</i> ..	80
Bảng 4.1:	Tỷ lệ thể GPBL theo một số nghiên cứu trên thế giới.....	83
Bảng 4.2:	Tỷ lệ hình thái tổn thương UTTB đáy theo một số nghiên cứu	90
Bảng 4.3:	Tỷ lệ p53 dương tính ở một số nghiên cứu.....	100
Bảng 4.4:	Tỷ lệ đột biến gen <i>TP53</i> theo một số nghiên cứu.....	107

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1:	Giải phẫu da.....	3
Hình 1.2:	Hình ảnh minh họa phân làm 4 độ (grading) biệt hoá.....	18
Hình 1.3:	Quy trình phẫu thuật Mohs và các lớp cắt Mohs	20
Hình 1.4:	Cấu trúc của gen <i>TP53</i>	23
Hình 1.5:	Vai trò của <i>TP53</i> trong phân bào.....	24
Hình 1.6:	Cơ chế kiểm soát chu kỳ tế bào của <i>TP53</i> qua trung gian p21 .	25
Hình 1.7:	Cơ chế tác động của tia UV làm biến đổi DNA.....	26
Hình 1.8:	Chu kỳ tế bào: M: các giai đoạn phân bào; G1, S, G2 là các pha của giai đoạn gian kỳ.....	27
Hình 1.9:	Cấu trúc protein p53	30
Hình 1.10:	Hình ảnh giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động ..	33
Hình 2.1:	Mô tả phẫu tích bệnh phẩm UT da nghiên cứu mức xâm lấn ...	42
Hình 2.2:	Máy BENCH MARK XT hiệu VENTANA.	45
Hình 2.3:	Máy tách mẫu LabGard Class II, Biological Safety Cabinets ..	49
Hình 2.4:	Hệ thống UPV chụp ảnh gel, xác định kích thước DNA	51
Hình 2.5:	Máy xác định trình tự gen ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	53
Hình 3.1:	Tiêu bản nhuộm H.E x 400 lần ở UTTB đáy và UTTB vảy	61
Hình 3.2:	Hình ảnh nhuộm HMMD với p53 x 400 trong UTTB đáy	68
Hình 3.3:	Hình ảnh nhuộm HMMD với p53 x 400 trong UTTB vảy	69
Hình 3.4:	Hình ảnh nhuộm HE x 400 với Ki-67 trong UTTB đáy	71
Hình 3.5:	Hình ảnh nhuộm HMMD với Ki-67 trong UTTB vảy.....	72
Hình 3.6:	Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel Agarose	74
Hình 3.7:	Một số hình ảnh đột biến gen <i>TP53</i> trên các exon.....	77
Hình 4.1:	Vị trí UT da thường gặp vùng đầu mặt	96
Hình 4.2:	Phân bố phát hiện đột biến <i>TP53</i> trong ung thư.....	106

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1:	Phân bố bệnh nhân theo giới	57
Biểu đồ 3.2:	Hình thái học của UTTB đáy.....	60
Biểu đồ 3.3:	Độ mô học của UTTB vảy.....	60

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư (UT) da là dạng u ác tính hay gặp nhất vùng đầu mặt cổ. Bệnh có tỷ lệ mắc tăng dần theo tuổi, thường gặp người trên 50 tuổi, tỷ lệ nam nhiều hơn nữ. Nghiên cứu của Stern năm 2007 ở Mỹ cho thấy tỷ lệ mắc UT da cao gấp 5 lần UT vú [1]. Ở Úc, UT da cao gấp 3 lần tổng số các UT khác cộng lại và khoảng 1% dân số bị UT da [2]. UT da gồm 2 loại chính là ung thư tế bào (UTTB) đáy chiếm 80% và UTTB vảy xấp xỉ 20% [3].

Ung thư tế bào đáy là loại UT biểu mô hay gặp nhất trong các loại UT da. Ước tính hàng năm ở Mỹ có trên 1 triệu người mắc UT da không hắc tố, trong đó UTTB đáy chiếm tới 75% [4]. Tại Úc, tỷ lệ mắc UTTB đáy chuẩn theo tuổi ở nam giới là 2.145/100.000 dân và nữ giới là 1.259/100.000 dân [5]. UTTB vảy là dạng thường gặp thứ hai ở những người da trắng sống ở vùng nhiều ánh nắng mặt trời, có hoạt động thường xuyên ngoài trời. Tỷ lệ mắc UTTB vảy ở Mỹ khoảng hơn 100/100.000 dân, ở Pháp là 30/100.000 dân. Tại Thụy Điển, từ năm 1961 đến 1995 có 39.805 trường hợp bị UTTB vảy được chẩn đoán [5].

Trên lâm sàng, UTTB đáy có thể nhầm với UTTB vảy do tính chất phát triển chậm, thương tổn cơ bản điển hình là những khối u nhỏ, thâm nhiễm, tăng sắc tố, loét và chảy máu [6],[7],[8]. Bệnh thường tái phát, ảnh hưởng đối với sức khỏe cộng đồng, đặc biệt gây các ảnh hưởng về tâm sinh lý của người bệnh như những di chứng về mắt, mũi, miệng... Hầu hết UT da được điều trị bằng phẫu thuật nhằm loại bỏ hoàn toàn tổ chức UT và phục hồi các tổn khuyết. Một điều quan trọng đối với phẫu thuật UT da là đảm bảo diện cắt không còn tế bào UT mới có thể tránh tái phát. Trong phẫu thuật UT da đầu mặt cổ, việc đánh giá mức độ xâm lấn của tế bào u là hết sức cần thiết không những đảm bảo thành công của phẫu thuật mà còn giảm tỷ lệ tái phát hoặc di căn. Ngoài phẫu thuật Mohs, đánh giá diện cắt theo từng lớp trong phẫu thuật,

chúng tôi chưa thấy có công trình nào nghiên cứu đánh giá mức xâm lấn vi thể trên toàn bộ diện quanh u.

Căn nguyên bệnh sinh của UT da được cho là do tia cực tím mặt trời, những thương tổn DNA do tia cực tím gây ra luôn được tự sửa chữa, quá trình sửa chữa này do một số gen đảm nhiệm. Trong số những gen đó, gen *TP53* được nghiên cứu nhiều nhất. Gen *TP53* có vai trò ức chế tạo u, ngăn chặn việc phân chia tế bào bị hư hỏng DNA, chịu trách nhiệm mã hoá cho protein cấu tạo nên yếu tố sao chép có tác dụng điều chỉnh sự nhân lên của tế bào [9]. Đột biến gen *TP53* thường gặp trong một số bệnh UT và được nghiên cứu tại nhiều nước trên thế giới. Bên cạnh đó, Ki-67 là một protein không histon chủ yếu can thiệp vào sự phát triển, kiểm soát chu kỳ tế bào và được cho có liên quan mật thiết với hình thái tăng sinh tế bào. Tỷ lệ bộc lộ Ki-67 cao liên quan đến chỉ số phân bào và độ mô học cao của u. Sự bộc lộ sản phẩm đột biến gen *TP53* và chỉ số tăng sinh nhân Ki-67 trong UT nói chung phản ánh tính chất ác tính của bệnh, không những liên quan đến sinh bệnh học mà còn liên quan đến tiên lượng bệnh.

Tại Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về UT da nhưng chưa có công trình nào nghiên cứu sâu về đánh giá mức độ xâm lấn tế bào u, sự bộc lộ protein p53, Ki-67 và tình trạng đột biến gen *TP53* của cả UTTB đáy và UTTB vảy.

Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “***Nghiên cứu mức xâm lấn và bộc lộ p53, Ki-67 trong ung thư tế bào đáy và tế bào vảy vùng da đầu mặt cổ***” với hai mục tiêu:

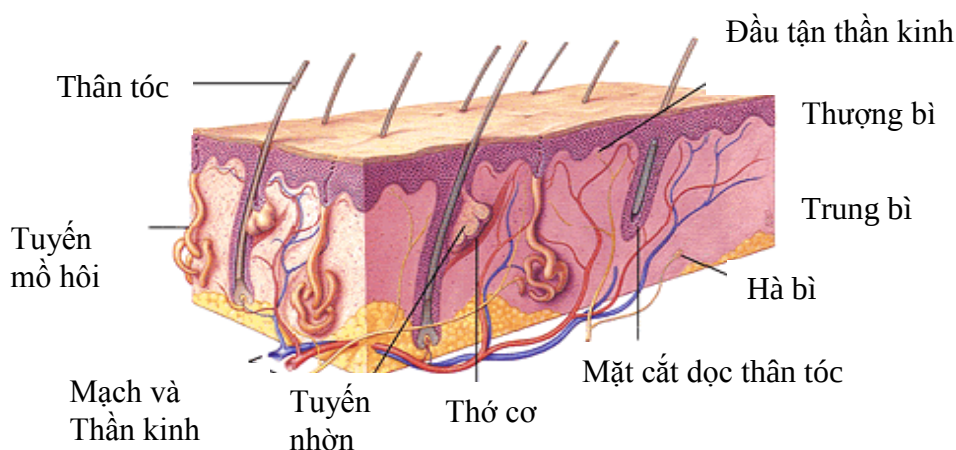
1. ***Đánh giá mức xâm lấn của ung thư tế bào đáy và ung thư tế bào vảy của da vùng đầu mặt cổ.***
2. ***Xác định tình trạng đột biến gen *TP53*, mức độ bộc lộ p53, Ki-67 và mối liên quan của chúng với lâm sàng và mô bệnh học.***

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. MÔ HỌC CỦA DA

Da chiếm khoảng 16% trọng lượng cơ thể, nó bao bọc toàn bộ mặt ngoài của cơ thể. Da có rất nhiều chức năng như chức năng bảo vệ (chống sự xâm nhập của hoá chất, tia cực tím, vi khuẩn, độc tố...), chức năng cân bằng nội môi, chống mất nước qua da hay điều hoà thân nhiệt. Trong đó chức năng quan trọng nhất là bảo vệ cơ thể trước tác động của môi trường bên ngoài. Da người có cấu tạo gồm ba lớp: thượng bì, trung bì và hạ bì.



Hình 1.1: Giải phẫu da [3]

1.1.1. Thượng bì

Các tế bào tạo sừng (keratinocyte) là thành phần chủ yếu tạo nên thượng bì da. Căn cứ vào quá trình biến đổi của các tế bào tạo sừng từ sâu ra nông gồm có 4 lớp: lớp tế bào đáy, lớp tế bào gai, lớp tế bào hạt và lớp tế bào sừng.

1.1.2. Trung bì

Trung bì nằm dưới thượng bì, được phân cách bởi màng đáy:

- Lớp nhú: Mặt ngoài của trung bì tiếp xúc với thượng bì có những chỗ lồi lõm, chỗ lõm về phía thượng bì tạo thành các nhú trung bì.
- Lớp dưới: Phần chính của trung bì nằm ở phía dưới được tạo bởi mô liên kết đặc hơn, các sợi tạo keo tạo thành bó, có hướng song song với mặt da.

1.1.3. Hạ bì

Hạ bì nằm giữa trung bì và cân cơ hoặc màng xương. Đó là tổ chức đệm, lẫn các đám mô mỡ, tạo thành nhiều ô được ngăn cách nhau bởi những vách xơ mỏng. Độ dày của hạ bì tùy thuộc vào từng chủng tộc người và giới tính...

1.1.4. Phần phụ của da: Tuyến bã, tuyến mồ hôi, tuyến bã, nang lông.

1.2. DỊCH TỄ HỌC UNG THƯ DA

Ở Úc, UT da cao gấp 3 lần tổng số các UT khác cộng lại và khoảng 1% dân số bị UT da [2]. Ở Châu Âu, tỷ lệ này cũng rất cao. Ước tính một năm ở Thụy Sĩ có không dưới 15.000 bệnh nhân mắc mới [10]. Ở Anh, tỷ lệ mắc mới ước tính trong thời gian 10 năm từ 2001 đến 2010 tăng 33% [11]. Châu Á có nước da thuộc loại IV-V theo cách phân loại của Fitz-Patrick nên ít bị UT da hơn người da trắng. Một nghiên cứu năm 2006 thấy tỷ lệ UT da của người châu Á sống ở Singapore là 7,4/100.000 dân. Tỷ lệ UTTB đáy ở người Trung Quốc là 18,9/100.000 dân, người Ấn Độ là 4,1/100.000 dân [12].

1.2.1. Ung thư tế bào đáy

Ung thư tế bào đáy là loại UT da thường gặp nhất. Tại Úc, tỷ lệ mắc UTTB đáy chuẩn theo tuổi ở nam giới là 2.145/100.000 dân và nữ giới là 1.259/100.000 dân [5]. Trong khi đó tại Châu Âu thì tỷ lệ này thấp hơn nhiều, ở Thụy Sĩ tỷ lệ ở nam giới là 75/100.000 dân và nữ giới là 67/100.000 dân [13]. Trong khi đó ở Bắc Ailen tỷ lệ là 94/100.000 dân ở nam giới và 72/100.000 dân ở nữ giới [14]. Nghiên cứu về UT da của người châu Á sống ở Singapore năm 2006 cho thấy tỉ lệ UTTB đáy ở người Trung Quốc là 18,9/100.000 dân, người Ma-lai-xi-a là 6,0/100.000 dân và người Ấn Độ là 4,1/100.000 dân [13],[15].

Tại Việt Nam, theo nghiên cứu của Bùi Xuân Trường và cộng sự (CS) trên 481 trường hợp UT da vùng đầu cổ tại Bệnh viện Ung bướu TP.HCM từ 1994-1997 thấy 67% bệnh nhân là UTTB đáy [16]. Nghiên cứu của Nguyễn

Thị Hương Giang (2005) tại Bệnh viện Ung bướu Hà Nội thì UT da không hắc tố chiếm 91,67% UT da, trong đó 50% là UTTB đáy [17]. Nghiên cứu gần đây của Vũ Thái Hà và CS tại Bệnh viện Da liễu Trung ương cho thấy tỷ lệ UTTB đáy năm 2010 tăng gần gấp 3 lần so với năm 2007 và chiếm 58,8% tổng số bệnh nhân UT da [18].

1.2.2. Ung thư tế bào vảy

Trên thế giới, UTTB vảy hay gặp ở những người có hoạt động thường xuyên ngoài trời. Với tỷ lệ mới mắc ở Mỹ khoảng hơn 100/100.000 dân, ở Pháp là 30/100.000 dân [5]. Nghiên cứu ở Australia cho thấy tỷ lệ mắc bệnh là 166/100.000 người, trong vòng 5 năm tăng hơn 50% lên 250/100.000 dân [2], đây là tỷ lệ cao nhất thế giới vì nó liên quan đến chủng tộc (người da trắng) và cường độ chiếu sáng của mặt trời [19]. Hiện nay, tỷ lệ UTTB vảy ngày một tăng lên ở trên các nước trên thế giới. Thói quen phơi nắng và thói quen và xu hướng du lịch đến các nước nhiệt đới về mùa hè của người da trắng ngày một tăng là các yếu tố quan trọng dẫn đến gia tăng tỉ lệ UT da.

Ở Việt Nam, tỷ lệ UTTB vảy chiếm khoảng trên 20% các trường hợp UT da. Theo nghiên cứu của Bùi Xuân Trường, tỷ lệ UTTB vảy là 27% [16]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Hương Giang là 27,78% [17] và của Đỗ Thu Hằng là 9,9% trong giai đoạn 1999-2004 [20].

1.3. SINH BỆNH HỌC UTTB ĐÁY VÀ UTTB VẢY

1.3.1. Ung thư tế bào đáy

Bác sĩ nhãn khoa người Alien Arthur Jacob (1827) là người đầu tiên nghiên cứu UTTB đáy [21]. Sau đó, Braun và Spiegler (1899) xem UTTB đáy như một u nội mô và Krompecher (1900) đã mô tả hình ảnh giải phẫu bệnh, gọi tình trạng bệnh là "UTTB đáy". Theo ý kiến của ông, khối u bắt nguồn từ các tế bào đáy của biểu bì và ông cũng đặt ra câu hỏi liệu u có thể bắt nguồn từ các nang và các tuyến không. Một số tác giả phân loại nó là

một khối u lành tính, thích hợp xếp thành nhóm các nốt bớt. Lever (1954) cho rằng những tổn thương này phát triển ở vị trí đã tia xạ gây tăng sinh các tế bào phôi thai, trở thành hoạt động như là kết quả của những kích thích đó. Melczer và CS coi UTTB đây là một UT biểu mô thực sự vì họ có thể nhìn thấy một cấu trúc biểu bì thô sơ trong UTTB đây. Bệnh không di căn nhưng có bản chất gây phá huỷ quá trình phát triển của tổn thương. Feyrter (1938) và Pinkus (1928) xếp UTTB đây vào các tế bào nằm trong mô biểu bì mà cuối cùng có thể phát triển ở tuổi già. Cấu trúc mô bệnh học cũng là dạng trung gian, mức độ loạn sản thì ít thấy hơn so với trong UTTB vảy và rất hiếm được tạo thành trên thí nghiệm. Tuy nhiên nghiên cứu gần đây có xu hướng không chứng minh điều này [6].

Bệnh thường được phát hiện trên một nền da đã tổn thương trước đó, nhưng cũng thường xuất hiện trên một vùng dường như còn nguyên vẹn mà không có bất kỳ thay đổi da rõ ràng nào. Những thay đổi được xem như giai đoạn tiền UT của UTTB đây là sẹo bỏng, viêm nhiễm mạn tính như những đám loét lao cũ, đám mụn tái đi tái lại, các mụn cơm (mụn cóc) già và các sừng (mụn) của da [6]. Pinkus (1953) còn mô tả UTTB đây xảy ra trong những trường hợp UT biểu mô sợi và được gọi là "UT sợi tiền ác tính". Winer và Lewin (1961) đã quan sát thấy 2 trường hợp UTTB đây nhiễm sắc tố bắt nguồn từ mụn cóc. Một dạng ít gặp của UTTB đây là dạng nội biểu bì. UTTB đây hay xảy ra nhất từ độ tuổi 50 trở lên, một số gặp ở trường hợp người trẻ hơn và đa số các tổn thương phát triển ở vùng đầu cổ, ít thấy hơn ở thân và chi, có thể có nhiều ổ UT (một nam giới 63 tuổi với 94 tổn thương cũng trên thân mình) [22].

Ung thư tế bào đây được coi là những tổn thương tiến triển chậm, rất hiếm di căn. Theo y văn thế giới chỉ có 300 trường hợp UTTB đây di căn xa và di căn hạch, tỷ lệ di căn hạch của UTTB đây là 0,03%, theo Lo (1991)

tỷ lệ di căn được đánh giá khoảng 0,0028 – 0,5%, trong đó 85% di căn hạch vùng đầu và cổ [23],[24],[25].

1.3.2. Ung thư tế bào vảy

Ung thư tế bào vảy có khá nhiều thuật ngữ: UT tế bào gai, UT tế bào dẹt sừng hoá, UT biểu bì... nhưng thường dùng nhất là UTTB vảy và UTTB gai. UTTB vảy của da không khác nhiều so với ở các cơ quan bộ phận khác, về cơ bản là đồng nhất. Bức tranh mô học trong UTTB vảy rất đa dạng, có nhiều phần trong khối u có thể phân biệt với nhau bởi độ biệt hoá và cách thức nhân lên. Broders (1932) phân mức độ ác tính dựa trên mức độ biệt hoá, từ biệt hóa cao đến không biệt hoá. UTTB vảy sừng hoá luôn luôn hình thành trên các tổn thương biến đổi tiền UT, tương tự như UTTB đáy thường ở những vị trí da bị phơi nhiễm như mặt, cổ, tay... Thống kê của Herendi (1951) cho thấy UTTB vảy thường là đơn ổ, trong khi UTTB đáy phần thân cơ thể thường đa ổ. Theo Trendelenburg (1933), UTTB vảy thường gặp ở nam nhiều hơn nữ, thường trước tuổi 40, tăng dần ở tuổi 50 và đạt đỉnh ở các tuổi 60 đến 70 [22].

Rất khó phân biệt UTTB vảy và UTTB đáy ở giai đoạn sớm. Nhưng UTTB vảy sau đó sẽ phát triển nhanh hơn. Khối u được hình thành từ các tế bào không biệt hoá và đa hình. Trên vi thể hiện diện nhiều tế bào khổng lồ đa nhân và phân bào không điển hình. Sau khi vượt qua ranh giới giữa lớp biểu mô và mô liên kết, khối u bắt đầu thâm nhiễm sâu và đồng thời phá huỷ các mô lân cận. Xu hướng phá huỷ là đặc trưng của khối u này [6]. Một dạng khác là quá trình sừng hoá chưa được hoàn thành, gọi là á sừng. Một trong những đặc điểm chính của UTTB vảy không sừng hóa là sự thiếu hụt hoàn toàn hoặc gần hoàn toàn của sự sừng hóa (keratin hóa). Một số khối u có các tế bào là các vết bắt màu nhạt với bào tương như lớp bột, làm cho hình thái mô bệnh học của chúng giống như sarcom không biệt hóa hoặc sarcom lưới. Các khối u này không biệt hóa hoàn toàn và đã được Gotton (1960) gọi là sarcom giả (pseudosarcoma).

1.4. ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG UNG THƯ DA

1.4.1. Triệu chứng lâm sàng

1.4.1.1. Ung thư tế bào đáy

Khối u thường xuất hiện sau một tổn thương dày sừng ở người lớn tuổi, hay gặp ở vùng mặt, là nơi tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời. UTTB đáy cũng có thể gặp ở trẻ em [9]. Theo Gunter Burg (2000), u hay gặp nhất là ở vùng mặt, chiếm khoảng 85,3% các trường hợp, hiếm khi khu trú ở lòng bàn tay, bàn chân và niêm mạc [7]. Biểu hiện là khối u nhỏ ở vùng da hở, thâm nhiễm cứng, màu da bình thường hay có hiện tượng tăng sắc tố, có thể loét, dễ chảy máu, tiến triển sau một thời gian tổn thương này lan rộng, thâm nhiễm và ở phía đáy có một vết trợt loét, dần dần xuất hiện các cục nhỏ riêng rẽ hoặc liên kết. Cục nhỏ đó được gọi là hạt ngọc trai UT [8]. Tuy nhiên, tùy theo các biến thể của UTTB đáy ta có thể thấy biểu hiện lâm sàng khác nhau.

Các hình thái lâm sàng thường gặp [26],[27]:

** Hình thái nốt hoặc nốt loét:*

- Tổn thương cơ bản: Các nghiên cứu đều cho thấy tổn thương thường bắt đầu là sẩn sau đó tiến triển thành nốt có màu đỏ hoặc hồng, bóng trung tâm lõm giữa, mật độ chắc, bề mặt giãn mạch. Trên bờ có sẩn ngọc màu sáp hoặc trong mờ (như hạt ngọc trai). Tổn thương có thể lan rộng, trung tâm hoại tử và loét, do vậy trước đây còn được gọi là “loét ở động vật gặm nhấm” [28].

- Tiến triển: UTTB đáy thể nốt thường tiến triển chậm. Tuy nhiên, nó có thể xâm lấn vào tổ chức xung quanh làm biến dạng và rối loạn chức năng của một số cơ quan bộ phận như mũi, miệng, mắt...

**Hình thái nông:*

Hình thái nông là hình thái thường gặp thứ hai sau hình thái nốt và chiếm 9-17,5% các trường hợp UTTB đáy [14].

- Tổn thương cơ bản: là mảng bằng phẳng hoặc hơi gồ lên so với mặt da, bờ tổn thương trông giống sợi chỉ nhỏ, giới hạn rõ, màu đỏ hoặc hồng. Trung tâm có thể có teo, đóng vảy hoặc loét. Trên bề mặt có thể xuất hiện các đốm sắc tố. Trên lâm sàng thể nông dễ nhầm với chàm đồng tiền, vảy nến hay bệnh Bowen [29].

- Tiến triển: Hình thái nông thường phát triển theo chiều ngang và xâm lấn sâu vào tổ chức xung quanh nếu không được điều trị.

**Hình thái xơ:*

Đây là hình thái ít gặp nhất, chiếm khoảng 2-3% các UTTB đáy. Nó là thể có khả năng xâm lấn mạnh nhất nên dễ tái phát sau điều trị. Hiện tượng xâm lấn mạnh trong UT da liên quan đến sự biểu hiện của gen *TP53* [30].

- Tổn thương cơ bản: là mảng hoặc sẩn xơ (giống như sẹo) có màu giống như màu da thường hoặc màu hồng hoặc màu trắng, mặt da đôi khi thành sẹo lõm, thâm nhiễm, phía dưới khối u thường lan rộng hơn so với bờ tổn thương, vì vậy, dễ bị chẩn đoán nhầm với sẹo lõm và xơ cứng bì. Những năm gần đây, với phương pháp soi da đã giúp cho việc chẩn đoán do quan sát thấy tăng sinh, giãn mạch trên bề mặt thương tổn.

- Tiến triển: Hình thái xơ có khả năng xâm lấn mạnh hơn so với các thể khác của UTTB đáy nên rất dễ tái phát sau điều trị. Sự tái phát của thể này lên đến 60% do phía dưới khối u thường lan rộng hơn bờ tổn thương [31].

** Hình thái hỗn hợp:*

Thường có 2 hoặc nhiều hơn các thể trên trong một khối u.

**Hình thái tăng sắc tố:*

- Tổn thương cơ bản: trên tổn thương ở thể nốt hoặc thể nông xuất hiện tăng sắc tố. Đối với thể nốt thường có hiện tượng “lốm đốm” sắc tố màu nâu đen ở bên trong và/hoặc tại bờ của tổn thương. Đây là dấu hiệu lâm sàng rất

có giá trị [32]. Tùy thuộc vào số lượng và vị trí của melanin mà biểu hiện lâm sàng của tổn thương khác nhau như màu đen, nâu hoặc xám xanh.

1.4.1.2. Ung thư tế bào vảy

Ung thư tế bào vảy có những thương tổn cơ bản là các sản hoặc mảng nổi cao, chắc, màu hồng đến màu đỏ, có thể loét hoặc đóng vảy, thường xuất hiện trên một thương tổn tiền UT trước đó. Theo Robbins, tổn thương ban đầu thường biểu hiện dày cứng da hoặc niêm mạc, phát triển chậm, ranh giới không rõ, tổn thương này được gọi là dày sừng ánh sáng (actinic keratosis). Đây được coi là tổn thương tiền UT của tế bào vảy, gặp ở người có màu da sáng và tiền sử tiếp xúc nhiều với ánh nắng. Một số đặc điểm khác là da khô, giãn mạch, dày sừng, bong vảy, 20-25% tiến triển thành UTTB gai [33]. Tổn thương thường dưới 1 cm, màu nâu đậm hoặc đỏ sần sùi như giấy nháp, tiến triển thành sừng da (cutaneous horn) [34].

Thể điển hình có khối u sùi, bề mặt mụn nát, dễ chảy máu. U lớn thể hiện như một khối loét sùi kiểu súp lơ, mùi hôi khó chịu. Khối u bội nhiễm, nề đỏ quanh u, đau, tiến triển nhanh, loét sùi theo bề mặt nông, xâm lấn xuống lớp sâu. Khối u vùng da đầu có thể làm lộ xương sọ, gây biến dạng và bội nhiễm trầm trọng [35]. Robbins cho rằng UTTB vảy ban đầu là một loét nông với vảy sừng bao quanh bờ cao không đều, loét tiến triển sâu xuống dưới nền cứng. Loét có thể phá hủy tổ chức trung bì gây tổn thương mạch máu dẫn đến hiện tượng xuất huyết tại khối u [33].

Một số UTTB vảy có tiền sử chấn thương, tiếp xúc ánh nắng, xuất hiện nhanh trong vài tuần, có thể khỏi tự nhiên sau vài tháng [36]. Thể bệnh này thường liên quan đến một số bệnh lý da khác như: hội chứng Ferguson Smith, Gryzbowski, Muir-Torre. Ngoài tổn thương trên, UTTB vảy còn có thể phát triển trên những thương tổn đã có từ trước, đặc biệt là trên nhóm bệnh da tiền UT (Bowen, Paget).

Bệnh thường biểu hiện rất đa dạng với các thể lâm sàng:

- UTTB vảy xâm nhập gồm: thể sùi, có thương tổn sùi giống súp lơ, hiếm gặp, độ ác tính thấp. Thể hậu môn sinh dục thường gặp trên các thương tổn loạn sản trước đó. Thể quanh miệng gặp ở môi dưới, thể quanh móng dễ nhầm với hạt cơm và liên quan đến HPV16. Thể viêm kẽ, thể Marjolin thường gặp ở những thương tổn sẹo hoặc loét mạn tính.

- UTTB vảy tại chỗ: bệnh Bowen, hồng sản Queyrat, sản dạng Bowen. Các thể này có thể chuyển thành thể xâm nhập nếu không điều trị sớm.

UTTB vảy da vùng đầu mặt cổ thường tiến triển có khuynh hướng lan rộng và xâm nhập vào hệ thống bạch huyết, xâm lấn vào tổ chức lân cận, loét, phá hủy và chèn ép các sợi thần kinh, gây đau, nhiễm trùng kèm theo hoại tử. Hạch viêm thường gặp và khó phân biệt với hạch di căn. Nếu phát hiện muộn, UTTB vảy có thể di căn hạch với tỷ lệ khác nhau ở các vị trí, trên 50% ở cổ, tai [15],[37]. Theo Venker (1964) tỷ lệ di căn hạch là 0,5-16% trong khi Greithe (1957) lại có tỷ lệ 15-20% [6]. T.Q. Diện cho tỷ lệ di căn là 13,8% và sớm hơn đối với tổn thương rộng ở niêm mạc và các vùng bán niêm mạc như môi hoặc một số vùng da khác như vành tai, da đầu [38]. UTTB vảy độ ác tính càng cao, càng ít biệt hóa thì càng sớm di căn theo đường bạch huyết vào hạch và di căn theo đường máu vào phổi, xương [35]. Kích thước u cũng là yếu tố có liên quan mật thiết với mức độ di căn hạch [39],[40]. Nhiều tác giả cho rằng khối u có đường kính trên 2 cm tăng gấp 3 nguy cơ di căn hạch và mức độ xâm lấn khối u có liên quan với tỷ lệ di căn hạch của UTTB vảy [39].

1.4.2. Phân loại giai đoạn theo TNM

Theo NCCN (2014), UTTB đáy và UTTB vảy của da đầu mặt cổ được phân loại như sau [41]:

T - Khối u nguyên phát

Tx: Khối u nguyên phát không thể đánh giá được.

Tis: Ung thư biểu mô tại chỗ.

T0: Không có u nguyên phát.

T1: U có kích thước lớn nhất không quá 2 cm, với ít hơn 2 yếu tố nguy cơ.

T2: U có kích thước lớn hơn 2 cm hoặc u kích thước bất kỳ với hơn 2 yếu tố nguy cơ.

T3: U xâm lấn vào các tổ chức xương hàm trên, xương hàm dưới, ổ mắt hoặc xương thái dương.

T4: U xâm lấn sâu vào xương, hoặc thần kinh.

N - Hạch bạch huyết vùng

NX: Hạch bạch huyết vùng không thể đánh giá được.

N0: Không có biểu hiện hạch vùng bị xâm lấn(di căn).

N1: Một hạch duy nhất cùng bên đường kính ≤ 3 cm. (Hạch vùng xâm lấn).

N2: Hạch vùng đối bên di động nhưng đã có biểu hiện bị xâm lấn > 3 cm một hạch duy nhất cùng bên đường kính ≤ 6 cm, nhiều hạch cùng bên đường kính < 6 cm, hạch hai bên hoặc đối bên đường kính < 6 cm.

N2a: 3cm $<$ Một hạch duy nhất cùng bên đường kính ≤ 6 cm.

N2b: Nhiều hạch cùng bên đường kính < 6 cm.

N2c: Hạch hai bên hoặc đối bên đường kính < 6 cm.

N3: Hạch vùng cố định và đã bị xâm lấn, đường kính ≥ 6 cm.

M - Di căn xa

M0: Không có biểu hiện di căn xa.

M1: Có biểu hiện di căn xa.

Theo cách phân loại mới này các tác giả đã chú ý đến chiều sâu và sự xâm lấn của khối u cũng như tiên lượng khối u tốt hơn.

1.5. MÔ BỆNH HỌC UNG THƯ DA

1.5.1. Phân loại mô bệnh học UTTB đáy

Ung thư tế bào đáy bao gồm các tế bào trông giống lớp đáy của thượng bì. Phần lớn các khối u đều bắt đầu từ thượng bì rồi xâm lấn xuống hạ bì ở dạng rắn hoặc dạng u nang hoặc thành dải tạo nên các mô hình phát triển khác nhau. Tế bào UT nhân thâm màu (kiềm tính), hình trụ, tỷ lệ nhân/bào tương tăng, mất các cầu nối gian bào. Tế bào thường nhỏ, tròn hoặc hơi bầu dục, xung quanh các đám tế bào UT là tổ chức liên kết thưa và xơ nhầy [32]. Các đám tế bào ở ngoại vi của khối u sắp xếp theo kiểu hàng đậu. Một đặc điểm thường gặp ở các khối u có kích thước lớn là có hiện tượng hoại tử ở trung tâm khối u.

Về nguồn gốc mô học: UTTB đáy phát triển từ các tế bào đáy của biểu bì hoặc từ các lớp ngoài của nang lông. Một phân loại mô bệnh học (MHB) lý tưởng về UTTB đáy nên chia thành các tít có liên quan đến độ ác tính, tiến triển và tiên lượng của u trên lâm sàng. Có hai hướng chính để phân loại UTTB đáy là phân loại dựa trên đặc điểm phát triển MBH và phân loại dựa vào đặc điểm biệt hóa về mặt mô học. Tuy vậy, cho tới nay, dường như vẫn chưa có một phân loại thống nhất về UTTB đáy và nhìn chung các phân loại dựa trên đặc điểm phát triển được coi là có ý nghĩa hơn trên lâm sàng [42].

Phân loại của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) năm 2006 dựa vào đặc điểm phát triển và sự biệt hóa để chia UTTB đáy thành các tít sau [43]:

**Tít bề mặt (ICD-O code 8091/3):*

- Đặc điểm lâm sàng: Tổn thương xuất hiện dưới dạng đám có màu hồng nhạt, thường loét, chảy máu và đóng vảy trên bề mặt, rìa tương đối rõ, kích thước thay đổi từ vài milimet đến vài centimet. Vùng thoái triển có thể biểu hiện như một mảng xám hoặc xơ hóa.

- Đặc điểm MBH: u gồm các đám tế bào dạng đáy liên tục với biểu bì hoặc nang lông, lồi vào trong trung bì và được bao quanh bởi mô nhày lỏng lẻo. Tuy nhiên, đôi khi có thể thấy các đám tế bào u đứng tách biệt nhau như biểu hiện của tủy đa ổ thực sự. Một số trường hợp có thể phối hợp với các tủy khác như tủy nốt, tủy vi nốt và tủy xâm nhập.

** Tủy nốt (ICD-O code 8097/3):*

- Đặc điểm lâm sàng: Biểu hiện như các nốt hạt trai nổi gồ lên, mật độ chắc, giãn mạch ở trên bề mặt, có thể loét và có nang. Các tổn thương có chảy máu dễ bị nhầm với u mạch máu hoặc u hắc tố.

- Đặc điểm MBH: Gồm nhiều đám kích thước lớn các tế bào dạng đáy với nhân xếp kiểu hàng đậu ở xung quanh. U có thể bị thoái hóa nhày tạo thành các nang hoặc có dạng “sàng”.

**Tủy vi nốt (ICD-O code 8090/3):*

- Đặc điểm lâm sàng: Biểu hiện các tổn thương phẳng hoặc hơi gờ nhẹ.

- Đặc điểm MBH: Tủy này gồm các nốt nhỏ kích thước tương đương các nang lông tỏa lan, xâm nhập ăn sâu vào trong trung bì nên rất dễ bị bỏ sót khi đánh giá rìa diện cắt u.

**Tủy xâm nhập (ICD-O code 8092/3):*

- Đặc điểm lâm sàng: u gồm các mảng cứng, màu xám, ranh giới không rõ, khi phẫu thuật phải chú ý vì rất dễ bỏ sót u.

- Đặc điểm MBH: u gồm các dải tế bào dạng đáy với bào tương hẹp, xâm nhập xen kẽ giữa mô đệm u nên thường không thấy hình ảnh hàng đậu. Trong biến thể này hay gặp hình thái xâm nhập quanh bó sợi thần kinh, cần phải chẩn đoán phân biệt với một số loại u khác như UT ống tuyến mô hôi xơ cứng, UTTB vảy xơ hóa và u mầm lông xơ hóa.

**Týp xơ - biểu mô (ICD-O code 8093/3):*

- Đặc điểm lâm sàng: Các khối u thường có hình thái như một nốt ban đỏ hoặc một nốt nổi gồ lên, dày sừng tiết chất bã hoặc mụn com có cuống.

- Đặc điểm MBH: u đặc trưng bởi mạng lưới các nhánh, các dải tế bào dạng đáy bao quanh mô xơ mạch lan rộng từ biểu bì và tạo thành hình ảnh “cửa sổ”.

** Týp biệt hóa phần phụ da (ICD-O code 8098/3):*

- Đặc điểm lâm sàng: Týp này không có điểm riêng biệt về lâm sàng.

- Đặc điểm MBH: Týp này đặc trưng bởi các thành phần giống với các cấu trúc phần phụ da như các cấu trúc dạng ống tuyến, nang lông và tuyến bã. Cần phải phân biệt với UT tuyến mồ hôi vì loại u này có nguy cơ di căn xa.

** Týp đáy - vảy (ICD-O code 8094/3):*

- Đặc điểm lâm sàng: Týp này không có đặc điểm riêng trên lâm sàng.

- Đặc điểm MBH: Các tế bào u có bào tương rộng hơn và hiện tượng sừng hóa nhiều hơn các trường hợp UTTB đáy điển hình. Rải rác một vài nơi không có hình ảnh “hàng đậu” ở xung quanh đám tế bào u.

** Týp sừng hóa (ICD-O code 8090/3):*

- Đặc điểm lâm sàng: Týp này có hình ảnh đặc trưng như những hạt ngọc trai lỏng lánh, trên đó có khảm các nang sừng nhỏ.

- Đặc điểm MBH: Týp này có cấu trúc giống với týp nốt nhưng nhiều nơi bị sừng hóa. Sự sừng hóa đôi khi chỉ mỏng mảnh, hình phễu hoặc dạng cấu trúc nang lông.

** Các biến thể khác:*

Các biến thể khác chiếm ít hơn 10% các trường hợp UTTB đáy và thường không phân biệt được trên lâm sàng.

- Biến thể nang: gồm một hoặc nhiều nang với các kích thước khác nhau tập trung gần vùng trung tâm.

- Biến thể dạng tuyến: cấu trúc gồm có nhiều dải mỏng mảnh các tế bào dạng đáy sắp xếp tạo thành các mạng lưới tế bào.
- Biến thể xơ hóa/xơ cứng: Các dải và các “ổ” tế bào u gắn chặt với mô đệm xơ cứng, biểu hiện như các mảng màu xám, hơi gờ ranh giới không rõ.
- Các loại khác: UTTB đáy tế bào sáng, UTTB đáy tế bào hạt, UTTB đáy tế bào không lồ...

1.5.2. Mô bệnh học và độ mô học UTTB vảy

Ung thư tế bào vảy bao gồm các ổ, đám, dải, dây tế bào vảy có nguồn gốc từ các tế bào biểu bì. Tổ chức u phát triển sâu xuống trung bì với các mức độ khác nhau. Bào tương của tế bào lớn, ưa toan và có các cầu nối tế bào, nhân tế bào to, có nhân quái, nhân chia. Mức độ biệt hóa được dùng để đánh giá độ biệt hóa của khối u. Biệt hóa rõ gồm các tế bào đa diện, hóa sừng rõ rệt với hình ảnh cầu sừng; biệt hóa vừa gồm những tế bào lớn, bào tương rõ nhân to, nhiều nhân chia; biệt hóa kém gồm các tế bào nhỏ, đôi khi giống như tế bào đáy [7].

Mô bệnh học các biến thể UTTB vảy.

Theo phân loại của WHO 2006 gồm các thể chính sau [43]:

- *UTTB vảy thể tiêu gai (Acantholytic squamous cell carcinoma)*: là loại biến thể của UTTB vảy, các tế bào UT thường liên kết lỏng lẻo do các gai nối của tế bào vảy bị tiêu biến.
- *UTTB vảy - tế bào thoi (Spindle- squamous cell carcinoma)*: là thể ít gặp của UTTB vảy, tế bào hình thoi chiếm ưu thế trong khối u. Khối u thường gặp ở da bị chiếu xạ hoặc ánh nắng mặt trời [45].
- *UTTB vảy mụn cơm (Verrucous squamous cell carcinoma)*: Đây là dạng UTTB vảy biệt hóa cao với khả năng ác tính thấp. Khối u chiếm tỷ lệ từ 2-12% các khối u ở miệng, gặp ở nam nhiều hơn nữ, hay gặp ở độ tuổi 50. Đôi khi khối u kết hợp với một tổn thương loét lâu liền, kéo dài.

- *UTTB tuyến vảy (Adeno squamous cell carcinoma)*: là loại biến thể hiếm gặp, nó có nguồn gốc từ các tế bào đa năng (pluripotent), có đặc tính hình thành tuyến nhày.

Phân độ biệt hóa theo 3 độ theo Hermanek (1997): là cách phân độ hiện nay được dùng đánh giá trong thực hành hợp lý hơn [45]:

- Độ I: Biệt hoá cao (well differentiated)
- Độ II: Biệt hoá vừa (moderately differentiated)
- Độ III: Biệt hoá kém hoặc không biệt hoá (poorly differentiated or undifferentiated).

Đặc điểm	Biệt hoá cao	Biệt hoá vừa	Biệt hoá kém
Ranh giới	Rõ hoặc không rõ	Rõ hoặc không rõ	Không rõ và có xâm lấn nhiều.
Kích thước ổ tế bào trong u	Hay thay đổi	Hay thay đổi	Thường nhỏ, có thể một vài tế bào tách rời nhau.
Sự sùng hoá của các tế bào và cầu nối	Thường rõ	Có hoặc không rõ	Ít hoặc không có
Cầu sùng	Thường có	Ít	Hiếm hoặc không có
Nhân chia	Ít	Có nhiều	Thường có và không điển hình
Xâm lấn mạch	Hiếm	Có thể thấy	Thường gặp

Phân độ biệt hoá theo 4 độ: Năm 1920 Broders tìm ra một phương pháp dễ nhớ để đánh giá khả năng phát triển của UT theo 4 độ ác tính [46], đó là:

- Độ 1: Có trên 75% các tế bào biệt hoá;
- Độ 2: Có từ 50%-75% các tế bào biệt hoá;
- Độ 3: Có từ 25-50% các tế bào biệt hoá;
- Độ 4: Có dưới 25% các tế bào biệt hoá.



Hình 1.2: Hình ảnh minh họa phân làm 4 độ (grading) biệt hoá

Theo phân loại mới của NCCN (2014) xu hướng phân làm 2 độ [41]:

- Độ biệt hóa cao (Well or moderately differentiated).
- Kém biệt hóa (Poorly differentiated).

1.6. ĐIỀU TRỊ UNG THƯ DA

1.6.1. Phẫu thuật

Theo UICC khoảng 80% UT da được điều trị bằng phẫu thuật. Nguyên tắc phẫu thuật triệt căn đối với u nguyên phát phải lấy u đủ rộng, đảm bảo diện cắt xung quanh u không còn tế bào UT, cần cân nhắc kỹ các yếu tố: vị trí, kích thước và mức độ thâm nhiễm, vấn đề thẩm mỹ chỉ là thứ yếu.

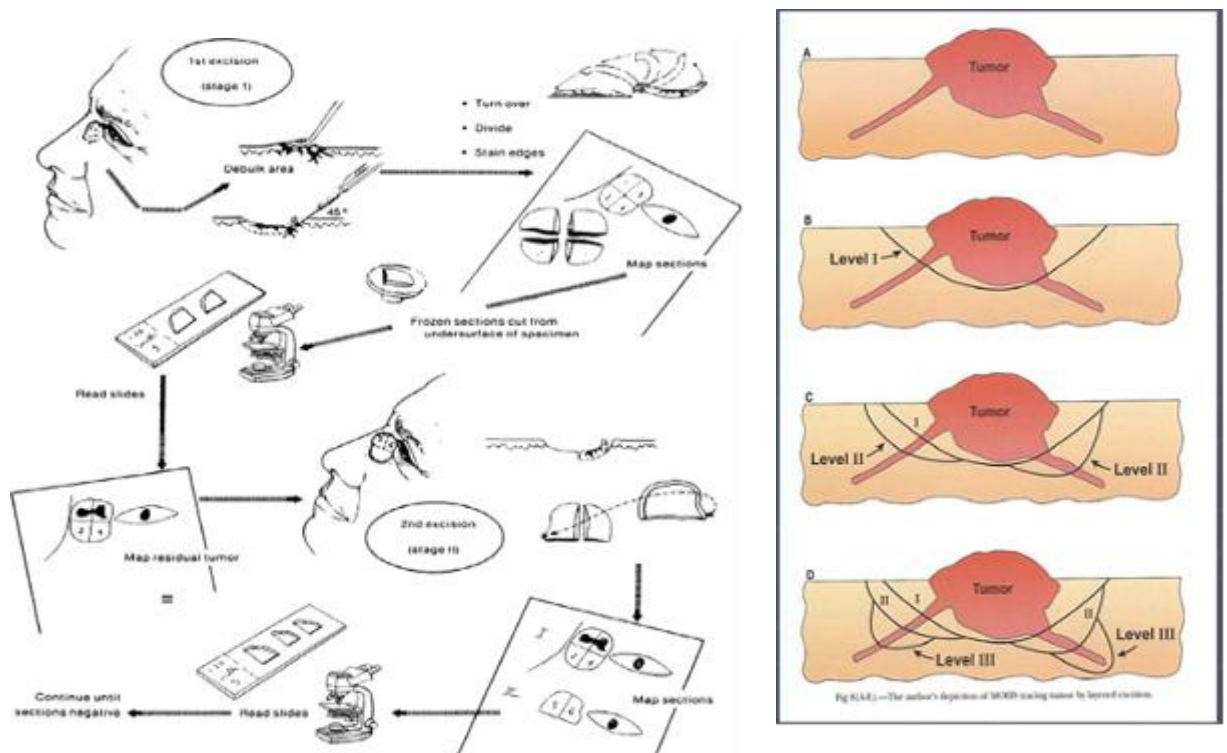
Việc cắt bỏ khối u da đòi hỏi diện cắt phải đủ rộng để tránh tái phát. Tỷ lệ tái phát tại chỗ rất khác nhau giữa các tài liệu: Bùi Xuân Trường là 3,3%, Đỗ Thu Hằng là 10,4% và Trịnh Quang Diện lên tới 16,7% [20],[38],[47]. Để cắt sạch tế bào UT, việc lựa chọn đường cắt tối ưu không phải lúc nào cũng dễ dàng, nó phụ thuộc kinh nghiệm của phẫu thuật viên, đặc điểm lâm sàng - MBH của từng trường hợp cụ thể. Trên thế giới và trong nước, có rất ít nghiên cứu về vấn đề đánh giá mức xâm lấn trong UT da, chủ yếu có nhiều đánh giá về diện cắt u [22],[47],[48],[49].

1.6.1.1. Phẫu thuật cắt bỏ UTTB đáy và UTTB vảy

Theo Wolf và Ziteli, các tổn thương UTTB đáy chỉ lan rộng vì thể khoảng 1-6 mm, khối u có đường kính 2 cm chỉ cần phẫu thuật cách bờ u 4 mm là có thể lấy được toàn bộ khối u, đạt tỷ lệ khỏi 90%, nếu u lớn hơn 2 cm thì cần rộng hơn nữa [22]. Các tổn thương thể xơ bì thường có độ ác tính cao, lan rộng theo các phía, được khuyên lấy rộng hơn khi phẫu thuật, cách bờ u tối thiểu 1–2 cm [3],[22]. Trong UTTB đáy, phẫu thuật chủ yếu theo chiều sâu thương tổn. Graham Colver cho rằng phần lớn bệnh không lan xuống hạ bì, do đó phẫu thuật tới lớp mỡ là đủ, độ sâu này ở mặt từ 1-4 mm, ở lưng từ 5-8 mm [50]. Với thương tổn tái phát, rạch da cách bờ tổn thương 5-10 mm để tỷ lệ khỏi bệnh cao hơn. Tuy nhiên, tùy theo loại u mà có diện cắt phù hợp. Kích thước $u < 2$ cm cần cắt sâu đến lớp mỡ dưới da, u kích thước 2-4 cm cần cắt hết lớp mỡ, $u > 4$ cm cần cắt một phần hoặc cả bề dày cơ, u xâm lấn rộng cắt đến màng xương hoặc đục một phần xương [35].

Với UTTB vảy, điều trị triệt căn cần cắt hết u, có thể kèm vét hạch khu vực. Đối với $u < 2$ cm, đường rạch cần cách rìa u tới 20 mm, diện bề sâu hết lớp mỡ dưới da. Kiểm tra vi thể diện cắt và vùng đáy u sạch tế bào UT. Với kích thước > 4 cm cắt cách rìa u 20 mm, cắt sâu đến một phần lớp cơ, kiểm tra vi thể diện cắt và đáy u. Phẫu thuật sạch sẽ chỉ định với bất cứ T, N có M1, chủ yếu chống chảy máu, giảm triệu chứng, điều trị phối hợp xạ trị hoặc hóa trị [35].

Phẫu thuật Mohs là kỹ thuật loại bỏ hoàn toàn tế bào UT bằng cách lấy bỏ tổ chức UT theo diện cắt hình lòng chảo, sau đó kiểm tra bằng kính hiển vi 100% diện cắt ở bề mặt đáy để tìm ra vị trí còn UT, vùng còn UT được tái phẫu thuật và lặp lại qui trình này đến khi đạt được mặt phẳng không còn UT.



Hình 1.3: Quy trình phẫu thuật Mohs và các lớp cắt Mohs

Phẫu thuật Mohs được chọn lựa trong một số trường hợp hoặc tái phát. Ưu điểm của phương pháp này là xác định được rìa diện cắt, thời gian lành vết thương nhanh hơn và kết quả về mặt thẩm mỹ tốt hơn so với các phương pháp khác. Nhược điểm của phương pháp này không đáng kể, tuy nhiên tốn nhiều thời gian và chi phí so với kỹ thuật nạo và đốt điện hay phẫu thuật đông lạnh. Phẫu thuật viên cũng cần nhiều kỹ năng và có kiến thức căn bản về phẫu thuật tạo hình hơn.

1.6.1.2. Phẫu thuật tạo hình ổ khuyết sau cắt u

Trong bất kỳ một phẫu thuật tạo hình nào, kế hoạch phẫu thuật được bắt đầu với việc đánh giá tổn thương, từng lớp của ổ khuyết được đánh giá về da che phủ, niêm mạc... cần thực hiện các nguyên tắc sau:

- Nguyên tắc phẫu thuật triệt căn.
- Nguyên tắc phẫu thuật phục hồi chức năng.
- Nguyên tắc thẩm mỹ.

Tạo hình là vấn đề suy tính kỹ trong phẫu thuật. Cắt càng xa thương tổn thì càng tạo ra lỗ hổng rộng hơn và khó khăn cho tạo hình. Với một thương tổn có đường kính 10 mm, được cắt cách bờ 4 mm sẽ tạo ra khuyết tổ chức có đường kính 18 mm.

Phẫu thuật UT da đòi hỏi kỹ năng chuyên ngành của phẫu thuật viên trong việc đánh giá giới hạn của u trên lâm sàng, sau đó khâu trực tiếp hay tạo hình bằng ghép da hay vật da. Phương pháp phẫu thuật đạt hiệu quả cao, tỷ lệ điều trị khỏi bệnh của phương pháp này là 90% [51]. Bờ u và diện cắt nên được đánh dấu trước khi gây tê tại chỗ, sau khi tiêm thuốc có thể làm biến dạng khối u gây khó khăn cho việc xác định rìa u. Giới hạn vi thể của u thường rộng hơn giới hạn của u quan sát được trên lâm sàng [52].

Đối với các tổn thương UTTB đáy, rìa diện cắt thường dao động từ 2-10 mm. U kích thước lớn, đa ổ, hoặc tái phát hay dạng mô học diễn biến mạnh, rìa diện cắt là 1 cm ở vùng mặt và 2 cm ở thân mình [47]. Trường hợp UTTB vảy, rìa diện cắt được khuyến cáo là 4-15 mm tính từ quầng đỏ. Nạo vét hạch vùng được thực hiện sau khi xác định có hạch di căn [53].

1.6.2. Xạ trị

Đối với UTTB đáy, cần chú ý vị trí gần mắt, niêm mạc mũi, miệng dễ bị bỏng do tia phát ra. Trong UTTB vảy, tổ chức u lan rộng cần điều trị tia xạ nhằm giảm kích thước u và xâm lấn để thuận lợi cho phẫu thuật.

1.6.3. Hóa trị liệu

Ung thư tế bào đáy không điều trị hóa chất, UTTB vảy ít nhạy cảm với hóa chất nên ít dùng. Do vậy, các sách nội khoa UT ít đề cập đến hóa chất điều trị UT da. Tuy nhiên, điều trị hóa chất hỗ trợ trước mổ và sau mổ đã được thử nghiệm. Trong một số trường hợp, điều trị hóa chất trước mổ được chỉ định với UT da có độ ác tính mô học cao. UTTB vảy kém hoặc không biệt hóa, phát triển nhanh, di căn sớm, không nên phẫu thuật ngay.

Hóa chất làm thoái lui khối u và hạch, dễ phẫu thuật hơn trước, giảm khả năng lan tràn tế bào UT. Trường hợp UT lan rộng, không phẫu thuật mà nên điều trị hóa chất đơn thuần hoặc phối hợp với tia xạ nhằm giảm triệu chứng, duy trì chất lượng sống.

1.7. NGHIÊN CỨU VỀ GEN *TP53* TRONG UNG THƯ DA

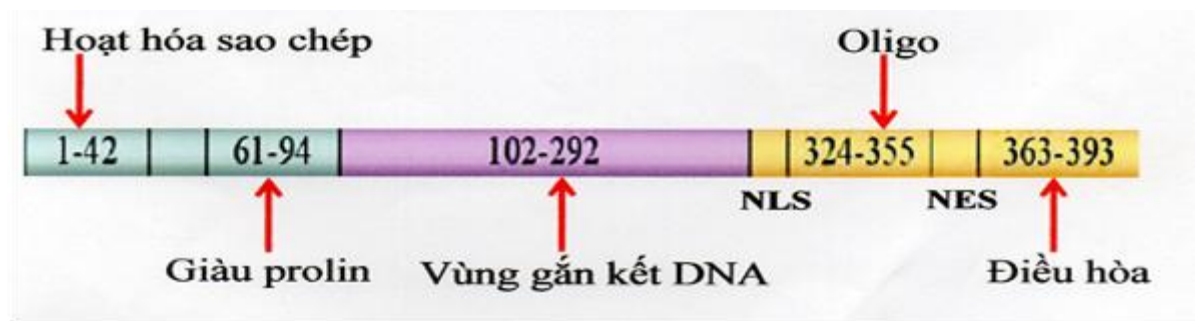
Các tế bào UT đều là những tế bào có đột biến, các đột biến này tạo ra các protein bất thường, tác động gây tăng quá trình phân bào hoặc tăng phân bào quá nhiều dẫn đến tế bào không còn khả năng sửa chữa các bất thường trước và sau mỗi quá trình phân bào. Do tăng quá nhanh quá trình phân bào, tế bào cũng sẽ không có đủ thời gian trưởng thành, tạo ra hiện tượng bất thụ [54],[55].

Gen ung thư (oncogene) được định nghĩa là các gen đột biến mà các biến đổi của chúng gây ra UT hoặc thúc đẩy quá trình UT. Bình thường các gen này có vai trò trong sự điều hòa chu trình tế bào, phát triển và biệt hóa tế bào [54]. Khi bị đột biến các gen tiền UT sẽ biểu hiện quá mức các tín hiệu phân chia tế bào làm các tế bào tăng sinh thừa thãi, trở thành các gen UT [55]. Trong số các gen gây UT, gen *TP53* được nghiên cứu khá nhiều.

1.7.1. Cấu trúc gen *TP53*

Gen *TP53* là một gen ức chế u nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 17 (17p13), mã hoá cho protein p53 có trọng lượng phân tử 53 kD, phiên bản RNA thông tin dài khoảng 3 KB, bao gồm 1179 khung đọc mở [56]. Gen *TP53* gồm 11 exon (từ E1 đến E11, trong đó E1 không mã hóa) và 10 intron [57]. Nó thường được tìm thấy với nồng độ cao trong các tế bào UT [58],[59]. Theo Bourdon và CS, gen *TP53* có 2 vùng bắt đầu phiên mã ở exon 1, vùng cắt intron khác có thể xuất hiện ở intron 2 và giữa exon 9 và exon 10 [60]. Trong đó, vùng chức năng chính nằm ở exon 5 đến exon 8 và đây là vùng thường bị đột biến nhất trong các UT ở người [61].

Chức năng của gen *TP53* khá khác biệt với các gen ức chế u khác. Thay vào việc điều hoà chu kỳ tế bào, gen này kiểm tra và bảo toàn tính toàn vẹn của bộ gen. Gen *TP53* đáp ứng với hư hại di truyền bằng cách cản trở tế bào trong các pha G1, S hoặc G2 của chu kỳ tế bào, ngăn cản phân chia trước khi việc sửa chữa các DNA hư hại được thực hiện. Đồng thời, sau khi dò tìm tổn thương, *TP53* có thể làm cho tế bào chết theo chương trình.

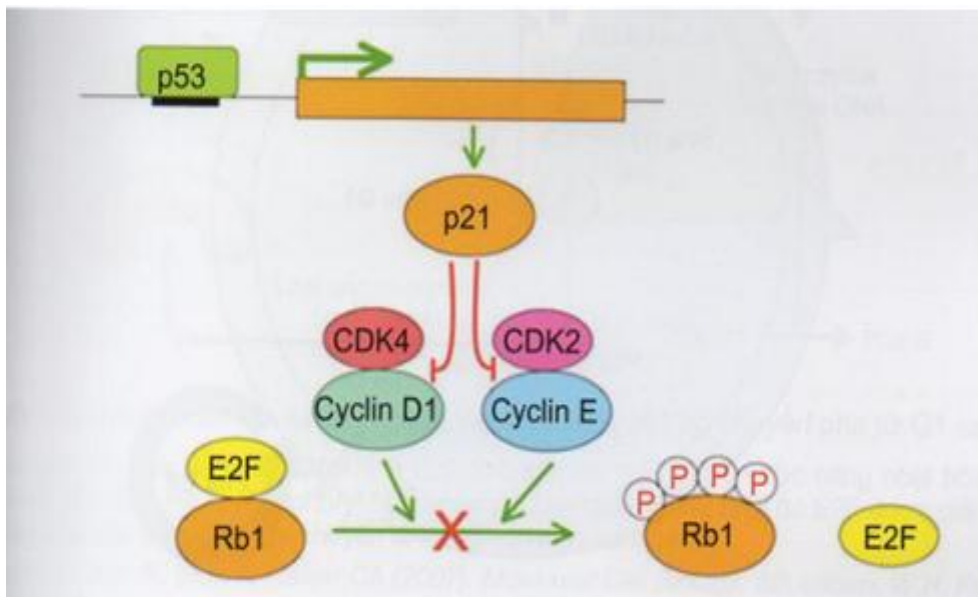


Hình 1.4: Cấu trúc của gen *TP53* [62]

Gen *TP53* được chọn là phân tử của năm 1993, là chìa khoá di truyền của sự phát triển UT, chia thành 3 phần chính gồm chức năng khác nhau [62]:

- Vùng hoạt hóa N tận (NH₂-terminal acidic transactivation domain TA):
 - + Vùng amino tận (1-42): vùng này cần thiết cho hoạt động sao chép và tương tác với MDM2 (murine double minute 2).
 - + Vùng giàu prolin (61-94): liên quan đến chức năng pro-apoptosis và có vai trò điều hòa hoạt động gen *TP53*. Khi vùng này bị xóa bỏ sẽ dẫn đến mất hoàn toàn chức năng pro-apoptosis của gen *TP53* [63].
- Vùng gắn kết DNA (DNA-binding domain DB) gồm acid amin từ 102-292, gắn kết DNA có trình tự đặc biệt, là vùng trung tâm gen *TP53* gắn kết DNA
- Vùng C tận (COOH-terminal oligomerization domain OD) bao gồm:
 - + Vùng oligomerization (324-355) tạo cấu trúc bậc 4 của gen *TP53*.
 - + Vùng điều hòa nhóm carboxyl tận (363-393) có vai trò điều hòa sự gắn kết DNA với vùng trung tâm và liên quan đến apoptosis. Nếu sự tương

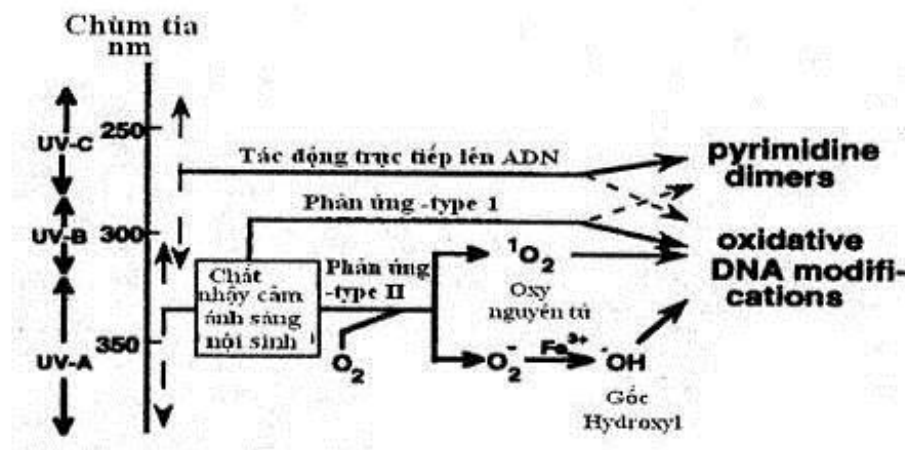
arrest and DNA-damage-inducible protein 45), p21 và protein 14-3-3. Sự dừng chu kỳ tế bào giúp tế bào có thời gian sửa chữa tổn thương DNA trước khi bước vào giai đoạn quan trọng của sự tổng hợp DNA và nguyên phân. Chu kỳ tế bào bước vào pha S cần enzym cdk2 và vào pha M cần enzym cdc2. Enzym cdk2 có thể bị ức chế bởi p21 và cdc2 có thể bị ức chế bởi p21, GADD45, 14-3-3δ [65]. Khi DNA bị tổn thương, gen *TP53* gây tăng phiên mã p21, p21 có 2 vùng gắn với p53 là p21 - WAF 1 (wild type of p53 activate fragment 1) và p21 - CIP 1 (cyclin dependent kinase interacting protein 1). Protein p21 - CIP gây bất hoạt phức hợp cyclinE-CDK2, p21 - WAF 1 gây bất hoạt phức hợp cyclinD1 - CDK4. Các phức hợp CDK bất hoạt không có khả năng phosphoryl hóa pRB (retinoblastoma protein) và pRB không phosphoryl hóa là dạng kích hoạt, sẽ gắn vào E2F. E2F (transcription factor induces cyclin E gene) có tác dụng kích hoạt các gen như myc, myb tham gia vào sự nhân lên của DNA trong pha S. Sự hình thành phức hợp pRB-E2F trực tiếp ngăn cản chu trình tế bào từ pha G1 chuyển vào pha S và kết quả là chu trình phân bào bị dừng ở pha G1 cho đến khi DNA tổn thương được sửa chữa [66].



Hình 1.6: Cơ chế kiểm soát chu kỳ tế bào của gen *TP53* qua trung gian p21 [66]

1.7.3. Cơ chế bệnh sinh ung thư da

Các nghiên cứu đều cho thấy nguyên nhân chính gây ra UT da là do bức xạ tia cực tím gây đột biến DNA của gen *TP53*. Dưới tác dụng của tia cực tím, DNA của một số tế bào bị thay đổi [67]. Bình thường sự thay đổi DNA này luôn được sửa chữa và hồi phục nhờ việc kiểm soát bởi gen ức chế khối u (gen *TP53*) để không hình thành UT da nói chung [59]. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy gen *TP53* tham gia hệ thống cấp cứu, sửa chữa nhiều tổn thương của tế bào đang phân chia. Yếu tố sao chép này có nhiệm vụ phát hiện ra những sai sót trong quá trình nhân đôi của sợi DNA, từ đó ức chế tế bào nhân lên và hướng tế bào chết theo chương trình. Dưới tác dụng của tia cực tím kéo dài, gen *TP53* có thể bị đột biến dẫn đến làm mất chức năng sửa chữa của mình do đó ngay cả các tế bào có DNA bị tổn thương quá trình apoptosis ở cũng không xảy ra. Ở những bệnh nhân có gen *TP53* không hoạt động, 50% mắc UT da ở tuổi 30, và 90% mắc UT da ở tuổi 70.

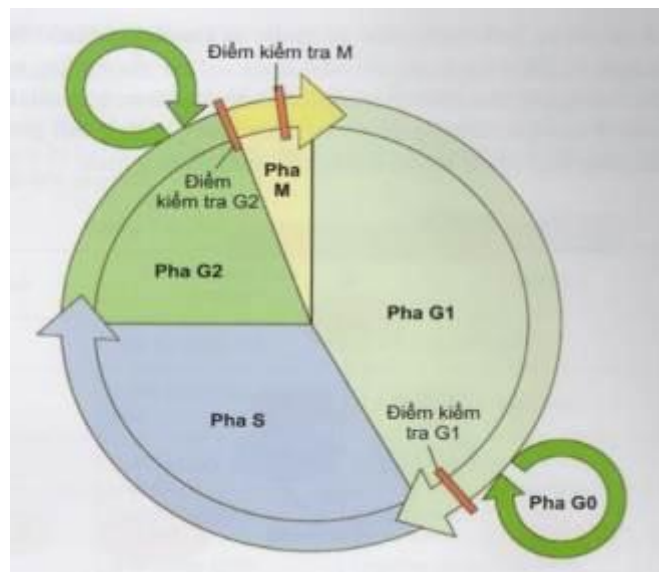


Hình 1.7: Cơ chế tác động của tia UV làm biến đổi DNA [59]

Gen *TP53* có khả năng hạn chế các đột biến xảy ra ở tế bào thông qua tác dụng của nó trên chu kỳ tế bào, khi các tín hiệu đến các receptor trên bề mặt tế bào, dẫn truyền vào trong bào tương và hội tụ vào đồng hồ chu kỳ tế bào. Các thời gian dừng chu kỳ tế bào này là để sửa chữa các tổn thương DNA do các yếu tố vật lý, hoá học... gây ra, làm cho tế bào không bị đột biến

và được sống sót, không bị tiến triển thành ác tính. Khi tế bào dừng ở giai đoạn G1 sẽ tránh được sự tái sao các DNA tổn thương, dừng ở G2 tránh được việc duy trì các tế bào có các nhiễm sắc thể hư hại không được sửa chữa mà bước ngay vào quá trình phân bào. Gen *TP53* trực tiếp tham gia vào quá trình sửa chữa này bằng cách tăng sao mã một số protein có chức năng sửa chữa DNA. Nếu DNA bị tổn thương sửa chữa được thì tế bào được phép thực hiện nốt chu trình của mình. Nhưng vì một số nguyên nhân nào đó mà cơ chế sửa chữa bị sai lệch, thì gen *TP53* sẽ dừng quá trình phân chia của các tế bào đột biến và khởi động quá trình chết theo chương trình [59].

Như vậy, khi thiếu hoặc gen *TP53* bị biến đổi thì hiện tượng chết theo chương trình sẽ giảm, lúc này tế bào có đột biến cũng không chết và hiện tượng tăng phân bào tiếp tục xảy ra đó là cơ chế duy trì các tế bào có đột biến, khi tích lũy thêm các đột biến ở mức độ nhất định sẽ hình thành các tế bào UT (có đột biến). Đặc biệt khi cả 2 alen từ bố và mẹ của gen *TP53* bị thương tổn thì sự ức chế tế bào chết theo chương trình càng xảy ra dễ dàng hơn khi chỉ bị tổn thương 1 alen, lúc này tế bào không chết mà cứ tăng phân bào.



Hình 1.8: Chu kỳ tế bào: M: các giai đoạn phân bào; G1, S, G2 là các pha của giai đoạn gian kỳ (interphase) [59]

Các đột biến, kết quả làm cho protein sản phẩm mất chức năng nhưng nó lại trở nên bền vững hơn và gây tích tụ với một nồng độ cao trong nhân tế bào, tạo ra các sản phẩm gọi là gen *TP53* đột biến. Trong UT da, đột biến hầu hết là đột biến điểm trong đoạn exon 5 đến 8, các vị trí codon sau: 175, 177, 248 và 282 [68].

Các loại thương tổn, đột biến hay mất chức năng của gen TP53:

Hoạt tính gen *TP53* biểu lộ bằng sự có mặt phân tử của gen *TP53* trong dịch sinh học. Các thương tổn gen *TP53* có thể gặp:

+ Đột biến điểm: do chuyển đổi vị trí pyrimidin này bằng pyrimidin khác, hoặc cặp pyrimidin này bằng cặp pyrimidin khác.

+ Đột biến mất đoạn: do mất các vùng trên nhiễm sắc thể làm bất hoạt, mất gen *TP53*. Diễn hình là mất tính dị hợp tử (LOH: loss of heterozygosity) do mất đoạn nhiễm sắc thể chứa gen *TP53* ở một trong hai nhiễm sắc thể gây ra mất một trong hai alen của tế bào. Tuy nhiên, trong UTTB đáy thì tần xuất mất tính dị hợp tử thấp hơn so với các UT khác [69].

Vai trò của gen TP53 trong cơ chế bệnh sinh UTTB da:

Quá trình apoptosis là tiến trình thầm lặng nên chúng ta còn chưa biết đầy đủ. Apoptosis là một hiện tượng cơ bản của sự sống ở cơ thể đa bào. Nó liên quan đến quá trình phát triển của phôi và liên quan đến khả năng giữ hằng định nội môi của cơ thể trưởng thành (cân bằng giữa tái sinh, tăng sinh và chết) đặc biệt đối với các tổ chức thường xuyên đổi mới như hệ thống miễn dịch. Quá trình apoptosis do nhiều gen điều khiển và kiểm soát. Quá trình apoptosis có thể xảy ra như sau:

- Các kích thích từ bên ngoài (exogenous) như các hormon, thuốc điều trị, tia cực tím... sẽ làm các chemokine hoạt hoá một receptor trên tế bào thuộc typ receptor APO-1 và Fas (tên khác của Fas là CD95 hay receptor của TNF hay của TRAIL). Tín hiệu này sẽ truyền đến một loại protein có tương tác vật

lý với receptor đó ở domain gây chết (death domain- DD hay dead effector domain - DED) làm hoạt hoá một dây chuyền nhiều protease gây phân rã cystein, có tên gọi là capcase. Các capcase sẽ gây phân rã một loạt các protein cấu trúc tế bào hay các protein kiểm soát chu kỳ tế bào (pRb) hay các enzym sửa chữa thương tổn ở DNA, protein của RNA thông tin trưởng thành làm cho tế bào chết.

- Yếu tố kích thích nội sinh (endogenous) là protein p53. Protein p53 xuất hiện khi có tổn thương DNA ở dạng gãy đơn (SSB: single strand break) hay gãy kép (DSB: double strand break) hay khi tái sao gen sai lệch, p53 hoạt hoá trực tiếp chương trình apoptosis hay gián tiếp thông qua các sản phẩm của gen bcl-2 và bax. Ngoài p53, các SSB và DSB còn giải phóng các tít topoisoмерase I và II. Các topoisoмерase của DNA được xem như là “trạm gác khu vực” của bộ gen có trong một tế bào dù là bình thường hay ác tính. Các topoisoмерase tách đôi sợi xoắn kép của DNA để sao chép hay sửa chữa tổn thương DNA bằng cách làm gãy sợi DNA (topoisoмерase tít I làm gãy 1 sợi, tít II làm gãy 2 sợi) nên rất cần cho sự phân bào. Khi thiếu các topoisoмерase, đặc biệt là tít II thì các nhiễm sắc thể không phân ly được, tế bào không phân bào được, dễ bị chết nhất là khi có tác động của kháng sinh và các thuốc gây độc tế bào [71],[72].

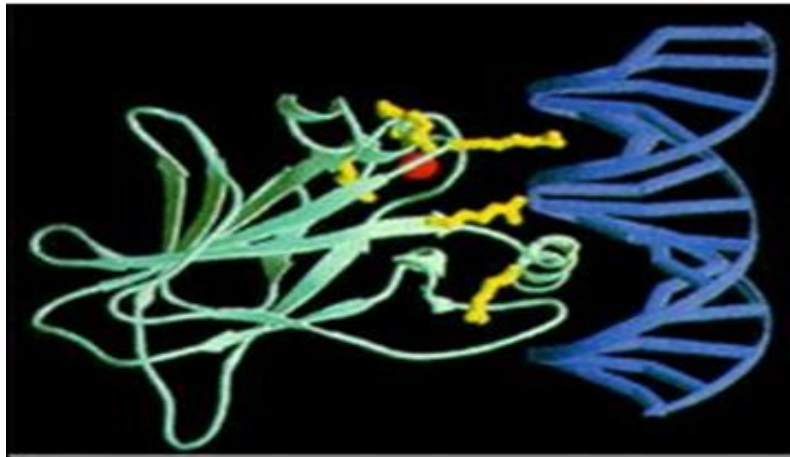
Sự hằng định nội môi là do sự cân bằng giữa số lượng tế bào mới tái sinh và số tế bào già chết đi. Có thể các tế bào chết do các telomere (6 nucleotid cuối cùng của nhiễm sắc thể làm cho các đầu nhiễm sắc thể không dính được vào nhau) nên không bảo vệ được tít toàn vẹn trong tái sao DNA. Một số chết do thiếu oxy, do tác dụng nhiệt độ không thuận lợi cho sự sống của tế bào, do oxy hoá, do tia cực tím gây các tổn thương DNA quá lớn vượt quá khả năng sửa chữa của tế bào.

1.7.4. Phương pháp phát hiện đột biến gen *TP53*

1.7.4.1. Hóa mô miễn dịch *p53* với ung thư da

Hiện nay, kỹ thuật hóa mô miễn dịch (HMMD) với các kháng thể đơn dòng để phát hiện các protein bất thường trong nhân tế bào.

Protein *p53* được phát hiện đầu tiên vào năm 1979 bởi Lionel Crawford và cs ở Trường Đại học Princeton, Dundee, Vương quốc Anh. Ở người, protein *p53* gồm có 393 acid amin, khối lượng phân tử là 53 kD, là protein có hàng loạt các biến đổi sau dịch mã như phosphoryl hóa, acetyl hóa, neddy hóa.



Hình 1.9: Cấu trúc protein *p53* [73]

Vai trò và chức năng trong cơ chế bệnh sinh:

Đột biến gen *TP53* tạo nên các protein bất thường có thời gian bán hủy tăng có thể do những thay đổi trong cấu trúc ba chiều của protein, là hậu quả của đột biến gen gây ra, cho thấy protein *p53* có vai trò nhất định trong việc xác định yếu tố nguy cơ cũng như tiên lượng trong UT da [73].

Các phương pháp phát hiện: qua phương pháp nhuộm HMMD và giải trình tự gen. Protein đột biến sẽ được tích lũy lại trong nhân tế bào và có thể phát hiện bằng các kỹ thuật HMMD. Đo sự bộc lộ protein *p53* bằng HMMD là một xét nghiệm dễ và chính xác để phát hiện sự tích lũy bất thường của protein này trong nhân tế bào, xác định định tính protein *p53* tích tụ trong nhân tế bào. Trong tế bào bất thường, protein *p53* thường tập trung biểu hiện

ở trong nhân tế bào, vì thế khi nhuộm HMMD thì nhân tế bào sẽ bắt màu, trong khi ở các tế bào bình thường, lượng protein p53 biểu hiện ít nên không cho thấy sự bắt màu đặc trưng và có các đặc điểm: (1) có sự biểu hiện vượt mức protein p53; (2) protein p53 biểu hiện phải được tích lũy trong nhân tế bào; (3) không có đột biến và không có sự biến đổi cấu trúc protein tại vị trí epitop gắn đặc hiệu trên protein p53. Vì có đến 80% các đột biến nhằm nghĩa tạo ra các protein p53 đột biến được tích lũy trong nhân nên phương pháp này được xem là phương pháp nhận diện trực tiếp protein đột biến có độ tin cậy cao. Tuy nhiên, các đột biến vô nghĩa và đột biến dịch khung lại thường không tạo ra các protein được tích lũy trong nhân. Vì thế, các kháng thể đánh dấu không thể gắn được vào epitop của các protein đột biến [73].

1.7.4.2. Kỹ thuật sinh học phân tử PCR và realtime PCR

Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) dựa vào cơ chế tổng hợp gen đặc hiệu trong tế bào. Nhà hóa sinh người Mỹ Karry Mullis đã phát minh ra kỹ thuật tổng hợp gen trong ống nghiệm (PCR) vào năm 1985. PCR là phương pháp in-vitro để tổng hợp một đoạn DNA đặc thù nhờ công hiệu của 2 môi oligonucleotide gắn vào 2 sợi đôi của đoạn DNA đích với sự tham gia của DNA polymerase.

Nguyên tắc của kỹ thuật PCR

Kỹ thuật PCR là một phương pháp tổng hợp DNA dựa trên mạch khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và một cặp môi (primer) đặc hiệu cho đoạn DNA. Primer là những đoạn DNA ngắn, có khả năng bắt cặp bổ sung với một mạch của đoạn DNA khuôn và nhờ hoạt động của DNA polymerase đoạn primer này được kéo dài để hình thành mạch mới. Đoạn DNA nằm giữa hai primer sẽ được khuếch đại thành số lượng lớn bản sao đến mức có thể thấy được sau khi nhuộm bằng ethidium bromide và có thể thu nhận đoạn DNA này cho các mục đích khác nhau bằng các thao tác trên gen.

Realtime PCR: là phương pháp khuếch đại gen gồm 2 quá trình: nhân bản DNA bằng phản ứng PCR và đo độ phát huỳnh quang tỷ lệ thuận với số lượng DNA tạo ra. Ưu điểm của Realtime PCR là cho kết quả nhanh, cho phép theo dõi tiến trình phản ứng và biết được lượng DNA đã tạo thành ở từng thời điểm, không cần điện di do đó tiến hành được nhiều mẫu, hạn chế tạp nhiễm, có độ nhạy cao. Realtime PCR là một cải biên của phương pháp PCR dựa trên chức năng của Taq DNA polymerase do Holand và CS công bố năm 1991.

So với PCR truyền thống, Realtime PCR có ưu điểm:

- Kiểm soát lượng huỳnh quang giải phóng ra trong phản ứng, từ đó có thể biết được sản phẩm PCR tại từng thời điểm của quá trình khuếch đại.
- Độ đặc hiệu của Realtime PCR cao hơn nhiều so với PCR truyền thống do sử dụng các mẫu dò đặc hiệu để phát hiện các sản phẩm khuếch đại.

1.7.4.3. Giải trình tự gen (DNA sequencing)

Giải trình tự gen là phương pháp xác định vị trí sắp xếp của các nucleotide trong phân tử DNA. Đoạn DNA cần giải trình tự được sử dụng như trình tự mẫu cho phản ứng khuếch đại gen (PCR) bắt đầu từ vị trí gắn mồi. Hỗn hợp của deoxy - và dideoxynucleotid được sử dụng trong phản ứng với nồng độ sao cho các dideoxynucleotid sẽ gắn vào mỗi vị trí mà các deoxynucleotid thường gắn trên đoạn DNA đang được tổng hợp. Sự gắn của các dideoxynucleotid sẽ làm gián đoạn quá trình kéo dài các đoạn DNA được tổng hợp, kết quả sẽ tạo ra hỗn hợp các sợi DNA có kích thước khác nhau.

Nucleotide tận cùng trên mỗi sợi DNA có thể được xác định bằng cách chạy đồng thời bốn phản ứng riêng biệt trong đó mỗi phản ứng chứa một loại dideoxynucleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) hoặc bởi một phản ứng hỗn hợp nhưng từng loại dideoxynucleotide được đánh dấu bằng các chất phát huỳnh quang đặc hiệu khác nhau.

Kết quả là hỗn hợp các sợi DNA tổng hợp từ sợi khuôn được phân tách bằng điện di trên thạch acrylamide có độ phân giải cao, cho phép phân biệt

1.8. NGHIÊN CỨU VỀ KI-67

Ki-67 là một protein non-histon được mô tả năm 1983, là kháng nguyên trong nhân của tế bào đang phân bào được bộc lộ trong chu kỳ tế bào ở pha G1, pha S và pha G2 trong phân kỳ và không có ở thời kỳ nghỉ (G0). Mức độ Ki-67 thấp ở pha G1, S và tăng cao nhất khi nhân chia, sau đó giảm mạnh ở pha cuối.

1.8.1. Vai trò và chức năng trong cơ chế bệnh sinh liên quan đến Ki-67

Ki-67 liên quan mật thiết với hình thái tăng sinh tế bào, đặc biệt là chỉ số phân bào và độ biệt hóa của u. Những bệnh nhân UT có thời gian sống thêm ngắn thường có tỉ lệ bộc lộ Ki-67 cao. Biểu hiện dương tính mạnh của Ki-67 là một yếu tố nguy cơ cho thấy khả năng tái phát cao, tiên lượng xấu. Tuy nhiên định lượng tăng sinh tế bào dựa vào đếm số lượng nhân chia là một việc không dễ và thường cho kết quả khác nhau giữa các nhà giải phẫu bệnh. Những khối u có bộc lộ Ki-67 cao sẽ tiến triển nhanh, làm tăng nguy cơ tái phát ở bệnh nhân UT da, có ý nghĩa cao trong đánh giá tiên lượng của nhiều loại u. Một vài nghiên cứu cho thấy giá trị tiên lượng của sự bộc lộ Ki-67 trong UTTB đáy vẫn còn đưa ra các kết quả khác nhau [74],[75],[76].

1.8.2. Phương pháp phát hiện và một số nghiên cứu liên quan đến Ki-67

Sự biến mất ở pha nghỉ G0 của Ki-67, cho phép ước lượng đoạn tăng sinh sau khi một số lượng tương đối nhỏ các tế bào được đếm qua pha S và pha G2. Các phương pháp này bao gồm việc đo nồng độ của thymidine đánh dấu bằng hydro phóng xạ và deoxyuridine kết hợp với DNA của tế bào u, đến tỷ lệ các tế bào ở pha S bằng đếm tế bào dòng chảy, các phương pháp này cần kỹ thuật và trang thiết bị phức tạp. Phương pháp HMMD được sử dụng phổ biến nhất để phát hiện Ki-67 dựa vào việc phát hiện các protein nhân có liên quan đến sao chép DNA của tế bào. Phương pháp HMMD thuận lợi hơn so với phương pháp đếm dòng chảy là nó cho phép đánh giá tỷ lệ tế bào tăng sinh đồng thời với việc đánh giá về hình thái của mô u. Dấu ấn liên quan đến

tăng sinh tế bào được nghiên cứu nhiều nhất là Ki-67, có liên quan chặt chẽ giữa sự bộc lộ thymidine và tỷ lệ các tế bào dương tính với Ki-67.

Lu S. và các CS xác định có mối quan hệ chặt chẽ giữa các chỉ số tăng sinh tế bào khác nhau và HMMD Ki-67 [77]. Trong điều kiện bình thường, protein này chủ yếu nằm trong hạch nhân. Trong quá trình nguyên phân, nó gắn liền với về mặt của chất nhiễm sắc đặc và các nhiễm sắc thể, sau khi phân bào, nó nằm trong nguyên sinh chất trước khi chuyển về hạch nhân. Mức bộc lộ của Ki-67 qua HMMD được cho là một chỉ số quan trọng trong các báo cáo về mô bệnh học [78]. Chỉ số tăng sinh Ki-67 được thể hiện bằng tỷ lệ bắt màu của các tế bào khối u. Tỷ lệ này khác nhau giữa từng thể u, thậm chí khác nhau giữa từng cá thể trong từng thể u [79],[80],[81]. Biểu hiện Ki-67 được sử dụng như là một công cụ chẩn đoán và tiên lượng bệnh trong một số loại UT. Healy và các CS đã nghiên cứu mối tương quan giữa chỉ số tăng sinh Ki-67 với các hình thái, MBH cũng như tỷ lệ tái phát của UTTB đáy. Nghiên cứu cho thấy sự tái phát của các khối u có chỉ số tăng sinh Ki-67 cao sẽ cao hơn so với các khối u có chỉ số tăng sinh Ki-67 thấp, trong khi đó, không có mối tương quan nào được phát hiện giữa hình thái lâm sàng của UTTB đáy với biểu hiện Ki-67 [82]. Chuprova năm 2008 đã chỉ ra được mối quan hệ có ý nghĩa thống kê giữa chỉ số tăng sinh Ki-67 và thể xâm nhập của UTTB đáy [83]. Các nghiên cứu gần đây về Ki-67 đều có mục đích tìm hiểu mối liên quan giữa mức độ tăng sinh Ki-67 ở UTTB đáy và UTTB vảy ở vùng da với một số đặc điểm hình thái lâm sàng, MBH, kích thước khối u hay vị trí giải phẫu để đưa ra những chẩn đoán và tiên lượng giúp quá trình điều trị hiệu quả

1.9. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI

1.9.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Một số nghiên cứu về đột biến gen TP53 trong UTTB đáy:

Ý nghĩa của gen TP53 trong UTTB đáy còn nhiều bàn cãi vì kết quả nghiên cứu của các tác giả chưa hoàn toàn thống nhất. Tuy nhiên, các nghiên cứu đã

chứng minh rằng gen *TP53* ức chế sự phát triển của UT, mã hoá cho protein p53 của nhân tế bào, điều hoà sự sinh sản và chết tế bào theo chương trình, ngăn ngừa đột biến DNA. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy đột biến gen *TP53* chiếm khoảng một nửa các trường hợp UTTB đáy đơn lẻ [12],[83],[84]. Nghiên cứu của Rady cho thấy 50% các trường hợp UTTB đáy có đột biến gen *TP53* [84], nghiên cứu sau đó của Ziegler phát hiện 56% trường hợp UTTB đáy có đột biến gen *TP53* [77]. Đặc biệt trong nghiên cứu của Ziegler còn phát hiện ra có khoảng 45% các trường hợp UTTB đáy có thêm điểm đột biến thứ 2 trên alen gen *TP53* khác. Các nghiên cứu ở người châu Á cho thấy tỷ lệ đột biến gen *TP53* trong UTTB đáy ở các nước là khác nhau. Theo nghiên cứu của Kim và CS, tỷ lệ gen *TP53* đột biến chiếm khoảng 30%, nghiên cứu của Ghaderi ở Iran là 68,3% còn trong nghiên cứu của Malhotra và CS thì tỷ lệ đột biến chỉ chiếm 17,6% [86],[87],[88].

Các nghiên cứu giải trình tự gen *TP53* trong UTTB đáy để tìm đột biến đều cho thấy đột biến thường gặp nhất là chuyển đổi vị trí pyrimidin này bằng pyrimidin khác (C→T) hoặc cặp pyrimidine này bằng một cặp pyrimidine khác (CC→TT) [84],[85].

Một số nghiên cứu về đột biến gen TP53 trong UTTB vảy:

Forbes S. và CS nghiên cứu cũng ở các bệnh nhân UTTB vảy vùng đầu, cổ thấy các đột biến hay gặp ở gen *TP53* là: Arg175His, Glu180Fs, Ser183Stop, Gln52InF, His179Arg, His193Leu, Gly266Arg và một số đột biến ít gặp khác [89]. Một nghiên cứu khác là của Telmer C.A. và CS cũng tiến hành ở các bệnh nhân UTTB vảy vùng đầu, cổ thấy các đột biến hay gặp ở gen *TP53* là: Arg306Stop, Thr155Pro, His179Tyr, Arg248Gln, Arg273His, Pro151His, Glu224Stop, His179Asn, Pro177Arg [68]. Cùng nghiên cứu ở bệnh nhân UTTB vảy vùng đầu cổ, tuy nhiên các biến đổi mà theo Viros A., Forbes S. và của Telmer C.A. cho thấy trên gen *TP53* hầu hết là khác nhau. Trong

nhiều đột biến mà các tác giả này đề cập chỉ có đột biến Arg175His là cả 3 tác giả đều cùng phát hiện thấy, đột biến Pro151His thì cả Viros A. và Telmer C.A. cùng phát hiện thấy, các đột biến còn lại chỉ có 1 tác giả đề cập.

Năm 2007, Thierry Soussi khi tổng kê nhiều báo cáo nghiên cứu về biến đổi gen *TP53* ở các bệnh nhân UTTB vảy vùng đầu cổ của các tác giả khác nhau, tiến hành nghiên cứu ở các địa điểm khác nhau và thấy 64 loại biến đổi ở gen *TP53* đã được phát hiện, tuy nhiên chỉ có 20 biến đổi là có từ 2 nghiên cứu trở lên cùng phát hiện thấy, có tới 44 biến đổi chỉ gặp trong 1 nghiên cứu [90]. Như vậy, biến đổi của gen *TP53* rất đa dạng, nó có thể phụ thuộc vào chủng tộc và địa dư khác nhau thì có các biến đổi khác nhau.

1.9.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Ở Việt Nam, nghiên cứu về đột biến gen *TP53* ở UT da còn hạn chế. Chúng tôi chỉ tìm thấy được hai nghiên cứu của Trần Đức Phấn và Lê Đức Minh về đột biến gen *TP53* trong UT da đã được thực hiện [55],[91].

Trong nghiên cứu của Trần Đức Phấn, tác giả đã giải trình tự gen *TP53* trên 218 mẫu UT da trên các Exon 3, 4 và 6 đã phát hiện ra 12 loại biến đổi. Tỷ lệ đột biến UT da ở Exon 3 của *TP53* là 61,5%; Exon 4 là 2,3% và Exon 6 là 8,3%. Tỷ lệ đột biến *TP53* của riêng UTTB đáy ở Exon 3,4 và 6 lần lượt là 84,7%; 3,3% và 12%. Tỷ lệ đột biến gen *TP53* của UTTB vảy ở Exon 3 là 14,9%. Không phát hiện đột biến xuất hiện ở tế bào hắc tố của gen *TP53* [55].

Tác giả Lê Đức Minh nghiên cứu trên nhóm UTTB đáy của UT da có kết quả khá tương đồng so với y văn trên thế giới như UTTB đáy chủ yếu gặp ở nhóm tuổi 50-79 (72,6%), hình thái thường gặp là thể nốt/loét (45,8%), có kích thước tổn thương chủ yếu là 1-2 cm (44,3%) và lớn hơn 2 cm (40,5%). Biểu hiện của kháng nguyên p53 và đột biến gen *TP53* trên Exon 2 – 9 và cho kết quả 24,4% UTTB đáy dương tính với p53 và tỷ lệ đột biến *TP53* ở UTTB đáy đạt 35%, trong đó ở Exon 2-4 là 22,5% và Exon 7-9 là 12,5% [91].

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu gồm 71 bệnh nhân được chẩn đoán xác định là UTTB đáy và UTTB vảy tại Bệnh viện K từ tháng 3/2012 đến tháng 3/2014.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân

- Bệnh nhân mắc bệnh UT da vùng đầu mặt cổ có tổn thương tiên phát, chưa được phẫu thuật, được chẩn đoán xác định về mặt MBH là UTTB đáy hoặc UTTB vảy từ các bệnh phẩm sau khi được điều trị bằng phẫu thuật tại Bệnh viện K.

- Khối nén còn được lưu trữ và đủ bệnh phẩm để cắt lại tiêu bản, nhuộm HMMD và giải trình tự gen.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân không thỏa mãn bất kỳ tiêu chuẩn lựa chọn trên.
- Bệnh nhân có 2 loại UT, đã được điều trị trước đó.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu:

Cỡ mẫu: Áp dụng công thức tính cỡ mẫu ngẫu nhiên:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \cdot p \cdot (1-p)}{d^2}.$$

Trong đó:

N: kích thước mẫu.

$Z_{1-\alpha/2}^2$: Hệ số tin cậy ở mức xác suất 95% thì $Z_{1-\alpha/2}^2$ bằng 1,96².

p: Tỷ lệ dương tính p53 khi nhuộm HMMD ở UT da không hắc tố, chúng tôi chọn $p=0,76$ theo kết quả nghiên cứu năm 2015 của Rasoul [92].

d: Sai số tuyệt đối chấp nhận trong nghiên cứu áp dụng $d=0,1$.

Như vậy:

$$n = \frac{1,96 \times 1,96 \times 0,76 \times (1-0,76)}{0,1 \times 0,1} = 70,07$$

Chúng tôi đã chọn được 71 bệnh nhân, trong đó 51 bệnh nhân được chẩn đoán là UTTB đáy và 20 bệnh nhân được chẩn đoán là UTTB vảy đáp ứng được các tiêu chuẩn nghiên cứu.

Nghiên cứu lấy tất cả các mẫu làm xét nghiệm HMMD, tiếp đó chọn ra 51 bệnh nhân làm xét nghiệm giải trình tự gen *TP53* đánh giá tình trạng đột biến.

Địa điểm nghiên cứu:

- Khoa Ngoại Đầu cổ - Bệnh viện K để thu thập thông tin về đặc điểm lâm sàng và mô bệnh học của UT da.

- Khoa Giải phẫu bệnh- Tế bào, Phòng Sinh học phân tử Bệnh viện K là nơi xét nghiệm Giải phẫu bệnh, HMMD và giải trình tự gen *TP53*.

2.2.3. Kỹ thuật thu thập số liệu

- Phỏng vấn bệnh nhân nhằm thu nhập các thông tin cá nhân, tiền sử, khám lâm sàng, đánh giá giai đoạn bệnh.

- Đánh giá mức độ xâm lấn của khối UT da, gồm 71 bệnh nhân, trực tiếp phẫu tích bệnh phẩm, thống kê theo mẫu thống nhất để ghi nhận các thông tin đầy đủ chỉ tiêu cần nghiên cứu.

- Hóa mô miễn dịch: xác định kháng nguyên p53, Ki-67.

- Tình trạng đột biến gen *TP53*: lựa chọn 51 bệnh nhân làm xét nghiệm giải trình tự gen *TP53* (PCR), xác định tỷ lệ đột biến.

2.2.4. Cách thức tiến hành

Nghiên cứu sử dụng tư liệu trong hồ sơ bệnh án, thu nhập thông tin theo mẫu in sẵn, trình tự theo các bước sau:

- Bộ câu hỏi phỏng vấn: bao gồm phần thông tin hành chính, đặc trưng cá nhân và các yếu tố liên quan của UTTB đáy và UTTB vảy.
- Bệnh án, phiếu xét nghiệm mô bệnh học và các xét nghiệm khác.
- Mẫu mô UT da: 71 mẫu mô của 2 loại UT trên (UTTB đáy, UTTB vảy), các mẫu mô UT da được cố định bằng formal và vùi trong paraffin (mẫu mô FFPE). Các mẫu mô này được lưu trữ, bảo quản và tiến hành phân tích đột biến gen tại phòng Sinh học phân tử, Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện K.

2.2.4.1. Khai thác thông tin

- Tuổi và giới tính, nghề nghiệp.
- Tiền sử bệnh, thời gian phát hiện bệnh.
- Triệu chứng lâm sàng, điều trị trước khi đến bệnh viện, số lần phẫu thuật, kết quả mô bệnh học.
- Vị trí và tính chất u: vị trí u, kích thước u tính theo cm đường kính lớn nhất, chia thành các nhóm có kích thước < 1 cm; 1-2 cm; 2-4 cm và > 4 cm.
- Hình thái lâm sàng: thu nhập các thông tin về mật độ, màu sắc u, bề mặt u, ranh giới, sự thâm nhiễm u, tính chất u sùi loét, thâm nhiễm...
- Tiền sử bệnh nhân: đã được chẩn đoán hay không có tiền sử UTTB đáy và UTTB vảy.
- Mức độ xâm lấn các cơ quan hoặc các tổ chức khác.
- Di căn hạch: có hay không di căn, các vị trí hạch di căn.
- Phân loại TNM, xếp giai đoạn bệnh theo NCCN.

2.2.4.2. Nghiên cứu mức xâm lấn của UTTB da

- Ghi nhận các phương pháp đã được áp dụng cho bệnh nhân tại bệnh viện K: thông tin về chẩn đoán, phương pháp điều trị.

- Các rìa diện cắt được xác định và đánh giá xâm lấn qua xét nghiệm MBH.

Quy trình tiến hành:

+ Hướng: - Dựa vào mặt phẳng giải phẫu: 12h phía trên, 6h phía dưới.

- Dựa vào vị trí giải phẫu: Đánh dấu vị trí giải phẫu như cách mũi, bờ môi, bờ mi mắt, vùng trước tai.

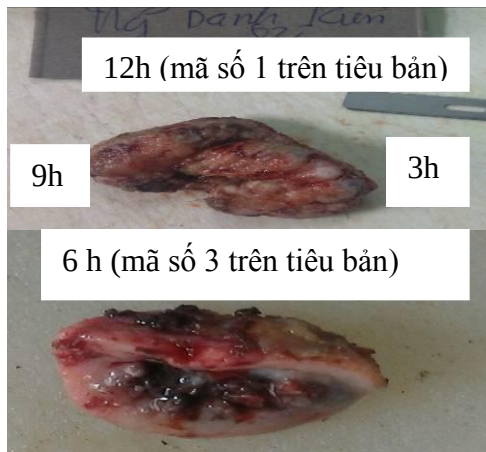
- Cách đánh dấu có thể bằng chỉ buộc sau khi cắt bệnh phẩm: đánh dấu chỉ buộc (vị trí 6h: chỉ < 2 cm; 12h chỉ > 3 cm)

+ Đánh dấu bệnh phẩm: sử dụng bút màu vẽ đánh dấu đường cắt, dự kiến cắt u trước phẫu thuật: màu xanh, đen, đỏ. Thuận lợi cho xác định giải phẫu u.

+ Phòng xét nghiệm pha bệnh phẩm:

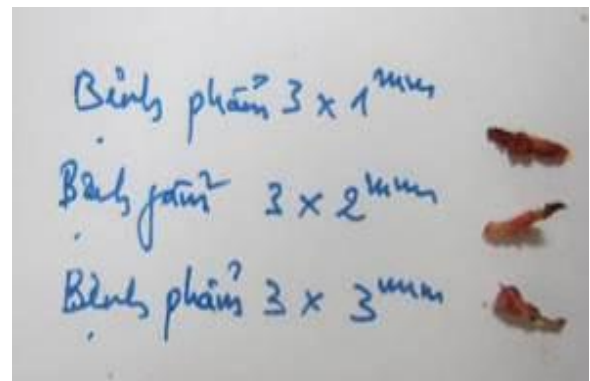
- Xử lý bệnh phẩm: cắt ngang u xác định mô lành và mô ung thư. Chia thành 2 phần: phần cắt lấy u đến rìa u; phần đại diện viền cắt u tại 4 rìa da và đáy u theo các hướng: trên, dưới, phải, trái, đáy u, tổng cộng có 5 khu lấy mẫu bệnh phẩm, mang tính chất đại diện cho diện cắt quanh u. Dùng thước đo tính khoảng cách theo milimet, cắt từng rìa da được đánh dấu theo các hướng thành từng mảnh tính bằng milimet, sát vị trí rìa u ra ngoài theo kích thước 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm và > 5 mm. Vị trí diện cắt u hướng 12 h: đánh số 1, vị trí bên phải: đánh số 2, vị trí 6h đánh số 3, vị trí bên trái: đánh số 4, vị trí đáy u: đánh số 5 (ghi mẫu bệnh phẩm theo số: 1x1mm; 1x2mm...). Thực hiện các diện cắt làm MBH theo quy chuẩn.

- Kiểm tra mẫu diện cắt rìa da trên kính hiển vi: đọc kết quả giải phẫu bệnh theo từng lát cắt lấy được từ diện cắt u ở các mẫu thử đại diện, xác định mức xâm lấn trên vi thể do các bác sỹ của khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện K. Nghiên cứu sẽ đánh giá diện cắt có tế bào UT xa rìa u nhất được coi là diện cắt dương tính xa nhất.



Cắt ngang bệnh phẩm xác định rìa u

Đánh dấu bệnh phẩm: theo các vị trí



Bệnh nhân K, nam 83 tuổi- Mẫu bệnh phẩm UT da má sau phẫu tích



Hình 2.1: Mô tả phẫu tích bệnh phẩm UT da nghiên cứu mức xâm lấn.

2.2.4.3. Nghiên cứu mô bệnh học

Các bệnh phẩm sau khi phẫu tích được cố định trong dung dịch formol 10% đệm trung tính từ 6 giờ đến 48 giờ;

Thẻ tích formol gấp 10 - 15 lần thẻ tích mô;

Thời gian cố định: 6 - 48 giờ;

Với bệnh phẩm có kích thước < 3 mm, thời gian cố định 4-8 giờ.

+ Chuyển bệnh phẩm: làm bệnh phẩm có thể cắt được dễ dàng, bảo quản bệnh phẩm được lâu dài màu không ảnh hưởng đến hình thái, cấu trúc của tế bào và mô.

Phương tiện, hóa chất: Tủ paraffin: 56-58 độ C, Paraffin tinh khiết, Cồn 80, 90, 95, 100; Toluene.

Các bước tiến hành:

- Cồn 80: 2 giờ
- Cồn 90: 6 giờ
- Cồn 95: 8 giờ
- Toluene (I): 4 giờ
- Toluene (II): 8 giờ
- Toluene (III): 8 giờ
- Paraffin (I): 4 giờ
- Paraffin (II): 6 giờ
- Paraffin (III): 10 giờ

+ Bệnh phẩm sau đó được đúc trong paraffin.

- Dùng khuôn kim loại đặt trên mặt phẳng rót paraffin nóng chảy vào khuôn.
- Đặt bệnh phẩm vào khuôn theo mặt phẳng đúng yêu cầu (đặt sát mặt đáy, đúng chiều).
- Gắn casset nhựa lên trên.
- Để nguội bệnh phẩm và gỡ khuôn, đặt vào bàn lạnh.

+ Cắt, nhuộm hematoxylin-eosin, đọc tiêu bản dưới kính hiển vi quang học, chẩn đoán phân loại mô học do các bác sĩ giải phẫu bệnh.

Phân loại UTTB đáy:

- Hình thái nốt hoặc nốt loét.
- Hình thái nông.
- Hình thái xơ.
- Hình thái hỗn hợp.

Phân độ UTTB vảy:

Phân độ biệt hoá theo 4 độ: Năm 1920 Broders tìm ra một phương pháp dễ nhớ để đánh giá khả năng phát triển của UT theo 4 độ ác tính [55]:

- Độ 1: > 75% các tế bào biệt hoá;
- Độ 2: 50%-75% các tế bào biệt hoá;
- Độ 3: 25-50% các tế bào biệt hoá;
- Độ 4: < 25% các tế bào biệt hoá.

2.2.4.4. Đánh giá sự biểu hiện của protein p53 và Ki-67

*** Kỹ thuật nhuộm Hematoxylin – Eosin (HE):**

Cố định bệnh phẩm:

- Sau khi cắt, bệnh phẩm được cố định ngay vào dung dịch Bouin 24 giờ.
- Bệnh phẩm được chuyển, đúc trong Paraffin.
- Các khối nên được cắt có độ dày từ 3-5 mm.

Các bước tiến hành:

- Tẩy nền tiêu bản 2 lần trong toluen, 10 phút/lần.
- Chuyển tiêu bản vào cồn 100°, cồn 95°, cồn 80° trong 2 phút mỗi bể.
- Rửa nước chảy 5 phút.
- Nhuộm nhân trong dung dịch hematoxylin từ 2-5 phút.
- Rửa nước chảy ít nhất 5 phút (kiểm tra dưới kính hiển vi xem nhân nhuộm đã được chưa, nếu nhạt thì nhuộm thêm, ngược lại, nếu sẫm quá thì biệt hóa bằng cồn axit và rửa nước chảy tiếp 5 phút).

- Làm xanh bằng dung dịch natri bicarbonat bão hòa trong 1 phút.
- Rửa nước chảy 5 phút.
- Nhuộm bào tương trong eosin từ 1-3 phút.
- Rửa qua nước.
- Loại phẩm thừa trong cồn 90° trong vài giây.
- Tẩy nước bằng cồn tuyệt đối, làm “trong” bằng toluen, gấn baume.

Đánh giá kết quả:

Các tiêu bản được đọc dưới kính hiển vi quang học với các độ phóng đại khác nhau. Phân loại dựa theo phân loại UTTB đáy và UTTB vảy của WHO.

*** Xét nghiệm hóa mô miễn dịch:**

Nguyên lý: sử dụng kháng thể đơn dòng gắn Biotin chống các phân tử kháng nguyên, phát hiện phức hợp KN-KT bằng stropa, dùng PO kháng Biotin và phát hiện màu DAB.



Hình 2.2: Máy BENCH MARK XT hiệu VENTANA.

Phương pháp nhuộm: Nhuộm HMMD theo phương pháp phức hợp Avidin Biotin tiêu chuẩn (Standard Avidin Biotin Complex Method).

Kháng thể sử dụng:

Bảng 2.1. Các dấu ấn miễn dịch dùng trong nhuộm HMMD

Dấu ấn miễn dịch	Dòng (clone)	Công ty sản xuất	Độ pha loãng
<i>p53</i>	DO-7	Dako	1/100
<i>Ki-67</i>	MIB- 1	Dako	1/50

Kỹ thuật HMMD được thực hiện trên mô đúc khối nền.

Quy trình nhuộm HMMD bằng máy nhuộm tự động như sau:

- + Chuẩn bị tiêu bản: cắt mỏng mẫu mô 3-5 μm rồi đặt vào khay đựng tiêu bản mang điện tích dương.
- + Khởi động máy vi tính, máy nhuộm HMMD tự động;
- + Chạy chương trình cho máy chung đã cài đặt sẵn trong máy;
- + Cài đặt chương trình xử lý và quy trình nhuộm HMMD cho máy;
- + Chọn kháng thể thứ nhất để nhuộm;
- + Khử paraffin bằng dung dịch Ezpred (hóa chất chuyên dụng cho máy);
- + Bộc lộ kháng nguyên bằng dung dịch CC1 ở 95°C , thời gian 30 phút;
- + Phủ kháng thể trên mô với từng loại và tỷ lệ kháng thể thích hợp;
- + Hiện thị màu bằng bộ kit DAB;
- + Sau khi kết thúc quy trình nhuộm, lấy tiêu bản ra và rửa bằng dung dịch xà phòng để loại bỏ lớp dầu LCS phủ trên tiêu bản;
- + Nhuộm nhân bằng hematoxyclin, dán la men;
- + Đọc và phân tích kết quả trên kính hiển vi quang học:

Kiểm chứng dương và kiểm chứng âm:

- Kiểm chứng dương: Sử dụng tiêu bản đã chắc chắn là dương tính p53, Ki-67 làm chứng dương.
- Kiểm chứng âm: Không phủ kháng thể thứ nhất vào tiêu bản đối với tất cả các trường hợp nhuộm tiêu bản chứng âm.

Đọc kết quả: Đánh giá mức độ biểu hiện của protein p53, Ki-67 dựa theo đánh giá tiêu chuẩn của Izumi và CS (2008) [93]:

Âm tính:	< 10 % tế bào u bắt màu;
Dương tính (1+):	Từ 10% - 50% tế bào u bắt màu;
Dương tính (2+):	Từ 51% - 80% tế bào u bắt màu;
Dương tính (3+):	> 80% tế bào u bắt màu.

2.2.4.5. Đánh giá đột biến gen TP53

*** Xét nghiệm giải trình tự gen TP53:**

- Thu thập và bảo quản mẫu nghiên cứu: từ bệnh phẩm đúc paraffin (FFPE) được thu thập và bảo quản ở nhiệt độ phòng, có mã số bệnh nhân theo qui định khoa Giải phẫu bệnh – Tế bào.

Quy trình giải trình tự gen từ mẫu bệnh phẩm đúc paraffin:

- Các mẫu mô paraffin (FFPE) được thu thập và bảo quản ở nhiệt độ phòng.
- Các mẫu mô tươi của UT da, sau khi được sinh thiết được bảo quản trong dung dịch TE, để nhiệt độ -80°C.
- Mỗi mẫu sẽ được đánh mã số nghiên cứu.

Các Exon có tần suất đột biến cao (Exon 5-8 thuộc vùng trung tâm hoạt động của gen TP53) được khuếch đại bằng phản ứng PCR và xác định những biến đổi trên phân tử DNA được xác định bằng phương pháp giải trình tự. Các cặp mồi đặc hiệu cho phản ứng PCR được thiết kế dựa trên trình tự gen TP53 được công bố trên ngân hàng gen (Genbank U94788.1) sử dụng phần mềm thiết kế mồi Primer. Trình tự các cặp mồi được thiết kế khuếch đại đoạn gen TP53 từ exon 5 đến exon 8 được trình bày trong bảng:

Bảng 2.2: Trình tự mỗi

Mỗi	Trình tự 5'-3'	Kích thước sản phẩm
Exon 5	F: GCCGTGTTCCAGTTGCTTTA R: ATAAGATGCTGAGGAGGGGC	368
Exon 6	F: ACAAGCAGTCACAGCACATG R: ACAACCACCCTTAACCCCTC	318
Exon 7	F: AGGAAGGAGAATGGCGTGAA R: GAAATCGGTAAGAGGTGGGC	390
Exon 8	F: GGACCTCTTAACCTGTGGCT R: GCTTCTTGTCTGCTTGCTT	333

Cách thức tiến hành:**a. Chuẩn bị tiêu bản**

- Cắt 10 tiêu bản bệnh phẩm dày 10 μm , 1 tiêu bản nhuộm HE.
- Khoanh vùng tế bào u ở tiêu bản HE, chọn vùng chứa > 70% tế bào u.
- Đánh dấu vùng tế bào u trên các tiêu bản còn lại.

b. Tách chiết DNA sử dụng bộ kit Kappa Express Extract**+ Chuẩn bị dung dịch tách chiết:**

- Kappa express extract buffer: 10 μl
- Kappa express extract enzyme: 2 μl
- Nước tinh khiết: 88 μl

+ Lấy mẫu và thu DNA:

- Sử dụng lưỡi dao mổ cạo lấy phần đã được đánh dấu trên tiêu bản với diện tích khoảng 2 mm^2 .
- Chuyển bệnh phẩm vào ống eppendorf chứa buffer đã chuẩn bị sẵn.
- Vortex đều và ly tâm.
- Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ 75⁰C trong 15 phút, 95⁰C trong 5 phút.

- Vortex nhẹ trong 2-3 giây, ly tâm 14.000 rpm trong 1 phút.
- Dùng pipet hút phần dịch chứa DNA ở phía trên và chuyển ống mới.
- Đo nồng độ DNA bằng máy đo Bio Drop:
 - Chọn chế độ đo Ds DNA.
 - Cân bằng (blank) máy đo bằng 2 ml TE hoặc H₂O.
 - Lau khô về mặt cảm ứng bằng giấy không bụi.
 - Đo nồng độ 2 μ l DNA: kết quả hiển thị trên máy với 2 thông số là nồng độ DNA và chỉ số tinh sạch 260/280 nm.
- Bảo quản dung dịch chứa DNA ở -20 độ C, dung dịch chứa DNA được sử dụng cho phản ứng khuếch đại gen quan tâm.
- + Phản ứng PCR với bộ kit KAPA2G Robust HotStart ReadyMix và kiểm tra kết quả.



Hình 2.3: Máy tách mẫu LabGard Class II, Biological Safety Cabinets

- **Thành phần phản ứng:** Thành phần phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen *TP53* được trình bày ở bảng:

Bảng 2.3: Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (ul)
KAPA2G Robust HotStart ReadyMix	12.5
Mồi xuôi	1.25
Mồi ngược	1.25
DNA mẫu	~ 1µl (10-100 ng)
Nước	9 µl

- **Chu trình nhiệt:** Phản ứng PCR được thực hiện trên hệ thống Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR qua bảng:

Bảng 2.4: Chu trình nhiệt phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ (độ C)	Thời gian	Số chu kỳ
<i>Biến tính chung</i>	95	1-3 phút	1
<i>Biến tính</i>	95	10-15 giây	30-45
<i>Gắn mồi</i>	55-65	10-15 giây	
<i>Kéo dài chuỗi</i>	72	10-15 giây	
<i>Kéo dài cuối cùng</i>	72	1-10 phút	1
<i>Làm mát</i>	4-10	---	1

- Kiểm tra kết quả PCR

+ Kiểm tra kết quả PCR bằng chạy điện di trên gel Agarose 1% hoặc trên gel Polyacrylamide 5% (nồng độ Gel phụ thuộc kích thước đoạn DNA được nhân lên. Đoạn trình tự khuếch đại có kích thước càng ngắn thì nồng độ gel càng cao). Các bước tiến hành điện di Agarose:

- Cân 0,5 g Agarose hòa tan trong 50 ml TAE.
- Đun sôi 2-3 phút trong lò vi sóng.
- Thêm 5 µl dung dịch gel Red.
- Đổ dung dịch vào khay tạo giếng, sau đó để nguội 30 phút.

- Viết sơ đồ các mẫu DNA điện di.
 - Đặt khay điện di vào hồ điện di.
 - Lấy 10 µl DNA trộn với 2 ml Bromphenol blue.
 - Nhỏ dung dịch đã trộn vào giếng theo sơ đồ.
 - Điện di với hiệu điện thế 100V trong 40 phút.
- + Chụp ảnh gel xác định kích thước DNA.



Hình 2.4: Hệ thống UPV chụp ảnh gel, xác định kích thước DNA

+ Tinh sạch sản phẩm PCR sử dụng bộ Kit DNA clear & concentrator – 5 (Zymo research):

- Chuẩn bị cột tinh sạch.
- Trộn sản phẩm PCR với dung dịch gắn (binding buffer), tỷ lệ 1:5.
- Chuyển hỗn hợp dung dịch lên cột tinh sạch.
- Ly tâm 14.000 vòng trong 30 giây. Loại bỏ phần dung dịch.
- Thêm 200 µl dung dịch rửa, li tâm thêm 14.000 vòng trong 30 giây (lặp lại 2 lần).
- Đặt cột tinh sạch vào 1 ống nghiệm 1,5 ml mới.
- Thêm 20 µl dung dịch đẩy (elution buffer).
- Li tâm 14.000 vòng trong 30 giây.
- Đo nồng độ DNA thu được.

+ Sản phẩm PCR đặc hiệu của một đoạn DNA sau khi tinh sạch được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với các nucleotide gắn màu huỳnh quang (BigDye Terminator kit) có thể được nhận dạng bởi máy giải trình tự.

- Phản ứng PCR giải trình tự

+ Sản phẩm PCR khuếch đại trình tự DNA exon từ 5 đến 8 của gen *TP53* sau khi được kiểm tra bằng phương pháp điện di sẽ được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với các dNTP đánh dấu huỳnh quang. Các dNTP mang các màu khác nhau sẽ được phát hiện nhờ một thiết bị Laser trong quá trình giải trình tự.

+ Xác định nồng độ DNA khuôn sau khi tinh sạch sản phẩm PCR.

+ Pha loãng sản phẩm về nồng độ chuẩn 10 ng/μl.

+ Tiến hành PCR với thành phần phản ứng:

Bảng 2.5: Thành phần phản ứng

Thành phần	Thể tích (μl)
BigDye Terminator Mix	4
5x sequencing buffer	2
Mỗi F (hoặc R) 4umol/ul	1
DNA mẫu	~ 1 μl (10 ng)
Nước	12

- Tinh sạch sản phẩm và chạy giải trình tự:

Sản phẩm PCR sau khi chạy Bigdye được tinh sạch với bộ kit ZR Sequencing Clear-up kit với các bước thực hiện như sau:

+ Cho thêm 240μl dung dịch Binding Buffer vào 5-20 μl sản phẩm PCR.

+ Chuyển hỗn hợp qua cột tinh sạch.

+ Ly tâm với tốc độ 10.000 vòng trong 30 giây.

+ Thêm vào cột 300 μl dung dịch rửa.

+ Ly tâm với tốc độ 10.000 vòng trong 30 giây.

- + Thêm 10-50 μ l nước hoặc Hidi-formamide vào cột.
- + Chuyển cột qua ống Eppendorf mới.
- + Ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/ 30 giây, được sản phẩm tinh sạch.
- + Lấy 10 μ l sản phẩm tinh sạch biến tính ở 95°C trong 5 phút sau đó cho ngay vào đá lạnh 1 phút.
- + Chuyển sản phẩm tinh sạch qua đĩa chuyên dụng cho máy giải trình tự.
- + Chạy giải trình tự và so sánh kết quả mẫu DNA chuẩn của GeneBank.

Bảng 2.6: Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR giải trình tự:

Bước	Nhiệt độ (độ C)	Thời gian	Số chu kỳ
Biến tính chung	95	3 phút	1
Biến tính	95	30 giây	25
gắn mồi	55	1 phút	
Kéo dài chuỗi	72	4 phút	
Làm mát	4-10	---	1

+ Xác định trình tự gen *TP53* được thực hiện trên máy ABI PRISM Genetic Analyzer. Các thông số, chất lượng được thu thập, kiểm tra bằng phần mềm ABI Data Collection v2.0 và Sequencing Software v5.3. Trình tự gen *TP53* của mẫu UT được so sánh với trình tự tham chiếu công bố trên GenBank qua sử dụng phần mềm BioEdit để xác định đột biến.



Hình 2.5: Máy xác định trình tự gen ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

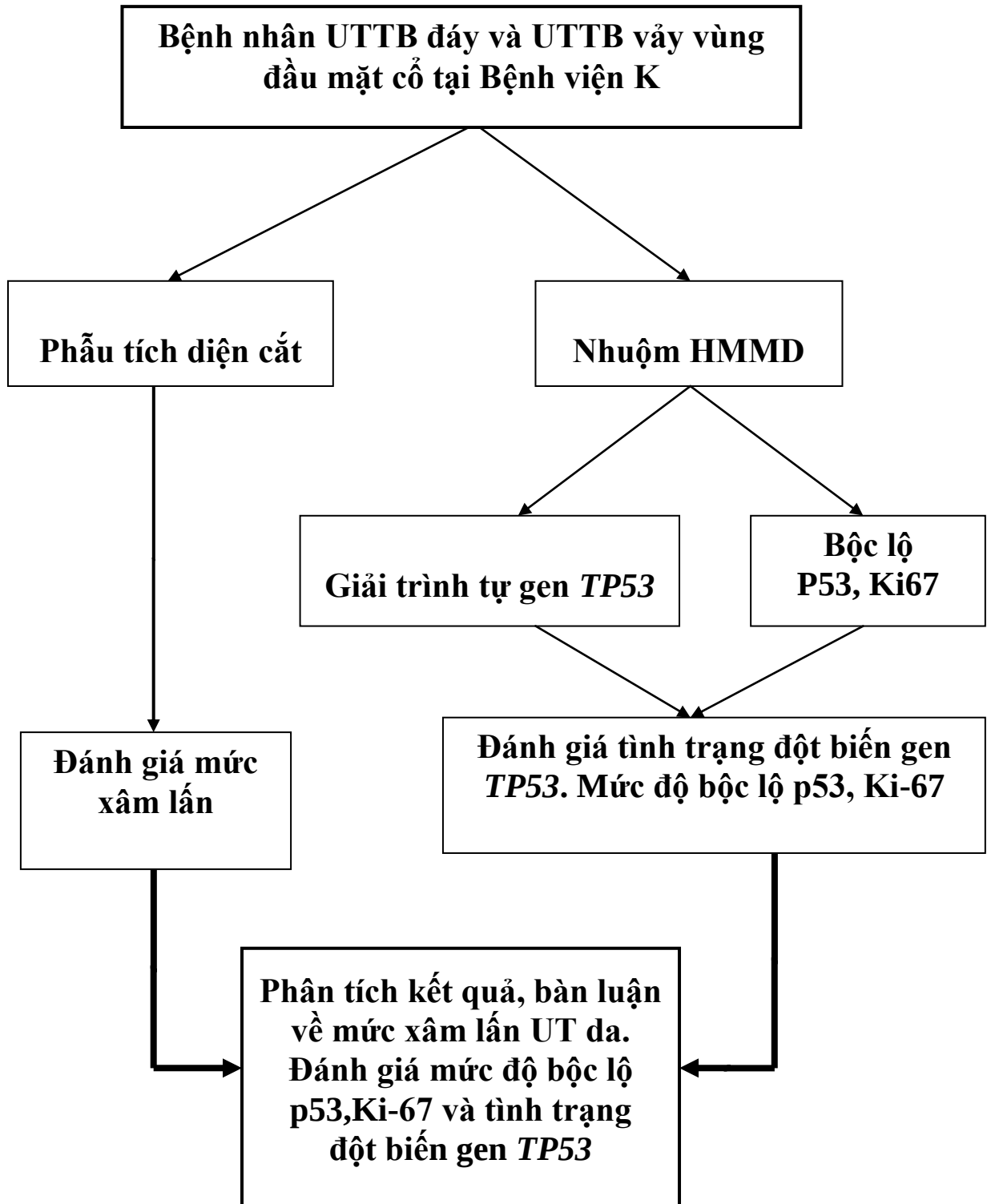
2.3. XỬ LÝ SỐ LIỆU

- Các bệnh nhân đều được đăng ký thông tin vào các cơ sở dữ liệu mã hóa tại bệnh án nghiên cứu.
- Xử lý các dữ liệu bằng phần mềm Epidata 3.1 và SPSS 16.0.
- Các biến số nghiên cứu được tính toán và trình bày bằng các bảng hoặc biểu đồ.
- Số liệu được trình bày dưới dạng số lượng và tỷ lệ.
- Mỗi liên quan giữa các biến số được tính toán bằng thuật toán kiểm định giả thuyết χ^2 .
- Các test thống kê được kiểm định có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

2.4. KHÍA CẠNH ĐẠO ĐỨC CỦA ĐỀ TÀI

- Nghiên cứu được sự chấp nhận của Hội đồng chấm đề cương nghiên cứu sinh của Trường Đại học Y Hà Nội.
- Người bệnh được tư vấn đầy đủ, đồng ý khi tham gia nghiên cứu.
- Kết quả nghiên cứu chỉ nhằm nâng cao hiệu quả điều trị cho bệnh nhân và được phục vụ cho công tác điều trị cũng như áp dụng kết quả trong nghiên cứu, đánh giá bệnh và các phương pháp phòng ngừa bệnh UT da.
- Các thông tin của người bệnh tham gia nghiên cứu được giữ bảo mật, được mã hóa trên máy vi tính trong quá trình xử lý số liệu.

SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu 71 trường hợp UTTB đáy và UTTB vảy được khám lâm sàng, điều trị phẫu thuật, xét nghiệm MBH, xác định mức xâm lấn, HMMD với p53 và Ki-67, có 51 bệnh nhân được làm xét nghiệm giải trình tự xác định tình trạng đột biến gen *TP53*. Chúng tôi thu được các kết quả như sau:

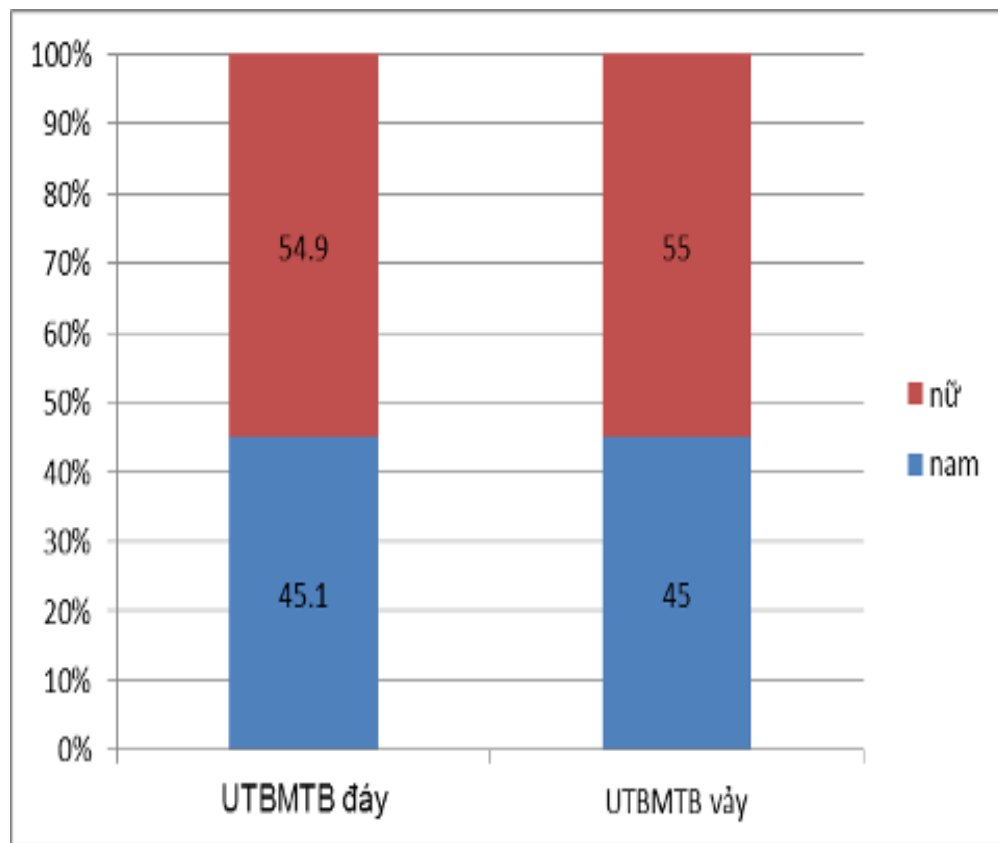
3.1. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG

3.1.1. Tuổi và giới tính

Bảng 3.1: Phân bố bệnh nhân theo nhóm tuổi

MBH Tuổi	UTTB đáy		UTTB vảy		Tổng số		p
	n	%	n	%	n	%	
< 40	1	2,0	0	0	1	1,4	0,34
40-49	6	11,8	2	10,0	8	11,3	
50-59	8	15,7	5	25,0	13	18,3	
60-69	16	31,4	2	10,0	18	25,4	
≥70	20	39,2	11	55,0	31	43,7	
Tổng	51	71,8	20	28,2	71	100,0	
$X \pm sd$	64,71 ± 12,44		70,35 ± 12,75		66, 38± 12,72		0,097
Min - Max	38 – 85		48 – 92		38 – 92		

Nhận xét: Nhóm tuổi > 70 chiếm tỷ lệ cao nhất 43,7%, tiếp theo là độ tuổi 60-69 chiếm 25,4% và thấp nhất là độ tuổi dưới 40, chiếm 1,4%, tuổi trung bình là 66,4. Sự khác biệt về tuổi giữa UTTB đáy và UTTB vảy không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Tuổi trung bình giữa hai nhóm cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p>0,05$).



Biểu đồ 3.1: Phân bố bệnh nhân theo giới

Nhận xét: Bảng trên cho thấy, nữ chiếm tỷ lệ 54,9%; nam chiếm tỷ lệ 45,1%.

3.1.2. Tỷ lệ của UTB đáy và UTB vảy

Bảng 3.2: Tỷ lệ UTB đáy và UTB vảy

Mô bệnh học	n	Tỷ lệ %
UTB đáy	51	71,8
UTB vảy	20	28,2
Tổng số	71	100,0

Nhận xét: Vùng da đầu cổ, tỷ lệ UTB đáy là 71,8%, cao hơn UTB vảy là 28,2%.

3.1.3. Vị trí tổn thương

Bảng 3.3: Phân bố theo vị trí tổn thương

Vị trí u	UTTB đáy		UTTB vảy		p
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	
Vùng má	8	15,7	3	15,0	1,00
Vùng mũi	12	23,5	5	25,0	1,00
Vùng mũi má	8	15,7	0	0	
Vùng trán	1	2,0	3	15,0	0,12
Quanh mắt	14	27,5	2	10,0	0,21
Vùng cằm	1	2,0	0	0	
Vùng Thái dương	5	9,8	5	25,0	0,20
Vùng đầu	0	0	2	10,0	
Vành tai	1	2,0	0	0	
Trước tai	1	2,0	0	0	
Tổng số	51	71,8	20	28,2	0,034

Nhận xét: UTTB đáy gặp ở vị trí vùng quanh mắt là phổ biến nhất (27,5%). UTTB vảy hay gặp ở vị trí mũi (25%). Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa vị trí u của UTTB đáy và UTTB vảy theo kiểm định Khi bình phương ($\chi^2=18,06$; $p=0,034$).

3.1.4. Kích thước u

Bảng 3.4: Phân bố kích thước u

Kích thước u	UTTB đáy		UTTB vảy		p
	n	%	n	%	
<i>Nhỏ hơn 1 cm</i>	6	11,8	2	10	1,00
<i>1 – 2 cm</i>	28	54,9	11	55	1,00
<i>2 – 4 cm</i>	15	29,4	7	35	0,86
<i>Lớn hơn 4 cm</i>	2	3,9	0	0	
<i>$X \pm sd$</i>	2,21 $\pm$ 1,13		2,09 $\pm$ 0,95		0,66
<i>Min – max</i>	0,7 – 6,0		0,5 – 4,0		
<i>Tổng</i>	51	71,8%	20	28,2%	0,81

Nhận xét: U kích thước nhỏ hơn 1 cm có tỷ lệ ở UTTB đáy (11,8%) cao hơn UTTB vảy (10%); U có kích thước lớn hơn 4 cm chỉ có 2 trường hợp ở UTTB đáy, không có trường hợp nào gặp ở UTTB vảy. Kích thước trung bình của UTTB đáy (2,21 cm) lớn hơn so với UTTB vảy (2,09 cm). Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.5. Tính chất u

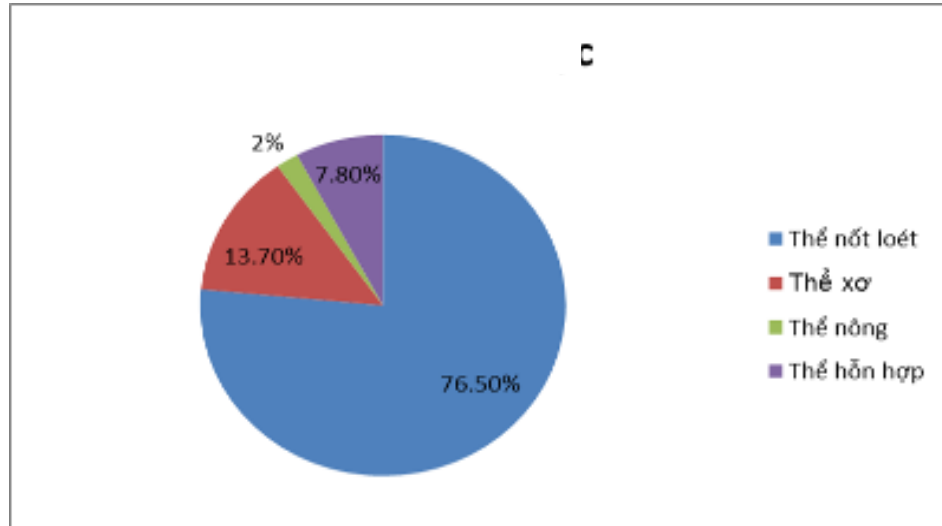
Bảng 3.5: Phân bố theo tính chất u

Tính chất u	UTTB đáy		UTTB vảy	
	n	%	n	%
<i>Có bờ, ranh giới</i>	36	70,6	10	50,0
<i>Thâm nhiễm</i>	17	33,3	6	30,0
<i>Sùi loét</i>	41	80,4	15	75,0
<i>Chảy dịch, máu</i>	7	13,7	3	15,0

Nhận xét: Biểu hiện lâm sàng của UTTB đáy chủ yếu là sùi loét: 80,4%; ranh giới rõ: 70,61%; thâm nhiễm: 33,3% và chảy dịch, máu: 13,7%. Tỷ lệ này ở UTTB vảy lần lượt là 75%; 50%; 30% và 15%.

3.2. ĐẶC ĐIỂM MÔ BỆNH HỌC

3.2.1. Phân loại hình thái học UTTB đáy

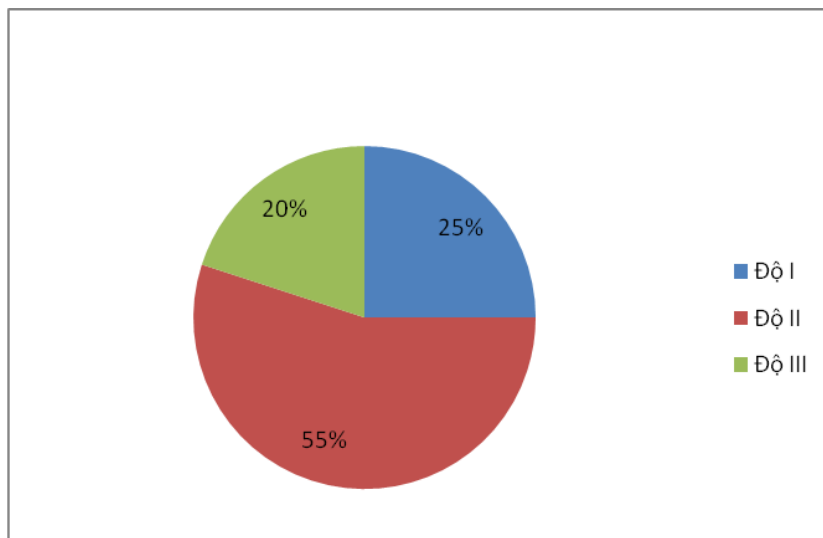


Biểu đồ 3.2: Hình thái học của UTTB đáy

Nhận xét: UTTB đáy gặp nhiều nhất ở thể nốt/loét: 39 BN chiếm 76,5%.

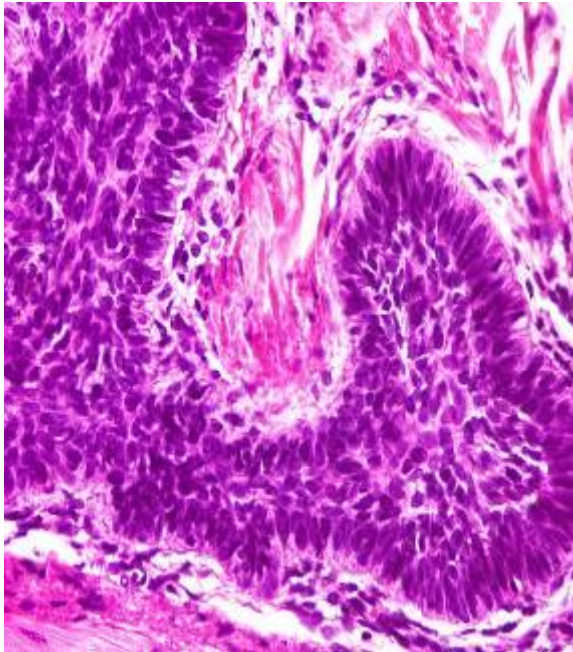
Thể nông chỉ có 1 trường hợp chiếm 2%.

3.2.2. Phân độ mô học UTTB vảy

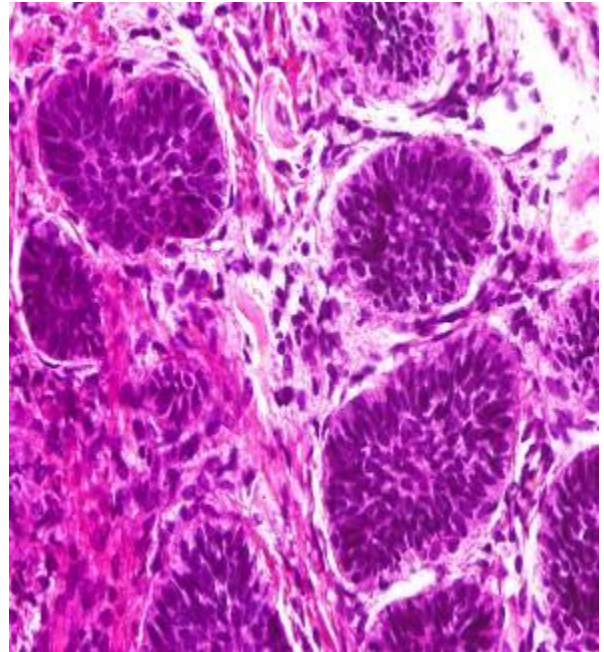


Biểu đồ 3.3: Độ mô học của UTTB vảy

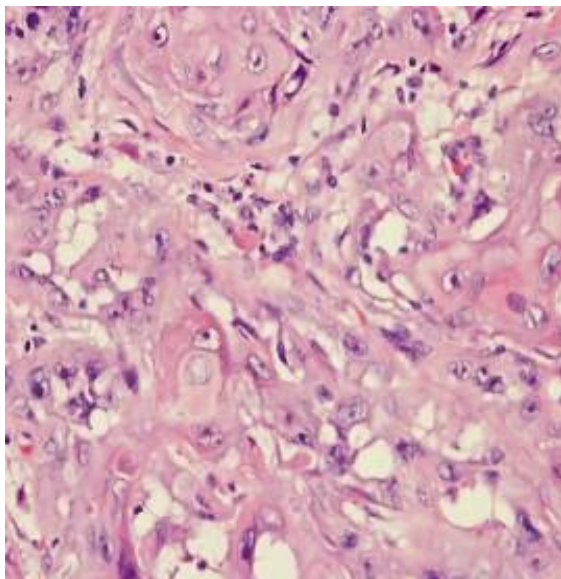
Nhận xét: UTTB vảy gặp nhiều ở độ I và II với tỷ lệ 80%. Độ III ít gặp hơn, có 4 bệnh nhân chiếm 20%, không có bệnh nhân nào ở độ IV.



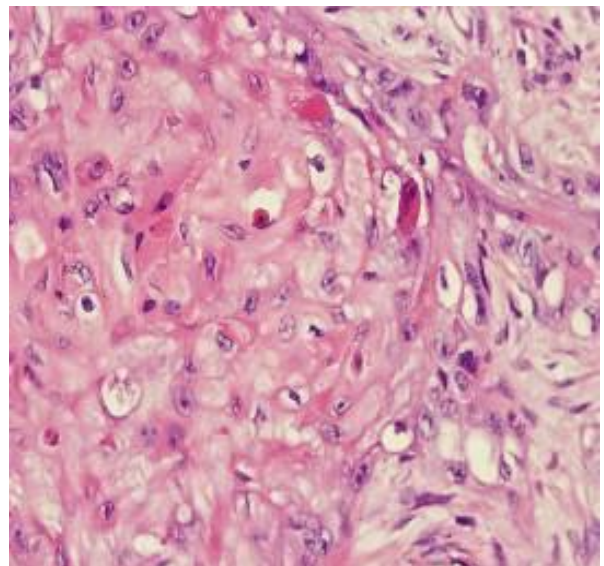
BN Nguyễn Văn T - UTTB đáy
Số GPBL: 12-13884



BN Triệu Văn H - UTTB đáy
Số GPBL:12-19148



BN Ngô Thị T - UTTB vảy
Số GPBL: 13-24776



BN Lê Thị B - UTTB vảy
Số GPBL:13-46040

Hình 3.1: Tiêu bản nhuộm H.E x 400 lần ở UTTB đáy và UTTB vảy

3.3. ĐÁNH GIÁ MỨC XÂM LẤN CỦA UT DA

3.3.1. Khoảng cách tới rìa u

Bảng 3.6: Khoảng cách tới rìa u

Khoảng cách tới rìa u	UTTB đáy		UTTB vảy		p
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	
2-3mm	6	11,8	0	0	
4-5mm	35	68,6	10	50	0,23
6-7mm	6	11,8	2	10,0	1,00
8-9mm	2	3,9	1	5,0	1,00
>10mm	2	3,9	7	35,0	0,002
$\bar{X} \pm sd$	5,1 $\pm$ 1,57		7,5 $\pm$ 3,76		0,011
Tổng số	51	71,8	20	28,2	0,007

Nhận xét: Mức xâm lấn cách rìa u 4-5 mm của cả 2 loại UT chiếm tỷ lệ cao nhất: 68,6% ở UTTB đáy và 50% ở UTTB vảy. Khi so sánh mức xâm lấn giữa 2 loại UT thì chỉ ở mức cách mép u lớn hơn 10 mm mới thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trung bình mức xâm lấn ở 2 loại UTTB đáy (5,1 mm) và UTTB vảy (7,5 mm) có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.3.2. Liên quan giữa diện cắt dương tính với thể GPBL

Bảng 3.7: Mối liên quan giữa diện cắt dương tính xa nhất và thể GPBL

Thể GPBL	Diện cắt dương tính xa nhất (mm)						Tổng
	1 mm	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	6 mm	
UTTB đáy	1 (2%)	10 (19,6%)	21 (41,2%)	14 (27,5%)	5 (9,8%)	0	51 (71,8%)
UTTB vảy	-	1 (5%)	4 (20%)	9 (45%)	5 (25%)	1 (5%)	20 (28,2%)
Tổng	1 (1,4%)	11 (15,5%)	25 (35,2%)	23 (32,4%)	10 (14,1%)	1(1,4%)	71 (100%)

Nhận xét : Các trường hợp UTTB đáy, diện cắt dương tính xa nhất 3 mm chiếm tỷ lệ cao nhất (41,2%), mức 4 mm (27,5%) và 5 mm (9,8%). Đối với UTTB vảy, diện cắt dương tính xa nhất 4 mm (45%). Mối tương quan giữa diện cắt dương tính xa nhất và thể GPBL không có ý nghĩa thống kê ($\chi^2=10,472$; $p=0,063$).

3.3.3. Diện cắt dương tính ở các hình thái UTTB đáy

Bảng 3.8: Đối chiếu diện cắt dương tính xa nhất với các thể lâm sàng UTTB đáy

Hình thái UTTB đáy	Diện cắt dương tính xa nhất (mm)					Tổng
	1 mm	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	
<i>Thể nốt/loét</i>	1 (2,6%)	7 (17,9%)	15 (38,5%)	12 (30,8%)	4 (10,3%)	39 (76,5%)
<i>Thể xơ</i>	-	1 (14,3%)	3 (42,9%)	2 (28,6%)	1 (14,3%)	7 (13,7)
<i>Thể nông</i>	-	-	1 (100%)	0	0	1 (2%)
<i>Thể hỗn hợp</i>	-	2 (50%)	2 (50%)	0	0	4 (7,8%)
Tổng	1 (2%)	10 (19,6%)	21 (41,2%)	14 (27,5%)	5 (9,8%)	51 (100%)

Nhận xét: Bảng trên cho thấy thể nốt loét và thể xơ có tỷ lệ diện cắt dương tính cách rìa u 5 mm cao nhất. Thể nông chỉ có 1 trường hợp dương tính ở cách 3 mm và thể hỗn hợp có 2 trường hợp dương tính ở cách 3 mm và 2 trường hợp 4 mm.

3.3.4. Diện cắt dương tính ở các độ mô học UTTB vảy

Bảng 3.9: Đối chiếu diện cắt dương tính xa nhất với độ mô học UTTB vảy

Độ mô học	Diện cắt dương tính xa nhất (mm)						Tổng
	1 mm	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	6mm	
Độ I	-	-	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	0	5 (25%)
Độ II	-	1 (9,1%)	1 (9,1%)	5 (45,5%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	11 (55%)
Độ III	-	0	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	0	4 (20%)
Tổng	-	1 (5%)	4 (20%)	9 (45%)	5 (25%)	1 (5%)	20 (100%)

Nhận xét : UTTB vảy trong nghiên cứu đều có diện cắt dương tính xa nhất lớn hơn 1 mm. Ở độ biệt hóa I, diện cắt dương tính 3 mm và 4 mm chiếm tỷ lệ cao (40%). Đối với độ biệt hóa II và III, diện cắt dương tính 4 mm chiếm tỷ lệ cao nhất (45,5% và 50%). Diện cắt dương tính 6 mm chiếm 9,1% ở độ biệt hóa II.

3.3.5. Diện cắt dương tính ở các vị trí u

Bảng 3.10: Đối chiếu diện cắt dương tính xa nhất với vị trí u

Vị trí u	Diện cắt dương tính xa nhất						Tổng
	1 mm	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	6mm	
Má	-	1 (9,1%)	3 (27,3%)	3 (27,3%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	11 (15,5%)
Mũi	1 (5,9%)	6 (35,3%)	5 (29,4%)	3 (17,6%)	2 (11,8%)	0	17 (23,9%)
Mũi má	-	1 (12,5%)	3 (37,5%)	4 (50%)	0	0	8 (11,3%)
Trán	-	-	3 (75%)	1 (25%)	0	0	4 (5,6%)
Quanh mắt	-	2 (12,5%)	7 (43,8%)	6 (37,5%)	1 (6,2%)	0	16 (22,5%)
Môi	-	1 (100%)	0	0	0	0	1 (1,4%)
Thái dương	-	-	2 (20%)	5 (50%)	3 (30%)	0	10 (14,1%)
Đầu	-	-	-	1 (50%)	1 (50%)	0	2 (2,8%)
Vành tai	-	-	1 (100%)	0	0	0	1 (1,4%)
Trước tai	-	-	1 (100%)	0	0	0	1 (1,4%)
Tổng	1 (1,4%)	11 (15,5%)	25 (35,2%)	23 (32,4%)	10 (14,1%)	1 (1,4%)	71 (100%)

Nhận xét : Diện cắt dương tính xa nhất là 3 mm và 4 mm chiếm tỷ lệ cao ở nhiều vị trí u. U vùng đầu xuất hiện 2 khối, có diện cắt dương tính xa nhất là 4 mm và 5 mm. Diện cắt 6 mm có 1 trường hợp u ở má

3.3.6. Diện cắt dương tính ở các kích thước u

Bảng 3.11: Diện cắt dương tính xa nhất với các kích thước u

Kích thước u	Diện cắt dương tính xa nhất						Tổng
	1 mm	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	6mm	
< 1cm	-	1 (12,5%)	4 (50%)	3 (37,5%)	0	0	8 (11,3%)
1-2cm	1 (2,6%)	9 (23,1%)	15 (38,5%)	9 (23,1%)	5 (12,8%)	0	39 (54,9%)
2-4cm	-	1 (4,5%)	6 (27,3%)	10 (45,5%)	4 (18,2%)	1 (4,5%)	22 (31%)
>4cm	-	-	-	1 (50%)	1 (50%)	0	2 (2,8%)
Tổng	1 (1,4%)	11 (15,5%)	25 (35,2%)	23 (32,4%)	9 (12,7%)	1 (1,4%)	71 (100%)

Nhận xét: Bảng trên cho thấy với những u < 4 cm, tỷ lệ dương tính cao gặp ở các diện cắt 3 mm và 4 mm, có 1 trường hợp dương tính ở diện cắt 6 mm.

3.3.7. Liên quan xâm lấn diện đáy u

Bảng 3.12: Mức xâm lấn của đáy u với thể GPBL

Loại UTTB Diện đáy	UTTB đáy		UTTB vảy		Tổng	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Âm tính	6	11,8	3	15	9	12,7
1 mm	39	76,5	16	80	55	77,5
2 mm	3	5,9	0	0	3	4,2
3 mm	2	3,9	1	5	3	4,2
4 mm	1	2	0	0	1	1,4
Tổng	51	71,8	20	28,2	71	100,0

Nhận xét : Mức xâm lấn của đáy u chủ yếu ở kích thước 1 mm (77,5%), trong đó chiếm 76,5% UTTB đáy và 80% UTTB vảy. Mức độ lan của đáy u to nhất là 4 mm của 1 bệnh nhân UTTB đáy. Kiểm định khi bình phương cho ta thấy không có mối liên quan có ý nghĩa giữa mức độ xâm lấn của đáy u với UTTB đáy và vảy ($\chi^2=1,75$; $p=0,78$).

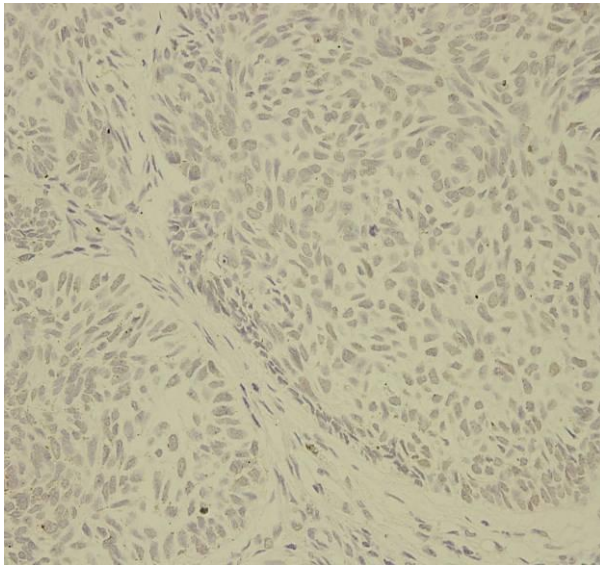
3.4. KẾT QUẢ NHUỘM HMMD VỚI P53 VÀ KI-67

3.4.1. Liên quan giữa mức độ dương tính p53 và Ki-67 với thể GPBL

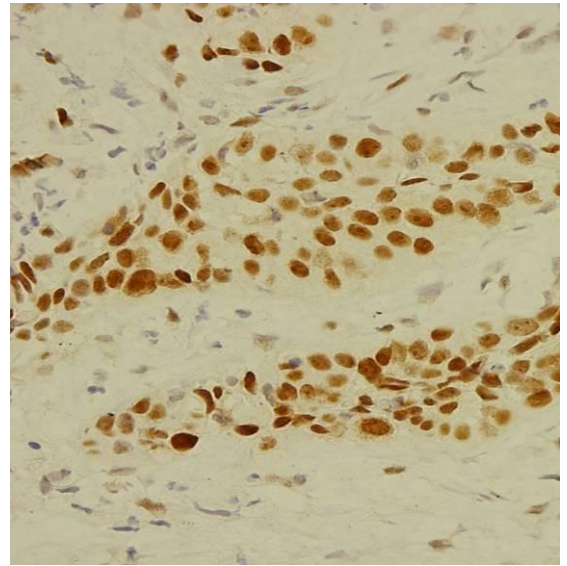
Bảng 3.13: Mối liên quan giữa mức độ dương tính p53 với thể GPBL

Loại u	Âm tính		Dương tính						Tổng số		p
			1+		2+		3+				
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
UTTB đáy	2	3,9	30	58,8	14	27,5	5	9,8	51	100	0,001
UTTB vảy	7	35,0	5	25,0	3	15,0	5	25,0	20	100	
Tổng số	9	12,7	35	49,3	17	23,9	10	14,1	71	100	

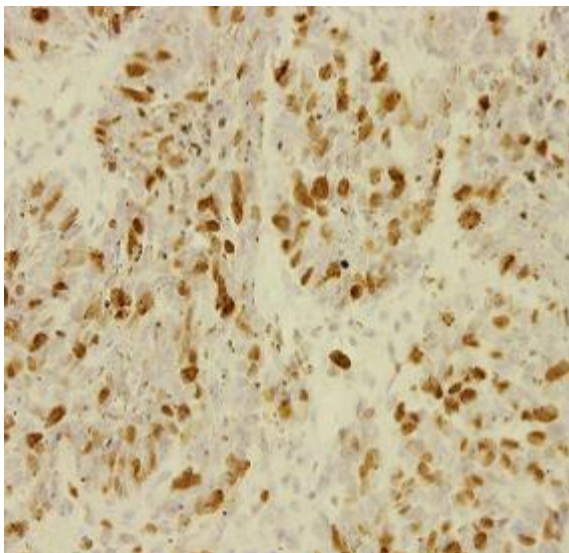
Nhận xét : Tỷ lệ p53 dương tính 1+; 2+ và 3+ ở UTTB đáy lần lượt là 58,8%; 27,5% và 9,8%. Đối với UTTB vảy, tỷ lệ này lần lượt là 25%; 15% và 25%. Tỷ lệ dương tính chung ở UTTB đáy là 96,1%, cao hơn so với UTTB vảy là 65%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($\chi^2=17,57$; $p=0,001$).



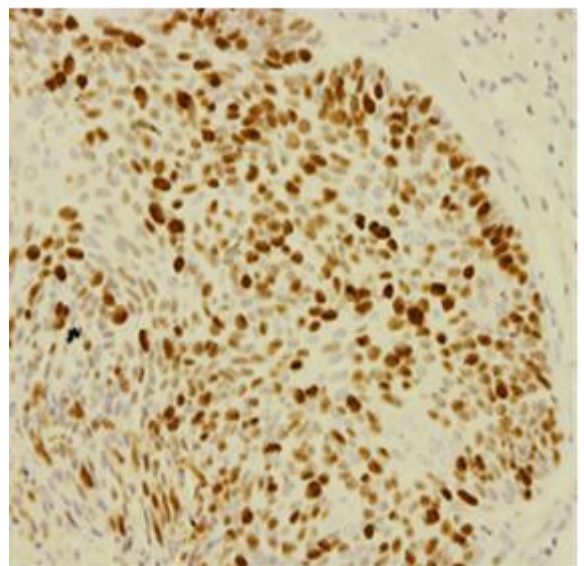
BN Vũ Thị H – UTTB đáy;
Nhuộm HMMD p53 (+) < 1%;
Số GPBL:13-28764;



BN Dương Thị N – UTTB đáy
Nhuộm HMMD p53 (1+)
Số GPBL:12-11457

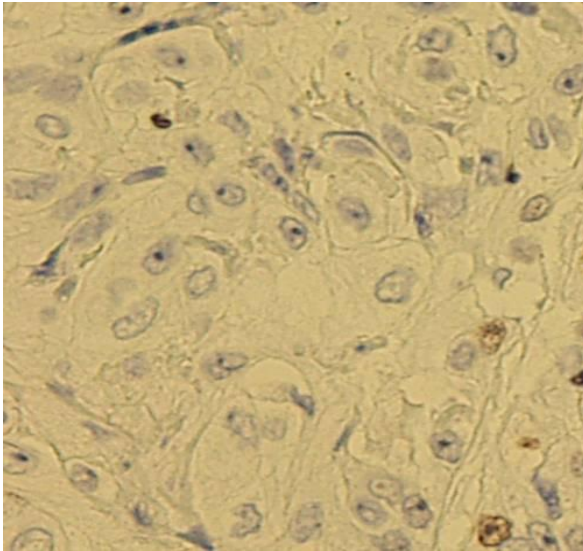


BN Lê Xuân T - UTTB đáy
Nhuộm HMMD p53 (2+)
Số GPBL:12-19149

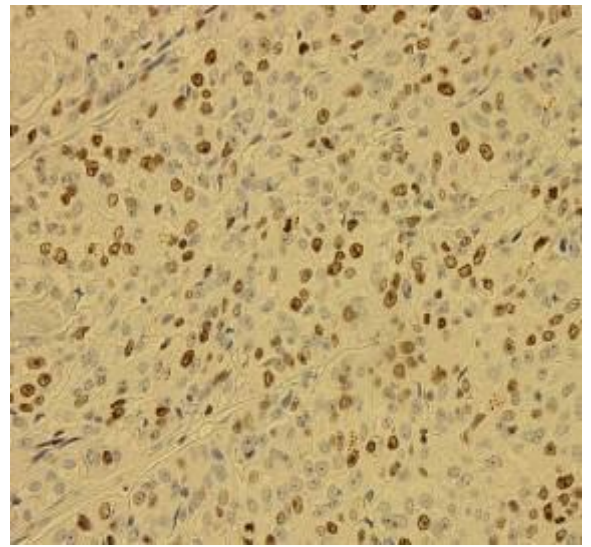


BN Đặng Thị L - UTTB đáy
Nhuộm HMMD p53 (3+)
Số GPBL:12-11251.

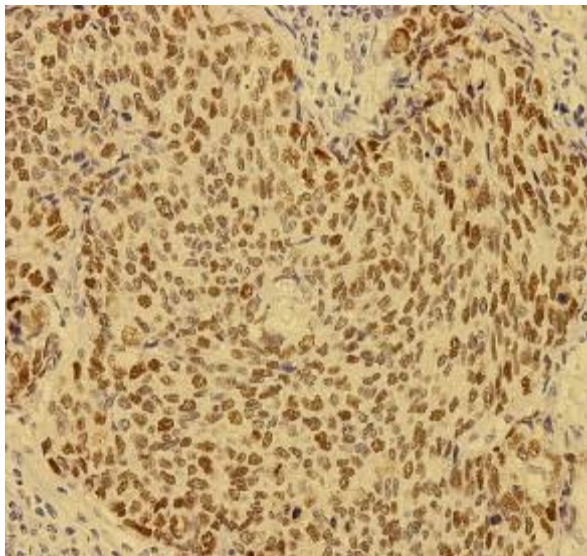
Hình 3.2: Hình ảnh nhuộm HMMD với p53 x 400 trong UTTB đáy



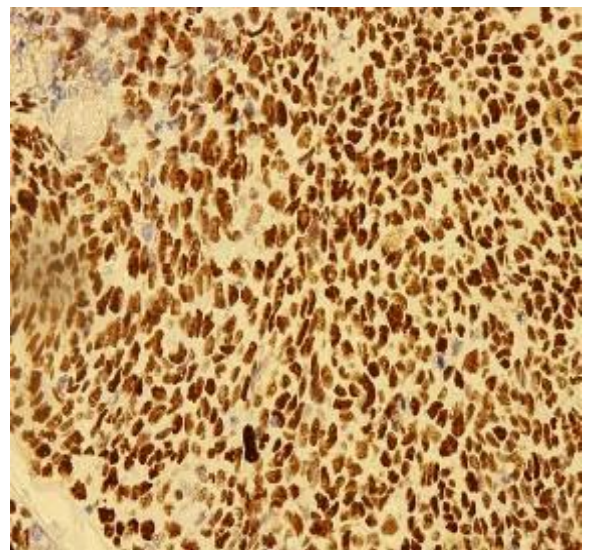
BN Nguyễn Thị X - UTTB vảy
 Nhuộm HMMD p53 (+) < 1%
 Số GPBL: 12-03219



BN Bùi Thị S - UTTB vảy
 Nhuộm HMMD p53 (1+)
 Số GPBL:13-43165



BN Nguyễn Thị T - UTTB vảy
 Nhuộm HMMD p53 (2+)
 Số GPBL: 12-13569



BN Nguyễn Thị N – UTTB vảy
 Nhuộm HMMD p53 (3+)
 Số GPBL:13-40461

Hình 3.3: Hình ảnh nhuộm HMMD với p53 x 400 trong UTTB vảy

Bảng 3.14: Mối liên quan giữa mức độ dương tính Ki-67 với thể GPBL

Loại u	Âm tính		Dương tính						Tổng số		p
			1+		2+		3+				
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<i>UTTB đáy</i>	8	15,7	26	51,0	8	15,7	9	17,6	51	100	0,002
<i>UTTB vảy</i>	0	0	6	30,0	12	60,0	2	10,0	20	100	
Tổng số	8	11,3	32	45,1	20	28,2	11	15,5	71	100	

Nhận xét : Tỷ lệ Ki-67 dương tính 1+; 2+ và 3+ ở UTTB đáy là 51%; 15,7% và 17,6%. Đối với UTTB vảy, tỷ lệ này lần lượt là 30%; 60% và 10%. Tỷ lệ dương tính chung ở UTTB đáy là 84,3%, thấp hơn so với UTTB vảy là 100%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($\chi^2=15,1$; $p=0,002$).

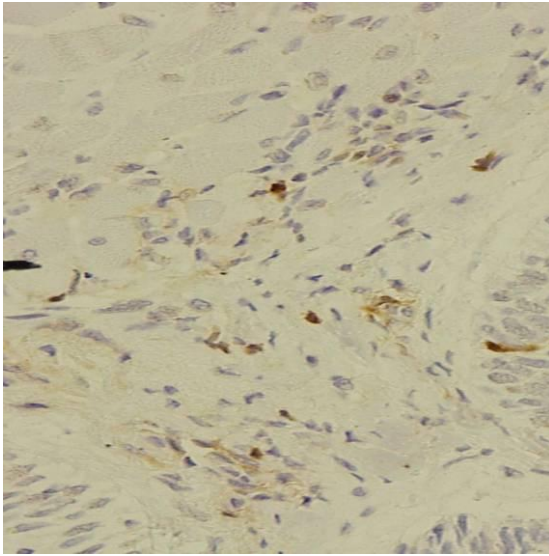
3.4.2. Đối chiếu bậc độ p53, Ki-67 với thể lâm sàng UTTB đáy

Bảng 3.15: Đối chiếu bậc độ p53 và Ki-67 với thể lâm sàng UTTB đáy

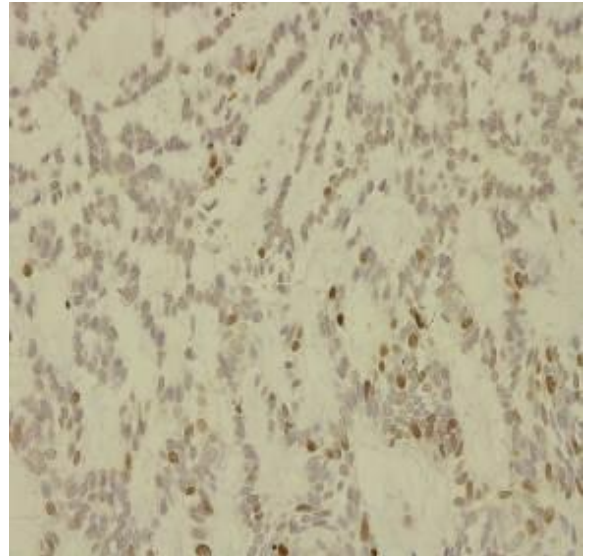
Hình thái lâm sàng	P53		Ki-67	
	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính
<i>Thể nốt/ loét</i>	38 (97,4%)	1 (2,6%)	33 (84,6%)	6 (15,4%)
<i>Thể xơ</i>	7 (100%)	0	5 (71,4%)	2 (28,6%)
<i>Thể nông</i>	1 (100,0%)	0	1 (100%)	0
<i>Thể hỗn hợp</i>	3 (75%)	1 (25%)	4 (100%)	0
Tổng số	49 (96,1%)	2 (3,9%)	43 (84,3%)	8 (15,7%)

Nhận xét: Đối với p53 chỉ có 1 trường hợp âm tính ở thể nốt loét và 1 trường hợp ở thể hỗn hợp, còn lại là dương tính.

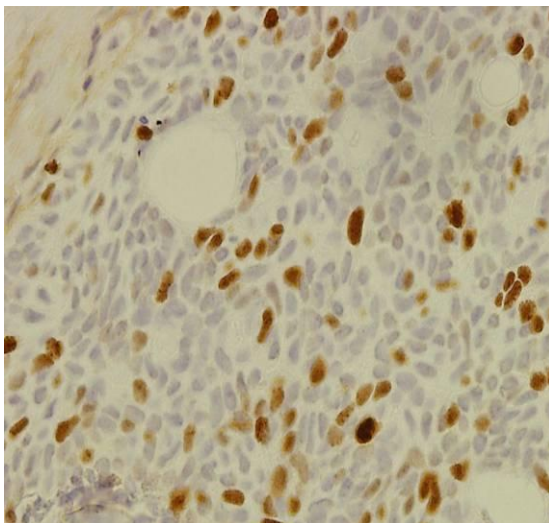
Đối với Ki-67 có 6 trường hợp âm tính ở thể nốt loét và thể xơ, còn lại là dương tính.



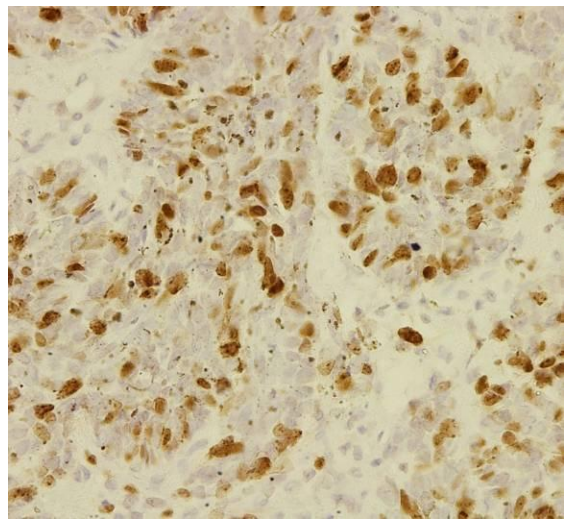
BN Nguyễn Văn D - UTTB đáy
 Nhuộm HE Ki-67 (1+)
 Số GPBL:12-18646



BN Nguyễn Thị X - UTTB đáy
 Nhuộm HE Ki-67 (2+)
 Số GPBL:13-27979



BN Nguyễn Thị V - UTTB đáy
 Nhuộm HE Ki-67 (3+)
 Số GPBL:12-08568



BN Triệu Văn H - UTTB đáy
 Nhuộm HE Ki-67 (4+)
 Số GPBL:12-19148

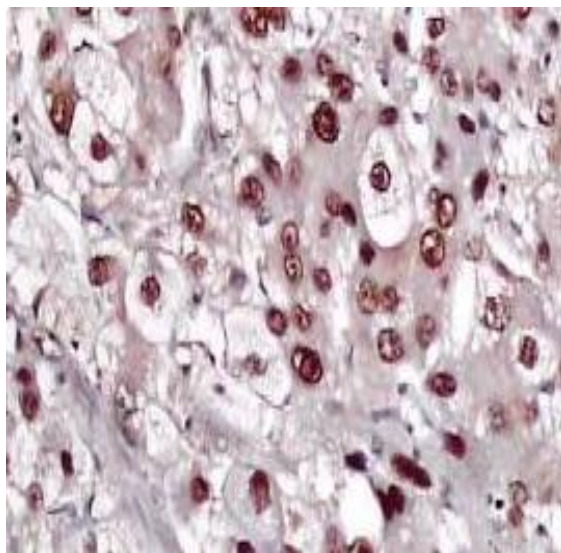
Hình 3.4: Hình ảnh nhuộm HE x 400 với Ki-67 trong UTTB đáy

3.4.3. Đối chiếu bậc độ p53, Ki-67 với độ mô học UTTB vảy

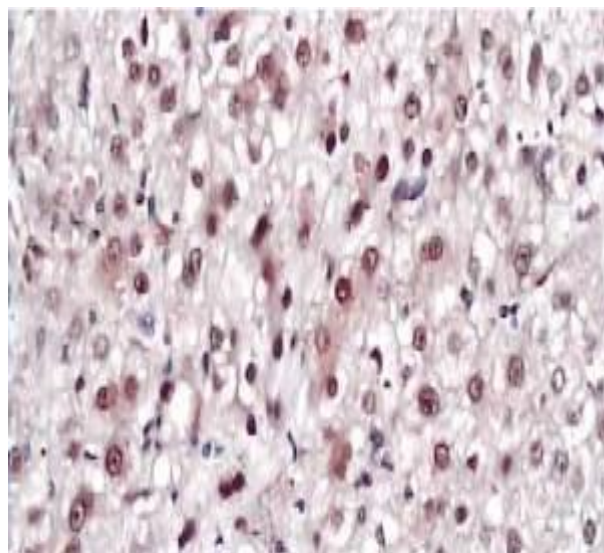
Bảng 3.16: Đối chiếu bậc độ p53, Ki-67 với độ mô học UTTB vảy

Độ mô học	P53		Ki-67	
	<i>Dương tính</i>	<i>Âm tính</i>	<i>Dương tính</i>	<i>Âm tính</i>
<i>Độ I</i>	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)	0
<i>Độ II</i>	6 (54,5%)	5 (45,5%)	11 (100%)	0
<i>Độ III</i>	4 (100%)	0	4 (100%)	0
Tổng số	13 (65,0%)	7 (35,0%)	20 (100%)	0

Nhận xét: Đối với p53, tỷ lệ dương tính ở độ III cao hơn độ I và độ II. Đối với Ki-67, 100% dương tính ở cả 3 độ mô học.



BN Nguyễn Cao H - UTTB vảy
Nhuộm HMMD Ki-67 (2+)
Số GPBL: 13-045314



BN Nguyễn Thị T - UTTB vảy
Nhuộm HMMD Ki-67 (3+)
Số GPBL: 13-47024

Hình 3.5: Hình ảnh nhuộm HMMD với Ki-67 trong UTTB vảy

3.4.4. Mối liên quan giữa bậc lộ p53, Ki-67 và kích thước u

Bảng 3.17: Mối liên quan giữa bậc lộ p53 và kích thước u

P53 Kích thước	Dương tính		Âm tính		Tổng	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%
< 1 cm	7	87,5	1	12,5	8	11,3
1-2 cm	34	87,2	5	12,8	39	54,9
2-4 cm	19	86,4	3	13,6	22	31
>4 cm	2	100	0	0	2	2,8
Tổng	62	87,3	9	12,7	71	100
	$\chi^2=0,31;p=0,96$					

Nhận xét: Ở các nhóm u kích thước dưới 4 cm, tỷ lệ dương tính với p53 khá tương đồng, khoảng 86-87%. Với nhưng u kích thước lớn hơn 4 cm, tỷ lệ này lên tới 100%. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa ($\chi^2=0,31;p=0,96$).

Bảng 3.18: Mối liên quan giữa HMMD Ki-67 và kích thước u

Ki67 Kích thước	Dương tính		Âm tính		Tổng	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
< 1 cm	7	87,5	1	12,5	8	11,3
1-2 cm	34	87,2	5	12,8	39	54,9
2-4 cm	20	90,9	2	9,1	22	31
>4 cm	2	100	0	0	2	2,8
Tổng	63	88,7	8	11,3	71	100
	$\chi^2=0,464; p=0,93$					

Nhận xét : Tỷ lệ Ki-67 dương tính ở các nhóm u có kích thước nhỏ hơn 1 cm; từ 1 - 2 cm; từ 2 - 4 cm và lớn hơn 4 cm lần lượt là 87,5%; 87,2%; 90,9% và 100%. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($\chi^2=0,464; p=0,93$).

3.5. KẾT QUẢ GIẢI TRÌNH TỰ GEN *TP53*

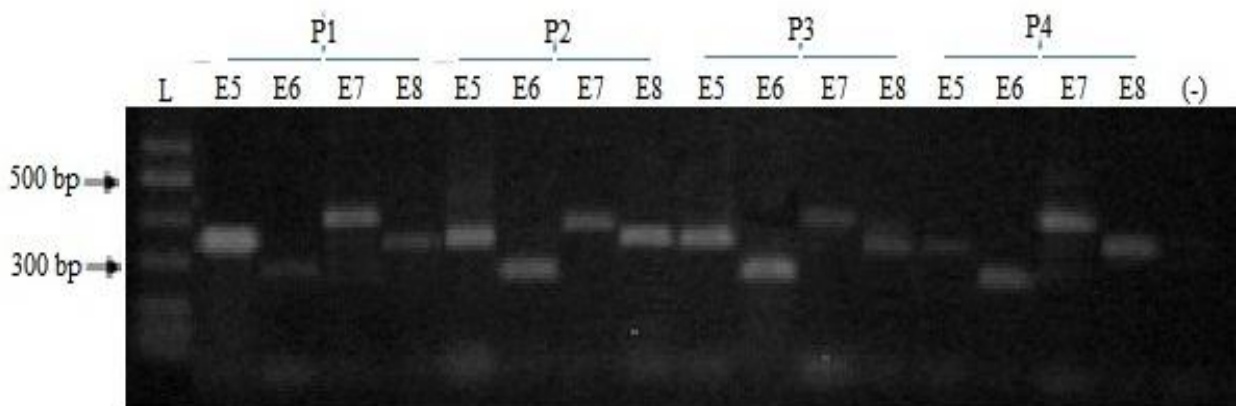
3.5.1. Phân loại đột biến gen *TP53*

Trong số 51 mẫu UT da được giải trình tự gen, toàn bộ là mẫu bảo quản với paraffin, tất cả các mẫu đã tách DNA đủ số và chất lượng cho xét nghiệm phân tử. Gen *TP53* được giải trình tự cho các đoạn: đoạn 1 exon 5, đoạn 2 là 6 và đoạn 3 là 7, đoạn 4 là exon 8. Kết quả điện di PCR các đoạn gen để giải trình tự đều tốt, đảm bảo cho việc giải trình tự dễ dàng, chính xác.

Bảng 3.19: Phân loại đột biến gen *TP53*

Đột biến gen <i>TP53</i>	UTTB đáy		UTTB vảy		Tổng số	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%
<i>Đột biến sai nghĩa</i>	19	95	16	100	35	97,2
<i>Đột biến vô nghĩa</i>	1	5	0	0	1	2,8
Tổng	20	55,6	16	47,4	36	100

Nhận xét: Trong 36 mẫu mang đột biến, có 35 trường hợp (97,2%) là đột biến thay thế axit amin (đột biến sai nghĩa), và có 1 trường hợp (2,8%) là đột biến vô nghĩa (bộ ba mã hóa axit amin biến đổi thành bộ ba kết thúc). Trong các nghiên cứu của chúng tôi chỉ thấy đột biến điểm.



Hình 3.6: Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel Agarose

3.5.2. Các loại đột biến gen *TP53*

Bảng 3.20: Các loại đột biến gen *TP53*

Exon	Loại Đột Biến	Tỷ lệ		Tổng số
		<i>n</i>	%	
5	Lys132Met (AAG-ATG)	1	12.5	8
	Thr140Ile (ACC-ATC)	1	12.5	
	Arg156Cys (CGC-TGC)	2	25	
	Ala159Pro (GCC-CCC)	1	12.5	
	Met160Lys (ATG-AAG)	1	12.5	
	Tyr163Cys (TAC-TGC)	1	12.5	
	Cys176Trp (TGC-TGG)	1	12.5	
6	Pro190Ser (CCT-TCT)	1	12.5	8
	Pro190Thr (CCT-ACT)	1	12.5	
	Glu192His (CAG-CAC)	1	12.5	
	Arg196Gln (CGA-CAA)	1	12.5	
	Tyr205Cys (TAT-TGT)	2	25	
	Phe212Ile (TTT-ATT)	1	12.5	
	Val217Gly (GTG-GGG)	1	12.5	
7	His233Leu (CAC-CTC)	1	8.3	12
	Tyr236Stop (TAC-TAG)	1	8.3	
	Met237Leu (ATG-CTG)	1	8.3	
	Cys242Tyr (TGC-TAC)	2	16.6	
	Cys242Arg (TGC-CGC)	1	8.3	
	Met243Ile (ATG-ATA)	1	8.3	
	Pro250Leu (CCC-CTC)	1	8.3	
	Pro250Arg (CCC-CGC)	1	8.3	
	Thr253-Ile (ACC-ATC)	1	8.3	
	Ser260Thr (TCC-ACC)	1	8.3	
	Arg283His (CGC-CAC)	1	8.3	
8	Pro278Thr (CCT-ACT)	1	12.5	8
	Pro278Ala (CCT-GCT)	2	25	
	Asp281Glu (GAC-GAG)	1	12.5	
	Arg282Pro (CGG-CCG)	1	12.5	
	Lys251Met (ATC-ATG)	1	12.5	
	Glu298Lys (GAG-AAG)	1	12.5	
	Pro300Thr (CCC-ACC)	1	12.5	

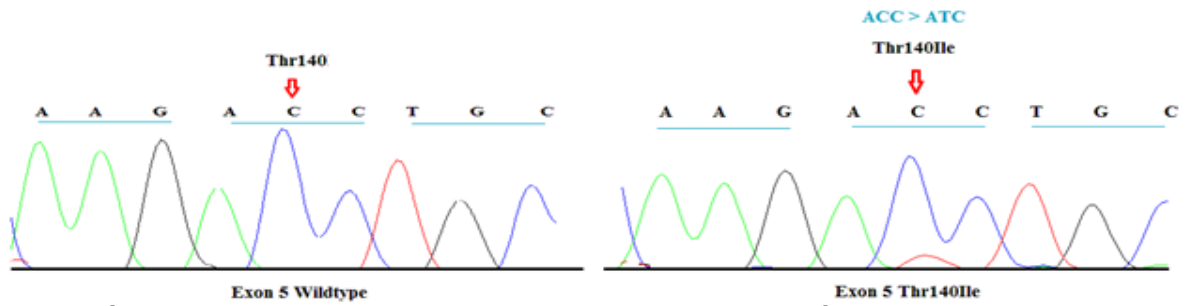
Nhận xét: Exon 5, exon 6 và exon 8 đều phát hiện 8 đột biến (22,2%), trong đó, exon 5 xuất hiện 2 đột biến ở vị trí Arg156Cys (CGC-TGC) chiếm 25%; Exon 6 xuất hiện 2 đột biến ở vị trí Tyr205Cys (TAT-TGT) chiếm 25% và Exon 8 xuất hiện 2 đột biến ở vị trí Pro278Thr (CCT-GCT) chiếm 25%. Exon 7 có 12 đột biến điểm (33,3%) trong đó có 2 đột biến ở vị trí Cys242Tyr (TGC-TAC) chiếm 16,6%.

3.5.3. Tình trạng đột biến gen *TP53* trên các exon

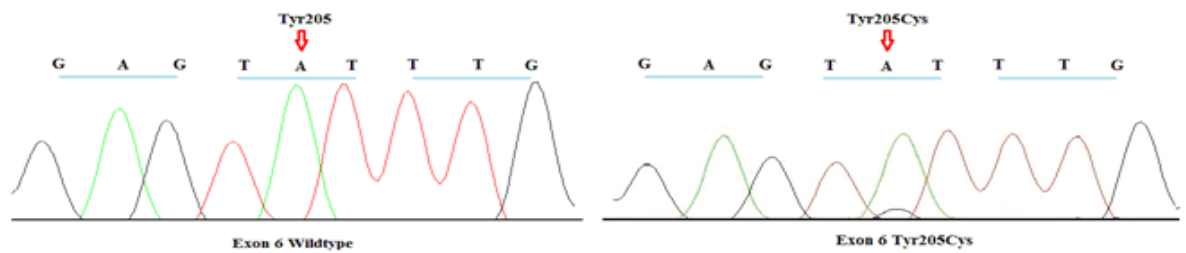
Bảng 3.21: Tình trạng đột biến gen *TP53* trên các exon

Exon	UTTB đáy		UTTB vảy		Tổng số		p
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%	
<i>Exon 5</i>	4	12,1	4	22,2	8	15,7	0,278
<i>Exon 6</i>	5	15,2	3	16,7	8	15,7	
<i>Exon 7</i>	6	18,2	6	33,3	12	23,5	
<i>Exon 8</i>	5	15,2	3	16,7	8	15,7	
Không biến đổi	13	39,4	2	11,1	15	29,4	
Tổng	33	64,7	18	35,3	51	100,0	

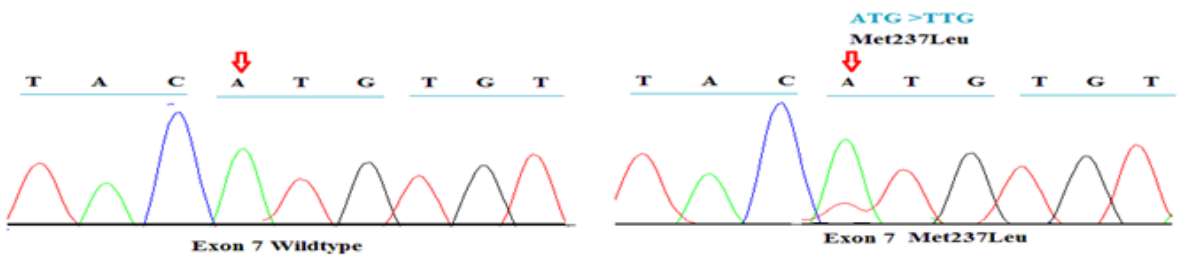
Nhận xét : Với UTTB đáy, đột biến Exon 5 chiếm 12,1%; Exon 6 chiếm 15,2%; Exon 7 chiếm 18,2% và Exon 8 chiếm 15,2%. Với UTTB vảy, đột biến Exon 5 chiếm 22,2%; Exon 6 chiếm 16,7%; Exon 7 chiếm 33,3% và Exon 8 chiếm 16,7%. Có 15 mẫu không có đột biến chiếm 29,4%. Kiểm định khi bình phương cho ta thấy không có mối tương quan nào giữa vị trí exon đột biến gen *TP53* và loại UTTB ($\chi^2=5,096$; $p=0,278$).



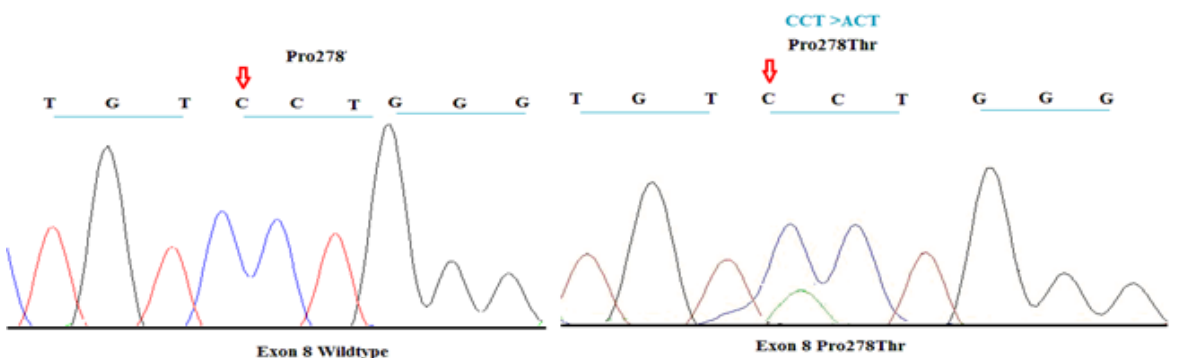
Đột biến tại Exon 5 (BN Nguyễn Văn T, UTTB đáy, số GPBL:12-13884)



Đột biến tại Exon 6 (BN Lê Xuân T, UTTB đáy, số GPBL:12-119149)



Đột biến tại Exon 7 (BN Nguyễn Danh K, UTTB đáy, số GPBL:12-16161)



Đột biến tại Exon 8 (BN Nguyễn Văn H, UTTB vảy, số GPBL:13-37572)

Hình 3.7: Một số hình ảnh đột biến gen TP53 trên các exon

3.5.4. Biểu hiện tình trạng đột biến gen *TP53* UTTB đáy và UTTB vảy

Bảng 3.22: Tình trạng đột biến gen *TP53* trên 2 loại UT

Loại	Đột biến		Không đột biến		Tổng số
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<i>UTTB đáy</i>	20	60,6	13	39,4	33 (64,7%)
<i>UTTB vảy</i>	16	88,9	2	11,1	18 (35,3%)
Tổng số	36	70,6	15	29,4	51 (100%)

Nhận xét: Phân tích đột biến bệnh phẩm UTTB đáy và UTTB vảy, có 36 trường hợp mang đột biến gen *TP53* ở các exon 5-8, trong đó có 20/33 (60,6%) trường hợp UTTB đáy và 16/18 (88,9%) UTTB vảy. Sự khác biệt giữa tỷ lệ đột biến gen *TP53* ở UTTB đáy và UTTB vảy có ý nghĩa thống kê ($\chi^2 = 4,49$; $p = 0,034$). Tỷ suất chênh chỉ ra sự khác nhau của 2 tỷ lệ này là 0,192 (khoảng tin cậy 95% là 0,38 – 0,98).

3.5.5. Tình trạng đột biến *TP53* ở các thể lâm sàng UTTB đáy

Bảng 3.23: Tình trạng đột biến *TP53* ở thể lâm sàng UTTB đáy

Hình thái u UTTB đáy	Đột biến gen <i>TP53</i>		Tổng
	Có	Không	
<i>Thể nốt/loét</i>	17 (60,7%)	11 (39,3%)	28 (84,8%)
<i>Thể xơ</i>	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (9,1%)
<i>Thể nông</i>	0	0	0
<i>Thể hỗn hợp</i>	1 (50%)	1 (50%)	2 (6,1%)
Tổng	20 (55,6%)	13 (39,2%)	33 (100%)

Nhận xét: Chúng tôi chọn ra 36/51 trường hợp UTTB đáy để phân tích đột biến gen *TP53*. Trong 4 loại hình thái tổn thương của u, thể nốt loét có tỷ lệ đột biến gen *TP53* cao nhất (60,7%); tiếp đến là thể xơ (66,7%) và thể hỗn hợp (50%). Không có trường hợp thể nông nào đột biến gen *TP53*.

3.5.6. Tình trạng đột biến gen *TP53* theo độ mô học UTTB vảy

Bảng 3.24: Tình trạng đột biến *TP53* theo độ mô học UTTB vảy

Độ mô học UTTB vảy	Đột biến <i>TP53</i>		Tổng
	Có	Không	
<i>Độ I</i>	3 (75%)	1 (25%)	4 (22,2%)
<i>Độ II</i>	10 (90,9%)	1 (9,1%)	11 (61,1%)
<i>Độ III</i>	3 (100%)	0	3 (16,7%)
Tổng	16 (88,9%)	2 (11,1%)	18 (100%)

Nhận xét : Có 18 trường hợp UTTB vảy để phân tích đột biến gen *TP53*, trong đó, độ mô học III 100% có đột biến gen *TP53*, tiếp đến là độ II với 90,9% và độ I chiếm 75%.

3.5.7. Liên quan giữa bậc độ p53 bằng HMMD và đột biến gen *TP53*

Bảng 3.25: Mối liên quan bậc độ p53 bằng HMMD và đột biến gen *TP53*

Đột biến gen <i>TP53</i> HMMD p53	UTTĐ đáy		UTTĐ vảy	
	<i>Đột biến</i>	<i>Không đột biến</i>	<i>Đột biến</i>	<i>Không đột biến</i>
-	0	0	6 (85,7%)	1 (14,3%)
1+	10 (55,6%)	8 (44,4%)	3 (75%)	1 (25%)
2+	7 (63,6%)	4 (36,4%)	2 (100%)	0
3+	3 (75,0%)	1 (25%)	5 (100%)	0
Tổng số	20 (60,6%)	13 (39,4%)	16 (88,9%)	2 (11,1%)
	$\chi^2=0,582$; $p=0,748$		$\chi^2=1,73$; $p=0,631$	

Nhận xét : Phân tích riêng các trường hợp UTTĐ đáy, ở mức độ dương tính p53 (1+) có 55,6% đột biến *TP53*; ở mức độ (2+) là 63,6% và mức (3+) có tới 75%. Theo kiểm định khi bình phương, không có mối tương quan có ý

nghĩa thống kê giữa HMMD p53 và đột biến gen *TP53* ở các trường hợp UTTB đáy ($\chi^2=0,582$; $p=0,748$).

Đối với UTTB vảy, ở mức độ dương tính p53 (1+) có 75% đột biến gen *TP53*; ở mức độ (2+) là 100% và (3+) cũng có 100%. Theo kiểm định khi bình phương, không có mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa HMMD p53 và đột biến gen *TP53* ở các trường hợp UTTB vảy ($\chi^2=1,73$; $p=0,631$).

3.5.8. Liên quan giữa bậc độ Ki-67 bằng HMMD và đột biến gen *TP53*

Bảng 3.26: Liên quan giữa bậc độ Ki-67 bằng HMMD và đột biến gen *TP53*

Đột biến gen <i>TP53</i> HMMD Ki-67	UTTB đáy		UTTB vảy	
	Đột biến	Không đột biến	Đột biến	Không đột biến
-	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0	0
1+	11 (68,8%)	5 (31,2%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)
2+	4 (66,7%)	2 (33,3%)	9 (90%)	1 (10%)
3+	4 (50%)	4 (50%)	2 (100%)	0
Tổng số	20 (60,6%)	13 (39,4%)	16 (88,9%)	2 (11,1%)
	$\chi^2=1,848$; $p=0,604$		$\chi^2=0,45$; $p=0,799$	

Nhận xét : Phân tích riêng các trường hợp UTTB đáy, ở mức độ dương tính Ki-67 (1+) có 68,8% đột biến gen *TP53*; ở mức độ (2+) là 66,7% và (3+) có 50%. Kiểm định khi bình phương, không có mối tương quan giữa HMMD Ki-67 và đột biến gen *TP53* ở các trường hợp UTTB đáy ($\chi^2=1,848$; $p=0,604$).

Đối với UTTB vảy, ở mức độ dương tính Ki-67 (1+) có 83,3% đột biến gen *TP53*; ở mức độ (2+) là 90% và (3+) là 100%. Theo kiểm định khi bình phương, không có mối tương quan giữa HMMD Ki-67 và đột biến gen *TP53* ở các trường hợp UTTB vảy ($\chi^2=0,45$; $p=0,799$).

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG

4.1.1. Tuổi và giới tính

Bệnh nhân mắc UT da nói chung thường gặp ở người cao tuổi và tỷ lệ cũng tăng dần theo tuổi. UT da có nguyên nhân chủ yếu do tia bức xạ, tia cực tím... Sau nhiều năm vùng da phơi nhiễm sẽ có những biến đổi của vật chất di truyền tạo điều kiện cho UT phát triển, điều này giải thích tại sao UT da lại tăng lên cùng với tuổi. Theo nghiên cứu của chúng tôi, khoảng tuổi trên 70 chiếm 43,7%, tiếp theo là độ tuổi 60-69 chiếm 25,4% và thấp nhất là độ tuổi dưới 40, chiếm 1,4%. Tuổi trung bình của quần thể mẫu là 66,4. Tương tự như kết quả nghiên cứu của Trần Văn Thiệp, tuổi trung bình là 65,8 và kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Bùi Xuân Trường và CS (1999) cho kết quả tuổi trung bình UT da vùng đầu cổ là 65; cao hơn so với kết quả nghiên cứu UT da chung của một số tác giả khác như Trịnh Quang Diện (1999) là 59,1 [47],[49],[94].

UTTB vảy có xu hướng tăng dần theo tuổi, tuổi càng cao thời gian tích lũy tiếp xúc với ánh sáng mặt trời càng lớn, thêm vào đó khả năng sửa chữa các biến đổi DNA do ánh sáng mặt trời cũng như các tác nhân gây UT khác kém đi. UTTB đáy xuất hiện thường từ tuổi 50 và cao hơn [95],[96]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, độ tuổi hay mắc bệnh nhất là từ 50 tuổi trở lên và cao nhất ở nhóm tuổi 70-79. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác ở các quốc gia khác trên thế giới [97],[98],[99]. Điều này cho thấy tuổi đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành và phát triển UTTB đáy và UTTB vảy và tần số tăng cao sau các năm.

Về giới tính, có 54,9% đối tượng là nữ giới; 45,1% là nam giới. Tỷ lệ nam/nữ xấp xỉ bằng 1, kết quả của chúng tôi có phần cao hơn so với nghiên cứu của Bùi Xuân Trường và cộng sự là 0,76; thấp hơn so với Trịnh Quang Diện là 1,3; tương tự với kết quả nghiên cứu của Đỗ Thu Hằng và Lê Tuấn Hùng (1999) [16],[20],[48],[49]. Các nghiên cứu về UT da ở châu Âu, Mỹ và Úc đều cho thấy bệnh gặp nhiều ở nam hơn so với nữ [99],[100]. Trong khi đó, các nghiên cứu ở châu Á cho thấy có sự chênh lệch không nhiều giữa nam và nữ [88],[97]. Khác biệt về tỷ lệ giới tính có thể do sự khác nhau về màu da cũng như lối sống, khí hậu và thời gian làm việc ngoài trời. Theo các tác giả thì nam giới bị bệnh nhiều hơn nữ là do nam giới phải làm những công việc ở ngoài trời nắng (như câu cá, trồng trọt), trong khi đó, nữ giới thường làm các công việc ở trong nhà. Tỷ lệ mắc bệnh ở nữ nhiều hơn nam ở châu Á, có lẽ do phụ nữ làm các công việc ở ngoài trời nắng nhiều. Theo nghiên cứu tại Ả Rập Xê út, tỷ lệ nam/nữ rất cao là 2,25 có thể lý giải do tập quán ăn mặc của phụ nữ Trung Đông (trùm khăn kín cả mặt và người) nên ảnh hưởng của bức xạ mặt trời giảm, do vậy, phụ nữ mắc UT da ít hơn hẳn nam giới [101]. Ở Việt Nam, nông nghiệp chiếm 80%, nữ giới thường chăm lo việc đồng áng nhiều hơn nam giới, tuy nhiên còn phụ thuộc vào từng khu vực.

4.1.2. Tỷ lệ của UTTB đáy và UTTB vảy

Nghiên cứu của chúng tôi thấy UTTB đáy có 51 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ nhiều hơn (71,8%), còn lại UTTB vảy có 20 bệnh nhân (28,2%).

Kết quả của chúng tôi cao hơn so với một số tác giả khác. Theo Trịnh Quang Diện (1999), UTTB đáy chiếm tỷ lệ cao 52,5%, tiếp đến là UTTB vảy 38,4%, tỷ lệ UT tuyến bã thấp 7,8% và UT tuyến mồ hôi rất hiếm chỉ chiếm 1,4%; Lê Tuấn Hùng (1999), tương ứng là 50,5%; 34,3% và 15,2% [48],[49]. So sánh với các nghiên cứu ở nước ngoài, tỷ lệ trong nghiên cứu của Al Aboud KM và các CS là 51%; 26%, còn lại là UT phần phụ và UT hắc tố

[102]. Kết quả của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của Thomas DR và CS: UTTB đáy (61%); UTTB vảy (25%) [103]. Một số kết quả nghiên cứu nước ngoài khác cũng có kết quả tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi. Một nghiên cứu dịch tễ học kéo dài 5 năm tại Singapore chỉ ra tỷ lệ UTTB đáy là 68,3% và ở UTTB vảy là 31,7% [104]. Marks có nhận định tỉ lệ UTTB đáy và UTTB vảy ở mức xấp xỉ 3 đến 4 trên 1 (~3-4:1) [105]. Nghiên cứu về UT vùng đầu và cổ của Ouyang và CS năm 2010 cũng chỉ ra UTTB đáy là UT thường gặp nhất ở UT da, chiếm tới 70-75% [106].

Bảng 4.1: Tỷ lệ thể GPBL theo một số nghiên cứu trên thế giới

Y văn	Andrade 2011 [104]	Al KM 2003 [102]	T.Q.Diện 1999 [49]	L.T.Hùng 1999 [48]	Thomas 1979 [103]
<i>UTTB đáy</i>	68,3%	51%	52,46%	50,5%	61%
<i>UTTB vảy</i>	31,7%	26%	38,38%	34,3%	25%

4.1.3. Phân bố theo vị trí tổn thương

Về vị trí tổn thương theo vị trí giải phẫu, thường gặp nhất của UTTB đáy và UTTB vảy là vùng đầu mặt cổ [104],[107],[108],[109]. Như đã phân tích ở mục trên, các nhà khoa học trên thế giới cho rằng đầu mặt cổ là vị trí thường xuyên tiếp xúc với ánh sáng mặt trời nhất, các tia UVA, UVB, UVC tác động trực tiếp đến da vùng đầu mặt cổ gây UT [104],[108],[109]. Nhiều nghiên cứu đã khẳng định những u ở vị trí đầu mặt cổ có nhiều khả năng tái phát và di căn, trong đó tái phát nhiều nhất ở các vị trí mũi, má và thái dương [110],[111],[112],[113],[114]. Một nghiên cứu ở Lithuania cho thấy ngoài vị trí ở đầu mặt cổ thì tỷ lệ vị trí tổn thương ở chân của nữ cao hơn so với nam giới. Điều này có thể được giải thích là do thói quen ăn mặc ở phụ nữ thường mặc váy nên vùng chân luôn tiếp xúc với ánh sáng mặt trời, trong khi đó nam

giới thường đi giày và mặc quần dài nên vùng chân không tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời [115].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy UTTB đáy gặp phổ biến nhất là ở vị trí vùng quanh mắt với 27,5% và vùng mũi chiếm 23,5%. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu trong và ngoài nước. Nghiên cứu trên 322 bệnh nhân của Bùi Xuân Trường đưa ra tỷ lệ vị trí tổn thương của UTTB đáy vùng đầu cổ như sau: da đầu chiếm 2,4%, trán - thái dương chiếm 7,4%, quanh mắt chiếm 10,8%, má chiếm 16,4%, mũi chiếm 28,8%, môi và cằm chiếm 6,2%, tai và quanh tai chiếm 5,2% [47]. Các tác giả Kikuchi và Chen cũng đều cho rằng vùng mũi và quanh mắt hay xuất hiện UTTB đáy [116],[117]. Việc xác định vị trí của khối u có vai trò đặc biệt quan trọng giúp cho việc lập kế hoạch điều trị. Các nghiên cứu đều cho thấy vị trí khối u thuộc “vùng chữ H” ở mặt (quanh mắt, lông mày, mũi, rãnh mũi má, quanh miệng, trước và sau tai) là những vị trí có nguy cơ tái phát sau điều trị cao nhất [27],[118]. Hiện nay vẫn chưa có giải thích chính xác là tại sao UTTB đáy lại hay gặp ở vùng mũi hay bất kỳ vị trí nào khác trên mặt. Tuy nhiên, Kikuchi cho rằng UTTB đáy trên mặt gặp nhiều ở mũi vì vùng này là nhô ra nên tiếp xúc với ánh sáng mặt trời nhiều nhất [116].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, UTTB vảy gặp phổ biến nhất ở vị trí vùng thái dương (25%) và vùng mũi (25%), tiếp đến là vùng má (15%) và trán (15%). Nghiên cứu dịch tễ học 5 năm tại Singapore của Andrade và CS cũng chỉ ra những vị trí tổn thương trên mặt tương tự, nhưng với tỷ lệ khác, đó là gò má (31%); môi dưới (17,8%); tai (11,7%); trán (11,5%) và mũi (10,1%) [104]. Có nghiên cứu đã chỉ ra được UTTB vảy ở các vị trí tai, trán, da đầu và môi dưới có tỷ lệ tái phát cao [119]. Kết quả kiểm định Khi bình phương trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa vị trí tổn thương và thể UT ($p=0,035$). Điều này chứng tỏ các vị trí tổn thương của UTTB vảy và UTTB đáy có sự khác biệt rõ rệt.

4.1.4. Phân bố theo kích thước tổn thương

Kích thước khối u cũng đóng vai trò quan trọng trong điều trị và nguy cơ tái phát bệnh, khối u to hơn sẽ có nguy cơ tái phát cao hơn [120],[121],[122]. Cherpelis cùng các cộng sự công bố trong nghiên cứu của họ rằng kích thước khối u có mối liên quan có ý nghĩa thống kê với sự di căn, cụ thể khối u có kích thước lớn hơn 2 cm có nguy cơ di căn cao hơn, bên cạnh đó, những trường hợp UTTB vảy xâm lấn có kích thước nhỏ hơn 1 cm cũng có thể di căn, nhưng không thường xuyên [123]. Một số các bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi thường đến khám muộn hoặc tự điều trị nên tổn thương đã lan rộng.

Kích thước tổn thương thường gặp nhất của UTTB đáy là từ 1-2 cm, chiếm 54,9%; tiếp đến là kích thước 2–4 cm chiếm 29,4%; kích thước nhỏ hơn 1 cm là 11,8%, kích thước ít gặp nhất là lớn hơn 4 cm, chỉ chiếm 3,9%. Kích thước trung bình là 2,21 cm. Kích thước to nhất đo được là 6 cm. Kết quả này khá tương đồng so với nghiên cứu của Đỗ Thu Hằng và Lê Đức Minh, hai tác giả này đều chỉ ra kích thước 1-2 cm là thường gặp nhất ở UTTB đáy, tỷ lệ lần lượt là 50,8% và 44,3% [20],[91]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng khác so với một số nghiên cứu trong và ngoài nước khác. Nghiên cứu của Manstein ME, Manstein CH, Smith R chỉ ra có tới 85% u có kích thước < 2 cm [124]. Điều này có thể là do trình độ dân trí, điều kiện kinh tế cao, thói quen khám bệnh định kỳ nên người dân được khám và điều trị sớm. Người dân nước ta thường khi thấy có vấn đề, có triệu chứng mới đi khám, không có thói quen khám bệnh định kỳ nên để u to mới đến bệnh viện. Một nghiên cứu của Hoàng Anh Tuấn chỉ ra kích thước gặp nhiều nhất là nhỏ hơn 1 cm (41,3%) [74]. Sự khác biệt này có thể lý giải là do tác giả khu trú vào UTTB đáy vùng mi mắt. Các khối u vùng mi mắt sẽ gây ảnh hưởng đến khả năng thị giác của bệnh nhân nên họ đến khám sớm hơn so với u ở vị trí khác.

Ở UTTB vẩy, kích thước u từ 1-2 cm chiếm tỷ lệ cao nhất là 55%; tiếp đến là từ 2-4 cm chiếm 35%; u nhỏ hơn 1 cm chiếm 10% và không có u lớn hơn 4 cm. Điều này khá khác biệt so với nghiên cứu của Đỗ Thu Hằng khi tác giả này chỉ ra kích thước u từ 2-5 cm chiếm tỷ lệ cao nhất với 63,7%; tỷ lệ u nhỏ hơn 2 cm chỉ chiếm 19,8% [20]. Kết quả nghiên cứu của Phạm Cẩm Phương năm 2001 cũng tương tự [125]. Khi nghiên cứu mối tương quan giữa kích thước u với các đặc điểm như tuổi, giới tính và phân bố theo loại UT, kết quả cho thấy không có mối tương quan nào có ý nghĩa thống kê.

4.1.5. Tính chất u

Để xác định tổn thương da, cần xác định đặc điểm, tính chất của tổn thương như các giới hạn, bề mặt, mật độ, tình trạng giãn mạch, sự thâm nhiễm, loét...

Ung thư tế bào đáy: cho tới nay, dường như vẫn chưa có một phân loại thống nhất về UTTB đáy và nhìn chung các phân loại dựa trên đặc điểm phát triển được coi là có ý nghĩa hơn trên lâm sàng [42]. Biểu hiện lâm sàng của UTTB đáy chủ yếu là sùi loét: 80,4%; ranh giới rõ: 70,6%; thâm nhiễm: 33,3% và chảy dịch, máu: 13,7%. Giãn mạch và tăng sinh mạch máu là hiện tượng thường gặp trong UT nói chung. Một khối u phát triển được cần có sự tăng sinh mạch máu và sự tăng sinh này chịu tác động của yếu tố tăng sinh nội mạc mạch máu. Thể nốt/loét tại nghiên cứu chiếm 76,5%, tương tự như kết quả tại Anh thể sùi loét chiếm 78,7% [96]. Nghiên cứu tại Úc có tỷ lệ thấp hơn: thể u với triệu chứng sùi loét là 48,1%, trong nghiên cứu của Chang ở Trung quốc sùi loét là 53,9%, và trong đề tài của Cho và cộng sự tại Hàn Quốc là 52% [95],[126]. Ở thể nốt/loét tổn thương u thường có màu đỏ hoặc hồng, bóng, trung tâm lõm giữa, mật độ chắc, bề mặt giãn mạch, trên bờ có sẩn ngọc màu sáp hoặc trong mờ (trông như ngọc trai). Tổn thương có thể lan rộng, trung tâm hoại tử và loét do vậy trước đây còn gọi là “loét ở động vật gặm nhấm”.

Các tính chất khác của u như có thể teo, đóng vảy hoặc xuất hiện các đốm sắc tố hoặc là đám da màu vàng hoặc trắng đục nằm xen kẽ với da lành, hay như một ban đỏ, sẩn nổi gồ..., các tính chất này chiếm tỷ lệ thấp từ 2-13% trong nghiên cứu, Hoàng Anh Tuấn cũng có đánh giá thấp khoảng 6% [74]. Các tác giả nước ngoài có đánh giá các hình thái này khá cao: nghiên cứu tại Nhật Bản chiếm khoảng 75%; 69,4% tại Đài Loan, 55% tại Hàn Quốc, 44,2% tại Ấn Độ [88],[116],[117],[126]. Điều này cho thấy rằng sắc tố là dấu hiệu đặc trưng của người châu Á, theo Kikuchi, hình thái sắc tố có thể coi là một trong những tiêu chuẩn để chẩn đoán UTTB đáy tại Nhật Bản [116].

Nghiên cứu về số lượng tổn thương, chúng tôi nhận thấy đa số các bệnh nhân UT da có một tổn thương duy nhất (97,2%) và có 2 bệnh nhân có 2 tổn thương trở lên (2,8%). Theo Rajpar có khoảng 10% bệnh nhân có từ 2 tổn thương trở lên, do đó cần kiểm tra kỹ các vùng da để tránh bỏ sót tổn thương [27].

Ung thư tế bào vảy thường xuất hiện trên nền của một tổn thương da mạn tính có sẵn từ trước, thường có 2 lý do chính khi bệnh nhân đến viện là nổi u trên da và vết loét lâu liền. Theo nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ biểu hiện trên lâm sàng chủ yếu là sùi loét: 75%; ranh giới rõ: 50%; chảy dịch, máu: 15%. Tương tự theo nghiên cứu của Trần Hậu Khang, tỷ lệ ranh giới rõ: 72,5%, loét lâu liền: 26,3% và các nguyên nhân khác 1,2% [127]. UTTB vảy có tỷ lệ cao vùng đầu cổ như nhiều nghiên cứu khác, vùng có tiếp xúc với bức xạ cực tím, bệnh dày sừng ánh nắng được coi như một UTTB vảy tại chỗ và cần theo dõi. Ngoài tổn thương trên, UTTB vảy còn có thể phát triển trên những thương tổn đã có từ trước, đặc biệt là trên nhóm bệnh da tiền UT (Bowen, Paget), hiếm hơn là trên những vùng da có sẹo, viêm mạn tính...

4.2. ĐẶC ĐIỂM GIẢI PHẪU BỆNH

4.2.1. Đặc điểm đại thể UTTB đáy

Hình thái lâm sàng hay gặp nhất ở UTTB đáy trong nghiên cứu của chúng tôi là thể nốt/loét chiếm 76,5%; ở thể xơ chiếm 13,7%; tiếp đến là thể hỗn hợp chiếm 7,8%; ít gặp nhất là ở thể vi nốt chỉ chiếm 2%. Các nghiên cứu khác tại Việt Nam và trên thế giới cũng đồng ý với quan điểm thể nốt loét là hình thái thường gặp nhất ở UTTB đáy [74],[88],[91],[116], hiện tượng loét hay gặp trong UTTB đáy rất ít nghiên cứu giải thích được, một trong số ít đó là nghiên cứu của Nouri năm 2008. Tác giả cho rằng do hoại tử riêng lẻ các tế bào cũng như hoại tử thành đám là nguyên nhân gây ra hình thái loét trên lâm sàng. Chính đặc điểm lâm sàng loét là phổ biến trong UT da nên các bác sỹ không thuộc chuyên khoa UT và da liễu dễ nhầm với các bệnh nhiễm trùng khác [128]. Thể nốt/loét chiếm 76,5% các trường hợp UTTB đáy. Tỷ lệ này khá tương đồng so với một nghiên cứu của Trương Mạnh Dương và Vương Quốc Cường thực hiện năm 2014 tại Bệnh viện K, Bệnh viện Da liễu và Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương năm 2014. Hai tác giả này chỉ ra tỷ lệ thể nốt loét là 74,6% [129]. Nhiều nghiên cứu khác ở Châu Á, Châu Úc hay Châu Âu cũng chỉ ra đây là hình thái hay gặp nhất. Tuy nhiên, tỷ lệ ở mỗi nghiên cứu, mỗi địa điểm có phần khác biệt so với nghiên cứu của chúng tôi. Cụ thể, tỷ lệ thể nốt/loét trong một số nghiên cứu ở các nước gần chúng ta như Trung Quốc là 53,9% [95]; Đài Loan là 86,5% [117]; Singapore là 40% [130]; Nhật Bản là 54% [116] và Hàn Quốc là 60,3% [126]. Tỷ lệ này trong một nghiên cứu tại Úc là 48,1% và tại Anh là 78,7% [14],[96]. Sở dĩ tỷ lệ này ở các nghiên cứu khác nhau có thể là do vị trí địa lý, môi trường sống, màu da... hay thậm chí là do sự đánh giá chủ quan của người đọc kết quả. Theo một nghiên cứu của Cohen thì có khoảng 40% các trường hợp UTTB đáy có sự phối hợp

đặc điểm của các thể khác nhau. Nhiều trường hợp không thể xác định thể một cách chính xác nếu chỉ sinh thiết một phần khối u [131].

Thể xơ trong nghiên cứu của chúng tôi chiếm 13,7% các UTTB đáy. Thể xơ gặp ở bệnh nhân có vị trí u tại má, mũi và thái dương. Tỷ lệ này ở nghiên cứu của Tan tại Singapore là 16% [130]; ở Hàn Quốc là 9% [126]; ở Đài Loan rất thấp chỉ 0,5% [117]. Nghiên cứu khác ở một số nước người da trắng như Úc và Mỹ, tỷ lệ này lần lượt là 14,2% và 2% [96],[132]. Đây là hình thái lâm sàng dễ xâm lấn sâu và tái phát theo lập luận của Crowson [133]. Điều này tương đồng phần nào so với nghiên cứu của chúng tôi khi 2/6 (33,3%) trường hợp tái phát UT lần hai là ở u thể xơ.

Trong nghiên cứu, chúng tôi chỉ gặp 1 trường hợp hình ảnh đại thể loét nông (chiếm 2%). Trong khi đó, nhiều nghiên cứu ở châu Âu và châu Á xác định thể nông là thể thường gặp thứ hai sau thể nốt/loét. Cụ thể hơn, tại châu Á, tỷ lệ thể nông trong các nghiên cứu tại Singapore, Hàn Quốc, Nhật Bản và Đài Loan lần lượt là 8%; 11,5%; 14,4% và 7,8% [117],[126],[130],[134]. Tỷ lệ này ở Úc cao hơn rất nhiều là 26,2%. Theo một nghiên cứu ở Mỹ thể loét nông chiếm từ 9 đến 11% [96],[132]. Theo Batriens và CS thì nguyên nhân hình thành UTTB đáy thể loét nông là do tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời với cường độ mạnh (tắm nắng), trong khi đó nguyên nhân gây nên UTTB đáy thể nốt là do tiếp xúc mạn tính kéo dài với ánh sáng mặt trời (làm việc ngoài trời nắng). Chính sự khác nhau về nguyên nhân này có thể giải thích tại sao thể loét nông thường gặp ở thân mình và thể nốt thường gặp ở vùng đầu mặt cổ [100]. Kaur và CS cũng đưa ra giả thuyết về sự phát triển từng bước một của UTTB đáy và cho rằng thể nông có thể phát triển thành thể nốt và thể xâm nhập [135]. Chính các giả thuyết này đã lý giải vì sao trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ gặp 01 trường hợp thể nông, có thể là do bệnh nhân của

chúng tôi lúc đầu khởi phát là thể loét nông nhưng sau đó phát triển thành các thể khác của UTTB đáy.

Thể hỗn hợp chiếm 7,8% các trường hợp UTTB đáy trong nghiên cứu của chúng tôi. Một đặc điểm MBH thường gặp trong UTTB đáy có thể có một số thể phối hợp với một hay nhiều thể khác. Theo nhiều nghiên cứu trên thế giới, tỷ lệ này xảy ra giao động từ 11-39% [131],[135],[136]. Các trường hợp có MBH thể hỗn hợp đều gặp ở vùng đầu mặt cổ, đặc biệt là vùng mũi, sau đó đến tai và má. UTTB đáy ở vùng mũi hay tái phát sau điều trị có thể do vùng đó có MBH hỗn hợp [131]. Ở nghiên cứu này, có đến 75% số u thể hỗn hợp nằm ở vị trí má và mũi má.

Bảng 4.2: Tỷ lệ hình thái tổn thương UTTB đáy theo một số nghiên cứu

Y văn	Chen (2006) [117]	Tan (2014) [130]	Kikuchi (1996) [116]	Cho (1999) [126]	Raasch (2006) [96]
<i>Thể nốt/loét</i>	86,5%	40%	54%	60,3%	48,1%
<i>Thể xơ</i>	0,5%	16%	-	9%	14,2%
<i>Thể nông</i>	7,8%	8%	14,4%	11,5%	26,2%

4.2.2. Đặc điểm mô bệnh học UTTB vảy

Trong nghiên cứu, UTTB vảy gặp nhiều ở độ I với tỷ lệ 25% và độ II với 11 bệnh nhân chiếm 55%; độ III ít gặp hơn chiếm 20% và không có bệnh nhân nào ở độ IV. Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước cũng chỉ ra tỷ lệ MBH độ I và độ II của UTTB vảy chiếm đa số. Cụ thể, theo nghiên cứu của Đỗ Thu Hằng, tỷ lệ độ I là 31,9% và độ II là 31,1% [20]. Trong khi đó, nghiên cứu của Stolle và Kjerkegaard thực hiện tại Anh năm 2011, tỷ lệ độ I và độ II lần lượt là 67% và 25% [137]. Một nghiên cứu mới hơn được công bố trong năm 2016, Lyhne cùng cộng sự đã thực hiện một nghiên cứu lấy số

liệu trong 40 năm từ năm 1971 đến 2011 tại Đan Mạch, đã chỉ ra tỷ lệ UTTB vảy độ I và độ II trên toàn bộ quần thể nghiên cứu là 51% và 29%. Nghiên cứu này còn chỉ ra được thể MBH của UTTB vảy có sự liên quan với giới tính khi tỷ lệ nam giới ở độ I thấp hơn nữ giới, nhưng ở độ II, độ III và độ IV thì ngược lại, nữ giới lại thấp hơn nam giới [138]. Tỷ lệ MBH độ I các nghiên cứu nước ngoài cao hơn nhiều so với chúng tôi, có thể do sự quan tâm, ý thức chăm sóc sức khỏe của họ cao hơn. Họ thường đi khám sức khỏe định kỳ và phát hiện u sớm hơn, không để u to lên và đi khám muộn như tại Việt Nam.

4.3. ĐÁNH GIÁ MỨC XÂM LẤN CỦA UT DA

Phẫu thuật cắt bỏ là lựa chọn điều trị hiệu quả nhất đối với hầu hết UT da không hắc tố. Việc điều trị UT da vùng mặt nhằm mục đích loại bỏ hoàn toàn tổ chức UT, đảm bảo diện cắt không còn tế bào UT là mục tiêu chính. Việc phục hồi chức năng cũng như tính thẩm mỹ ở mức chấp nhận được. Điều quan trọng nhất trong việc tiên lượng, đưa ra phác đồ điều trị là xác định khối u có nguy cơ tái phát hoặc di căn cao hay thấp. Những khối u có khả năng tái phát hoặc di căn là những khối u có nguy cơ cao, cần chỉ định phẫu thuật. Ngược lại, những u không có khả năng tái phát và di căn được xác định là có nguy cơ thấp.

Đối với UT da, việc phẫu thuật phải đảm bảo diện cắt không còn UT nhằm hạn chế tái phát tại chỗ. Chính vì vậy, các phẫu thuật viên rất quan tâm tới diện cắt an toàn cho người bệnh. Một số tác giả trong nước cũng đã tiến hành nghiên cứu MBH diện cắt trên u để có thể đưa ra một đường cắt an toàn khi phẫu thuật... Trong các tài liệu trong và ngoài nước, rất ít nghiên cứu đánh giá sự xâm lấn của UT da không hắc tố qua các lát cắt. Một số nghiên cứu đánh giá sự xâm lấn qua diện cắt của phẫu thuật Mohs. Đây là kỹ thuật loại bỏ hoàn toàn tổ chức UT theo diện cắt hình lòng chảo, sau đó kiểm tra bằng kính hiển vi 100% diện cắt ở bề mặt đáy để tìm ra vị trí còn UT. Điều

này cho phép bảo vệ tối đa tổ chức lành và đảm bảo kết quả điều trị ở mức cao nhất và đánh giá độ sạch diện cắt không còn tế bào UT. Kỹ thuật này ở Việt Nam còn chưa phổ biến, nếu thực hiện được sẽ làm giảm tỷ lệ tái phát đem lại nhiều lợi ích cho người bệnh [139],[140]. Theo kết quả nghiên cứu phẫu thuật Mohs của Phạm Cao Kiêm thực hiện trên 36 bệnh nhân theo phương pháp phẫu thuật Mohs 1 lớp (72,2%), lớp 2 có 13,9%; lớp 4 có 5,6% và kết quả thành công là 97% (sau 12 tháng không tái phát) [141]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy trong khi ở khoảng cách tới rìa u 3 mm, tỷ lệ còn UT chung cho cả 2 loại là 35,2%, ở diện cắt 4 mm tỷ lệ này chỉ còn 32,4% và đến 5 mm còn 15,5%. Như vậy, diện cắt gần khối u thì tỷ lệ còn tế bào UT cao, cắt rộng rãi xa u thì có tỷ lệ UT giảm, tuy nhiên điều này trong nghiên cứu của chúng tôi không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Trên thực tế, ở một số trường hợp việc cắt đến đâu là vừa đủ vô cùng khó vì còn phụ thuộc nhiều yếu tố khác như vị trí của u, kích thước u, thể đại thể, thể mô học. Một số nghiên cứu đưa ra tỷ lệ khác nhau còn tế bào UT ở các diện cắt viền ngoài của khuyết phẫu thuật. Việc lựa chọn đường cắt thỏa đáng phụ thuộc vào từng bệnh nhân. Tỷ lệ diện cắt còn tế bào UT rất khác nhau giữa các tác giả, theo Ang, Tan AW, diện cắt còn tế bào u là 16%; cao hơn Trần Thanh Cường: 3,4%, trong khi đó tỷ lệ của Emmett tại Australia là rất thấp chiếm 0,7%; Kuman là: 4,49%. Nhiều nhận xét cho rằng mức xâm lấn xa hơn 4 mm làm tăng nguy cơ di căn [119],[142].

Với UTTB đáy: khi điều trị cho UTTB đáy bằng phẫu thuật thông thường thì đối với thể nốt/loét và thể nông chỉ cần cắt tổn thương cách bờ nhìn thấy trên lâm sàng khoảng 5 mm đã điều trị khỏi 90%, thể xơ thì cần cắt rộng hơn từ 8-10 mm [143]. Thương tổn tiên phát với u nhỏ hơn 2 cm và không phải thể xơ, rạch da cách bờ ít nhất 4 mm đạt tỷ lệ khỏi hơn 90%. Thương tổn tái phát rạch da cách bờ thương tổn 5-10 mm cho tỷ lệ khỏi khoảng 83% [144].

Một nghiên cứu trên 16.066 trường hợp UTTB đáy sau phẫu thuật cắt u, tỷ lệ tái phát ở những u nhỏ hơn 2 cm có diện cắt cách mép u 3 mm là 5% [145]. Hai nghiên cứu khác chỉ ra cũng tỷ lệ tái phát sau 5 năm là nhỏ hơn 2% ở kích thước u và diện cắt tương tự [146],[147].

Với UTTB vảy: nhiều đánh giá cho rằng kích thước, độ dày khối u và mức độ xâm lấn là một dự báo quan trọng trong tiên lượng UTTB vảy. Nghiên cứu của Brantsch và cộng sự cho rằng UTTB vảy có độ dày lớn hơn 6 mm có mối tương quan với sự tái phát ngay tại vị trí của u. Họ cũng chia UTTB vảy thành 3 loại [148]:

- Không có nguy cơ di căn: độ dày khối u nhỏ hơn 2mm.
- Nguy cơ thấp : 2-6 mm.
- Nguy cơ cao: > 6 mm.

Diện cắt 6-10 mm cần thiết cho những u lớn hơn 2 cm. Tuy nhiên, những diện cắt lớn ở những vị trí nguy cơ cao có thể gây mất một số chức năng đối với vùng đầu mặt. Do đó diện cắt với biên độ được kiểm soát thích hợp là hướng xử trí đúng đắn ở những trường hợp này [149]. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra tỷ lệ tái phát sau 5 năm ở những u nhỏ hơn 2 cm với diện cắt 4 mm là 5-8%. Mức xâm lấn cao hơn 4 mm làm tăng nguy cơ di căn [119],[150].

4.3.1. Khoảng cách tới rìa u

Đánh giá khoảng cách tính từ rìa u tới mép ngoài của khối u đã phẫu thuật, xác định diện cắt tới từng milimet qua 4 rìa da mang tính chất đại diện cho diện cắt quanh u. Trong nghiên cứu này có 8,5% khoảng cách tới rìa u < 3 mm; 63,4% với 4-5 mm; 11,3% với 6-7 mm; 4,2% và 12,6 % đối với khoảng cách từ 8-9 mm và lớn hơn 10 mm. Một nghiên cứu trên 292 bệnh nhân của Bùi Xuân Trường cho biết khoảng cách tới rìa u nhỏ hơn 5 mm chiếm 10%; 5 mm chiếm 32%; 7 mm chiếm 36%; 10 mm chiếm 10,1% và khoảng cách lớn hơn 10 mm chiếm 0,6% [47].

Với UTTB đáy có 11,8% được phẫu thuật với khoảng cách tới rìa u nhỏ hơn 3 mm; 68,6% với 4-5 mm; 11,8% với 6-7 mm; 3,9% với 8-9 mm và 3,9% với khoảng cách lớn hơn 10 mm. Như vậy cắt rộng dưới 5 mm là chủ yếu (80,4%). Đây được cho là mức cắt rộng vừa đủ được thể hiện qua nhiều báo cáo [13],[14],[15],[151]. Trong nghiên cứu của chúng tôi có 2 trường hợp được cắt rộng hơn 10 mm (3,9%), do u tái phát và ở vị trí rộng rãi. Theo Breuninger và Dietz chứng minh rằng với những UTTB đáy kích thước nhỏ hơn 1 cm, 30% được phẫu thuật với khoảng cách tới rìa u 2 mm; 16% với 3 mm và 5% với 5 mm. Ở kích thước từ 1-2 cm, tỷ lệ này lần lượt là 48%; 34% và 18% [152]. Rạch da cách bờ thương tổn 5-10 mm cho tỷ lệ khỏi khoảng 83% [144].

Với UTTB vảy, trong nghiên cứu có 50% được phẫu thuật với khoảng cách tới rìa u 4-5 mm; 10% với 6-7 mm; 5% với 8-9 mm và 35% với lớn hơn 10 mm. Tỷ lệ cắt cách rìa u ở khoảng cách 4-5 mm theo nguyên tắc phẫu thuật với UTTB vảy như trên là chưa phù hợp do việc đánh giá, xác định trên lâm sàng trước phẫu thuật khối u UT là UTTB vảy hay UTTB đáy hay nhầm lẫn do hình thái lâm sàng không khác nhau nhiều.

4.3.2. Liên quan giữa diện cắt dương tính xa nhất với thể GPBL

Đối với mức xâm lấn của UTTB đáy, theo Fleming (1995) với thể nốt/loét và thể nông, chỉ cần cắt bỏ tổn thương cách bờ nhìn thấy về mặt lâm sàng khoảng 5 mm đã điều trị khỏi 90%, với thể xơ nên cắt cách bờ 7,2 mm [143]. Diện cắt cách rìa u 5 mm được cho là chắc chắn làm giảm tỷ lệ tái phát ở những u nhỏ hơn 2 cm. Ở diện cắt 3 mm cũng có thể an toàn sử dụng để nâng cao tính thẩm mỹ cũng như đạt tỷ lệ chữa khỏi 95% [145]. Từ kết quả nghiên cứu này có thể khẳng định diện cắt trên u 5 mm sẽ mang lại an toàn cho gần 90% bệnh nhân UTTB đáy. Theo nghiên cứu của chúng tôi, diện cắt

dương tính xa nhất 3 mm chiếm tỷ lệ cao ở cả 4 thể hình thái: thể nốt loét là 38,5%; thể xơ là 42,9%; thể nông là 100% và thể hỗn hợp là 50%. Ở hai thể nốt loét và xơ xuất hiện thêm cả những diện cắt dương tính xa nhất là 4 mm và 5mm, chiếm tỷ lệ khá cao. Ngược lại, ở thể nông và hỗn hợp, diện cắt dương tính xa nhất tìm thấy được xa nhất chỉ là 3 mm. Chúng tôi không tìm ra bằng chứng nào trong nghiên cứu chỉ ra được mối liên quan giữa diện cắt dương tính xa nhất của u với hình thái lâm sàng của UTTB đáy.

Đối với UTTB vảy, diện cắt dương tính xa nhất chủ yếu tìm thấy được là 4 mm (độ biệt hóa I: 40%; độ II: 45,5%; độ III: 50%). Tỷ lệ dương tính ở các diện cắt 5 mm cũng khá cao ở trường hợp độ biệt hóa II (27,3%) và độ III (25%). Diện cắt dương tính 6 mm còn xuất hiện ở một trường hợp độ II (9,1%). Theo các tài liệu, với UTTB vảy, rìa diện cắt được khuyến cáo là 4 - 15 mm tính từ quầng đỏ [53].

Nghiên cứu còn cho thấy tỷ lệ còn tế bào UT ở các diện cắt 2 mm; 3 mm ở UTTB đáy tương ứng là 19,6% và 41,2%, cao hơn so với UTTB vảy (5% và 20%). Ngược lại, ở các diện cắt 4 mm và 5 mm tỷ lệ UTTB đáy (27,5% và 9,8%) thấp hơn so với UTTB vảy (45% và 25%). Diện cắt dương tính 6 mm còn xuất hiện ở 1 trường hợp UTTB vảy (5%). Với các UTTB đáy và UTTB vảy đều có sự xâm nhập trong giới hạn như các tài liệu. UTTB vảy còn có khả năng xâm nhập lớn hơn 5 mm và có thể tới 10 mm như nhiều y văn đã đề cập đến.

4.3.3. Diện cắt dương tính theo vị trí u

Vị trí u là một trong những nguyên nhân quan trọng nhất gây tái phát và di căn. U vùng đầu cổ có nhiều khả năng tái phát và di căn [110], [111], [112], [113],[114]. Swanson minh họa các vị trí có nguy cơ cao ở khuôn mặt như một vùng chữ “H”, thể hiện diện cắt còn tế bào UT nhiều nhất ở các vị trí mũi, má, thái dương [114].



Hình 4.1: Vị trí UT da thường gặp vùng đầu mặt [114]

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, diện cắt dương tính ở vị trí mũi và quanh mắt là cao nhất: 23,9% và 22,5%. Diện cắt dương tính xa nhất 5 mm gặp nhiều ở vị trí da đầu (50%) và má (27,3%). Diện cắt 4 mm tại vị trí mũi má, thái dương và đầu cũng chiếm một tỷ lệ cao (đều 50%). Trong khi ở các trường hợp UTTB đáy, chúng tôi thường tìm thấy tế bào UT ở các diện cắt 2 và 3 mm, như ở mũi (41,7% ở 2 mm và 33,3% ở 3 mm), vành tai và trước tai (100% ở 3 mm). Các trường hợp UTTB vảy, tế bào UT lại được tìm thấy ở diện cắt 4-5 mm như ở má (66,7%) hay đầu (100% ở diện 4-5 mm) và thái dương (80% ở diện 4-5 mm). Thậm chí, ở má xuất hiện 1 trường hợp có diện cắt dương tính 6 mm (9,1%) Một số nghiên cứu cho rằng, UTTB vảy ở các vị trí tai, trán, da đầu, môi dưới thường có tỷ lệ diện cắt dương tính cao [119].

4.3.4. Diện cắt dương tính theo kích thước u

Kích thước u cũng là một yếu tố quan trọng liên quan tới sự tái phát. Khối u to hơn sẽ có nguy cơ tái phát cao hơn [120],[121],[122]. Ở UTTB đáy, u có kích thước lớn hơn có xâm nhập sâu hơn [122]. Kích thước tổn thương của UTTB vảy có mối tương quan với sự tái phát và độ sâu của xâm lấn [120]. Cherpelis cùng các cộng sự công bố trong nghiên cứu của họ rằng kích

thước khối u có mối liên quan có ý nghĩa thống kê với sự di căn, cụ thể khối u lớn hơn 2 cm có nguy cơ di căn cao hơn, trong khi đó những trường hợp UTTB vảy xâm lấn có kích thước nhỏ hơn 1 cm cũng có thể di căn, nhưng tỷ lệ ít hơn [123].

Chúng tôi thấy trong các u có kích thước khác nhau, diện cắt dương tính xa nhất lớn nhất ở các u có kích thước nhỏ hơn 1 cm là 4 mm (chiếm 37,5%); ở các kích thước lớn hơn, tế bào UT được tìm thấy xa hơn với tỷ lệ cao hơn. Tế bào UT ở lát cắt 5 mm chiếm 12,8% số u 1-2 cm; 18,2% số u 2-4 cm và tới 50% số u lớn hơn 4 cm. Tỷ lệ này cũng khá cao ở lát cắt 4 mm, lần lượt là 23,1% (kích thước u 1-2 cm); 45,5% (kích thước u 2-4 cm) và 50% (kích thước u lớn hơn 4 cm). Đặc biệt có 1 trường hợp u kích thước 2-4 cm có diện cắt dương tính xa nhất là 6 mm (4,5%).

Như vậy với các u còn nhỏ, phẫu thuật viên sẽ có nhiều sự lựa chọn đường cắt rộng hơn để tránh tái phát. Trong nghiên cứu của chúng tôi, không thấy có sự liên quan giữa kích thước u với tình trạng xâm nhập vi thể ở diện cắt trên nhỏ hơn 5 mm. Điều này chưa khẳng định được u có kích thước càng lớn thì xâm lấn càng rộng lên các diện cắt trên u. Như vậy u có kích thước 1-4 cm thì đường cắt gần như tương đương ở mức 5 mm trở lên với UTTB đáy là đủ hết xâm lấn u. Với UTTB vảy mặc dù nghiên cứu thấy mức xâm lấn chỉ đến 5 mm tuy nhiên tỷ lệ xâm lấn tương đối cao ở mức 4 mm và 5 mm. Do vậy, chúng tôi khuyến cáo đối với UTTB vảy cần cắt rộng đến 10 mm cách rìa u. Một số trường hợp xác định thể GPBL trên lâm sàng khó khăn, nên phẫu thuật viên chấp nhận cắt rộng chỉ 5 mm và bệnh nhân được khuyến cáo theo dõi sát sao hơn. Trên thực tế, những trường hợp UT da khi đến bệnh viện là những u có kích thước lớn, nên việc lựa chọn đường cắt tối ưu đảm bảo thẩm mỹ khó có thể thực hiện. Vì vậy bệnh nhân UT da đành phải chấp nhận mất thẩm mỹ để đổi lại giảm nguy cơ tái phát hoặc chữa khỏi bệnh. Do vậy,

phát hiện bệnh UT da ở giai đoạn sớm, khi khối u còn nhỏ, sẽ cho phép phẫu thuật viên nhiều lựa chọn có lợi cho bệnh nhân hơn để tránh tái phát, đảm bảo chức năng và có thẩm mỹ tốt hơn. Để làm được điều này, cần phải tuyên truyền sâu rộng trong cộng đồng, giúp người dân đi khám bệnh định kỳ nhằm phát hiện UT giai đoạn sớm.

4.3.5. Mức xâm lấn đáy u

Mức xâm lấn đáy u trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ còn tế bào UT vùng đáy u ở lát cắt 1 mm chiếm 77,5%, lát cắt 2mm và 3mm là 4,2%, có 1 trường hợp UTTB đáy xâm nhập tới 4 mm, đây là trường hợp UTTB đáy tại vùng quanh mắt, do tổ chức quanh mắt lỏng lẻo, tế bào UT xâm nhập sâu và bệnh nhân phải khoét mắt. Việc bảo tồn nhãn cầu là khó khăn do tỷ lệ tái phát tại vùng quanh mắt cao, xâm lấn vào nhãn cầu.

Như vậy sự xâm lấn của đáy u là rất hạn chế, không xâm lấn sâu xuống dưới dù u to hay nhỏ. Trong các bài báo, đặc biệt là UTTB đáy thể xơ rất ít khi xâm lấn qua màng đáy, như vậy là UT da ít xâm lấn sâu vào tổ chức dưới da. Tuy nhiên khuyến cáo trong UTTB vảy, sự xâm lấn sâu của tế bào UT được đánh giá lan rộng từ 2-8 mm, do vậy khi phẫu thuật cắt UTTB vảy cần cắt sâu hơn tới lớp mỡ, cơ.

4.4. ĐẶC ĐIỂM BỘC LỘ P53 VÀ KI-67 BẰNG HÓA MÔ MIỄN DỊCH

4.4.1. Mối tương quan giữa HMMD với thể GPBL ung thư da

Hóa mô miễn dịch p53

Mức độ dương tính p53 được xác định theo tỷ lệ số tế bào bắt màu khi nhuộm HMMD. Trong 51 trường hợp UTTB đáy, có 49 trường hợp (96,1%) p53 dương tính, trong đó có 58,8% dương tính (1+), dương tính (2+) là 27,5% và dương tính (3+): 9,8%. Kết quả của các nghiên cứu về biểu hiện p53 trong

UTTB đáy là khác nhau qua các nghiên cứu: Rasoul Esmaeili năm 2015 và Monsef cùng cộng sự năm 2012 cùng đưa ra tỷ lệ dương tính p53 ở UTTB đáy là 76%, thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi [92],[153]. Tuy nhiên, một nghiên cứu khác lại cho kết quả cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Nghiên cứu của Abu Juba năm 2013 cho thấy tỷ lệ p53 dương tính trong UTTB đáy là 100% [154], Karagece cùng cộng sự cho kết quả p53 dương tính 98% [155]. Bên cạnh đó, tỷ lệ mức dương tính (2+) trở lên ở một số nghiên cứu cao so với chúng tôi. Nghiên cứu của Monsef cùng CS cho thấy p53 dương tính (2+) là 60%, của Abu Juba và cs là 50% [153],[154]. Nhiều nghiên cứu đưa ra tỷ lệ p53 dương tính ở UTTB đáy dao động từ 42% đến 90% [85],[92],[153],[156]. Sự khác biệt về tỷ lệ p53 dương tính trong UTTB đáy qua các nghiên cứu có thể giải thích là do sự khác nhau về chủng tộc và địa dư của các bệnh nhân UTTB đáy.

Trong 20 trường hợp UTTB vảy, có 13 trường hợp (65%) thể hiện p53 dương tính, trong đó mức (1+) và (3+) đều chiếm 25%, mức (2+) chỉ chiếm 15%. Nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra được sự khác biệt về mức độ dương tính của p53 giữa UTTB đáy và UTTB vảy có ý nghĩa thống kê. ($p < 0,05$). Một số nghiên cứu khác trên thế giới cho kết quả khá khác biệt. Mothebat Gouda và CS đưa ra tỷ lệ p53 dương tính ở UTTB vảy lên tới 88,9%, của Batinac và cs là 86,7%, của Khodaeiani và cs là 50,2% và Kerschmann và cs là 60%, thậm chí nghiên cứu của Abu Juba và cs cho kết quả 100% [154],[157],[158],[159],[160]. Về tỷ lệ giữa các mức độ dương tính cũng có sự khác biệt nhất định giữa các nghiên cứu với nhau. Recep Birdi chỉ ra dương tính (1+) chiếm 35%; dương tính (2+) là 37,5% và dương tính (3+) là 27,5%; trong khi đó, Khodaeiani đưa ra các tỷ lệ này lần lượt là 60%; 20% và 20% [159],[161].

Bảng 4.3: Tỷ lệ p53 dương tính ở một số nghiên cứu

Tỷ lệ dương tính p53	Rasoul 2015 [92]	Monsef 2012 [153]	AbuJuba 2013 [154]	Karagece 2012 [155]	Gouda 2014 [157]	Batinac 2004 [158]	Chúng tôi
UTTB đáy	76%	76%	100%	98%	-	-	96%
UTTB vảy	-	-	100%	-	88,9%	86,7%	65%

Về tỷ lệ p53 dương tính theo thể MBH:

Với UTTB đáy, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ p53 dương tính 97,4% ở thể nốt/loét, 75% ở thể hỗn hợp và 100% ở thể nông. Kết quả của chúng tôi có khác biệt so với một số nghiên cứu khác. Nghiên cứu của Koseoglu, tỷ lệ p53 dương tính ở thể nốt là 18,8%, thể nông là 0% và thể hỗn hợp là 71,4% [162]. Auepemkiate chỉ ra tỷ lệ p53 dương tính ở thể nốt là 45,5%; thể nông 25% và thể hỗn hợp 50% [163].

Về độ mô học của UTTB vảy, có tới 60% u độ mô học I; 54,5% u độ II và 100% u độ III có kết quả dương tính với p53. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về mối liên quan giữa bộc lộ kháng nguyên p53 với hình thái tổn thương của UTTB đáy ở đưa ra là khác nhau. Kết quả nghiên cứu của De Rosa và CS cũng như nghiên cứu của Barrett và CS cho thấy bộc lộ protein p53 phản ánh hình thái tổn thương của UTTB đáy [164],[165]. Ngược lại, nghiên cứu của Healy và Auepemkiate lại cho thấy bộc lộ protein p53 không phản ánh hình thái tổn thương của UTTB đáy [163],[166]. Trên thực tế, nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng thể hiện không có mối tương quan giữa sự bộc lộ kháng nguyên p53 quá mức và hình thái u của UTTB đáy [92],[162],[163].

Hóa mô miễn dịch Ki-67

Thực hiện nhuộm HMMD với Ki-67 trên 71 trường hợp, kết quả cho thấy tỷ lệ Ki-67 dương tính ở UTTB đáy là 84,3% và với UTTB vảy là 100%. Có 8 trường hợp âm tính Ki-67 (11,3%) và đều là các UTTB đáy. Các trường hợp UTTB đáy dương tính Ki-67, tỷ lệ cao nhất là 51% thể hiện mức dương tính (1+); (2+) là 15,7% và (3+) là 7,6%. So sánh với UTTB vảy, mức chiếm tỷ lệ cao nhất lại là (2+) với 60%; tiếp đến là (1+) với 30% và (3+) với 10%. Sự bộc lộ Ki-67 ở UTTB đáy hay UTTB vảy có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có khác biệt với một số nghiên cứu trên thế giới. Nghiên cứu của Rasoul cho thấy tỷ lệ dương tính Ki-67 ở UTTB đáy là 60% [92], Gouda cho tỷ lệ này ở UTTB vảy là 88,3% [157]. Tỷ lệ mức dương tính (2+) trở lên đều cao hơn so với kết quả của chúng tôi, với khoảng từ 33% đến 70% [75],[92],[159],[167]; còn ở các trường hợp UTTB vảy, tỷ lệ này ở nghiên cứu của chúng tôi (70%) phù hợp với khoảng từ 40% đến 80% mà các nghiên cứu đưa ra [159],[161],[167]. Những sự khác biệt trong các kết quả nghiên cứu có thể là do sự khác biệt trong kỹ thuật HMMD, kích thước mẫu, cách lựa chọn mẫu hay nhận xét chủ quan của người đọc kết quả.

Tỷ lệ bất màu của tế bào khác nhau giữa từng hình thái u khác nhau, thậm chí khác nhau giữa những cá thể trong từng hình thái u [79],[80],[81]. Một khó khăn lớn khi đánh giá HMMD ở UTTB đáy là những tế bào trong u phân bố không đồng đều và không đồng nhất. Hơn nữa, một hình thái u ở da thường biểu hiện một hỗn hợp nhiều loại mô bệnh học khác nhau [79],[168]. Về hình thái tổn thương của UTTB đáy, có 84,6% u có hình thái nốt/loét; 100% u thể nông và hỗn hợp; và 71,4% u thể xơ thể hiện dương tính với Ki-67. Trong khi đó, ở các trường hợp UTTB vảy, 100% các u đều thể hiện dương tính với Ki-67.

4.4.2. Mối liên quan giữa HMMD và kích thước u

Ta thấy được tỷ lệ dương tính p53 chiếm đa số so với âm tính; có đến 87,5% số lượng u nhỏ hơn 1 cm; 87,2% u từ 1 đến 2 cm; 86,4% u từ 2 đến 4 cm và 100% các u có kích thước lớn hơn 4 cm xuất hiện dương tính p53 khi nhuộm HMMD. Chúng tôi không tìm được bằng chứng nào thể hiện mối liên quan giữa kích thước u và HMMD p53.

Ta cũng thấy được tỷ lệ dương tính Ki-67 chiếm đa số so với âm tính, với tỷ lệ phân bố khá tương đồng khi so sánh với tỷ lệ bộc lộ dương tính p53; có đến 87,5% số lượng u nhỏ hơn 1cm; 87,2% u từ 1 đến 2 cm; 90,9% u từ 2 đến 4 cm và 100% các u có kích thước lớn hơn 4 cm xuất hiện dương tính p53 khi nhuộm HMMD. Chúng tôi không tìm được bằng chứng nào thể hiện mối liên quan giữa kích thước u và HMMD Ki-67.

Có nhiều ý kiến khác nhau về vai trò của HMMD Ki-67 trong tiên lượng và điều trị. Một số nhà khoa học cho rằng mức độ biểu hiện Ki-67 là chỉ số về mức độ nghiêm trọng của bệnh và là tham số hữu ích trong tiên lượng [83],[169],[170]. Tuy nhiên một số nhà khoa học khác lại kết luận rằng không có sự khác biệt nào có ý nghĩa thống kê giữa sự tăng trưởng UTTB đáy và sự tiên lượng “thuận lợi” hay “không thuận lợi”, và chỉ số Ki-67 không thể coi là một yếu tố tiên lượng bệnh [171],[172]. Trong quá trình thực hiện nghiên cứu này, chúng tôi đã tìm hiểu rất nhiều tài liệu tham khảo ở Việt Nam và của nhiều tác giả trên thế giới. Những tài liệu có phân tích mối liên quan giữa HMMD Ki-67 và p53 với các đặc điểm vị trí, số lượng và kích thước của u khá ít, họ chỉ tập trung nghiên cứu UT vú, dạ dày, rất ít nghiên cứu về UT da vùng đầu mặt cổ. Nghiên cứu của chúng tôi đưa ra những kết quả và cách phân tích vấn đề khá mới, có thể đưa ra những ứng dụng mới trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh. Tuy nhiên, hạn chế trong nghiên cứu này là số mẫu còn

nhỏ (n=71), thời gian có hạn nên chưa có đủ thời gian để đánh giá vai trò của p53 và Ki-67 trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh.

Trên thế giới có rất ít nghiên cứu chỉ ra được mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa HMMD p53 và Ki-67 với tuổi hay giới tính. Đa số các nhà khoa học đều chưa tìm được kết quả nào mà HMMD p53; Ki-67 có liên quan đến độ tuổi hay giới của bệnh nhân [153],[162],[163],[165],[173].

4.5. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM ĐỘT BIẾN GEN *TP53*

4.5.1. Các loại đột biến gen *TP53*

Chúng tôi tập trung phân tích đột biến gen *TP53* từ exon 5 đến exon 8, phát hiện 36 đột biến từ trải dài từ codon 132 đến codon 300. Trong đó, đột biến ở exon 5, exon 6 và exon 8 đều có 8 trường hợp (22,2%), tại exon 7 xuất hiện 12 trường hợp (33,4%) và đa số các đột biến gen *TP53* được phát hiện trong khu vực từ exon 5-8. Các nghiên cứu ở trong nước hay thế giới tiến hành phân tích đột biến gen *TP53* trên rất nhiều đoạn exon khác nhau. Nghiên cứu của Trần Đức Phấn phân tích đột biến tại các exon từ 2 đến 8, trong khi đó, ở bài báo của Bolshakov cùng CS là từ exon 4 đến 9; của Ling và cs là từ 5 đến 9; của Reifenger là từ exon 4 đến 10 và trong một nghiên cứu mới đây của Wang cùng CS năm 2014 là từ exon 2 đến 11 [55],[174],[175],[176],[177].

Những codon thường xuất hiện đột biến mà các nghiên cứu gọi là “điểm nóng đột biến điển hình” ở các trường hợp UTTB đây là codon 177; 196 và 245 [85],[178]. Trong đó, đột biến tại codon 177 không xuất hiện thường xuyên trong các khối u ác tính mà chỉ điển hình cụ thể cho UTTB đây ở da. Rất ít tài liệu nghiên cứu về codon này, một trong số đó chỉ ra rằng codon 177 là một trình tự tự sửa chữa rất chậm khi tiếp xúc với tia UV [179]. Đột biến tại codon 196 và 245 thì thường được phát hiện ở UT vú hay ruột kết, riêng

đột biến tại codon 245 còn phổ biến ở UT phổi, buồng trứng, dạ dày, thực quản [178]. Ở những trường hợp UTTB vảy, điểm nóng đột biến điển hình thường xuất hiện tại codon 179, 248 và 278. Tại codon này, những tổn thương do tia UV gây ra thường được sửa chữa từ 24 - 48 giờ; trước 24 giờ, không có tổn thương nào được sửa chữa trong khi sau khoảng thời gian 48 giờ, có đến 88% các tổn thương được sửa chữa [179]. Kết quả phân tích đột biến gen *TP53* của chúng tôi cho thấy chỉ phát hiện 1/20 (5%) trường hợp UTTB đáy đột biến tại codon 196 và 2/16 (12,5%) trường hợp UTTB vảy đột biến tại codon 278.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đột biến gen *TP53* chỉ gặp ở 1 dạng duy nhất là đột biến điểm và mỗi bệnh nhân chỉ xuất hiện 1 đột biến trên vùng exon từ 5 đến 8. Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước thấy xuất hiện 3 loại đột biến ở gen *TP53*, đột biến mất đoạn lớn: mất đoạn vài trăm bp; đột biến mất đoạn nhỏ: mất đoạn vài chục bp; đột biến điểm: thay thế nucleotide [91],[180]. Đột biến điểm thường được gắn liền với giai đoạn đầu khi hình thành khối u da, trong khi đột biến mất đoạn làm cho khối u phát triển mạnh hơn khi tiếp xúc với tia cực tím [180]. Khá nhiều tác giả trên thế giới khi phân tích đột biến gen *TP53* chỉ gặp duy nhất loại đột biến điểm trên toàn bộ quần thể mẫu UTTB đáy [177],[178],[181]. Cũng theo một số nghiên cứu khác, trường hợp có 1 đột biến chiếm khoảng từ 15-50% [86],[100],[139],[150].

Kết quả phân tích đột biến cho thấy 35 trường hợp (97,2%) là đột biến sai nghĩa và chỉ có 1 trường hợp (2,8%) là đột biến mất nghĩa. Tất cả các đột biến điểm trong nghiên cứu của chúng tôi đều là đột biến thay thế axit amin, xảy ra ở tất cả các đoạn gen *TP53* được phân tích và tìm thấy biến đổi. Trường hợp đột biến mất nghĩa thuộc về một mẫu UTTB đáy, xuất hiện ở exon 6, codon 236, bộ ba mã hóa axit amin Tyrosine TAC đã biến đổi thành bộ ba kết thúc TAG. Trường hợp này, sự biến đổi trong phân tử protein là

nhiều vì gen sẽ ngừng lại, kết thúc ngay khi xuất hiện đột biến. Trong những trường hợp đột biến sai nghĩa, có 11 loại biến đổi nucleotide được phát hiện gây biến đổi axit amin trong phân tử protein. Trong đó, loại biến đổi nucleotide C→T thường được nhắc đến trong rất nhiều bài báo nghiên cứu như là một kết quả biến đổi với nguyên nhân chính là tiếp xúc với tia UV trong ánh sáng mặt trời, chỉ chiếm 16,7% và không phải loại biến đổi gặp nhiều nhất trong nghiên cứu này (C→G: 19,4%). Đột biến C→T ở các nghiên cứu nước ngoài, đặc biệt là trên những người da trắng, chiếm tỷ lệ rất cao trong các loại biến đổi nucleotide, từ 50% đến 72% [84],[174],[175],[176],[177],[180].

Hình 4.2 thể hiện một phần sự phân bố (các codon xảy ra nhiều đột biến gen *TP53* từ Exon 5 đến Exon 8) đột biến gen *TP53* đã được phát hiện và tổng hợp từ hơn 1.400 y văn trên thế giới về 150 loại UT ở người, trong đó có UT da không hắc tố [182]. Các đột biến gen *TP53* được phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi có nét tương đồng với bảng phân bố khi chúng đều nằm tại các codon xảy ra nhiều ra nhiều đột biến. Đặc biệt tại các codon 176, 196, 237, 278 và 282, cơ sở dữ liệu tổng hợp được từ 200 đến hơn 600 đột biến được tìm thấy tại mỗi codon này.

DISTRIBUTION OF p53 MUTATION

Amino acids residues are shown using both 3 or 1 letter abbreviation

Yellow: codon number

White: wt codon

Light orange: 3 letter aa

light blue: 1 letter aa

The last lane shows the number of mutations found at this position in the UMD p53 database

The frequency of p53 mutations is colored coded:

Red: between 1 and 10 mutations

Green: between 11 and 100 mutations

Blue: > 100 mutations

141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	CCG	CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG
Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met
C	P	V	Q	L	W	V	D	S	T	P	P	P	G	T	R	V	R	A	M
154	41	72	92	55	104	43	28	37	32	210	172	55	107	113	104	229	264	117	37

161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
GCC	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG
Ala	Iso	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu
A	I	Y	K	Q	S	Q	H	M	T	E	V	V	R	R	C	P	H	H	E
112	51	195	66	60	58	67	66	33	37	56	66	200	77	1092	343	107	79	341	38

221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	AGT
Glu	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Iso	His	Tyr	Asn	Tyr	Met	Cys	Asn	Ser
E	P	P	E	V	G	S	D	C	T	T	I	H	Y	N	Y	M	C	N	S
39	27	18	41	24	31	27	44	42	33	23	58	29	167	56	130	214	197	130	70

241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
TCC	TGC	ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG	AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC
Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro	Iso	Leu	Thr	Iso	Iso	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser
S	C	M	G	G	M	N	R	R	P	I	L	T	I	I	T	L	E	D	S
208	198	55	227	718	135	82	1544	573	134	96	51	37	57	84	42	57	137	67	25

261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
AGT	GGT	AAT	CTA	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA
Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg
S	G	N	L	L	G	R	N	S	F	E	V	R	V	C	A	C	P	G	R
22	38	19	33	46	195	65	18	38	97	83	165	1425	98	168	72	93	268	73	231

281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	CAC	GAG	CTG	CCC
Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	His	Glu	Leu	Pro
D	R	R	T	E	E	E	N	L	R	K	K	G	E	P	H	H	E	L	P
178	616	103	30	200	152	65	23	30	73	28	34	34	74	23	30	21	90	27	27

Hình 4.2: Phân bố phát hiện đột biến TP53 trong ung thư

4.5.2. Tình trạng đột biến gen *TP53* ở UTTB đáy và UTTB vảy

Trong nghiên cứu, chúng tôi chọn ra 51/71 mẫu để làm xét nghiệm đột biến gen *TP53* qua PCR, kết quả có 36 trường hợp mang đột biến gen *TP53* (70,6%). Trong đó có 20/33 trường hợp (60,6%) UTTB đáy và 16/18 trường hợp (88,9%) UTTB vảy mang đột biến gen *TP53*. Ta có thể dễ dàng thấy được tỷ lệ đột biến gen *TP53* ở UTTB vảy cao hơn rõ rệt so với các trường hợp UTTB đáy, sự khác biệt này mang ý nghĩa thống kê.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với một số nghiên cứu của Việt Nam và trên thế giới. Nhiều tác giả cho rằng tỷ lệ đột biến gen *TP53* ở UTTB đáy ở khoảng 30% đến 50% [84],[85],[87],[108],[176],[183]. Một số nghiên cứu khác cho kết quả nằm ngoài khoảng này, cụ thể, Ling và cộng sự kết luận có 66,7% UTTB đáy thể hiện đột biến gen *TP53*, điểm khác biệt là đối tượng của nghiên cứu này chỉ có 9 người, trong đó đa số là các UTTB đáy di truyền, mỗi bệnh nhân, tác giả lấy 3 mẫu để xét nghiệm nên tỷ lệ có phần cao hơn so với nhiều nghiên cứu khác [175]. Ngược lại, nghiên cứu của Wang CS thực hiện tại Trung Quốc được công bố vào năm 2014 mới đây chỉ ra kết quả này chỉ là 20%, ông cho rằng tỷ lệ này thấp hơn nhiều so với những nghiên cứu trên người da trắng là vì màu da trắng “nhạy cảm” và tiếp xúc nhiều hơn với tia UV ở ánh sáng mặt trời so với người da màu [177]. Ở các trường hợp UTTB vảy, tỷ lệ ở các nghiên cứu khác cũng thấp hơn nhiều so với kết quả của chúng tôi. Bolshakov cùng cộng sự chỉ ra tỷ lệ đột biến gen *TP53* ở UTTB vảy là 41,2%; ở nghiên cứu của Moles chỉ là 15% [174],[183].

Bảng 4.4: Tỷ lệ đột biến gen *TP53* theo một số nghiên cứu

Tỷ lệ đột biến p53	<i>Moles</i> 1993 [183]	<i>Ling</i> 2001 [175]	<i>Bolshakov</i> 2003 [174]	<i>Ghaderi</i> 2005 [86]	<i>Wang</i> 2014 [177]	<i>Chúng</i> <i>tôi</i>
UTTB đáy	-	66,7%	47,3%	68,3%	20%	60,6%
UTTB vảy	15%	-	41,2%	-	-	88,9%

Khi phân tích tỷ lệ đột biến gen *TP53* trên các exon, ở các trường hợp UTTB đáy, có 12,1% đột biến tại exon 5; 15,2% ở exon 6; 18,2% ở exon 7 và 15,2% ở exon 8. Ở các trường hợp UTTB vảy, các tỷ lệ trên exon 5-8 lần lượt là 22,2%; 16,7%; 33,3% và 16,7%. Ở cả hai thể giải phẫu bệnh lý ta thấy đột biến xảy ra trên exon 7 chiếm tỷ lệ cao nhất. Tuy nhiên kết quả kiểm định khi bình phương kết luận rằng không có mối tương quan có ý nghĩa thống kê nào giữa vị trí exon đột biến gen *TP53* và thể GPBL của UT da. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ tập trung phân tích các đột biến nằm trên exon 5 đến exon 8, trong đó có 15/51 mẫu không phát hiện đột biến gen *TP53* (29,4%). Các mẫu này có thể xuất hiện đột biến ngoài các exon 5- exon 8, hoặc cũng có thể phát hiện được các mối tương quan giữa đột biến với GPBL hay các đặc điểm khác của u khi phân tích ngoài những exon này. Điều đó là hạn chế và sai số trong nghiên cứu của chúng tôi. Những hạn chế này có thể mở ra những định hướng mới cho các nghiên cứu trong tương lai.

4.5.3. Mối liên quan giữa đột biến gen *TP53* và dấu ấn HMMD

Ở các trường hợp UTTB đáy có HMMD p53 dương tính, ta có thể thấy được mức độ dương tính hay tỷ lệ các tế bào bắt màu càng cao thì tỷ lệ đột biến gen *TP53* càng cao: (1+) là 55,6%; (2+) là 63,6% và (3+) lên tới là 75%. Cũng tương tự như vậy, ở UTTB vảy, mức độ dương tính càng cao thì tỷ lệ đột biến cũng cao theo: (1+) là 75% và (2+) với (3+) đều cho tỷ lệ 100% đột biến. Đối với những trường hợp dương tính với dấu ấn Ki-67, tỷ lệ đột biến của UTTB đáy thấp hơn UTTB vảy, lần lượt ở mức (1+) là 68,8% và 83,3%; mức (2+) là 66,7% và 90%; mức (3+) là 50% và 100%. Tuy nhiên, các sự khác biệt này đều không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Đột biến gen *TP53* đại diện hầu hết sự thay đổi di truyền phổ biến trong nhân các khối u. Sự tích tụ của protein cũng có thể xảy ra như là kết quả của biểu sinh thay đổi, do đó nó không phải là một chỉ số bắt buộc của một đột

biến gen [184]. Nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sự tăng sinh protein p53 quá mức không phải lúc nào cũng gây ra đột biến gen *TP53* [185],[186],[187]. Nghiên cứu của Yoshiaki trên 12 mẫu UTTB đáy trên các exon 2, 10 và 11, chỉ ra có 2/4 trường hợp dương tính p53 phát hiện đột biến và cả 2 đều là đột biến sai nghĩa; trong 8 trường hợp âm tính p53 còn lại thì có 3 trường hợp đều phát hiện đột biến mất nghĩa. Giải thích cho sự thiếu nhất quán này, tác giả cho rằng có thể đột biến xuất hiện trên ngoài những exon đang phân tích (exon 3-9), hoặc kỹ thuật PCR được phân tích ở 3 mức glyxerol khác nhau 0%, 5% và 10% và lý do thứ ba là đột biến thực sự không xuất hiện [180]. Bên cạnh đó cũng có một số ý kiến trái chiều. Nghiên cứu của Lidia Frey năm 2010 thực hiện phân tích 10 mẫu UTTB đáy trên exon 5-8 như nghiên cứu của chúng tôi, trong đó có 6 mẫu có mức dương tính cao và 4 mẫu có mức dương tính thấp. Kết quả cho thấy cả 4 mẫu có mức dương tính thấp đều không xuất hiện đột biến gen *TP53*. Trong 6 mẫu có mức dương tính cao, có 4 mẫu được phát hiện đột biến gen *TP53* và tác giả này cho rằng có mối liên quan giữa mức tăng sinh p53 và đột biến gen *TP53* [188]. Các nghiên cứu về mối tương quan giữa mức tăng sinh của p53 và Ki-67 với đột biến gen *TP53* khá phổ biến trong UT vú, thận, đại trực tràng, tử cung... nhưng với UT da và đặc biệt là UT da vùng đầu mặt cổ thì vẫn còn là một đề tài khá mới mẻ ở cả trong nước và trên thế giới. Đây có thể là một định hướng mới cho các nghiên cứu về gen, hóa mô miễn dịch ở UT da trong tương lai.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 71 trường hợp UT da vùng đầu mặt cổ, trong đó có 51 trường hợp UTTB đáy và 20 trường hợp UTTB vảy, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Mức xâm lấn của ung thư da

- Trung bình khoảng cách tới rìa u của UTTB đáy ($5,1 \pm 1,57$ mm) nhỏ hơn của UTTB vảy ($7,5 \pm 3,76$ mm), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Có mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa khoảng cách tới rìa u và thể giải phẫu bệnh lý của u ($p < 0,05$).

- **Mức xâm lấn rìa u:** Ở UTTB đáy, diện cắt dương tính xa nhất 3 mm và 4 mm chiếm tỷ lệ cao nhất, lần lượt là 41,2% và 27,5%. Ở UTTB vảy, diện cắt dương tính xa nhất chiếm tỷ lệ cao nhất là 4 mm (45%); 5 mm (25%) và có 1 trường hợp lên tới 6 mm (5%). Liên quan không có ý nghĩa thống kê giữa diện cắt dương tính xa nhất với từng đặc điểm sau: thể GPBL, hình thái lâm sàng của UTTB đáy, độ mô học của UTTB vảy, thời gian khởi phát bệnh, vị trí u và kích thước u ($p > 0,05$).

- **Mức xâm lấn của đáy u:** xâm lấn chủ yếu là 1 mm ở cả UTTB đáy (76,5%) và UTTB vảy (80%). Càng xuống sâu, tỷ lệ còn tế bào UT càng ít: 2 mm là 4,2%; 3 mm là 4,2% và 4 mm là 1,4%. Liên quan giữa xâm lấn đáy u với thể giải phẫu bệnh không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

2. Đặc điểm gen TP53, bộc lộ p53, Ki-67 bằng HMMD và mối liên quan của chúng với lâm sàng, mô bệnh học

Kết quả nhuộm HMMD:

- Tỷ lệ dương tính p53 ở UTTB đáy là 96,1%, cao hơn so với UTTB vảy là 65%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Tỷ lệ dương tính Ki-67 ở UTTB đáy là 84,3%, thấp hơn so với UTTB vảy là 100%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Mối liên quan giữa bộc lộ p53; Ki-67 với hình thái lâm sàng của UTTB đáy, độ mô học UTTB vảy và kích thước của u không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

- Trong các trường hợp HMMD dương tính với p53:

+ UTTB đáy: đột biến gen *TP53* ở 55,6% mức (1+); 63,6% mức (2+) và 75% mức (3+).

+ UTTB vảy: đột biến gen *TP53* ở 75% mức (1+); 100% mức (2+) và (3+).

Ở cả 2 thể GPBL, mức dương tính HMMD p53 càng cao thì tỷ lệ phát hiện đột biến gen *TP53* càng cao, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

- Trong các trường hợp HMMD dương tính với Ki-67:

+ UTTB đáy: đột biến gen *TP53* ở 68,8% mức (1+); 66,7% mức (2+) và 50% mức (3+). Mức dương tính càng cao, tỷ lệ đột biến gen *TP53* càng giảm ($p>0,05$).

+ UTTB vảy: đột biến gen *TP53* ở 83,3% mức (1+); 90% mức (2+) và 100% mức (3+). Mức dương tính càng cao, tỷ lệ đột biến gen *TP53* càng cao ($p>0,05$).

Kết quả giải trình tự TP53:

- Phát hiện 36/51 mẫu mang đột biến gen *TP53* (70,6%), trong đó 97,2% là đột biến sai nghĩa và 2,8% là đột biến mất nghĩa. Các đột biến xuất hiện ở Exon 5 đến Exon 8, trong đó Exon 7 xuất hiện nhiều đột biến nhất (33,3%).

- Tỷ lệ phát hiện đột biến gen *TP53* ở UTTB đáy là 60,6%, thấp hơn so với ở UTTB vảy là 88,9%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Liên quan không ý nghĩa thống kê giữa đột biến gen *TP53* với hình thái UTTB đáy và độ mô học UTTB vảy.

KIẾN NGHỊ

1. Mức xâm lấn trong UTTB đáy với diện cắt 5mm là đủ an toàn cho người bệnh, với UTTB vảy diện cắt u cần rộng rãi hơn, trên 10mm là đủ an toàn cho người bệnh.
2. Cần tiếp tục nghiên cứu về vai trò của gen *TP53* và mức tăng sinh p53, Ki-67 trong UT da, cơ chế bệnh sinh của UTTB đáy và UTTB vảy để tìm ra các thuốc điều trị thích hợp.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Văn Hùng, Tạ Văn Tờ (2013), Đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học và dấu ấn miễn dịch p53,Ki-67 của các ung thư biểu mô da, *Hội nghị khoa học nghiên cứu sinh lần thứ XIX năm 2013*- Trường Đại học Y Hà Nội, số 20, 19-24.
2. Nguyễn Văn Hùng, Tạ Văn Tờ, (2014), Đánh giá sự bộc lộ dấu ấn miễn dịch p53,Ki-67 của các ung thư biểu mô da và các yếu tố liên quan, *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*”, số 2, 499-505.
3. Nguyễn Văn Hùng (2016), Nghiên cứu biểu hiện gen TP53 trong ung thư biểu mô tế bào đáy vùng đầu mặt cổ tại Bệnh viện K, *Tạp chí Y học thực hành*, số 7, 15-18.
4. Nguyễn Văn Hùng (2016), Đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học và dấu ấn miễn dịch p53,Ki-67 của các ung thư biểu mô da vùng đầu mặt cổ tại Bệnh viện K từ 2012-2014, *Tạp chí Y học thực hành*, số 7, 77-79.
5. Nguyễn Văn Hùng (2016), Tình trạng đột biến gen TP53 trong ung thư biểu mô tế bào vảy vùng da đầu mặt cổ tại Bệnh viện K, *Tạp chí ung thư học Việt Nam*, Hội thảo Quốc gia PCUT lần thứ XVIII, số 2, 315-319.
6. Nguyễn Văn Hùng (2016), Đánh giá mức xâm lấn trong điều trị ung thư da vùng đầu mặt cổ bằng phẫu thuật tại Bệnh viện K từ 2012-2014, *Tạp chí Y học thực hành*, số 9, 111-113.
7. Nguyễn Văn Hùng (2016), Nghiên cứu biểu hiện gen TP53 trong ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu mặt cổ tại Bệnh viện K, *Tạp chí Y học thực hành*, số 9, 68-70.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Stern RS (2002). Prevalence of a history of skin cancer in 2007: results of an incidence-based model. *Arch Dermatol.* 146(3), 279-282.
2. Marks R (1997). Epidemiology of non-melanom skin cancer and solar keratoses in Australia: a tale os self-immolation in Elysian fields. *Australas J Dermatol.* 38 Suppl 1, 26-29.
3. Sherman C. D., J.D (1990). Skin cancer. *Manual of clinical oncology*, UICC: 172-178.
4. Levi F., Te V.C, Randimbison L et al (2001). Trends in skin cancer incidence in Vaud: an update, 1976-1998. *Eur. J. Cancer Prev*, 10, 371-373.
5. Hoey S.E, Devereux C.E, Murray L et al, (2007). Skin cancer trends in Northern Ireland and consequences for provision of dermatology services. *Br. J. Dermatol*, 156,1301-1307.
6. Venker T., Sugar J. (1964). Early diagnosis, pathohistology and treatment of maglignant tumor of skin, Akadmiai kiado, Budapest. 162-238.
7. Gunter B. (2000). Atlas of Cancer of the Skin. *Churchill Livingstone*, 1-23.
8. Abbas, O.L.,H. Borman (2012). Basal Cell Carcinoma: A Single-Center Experience. *ISRN Dermatology*, 2012: p. 1-6.
9. Kim, J. et al. (2012). Risk factors and outcomes associated with severe clostridium difficile infection in children. *Pediatr Infect Dis J.*, 31(2), 134-8.
10. Bulliard J.L., Panizzon R.G., Levi F. (2009). Epidemiology of epithelial skin cancer. *Rev Med Suisse.*, 5(200): 882,884 – 888.
11. Brouxhon S.M., Kyrkanides S., Raja V. et al. (2014). Ectodomain-specific E-cadherinantibody suppresses skin see growth and reduces tumor grade: a multitargeted therapy modulating RTKs and the PTEN-p53-MDM2 axis. *Mol. Cancer Ther.* 13(7), 1791 – 1802.

12. Soehnge H, Ouhtit A, Ananthaswamy O.N (1997). Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front. Biosci*, 2, 538-551.
13. Sng J, Koh D, Siong W.C et al (2009). Skin cancer trends among Asians living in Singapore from 1968 to 2006. *J. Am. Acad. Dermatol*, 61(3), 426- 432.
14. Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B (2002). Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br. J. Dermatol*, 147,41-47.
15. Pelucchi C., Landro A.D., Naldi L. et al (2007). Risk Factors for Histological Types and Anatomic Sites of Cutaneous Basal-Cell Carcinoma: An Italian Case-Control Study. *J. Invest. Dermatol*, 127,935-944.
16. Bùi Xuân Trường, Trần Văn Thiệp, Phó Đức Mẫn (1999). Chẩn đoán và Phẫu thuật ung thư da vùng đầu cổ. *Tạp chí thông tin Y dược*, Số đặc biệt chuyên đề ung thư, tr 122-128.
17. Nguyễn Thị Hương Giang và cộng sự (2005). Đặc điểm lâm sàng và mô bệnh học của trường hợp ung thư da và một số bệnh lý của da tại bệnh viện ung bướu Hà nội từ 2001- 2005. *Tạp chí thông tin Y dược*, 8-14.
18. Vũ Thái Hà, Lê Đức Minh, Nguyễn Hữu Sáu và cộng sự (2011). Nghiên cứu phân bố ung thư tế bào đáy tại Bệnh viện Da liễu Trung ương giai đoạn 2007-2010. *Tạp chí Y học thực hành*, 4 (760), 79-81.
19. Australian Institute of Health and Welfare and Australasian Association of Cancer Registries(2014). *Cancer in Australia: an overview, 2008*, 2008.
20. Đỗ Thị Thu Hằng (2005). *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng mô bệnh học và kết quả điều trị ung thư biểu mô da tại bệnh viện K từ 1999-2004*. Luận văn thạc sỹ y học, Đại học Y Hà Nội.

21. Jacob A (1827). An ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face. *Dublin Hosp. Rep*, 4, 232-239.
22. Jason R. Swanson and Jeffrey L. Melton (1996). *Basal cell carcinoma-contents*. last updated, January 19.
23. Gallagher R. P., Hill G. B., Bajdik C. D. et al (1995). Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 131 (2): 164-169.
24. Jorge Fairbanks Barbosa (1974). *Local flaps in head and neck: reconstruction*. chapter 2- chapter 8: 37- 409.
25. Klinggensmith RM, Millman B, and Foster PW (1994). Analysis of methods for nasal tip reconstruction. *Head and neck Surgery Journal, USA*: 347- 354.
26. Nguyễn Hữu Sáu (2014). *Ung thư tế bào đáy. Bệnh học da liễu*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1.321 - 326.
27. Rajpar S, Marsden J (2008). Basal cell carcinoma. ABC of skin cancer. *Blackwell pubshing*, 23-26.
28. Arits A.H, Schlangen M.H, Nelemans P.J et al (2011). Trends in the incidence of basal cell carcinoma by histopathological subtype. *J. Euro. Acad. Dermatol. Venereol*, 25(5), 565-569.
29. Sachs D.L, Marghoob A.A, Halpem A (2001). Geriatric dermatology. *Clin. Geriatr. Med*, 17(4), 715-738.
30. Erbagci Z, Erkilic S (2002). Can smoking and/or occupational UV exposure have any role in the development of the morpheaform basal cell carcinoma? A critical role for peritumoral mast cells. *Int. J. Dermatol*, 41(5), 275-278.
31. Goldberg L.H, Leis P, Pham H.N (1996). Basal cell carcinoma on the neck. *Dermatol. Surg*, 22, 349-353.

32. Goldberg L.H, Friedman R.H, Silapunt S (2004). Pigmented speckling as a sign of basal cell carcinoma. *Dermatol. Surg*, 30, 1553-1555.
33. Viros A., Sanchez-Laorden B., Pedersen M., et al (2014). Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature*. 511(7510), 478-482.
34. . Schosser, R.H., et al. (1979). Cutaneous horns: a histopathologic study. *South Med J*. 72(9), 1129-31.
35. Nguyễn Đại Bình (2010). *Phẫu thuật ung thư da, Điều trị phẫu thuật bệnh ung thư*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 449-464.
36. Arroyo Myxhr L.S., Hultin E., Bzhalava D., et al (2014). Human Papillomavirus Type 197 is Commonly Present in Skin Tumors. *Int. J Cancer*. 12.101 -105.
37. Đoàn Hữu Nghị (1999). Ung thư da. *Nhà xuất bản Y học*, 223-229.
38. Trịnh Quang Diện (2002). Đặc điểm lâm sàng - mô bệnh học ung thư biểu mô gai của da. *Tạp chí Y học thực hành*, 10-12.
39. Mckee P.H., marsden R.A., Santacruz D.J. (1998). Pathology of the skin with clinical correlations. *Mosby welfe*, 141-142.
40. Strick R.A. (1995). Skin cancer. *Cancer treatment*, 830-840.
41. NCCN (Clinical Practice Guidelines in Oncology) (2014). *Basal Cell and Squamous Cell Skin Cancers*.
42. Saldanha G., Fletcher A., Slater D.N. (2003). Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. *Bristish Journal of Dermatology*, 148(2), 195-202.
43. LeBoit P.E et al (2006). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and GenetiCS of Skin Tumours. *IARCPress; Lyon*, 10-19.
44. Erb E., Ji J., Wemli M. et al (2005). Role of apoptosis in basal ceil and squamous cell carcinoma formation. *Immunol. Letter*, 100, 68-72.

45. Hermanek , P., et al. (1997). *TNM atlas*.
46. Broders AC (1920). Squamous cell epithelioma of the lip. *J Am Med Assoc.* ;74:656–64.
47. Bùi Xuân Trường, Trần Văn Thiệp, Phó Đức Mẫn (2005). Phẫu thuật cắt rộng - tạo hình điều trị ung thư đầu mặt cổ. *Thông tin Y Dược*, p. 72-81
48. Lê Tuấn Hùng (2001). *Đánh giá phương pháp tạo hình quay vật da có chân nuôi và tạo hình vá da rời của bệnh nhân ung thư da đầu mặt cổ ở Bệnh viện K từ 1998 - 8/1999*. Luận văn chuyên khoa II.
49. Trịnh Quang Diện (1999). Đặc điểm lâm sàng-Mô học ung thư da không kể u hắc tố ác tính. *Tạp chí thông tin Y dược, Số đặc biệt chuyên đề ung thư*, 128-131.
50. Graham colver (2002). Skin cancer A practical guide to management. *Martin Dunitz Ltd*: 25- 43, 93- 152, 174-180.
51. Gabbi, T.V., et al., (2008). Giant superficial basal cell carcinoma treated with cryosurgery. *Dermatol Surg.* 34(10): 1441-2.
52. Mendenhall W.M., Werning J.W.,Plister D.G, (2011). Treatment of Head and Neck Cancer. *Cancer: Principles and Practice of Oncology, Lippincott William and Wilkins*, 729-734.
53. Taylor, I.V. , et al (1999). Head and neck carcinomas. *Current Therapy in Cancer. W.B. Saunder company*, 29-41.
54. Nguyễn Văn Thanh (2009). *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản giáo dục, 23-30.
55. Trần Đức Phần và CS (2015). *Nghiên cứu dịch tễ học phân tử ung thư da. Báo cáo tổng hợp đề tài nhánh cấp nhà nước. Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học, yếu tố nguy cơ, phương pháp chẩn đoán và điều trị ung thư da ở Việt Nam*. Bệnh viện Da Liễu Trung ương, Hà Nội.
56. Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498-1502.

57. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989). The p53 proto-oncogene can act as a carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. *Tumor Biol*, 22(5): 318-322.
58. Isobe M, Emanuel B.S, Givol D et al (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17pl3. *Nature*, 320, 84-85.
59. Levin A.J (1997). P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-331.
60. Bourdon J.C., Fernandes K., et al (2005). P53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes. Dev.*, 19, 2122-2137
61. Greenblatt M.S., Bennet W.P., Hollstein M. et al (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54, 4855-78.
62. Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10: 2438-2451.
63. Toshinori Ozaki, Akira Nakagawara (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers* 3: 994-1013.
64. Vousden KH, Lu X (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604.
65. Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, et al (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* 16: 6623-6633.
66. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1: 3-11
67. Grossman D., Leffell D.J. (1997). The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. *Arch. Dermatol*, 133, 1263 – 1270.

68. Telmer C. A, An J, Malehorn D. E et al (2003). Detection and assignment of *TP53* mutations in tumor DNA using peptide mass signature genotyping. *Hum. Mutat*, 22, 158-165.
69. Phan Thị Phi Phi (2007). *Sự phát triển của tế bào và gen ức chế ung thư. Một số vấn đề y sinh học cập nhật cho bác sĩ*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 68-82.
70. Benjamin C.L, Ananthaswamy H.N (2007). p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 224, 241-48.
71. Jiang W, Ananthaswamy H.N, Muller H.K et al (1999). p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*, 18, 4247- 4253.
72. Souusi T, May P (1996). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol*, 260, 623-637.
73. Ansarin H., Daliri M.f Sontani-Arabshahi R (2006). Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur. J Dermatol*, 16 (5), 543-7.
74. Hoàng Anh Tuấn (2012). *Nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học và hóa mô miễn dịch ung thư biểu mô tế bào đáy và tuyến bã ở mi mắt*. Luận án tiến sỹ y học, Đại học Y Hà Nội.
75. Abdelsayed RA., Guijarro-Rojas M., Ibrahim N.A. et al (2000). Immunohistochemical evaluation of basal cell carcinoma and trichopilioma using Bcl-2, Ki-67, PCNA and P53. *J. Cutan. Pathol*, 27, 169-75.
76. Janisson-Dargaud D., Durlach A., Lorenzato M. et al (2008). Aneuploidy, but not Ki-67 or EGFR expression, is associated with recurrences in basal cell carcinoma. *J. Cutan. Pathol.*, 35, 916-21.
77. Ziegler A, Leffell D.J, Kunala S. et al (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl Acad. Sci*, 90, 4216-4220.

78. Scholzen T. & Gerdes J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* 182: 311–322
79. Tilli C.M., Stavast-Koey A.J., Ramaekers F.C. & Neumann H.A. (2002). Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *J. Cutan. Pathol.* 29: 79–87.
80. Mazzarelli P., Rabitti C., Parella P., et al (2003). Differential modulation of Ku70/80 DNA-binding activity in a patient with multiple basal cell carcinomas. *J. Invest. Dermatol.* 121: 628–633.
81. Ionescu D.N., Arida M. & Jukic D.M. (2006). Metastatic basal cell carcinoma. Four cases report, review of literature, and immunohistochemical evaluation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130: 45–51.
82. Healy F, Angus B, Lawrench CM (1995). Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 1995; 133: 373-41
83. Chuprov I.N. (2008). Immunomorphological features of cutaneous basal-cell carcinoma. *Vopr. Onkol.* 54: 715–719.
84. Rady P, Scinicariello F, Wagner R.F et al (1992). P53 mutations in basal cell carcinomas. *Cancer Res*, 52, 3804-3806
85. Zhang H, Ping X. L, Lee P. K et al (2001). Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am. J. Pathol*, 158, 381-385.
86. Ghaderi R, Haghghi F (2005). Immunohistochemistry assessment of p53 protein in Basal cell carcinoma. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol*, 4(4), 167-71.
87. Kim M. Y, Park H.J, Baek s et al (2002). Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J. Dermatol Sci*, 29(1), 1-9.

88. Malhotra P, Singh A, Ramesh V (2011). Basal cell carcinoma in the North Indian population: Clinicopathologic review and immunohistochemical analysis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*, 77 (3), 328 – 330.
89. Forbes S., Clements J., Dawson E., et al. (2006). COSMIC 2005. *Br J Cancer*, 94, 318-322.
90. Thierry Soussi (2007). Handbook of p53 mutation in cell lines Version 1.0. 07/2007. <http://p53/free.fr> p53@free.fr.
91. Lê Đức Minh, Trần Hậu Khang, Trịnh Minh Trang và cộng sự (2014). Đặc điểm lâm sàng và mô bệnh học của ung thư tế bào đáy tại Bệnh viện Da liễu Trung ương (2007-2011). *Tạp chí y dược học quân sự*, 39 (2), 104-107.
92. Rasoul Esmaeili et al (2015). Immunohistochemical Expression of P53 and Ki-67 in Different Histopathological Variants of Basal Cell Carcinoma. *Middle East Journal of Cancer* 2015; 6(1): 29-34.
93. Izumi M., Mukai K., Nagai T. et al (2008). Basal cell carcinoma and Sebaceous carcinoma of the eyelids: Thirty cases from Japan. *Pathology International*, 58, 483-8.
94. Trần Văn Thiệp, Đỗ Tường Huân, Vũ Duy Phi Vũ, Phạm Triệu Cung (2010). Phẫu thuật ung thư da mũi giai đoạn sớm. *Tạp chí Ung thư học Việt Nam, Hội thảo Quốc gia phòng chống ung thư lần thứ XV*, 200-203.
95. Chang J.M, Gao X.M (2013). Clinical and histopathological characteristics of basal cell carcinoma in Chinese patients. *Chin. Med. J (Engl)*, 126(2), 211-214.
96. Raasch B.A, Buettner P.G, Garbe C (2006). Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br. J. Dermatol*, 155,401-407.

97. Buettner P.G, Raasch B. A (1998). Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia. *Int. J. Cancer*, 78, 587-593.
98. Demers A.A, Nugent z, Mihalcioiu c et al (2005). Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. *J. Am. Acad. Dermatol*, 53, 320-328.
99. Harris R.B, Griffith K, Moon T.E (2001). Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona, 1985-1996. *J. Am. Acad. Dermatol*, 45, 528-536.
100. Bastiaens M.T, Hoefnagel J.J, Bruijn J.A et al (1998). Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors. *J. Invest. Dermatol*, 110(6), 880-884.
101. Chu D.H (2008). Development and structure of skin. Fitzpatrick's dermatology in general medicine, 7th edition. *The Me Graw-Hill*, 7, 57-72.
102. Al Aboud KM, AL Hawsawi KA, Bhat MA, Ramesh V, Ali SM (2003). Skin cancers in Western Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2003 Dec; 24(12):1381-7.
103. Thomas D. Rees and Richard J. Coburn (1979). Reconstruction of the Scalp, Forehead, and Calvaria. *Plastic Surgery Third Edition*, 265- 277.
104. Andrade et al (2011). Epidemiology of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas in a Department of Dermatology - a 5 year review. *An Bras Dermatol*. 2012; 87(2):212-19.
105. Marks R. (1995). An overview of skin cancers. Incidence and causation. *Cancer*; 75(2 Suppl):607–612.
106. Ouyang et al (2010). Skin cancer of the Head and Neck. *SEMINARS IN PLASTIC SURGERY* VOLUME 24, NUMBER 2.

107. Brash D.E. (1997). Cancer of the skin. *Cancer Principles & Practia of onclogy, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 1879-1933.*
108. Cancer coucil Australia (2008). *Clinical Practice Guide: Basal cell carcinoma, squamous carcinoma (and related lesions) – a guide to clinical management in Australia.*
109. National Cancer Registry Ireland (2013). Non-melanoma skin cancer. *Cancer Trends No 20.*
110. Batra RS, Kelley LC (2002). A risk scale for predicting extensive subclinical spread of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg*, 28:107–12.
111. Griffiths RW, Suvarna SK, Stone J (2005). Do basal cell carcinomas recur after complete conventional surgical excision?. *Br J Plast Surg*; 58:795–805.
112. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, et al (2005). Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in AustraliaII. Outcome at 5-year follow-up. *J Am Acad Dermatol*; 53:452–7.
113. Ocanha JP, Dias JT, Miot HA, et al (2011). Relapses and recurrences of basal cell face carcinomas. *An Bras Dermatol*; 86:386–8.
114. Swanson NA. (1983). Mohs surgery. Technique, indications, applications, and the future. *Arch Dermatol*; 119:761–73.
115. Jurciukonyte R, Vincerzevskiene I, Krilaviciute A et al (2013). Epidemiology of basal cell carcinoma in Lithuania, 1996-2010. *Br. J. Dermatol*, 169, 1100-1105.
116. Kikuchi A, Shimizu H, Nashikawa T (1996). Basal cell carcinoma in Japanese patients. *Arch. Dermatol*, 132(3), 320-324.
117. Chen C.C, Chen C.L (2006). Clinical and histopathologic findings of superficial basal cell carcinoma: a comparison with other basal cell carcinoma subtypes. *J. Chin. Med. Assoc*, 69, 364-371.

118. Smeets N.w, Krekels G.A, Ostertag J.u et al (2004). Surgical excision vs Mohs' micrographic surgery for basal cell carcinoma of the face: randomised controlled trial. *Lancet*, 364(9447), 1766-1772.
119. Veness MJ (2007). High-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Biomed Biotechnol*; 2007:8057.
120. Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, et al (2005). Mortality risk from squamous cell skin cancer. *J Clin Oncol*; 23:759–65.
121. Mullen JT, Feng L, Xing Y, et al (2006). Invasive squamous cell carcinoma of the skin: defining a high-risk group. *Ann Surg Oncol*; 13:902–9.
122. Takenouchi T, Nomoto S, Ito M (2001). Factors influencing the linear depth of invasion of primary basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*; 27:393–6.
123. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG (2002). Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg*; 28:268–73.
124. Manstein ME, Mamstein CH, Smith R (2003). How accurate is frozen section for skin cancers?. *Ann Plast Surg*.; 50: 607-609.
125. Phạm Cẩm Phương (2001). *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng của ung thư biểu mô da. Góp phần chẩn đoán sớm và phòng chống ung thư*. Luận văn tốt nghiệp Bác sỹ y khoa, Hà Nội.
126. Cho S, Kim M.H, Whang K.K et al (1999). Clinical and histopathological characteristics of basal cell carcinoma in Korean patients. *J. Dermatol*, 26, 494-501.
127. Trần Hậu Khang và cs (2015). *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng kết quả điều trị ung thư da tại bệnh viện Da liễu Trung Ương*. Kết quả khoa học công nghệ đề tài nhánh, 152-157.

128. Nouri K (2008). *Basal cell carcinoma*. Skin cancer, The Me Graw-Hill, 6,55-71.
129. Trương Mạnh Dương, Vương Quốc Cường (2014). Đặc điểm mô bệnh học ung thư tế bào đáy da vùng đầu mặt cổ điều trị tại Bệnh viện K, Da liễu và Răng Hàm Mặt Trung ương. *Tạp chí Y học thực hành* (905): 2-201
130. Tan E.S.T, Ee M, Shell L et al (2014). Basal cell carcinoma in Singapore: A prospective study on epidemiology and clinicopathological characteristics with a secondary comparative analysis between Singaporean Chinese and Caucasian patients. *Aust. J. Dermatol*, 2, 21-25.
131. Cohen P.R, Schulze K.E, Nelson B.R (2006). Basal cell carcinoma with mixed histology: a possible pathogenesis for recurrent skin cancer. *Dermatol. Surgery*, 32, 542 - 551.
132. Miller S.J (1991). Biology of basal cell carcinoma (Part I). *J. Am. Acad. Dermatol*, 24, 1-13.
133. Crowson A.N (2006). Basal cell carcinoma: Biology, morphology and clinical implications. *Mod. Pathol*, 19(2), 127-131.
134. Kielbassa C, Roza L, Epe B (1997). Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18(4), 811-816.
135. Kaur P, Mulvaney M, Andrew Carlson J (2006). Basal Cell Carcinoma Progression Correlates With Host Immune Response and Stromal Alterations: A Histologic Analysis. *Am. J. Dermatopathol*, 28 (4), 293-307.
136. Wolf D.J, Zitelli J.A (1997). Surgical margins for basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol*, 123, 340-344.

137. Stolle LB and Kjerkegaard UK (2011). A single center retrospective study on 959 excisions of non-melanoma skin cancer in 2011. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013 Nov;66(11):1630-2.
138. Lyhne et al (2015). Incidence of and survival after glottic squamous cell carcinoma in Denmark from 1971 to 2011 - A report from the Danish Head and Neck Cancer Group. *European Journal of Cancer* 59 (2016) 46-56.
139. Vuyk, H.D., P.J. Lohuis (2001). Mohs micrographic surgery for facial skin cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 26(4): 265-73.
140. Kenneth, G.G.(1999). *Mohs Surgery*. Mosby, p. 1-287.
141. Phạm Cao Kiêm (2006). *Đánh giá các phương pháp tạo hình bằng tổ chức tại chỗ trong điều trị ung thư tế bào đáy ở đầu mặt cổ theo phẫu thuật MOHS*. Luận văn thạc sỹ y học, Hà Nội.
142. Trần Thanh Cường, Vũ Đăng Hùng, Bùi Xuân Trường (2005). Sử dụng vật tại chỗ trong điều trị ung thư da vùng đầu cổ. *Chuyên đề Ung thư học, hội thảo phòng chống ung thư TP Hồ Chí Minh*, 163-170.
143. Fleming I.D., Amonett R., Monaghan T., et al (1995). Principles of Management, of Basal and Squamous Cell carcinoma of skin. *Cancer Supplement*, 699-703.
144. Weinstein I.B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes - the Achilles heal ur cancer", *Science*, 297(5578), 63-4.
145. Gulleth Y, Goldberg N, Silverman RP, Gastman BR (2010). What is the best surgical margin for a basal cell carcinoma: a meta-analysis of the literature. *Plast Reconstr Surg*;126(4):1222–1231.
146. Telfer NR, Colver GB, Morton CA (2008). British Association of D. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*; 159(1):35–48.

147. Thissen MR, Neumann MH, Schouten LJ (1999). A systematic review of treatment modalities for primary basal cell carcinomas. *Arch Dermatol*; 135(10):1177–1183.
148. Brantsch KD, Meisner C, Schonfisch B, et al (2008). Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*; 9:713–20
149. Brodland DG, Zitelli JA (1992). Surgical margins for excision of primary cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*; 27(2 Pt 1): 241–248.
150. Jenifer Divine et al (2015). A comprehensive guide to the surgical management of nonmelanoma skin cancer. *Curr Probl Cancer* 39 (201) 216-225.
151. Schirren C.G, Rÿtten A, Kaudewitz P et al (1997). Trichoblastoma and basal cell carcinoma are neoplasms with follicular differentiation sharing the same profile of cytokeratin intermediate filaments. *Am. J. Dermatopathol*, 19 (4), 341-350.
152. Breuninger H, Dietz K (1991). Prediction of subclinical tumor infiltration in basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol*;17(7): 574-8.
153. Alireza Monsef et al (2012). Frequency of P53 immunohistochemical expression in all histopathological types of basal cell carcinoma and its correlation with clinicopathological features. *Life Sci J* 2012;9(2s):106-111.
154. Abu Juba et al (2013). Apoptotic markers in photoinduced cutaneous carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2013, 54(3 Suppl):741–747.
155. Karagece Yalçın U, Seçkin S (2012). The expression of p53 and COX-2 in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and actinic keratosis cases. *Turk Patoloji Derg.*; 28(2):119-27.
156. Barbareschi M, Girlando S, Cristofolini P, et al (1992). p53 protein expression in basal cell carcinomas. *Histopathology*, 21(6):579-81.

157. Mothebat H. Gouda et al, (2014). Value of P53, Ki-67 and CD10 in Differentiation between Keratoacanthoma and Squamous Cell Carcinoma. *Med. J. Cairo Univ.*, Vol. 82, No. 1, December: 795-801.
158. Batinac T., Zamolo G., Jonjic N., et al (2004). P53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. *Tumori*, 90:120-127.
159. Khodaeiani E., Fakhrjou A. and Amirnia M.(2013). Immunohistochemical evaluation of P53 and Ki67 expression in skin epithelial tumors. *Indian J. of Dermatology*, 58 (3): 181-187.
160. Kerschmann R.L.1, McCalmont T.H. and LeBoit P.E.(1994). P53 oncoprotein expression and proliferation index in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Arch. Dermatol.*, 130 (2): 181-6.
161. Recep Bedir et al (2016). The Role of p16, p21, p27, p53 and Ki-67 Expression in the Differential Diagnosis of Cutaneous Squamous Cell Carcinomas and Keratoacanthomas: An Immunohistochemical Study. *Balkan Med J* 2016; 33: 121-7.
162. Resit D. Koseoglu et al (2008). Expressionsof p53,cyclin D1and histopathologicalfeaturesin basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol* 2009; 36: 958 – 965.
163. Auepemkiate S, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P (2002). p53 expression related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma. *Histopathology*, 40, 568-573.
164. Barrett T.L, Smith K.J, Hodge J.J et al (1997). Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, and Ki-67 in different histologic variants of basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol*, 37, 430-437.
165. De Rosa G, Staibano S, Barra E et al (1993). p53 protein in aggressive and non-aggressive basal cell carcinoma. *J. Cutan. Pathol*, 20, 429-434.

166. Healy E, Angus B, Lawrence C.M et al (1995). Prognostic value of Ki 67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br. J. Dermatol*, 133, 737-741.
167. Claudio R. Cernea (2005). Ki-67 index and skin carcinomas with skull base invasion: a case–control study. *Cancer Therapy* Vol 3, 471-476.
168. Cabral A., Van Haaften C. & Boon M.E. (2004). Proliferation patterns reflect architectural dedifferentiation: a study of nodular basal cell carcinoma. *J. Dermatol*. 31: 305–313.
169. Misiuk Hojlo M., Wozniak Z.M., Barancewicz-Losek M., et al (2005). Palpebral basal cell carcinoma: relation between 34-betaE12, bcl-2 and Ki-67 expression (abstract). *Ophthalmic Res*. 37 (Supl 1): 59.
170. Selim A.G., El-Ashmawy A., Gheida S., et al (2009). Basal cell carcinoma: possible role of some proliferative and apoptotic factors. *J. Egypt Women Dermatol. Soc*. 6: 16–27.
171. Cernea C.R., Ferraz A.R., De Castro I.V., Sotto M.N., Logullo A.F., Potenza A.S. & Bacchi C.E. (2005). Ki-67 index and skin carcinomas with skull base invasion: a case-control study. *Cancer Therapy* 3: 471–476.
172. Mateoiu C., Pirici A. & Bogdan F. (2011). Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, Ki-67 and bcl-2 in different histologic variants of basal cell carcinoma. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 52 (Suppl. 1): 315–319.
173. Chang CH, Tsai RK, Chen GS, Yu HS, Chai CY (1998). Expression of bcl-2, P53 and Ki-67 in arsenical skin cancers. *J Cutan Pathol*.; 25(9):457-62.
174. Bolshakov S, Walker CM, Strom SS et al (2003). p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, 9:228–34

175. Ling et al (2001). PATCHED and p53 gene alterations in sporadic and hereditary basal cell cancer. *Oncogene* 20, 7770-7778.
176. Reifemberger et al (2004). Somatic mutations in the PCTH, SMOH, SUFUH and *TP53* genes in sporadic basal cell carcinomas. *British Journal of Dermatology* 2005, 152, 43-51.
177. Wang et al (2014). Frequency and features of *TP53* mutation in 30 Chinese patients with sporadic basal cell carcinoma. *Clinical and Experimental Dermatology* (2014) 39, 829–834.
178. Mari G.G, Sarasin A (2003). *TP53* mutation in Human skin cancers. *Human Mutation*, 21, 217- 228.
179. Tornaletti S, Pfeifer GP. (1994). Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science* 263:1436–1438.
180. Yoshiaki Kubo et al (1994). P53 Gene mutations in Human Skin Cancers and Precancerous Lesion: Comparison with Immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol* 102:440-444.
181. Walker DR, Bond JP, Tarone RE et al (1999). Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene*; 18: 211–18.
182. L. Hjortsberg, J.M. Rubio-Nevado, D. Hamroun, et al. The p53 Mutation; handbook 2.0, available online at <http://p53.free.fr> [Accessed 06 July 2016]
183. Moles JP, Moyret C, Guillot B et al (1993). p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene*; 8:583–8.
184. Chan J KC (2011). P53 expression. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th Edition. New York, SA: Mosby Elsevier;58.
185. M. V. Blagosklonny, (1997). Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene*, vol. 15, no. 16, 1889–1893.

186. Midgley CA. and Lane DP., (1997). P53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene*, vol. 15, no. 10, 1179–1189.
187. Wu A, Sun M.T, Huilgol S.c et al (2014). Histological subtypes of periocular basal cell carcinoma. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 42, 603-607.
188. Lidia M. Frey et al (2010). Pigmentation, Melanocyte Colonization, and p53 Status in Basal Cell Carcinom. *Journal of Skin Cancer* Volume 2011 , Article ID 349726, 6 pages.

PHỤ LỤC
PHỤ LỤC 1: HÌNH ẢNH

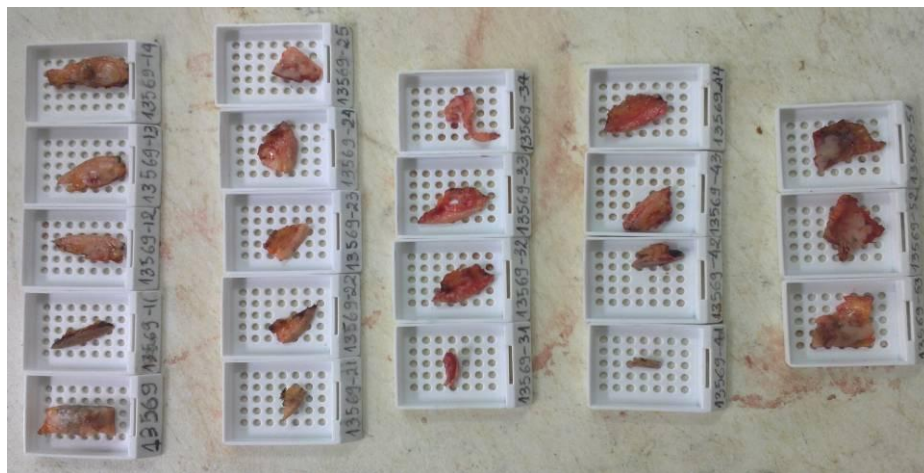
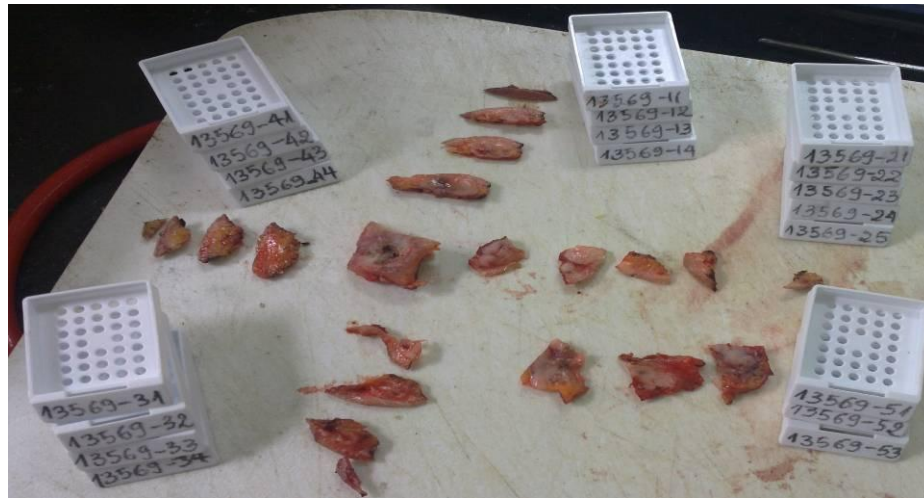


Bui Thi N- 72 tuổi; SHS: 12-06031; Mã GPBL: 05937-12



Nguyễn Thị T- 65 tuổi; SHS: 121-7978; GPBL: 12-10097

Hình 1: Phẫu thuật các ung thư da



Nguyễn Thị T: 67 tuổi; SHS: 121-8457; GPBL: 13569-12

Hình 2: Phẫu tích bệnh phẩm đánh giá mức xâm lấn

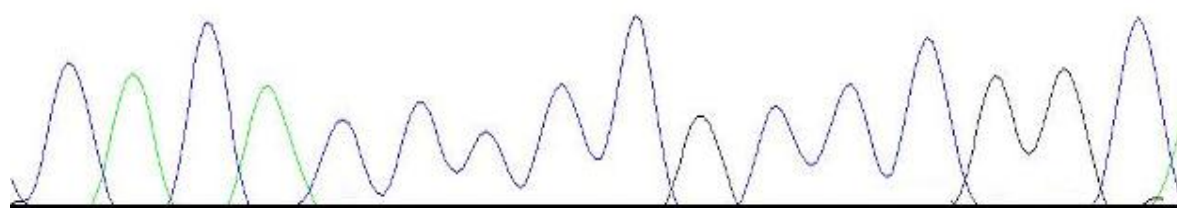
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ATG	GAG	GAG	CCG	CAG	TCA	GAT	CCT	AGC	GTC	GAG	CCC	CCT	CTG	AGT	CAG	GAA	ACA	TTT	TCA
Met	Glu	Glu	Pro	Gln	Ser	Asp	Pro	Ser	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr	Phe	Ser
21	22	23	24	25	E3 26	27	28	29	30	31	32	E4 33	34	35	36	37	38	39	40
GAC	CTA	TGG	AAA	CT/A	CTT	CCT	GAA	AAC	AAC	GTT	CTG	TCC	CCC	TTG	CCG	TCC	CAA	GCA	ATG
Asp	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Asn	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Gln	Ala	Met
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
GAT	GAT	TTG	ATG	CTG	TCC	CCG	GAC	GAT	ATT	GAA	CAA	TGG	TTC	ACT	GAA	GAC	CCA	GGT	CCA
Asp	Asp	Leu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Ile	Glu	Gln	Trp	Phe	Thr	Glu	Asp	Pro	Gly	Pro
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
GAT	GAA	GCT	CCC	AGA	ATG	CCA	GAG	GCT	GCT	CCC	CGC	GTG	GCC	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT
Asp	Glu	Ala	Pro	Arg	Met	Pro	Glu	Ala	Ala	Pro	Arg	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
ACA	CCG	GCG	GCC	CCT	GCA	CCA	GCC	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG
Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Trp	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Gln
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
AAA	ACC	TAC	CAG	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	GGG	ACA	GCC	AAG
Lys	Thr	Tyr	Gln	Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Leu	His	Ser	Gly	Thr	Ala	Lys
121	122	123	124	125	E5 126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	ATG	TTT	TGC	CAA	CTG	GCC	AAG	ACC
Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Met	Phe	Cys	Gln	Leu	Ala	Lys	Tyr
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	CCG	CGC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG
Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met
161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
GCC	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG
Ala	Ile	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu
181	182	183	184	185	186	E6 187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
CGC	TGC	TCA	GAT	AGC	GAT	G/GT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT
Arg	Cys	Ser	Asp	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	GTG	GTG	CCC	TAT
Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	Val	Val	Pro	Tyr
221	222	223	224	E7 225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	AGT
Glu	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Ile	His	Tyr	Asn	Tyr	Met	Cys	Asn	Ser
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
TCC	TGC	ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG	AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC
Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser
E8 261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
AGT	GGT	AAT	CTA	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA
Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg
281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	CAC	GAG	CTG	CCC
Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	His	Glu	Leu	Pro
301	302	303	304	305	306	E9 307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	G/CA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG
Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys
321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	E10 332	333	334	335	336	337	338	339	340
AAA	CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	ATG
Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Phe	Glu	Met
341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	GGG	AAG	GAG	CCA	GGG
Phe	Arg	Glu	Leu	Asn	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly
361	362	363	364	365	366	367	E11 368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
GGG	AGC	AGG	GCT	CAC	TCC	AG/C	CAC	CTG	AAG	TCC	AAA	AAG	GGT	CAG	TCT	ACC	TCC	CGC	CAT
Gly	Ser	Ala	Ala	His	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	Thr	Ser	Arg	His
381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394						
AAA	AAA	CTC	ATG	TTC	AAG	ACA	GAA	GGG	CCT	GAC	TCA	GAC	TGA						
Lys	Lys	Lys	Met	Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Gln	Asn	Ser	Asn							

Hình 3: Bảng danh mục trình tự các vị trí axit amin trên GENBANK của TP53

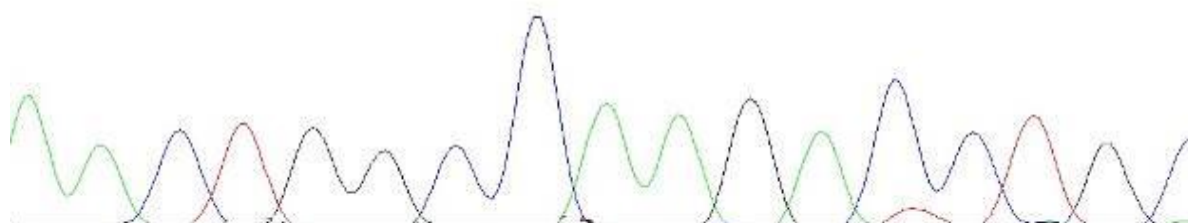
Bộ ba kết thúc có đuôi TAA; TAG, TGA sẽ gây mất nghĩa đoạn gene khi xảy ra đột biến

TTT	Phe	TCT	Tyr	TGT	Cys
TTC		TCC	Tyr	TGC	
TTA	Leu	TCA	Stop	TGA	Stop
TTG		TCG		TGG	Trp
CTT		CCT	His	CGT	
CTC	Leu	CCC		CGC	Arg
CTA		CCA	Gln	CGA	
CTG		CCG		CGG	
ATT		ACT	Asn	AGT	Ser
ATC	Ile	ACC		AGC	
ATA		ACA	Lys	AGA	Arg
ATG	Met	ACG		AGG	
GTT		GCT	Asp	GGT	
GTC	Val	GCC		GGC	Gly
GTA		GCA	Glu	GGA	
GTG		GCG		GGG	

Hình 4: Bảng danh mục bộ ba trình tự kết thúc của các axit amin.



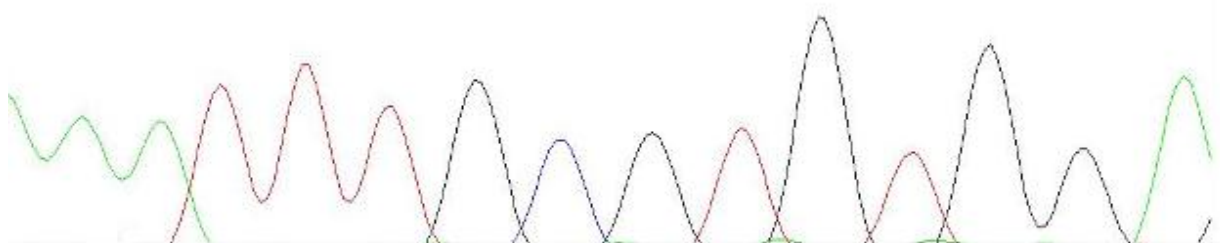
Exon 5 WT



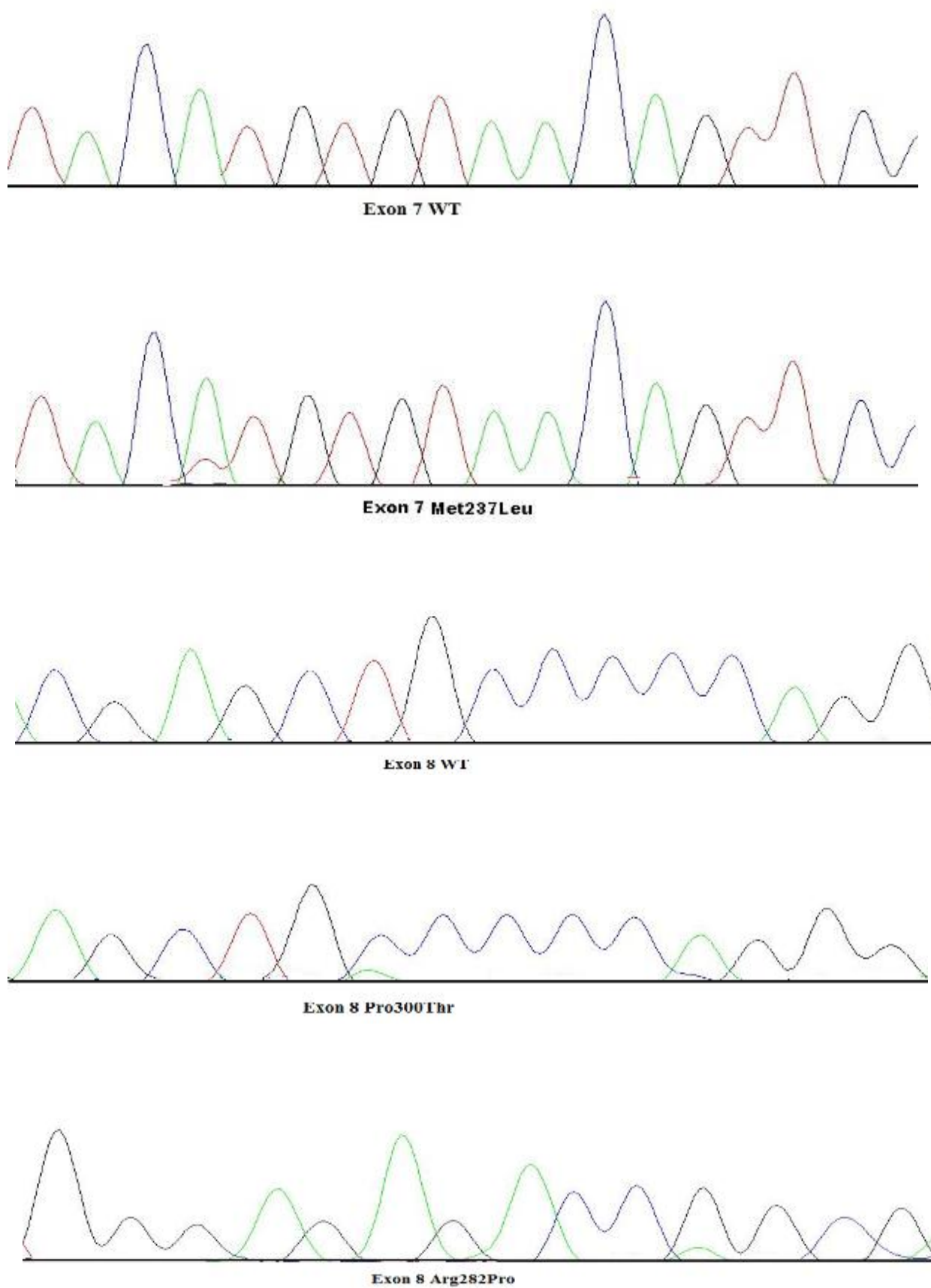
Exon 5 Thr140Ile



Exon 6 Tyr205Cys



Exon 6 WT



Hình 5. Mẫu và kết quả giải trình tự gen P53: Exon 5 đến Exon 8

PHỤ LỤC 2: Kết quả giải trình tự gen *TP53*: Exon 5 - 8

STT	Số GPBL	GPBL	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Vị trí điểm ĐB	ĐB thay thế
1	12-11457	UTTB đáy	-	-	-	-		
2	12-18397	UTTB đáy	-	Arg196Gln CGA-CAG	-	-	196	Thay thế a.a
3	12-11638	UTTB đáy	-	-	-	-		
4	12-19149	UTTB đáy	-	Tyr205Cys TAC-TGC	-	-	205	Thay thế a.a
5	12-16161	UTTB đáy	-	-	Met237Leu ATG-CTG	-	273	Thay thế a.a
6	12-14956	UTTB đáy	-	-	-	Arg282Pro CGG-CCG	282	Thay thế a.a
7	12-19820	UTTB đáy	-	-	-	Pro300Thr CCC-ACC	300	Thay thế a.a
8	12-13569	UTTB đáy	-	-	-	-		
9	12-08568	UTTB đáy	-	-	-	-		
10	12-18646	UTTB đáy	-	Tyr205Cys TAT-TGT	-	-	205	Thay thế a.a
11	12-13884	UTTB đáy	Thr140Ile CCT-TCT	-	-	-	140	
12	12-18402	UTTB đáy	-	-	-	-		
13	12-19148	UTTB đáy	-	-	-	Pro278Thr CCT-ACT	278	Thay thế a.a
14	12-09479	UTTB đáy	-	-	-	-		
15	12-9463	UTTB đáy	-	-	-	-		
16	12-07957	UTTB vảy	-	-	-	Glu298Lys GAG-AAG	298	Thay thế a.a
17	12-02615	UTTB vảy	-	-	-	-		
18	12-03219	UTTB vảy	-	-	Pro250Arg CCC-CGC	-	250	Thay thế a.a
19	12-20171	UTTB vảy	Arg156Cys- CGC-TGC	-	-	-	156	
20	12- 11251	UTTB vảy	-	-	His233Leu -CAC-CTC	-	233	Thay thế a.a
21	13-24776	UTTB vảy	-	-	-	Pro278Ala CCT-GCT	278	Thay thế a.a
22	13-37572	UTTB vảy	-	-	-	Pro278Ala CCT-GCT	278	
23	13-39527	UTTB vảy	-	-	-	-		
24	13-40461	UTTB vảy	-	-	Cys242Tyr- TGC-TAC	-	242	Thay thế a.a
25	13-40327	UTTB vảy	-	Pro190Thr- CCT-ACT	-	-	490	Thay thế a.a

26	13-43165	UTTB đáy	-	-	Tyr236stop TAC-TAG	-	236	Mất nghĩa
27	13-44443	UTTB vảy	-	Val217Gly- GTG-GGG	-	-	212	Thay thế a.a
28	13-45314	UTTB vảy	-	-	Cys242Tyr TGC-TAC	-	242	Thay thế a.a
29	13-46040	UTTB vảy	-	-	Cys242Arg TCG-CGC	-	242	Thay thế a.a
30	13-46653	UTTB vảy	-	-	Met243Ile- ATG-ATA	-	243	Thay thế a.a
31	13-47024	UTTB vảy	Cys176Trp TGC-TGG	-	-	-	176	Thay thế a.a
32	14-52896	UTTB vảy	Ala159Pro GCC-CCC	-	-	-	159	Thay thế a.a
33	14-53434	UTTB vảy	Lys132Met- AAG-TAG	-	-	-	132	Thay thế a.a
34	14-55940	UTTB vảy	-	Phe212Ile TTT-ATT	-	-	212	Thay thế a.a
35	12- 13083	UTTB đáy	-	-	Pro250Leu- CCC-CTC	-	250	Thay thế a.a
36	12- 14171	UTTB đáy	-	-	-	-		
37	12- 19745	UTTB đáy	-	-	Arg283His- CGC-CAC	-	283	Thay thế a.a
38	12-06031	UTTB đáy	Arg156Cys- CGC-TGC	-	-	-	156	Thay thế a.a
39	13- 32226	UTTB đáy	-	-	Ser260Thr- TCC-ACC	-	260	Thay thế a.a
40	13- 40452	UTTB đáy	-	Glu192His- CAG-CAC	-	-	192	Thay thế a.a
41	13- 40453	UTTB đáy	-	-	Thr253Ile- ACC-ATC	-	253	Thay thế a.a
42	13- 40456	UTTB đáy	-	-	-	-		
43	13-25049	UTTB đáy	-	-	-	Lys251Met- AAG-ATG	251	Thay thế a.a
44	13-25948	UTTB đáy	Tyr163Cys- TAC-TGC	-	-	-	163	Thay thế a.a
45	13-27926	UTTB đáy	-	-	-	Asp281Glu- GAC-GAG	281	Thay thế a.a
46	13-27978	UTTB đáy	-	-	-	-		
47	13-27979	UTTB đáy	-	Pro190Ser- CCT-TCT	-	-	190	Thay thế a.a
48	13-30447	UTTB đáy	Met160Lys- ATG-AAG	-	-	-	160	Thay thế a.a
49	13-31786	UTTB đáy	-	-	-	-		
50	13-37674	UTTB đáy	-	-	-	-		
51	13-39223	UTTB đáy	-	-	-	-		

PHỤ LỤC 3: BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU UNG THƯ DA mã NC

A. HÀNH CHÍNH:

A1. Họ và tên:..... A2.Tuổi:.....A3.Giới: ..
A4.Nghề nghiệp:.....A5. Dân tộc:
A6.Địa chỉ:
A7.Ngày vào viện:..... A8.Ngày ra viện:
A9.Số hồ sơ:

B. TIỀN SỬ

1. Mắc bệnh: UT Da ☐ Lần đầu ☐ Lần 2 ☐ Không mô tả
Ghi cụ thể (nếu có) hoặc bệnh UT kèm theo.....
2. Tiền sử: gia đình (ông bà, bố mẹ, anh chị em) có ai bị mắc ung thư da:
Tiền sử làm việc ngoài trời: ☐ Có ☐ Không
Tiền sử tiếp xúc với hóa chất, thuốc trừ sâu: ☐ Có ☐ Không
3. Thời gian khởi phát:
☐ < 1 năm ☐ 1-3 năm ☐ 4-6 năm ☐ 7-9 năm ☐ ≥ 10 năm
4. Cách khởi phát:
- Sẩn/loét: ☐ + Bỏng ☐ + Vết thương ☐ - Nốt ruồi ☐ - Tàn nhang ☐
- Xơ da ☐ - Bạch tạng ☐ - Bạch biến ☐ + Nguyên nhân khác ☐
- Các biểu hiện khác:.....
5. Các hội chứng gia đình:
6. Các bệnh phối hợp:

III. BỆNH SỬ:

1. Triệu chứng đầu tiên:
- Nổi u ☐ - Ngứa ☐ - Sùi loét da ☐ - Nổi hạch ☐ - Đau ☐
- Các dấu hiệu khác:.....
- 2.Thời gian phát hiện bệnh:.....
- Dưới 1 năm ☐ - 1- 5 năm ☐ - 5-9 năm ☐ - 10-19 năm ☐ - >20 năm ☐

3. Đã tới khám tại cơ sở y tế: - Không ☐ - Có ☐

4. Số lần điều trị phẫu thuật:

- 1 lần ☐ - 2 lần ☐ - 3 lần ☐ - 4 lần ☐ - >5 lần ☐

Mức độ phẫu thuật

5. Thời gian tái phát:

- Dưới 12 tháng ☐ - 1- 3 năm ☐ >3 năm ☐

6. Tái phát liên quan đến vị trí U tại:

7. Kết quả MBH sau mổ trước đó:

UT biểu mô TB đáy ☐ - UTTB vảy ☐ - Khác ☐

IV. KHÁM LÂM SÀNG

1. U: - Vị trí:

- Má ☐ - Mũi ☐ - Mũi má ☐ - Trán ☐ - Quanh mắt ☐

- Môi, cằm ☐ - Thái dương ☐ - Đầu ☐

Số lượng U: - 1U ☐ - 2 U ☐ - 3U ☐

Kích thước: U < 1cm ☐ 1 ≤ 2cm ☐ 2 ≤ 4cm ☐ > 4cm ☐

Tính chất U

- Có bờ, ranh giới ☐ Thâm nhiễm ☐ Sùi loét ☐ - Chảy dịch, máu ☐ - Hạn chế cơ năng ☐

2. Hạch

Vị trí Số lượng: Kích thước: Mật độ: Di động ☐

3. Toàn thân ☐ Sốt ☐ Gầy sút ☐ Các dấu hiệu khác:

4. Phân loại theo TNM.....Giai đoạn:.....

V. CẬN LÂM SÀNG: Các xét nghiệm khác:

CĐ tế bào trước mổ: UT biểu mô TB đáy ☐ - UTTB vảy ☐ - Khác ☐

CĐ MBH trước mổ: UT biểu mô TB đáy ☐ - UTTB vảy ☐ - Khác ☐

CĐ MBH sau mổ:

Ung thư biểu mô tế bào đáy

- Thể cục ☐ - Thể xơ ☐ - Thể nông ☐ - Thể hỗn hợp ☐

Ung thư biểu mô tế bào vảy

- Độ 1 ☐ - Độ 2 ☐ - Độ 3 ☐ - Độ 4 ☐

Ung thư phần phụ da

- UT tuyến bã ☐ - UT tuyến mồ hôi ☐ - Khác ☐

Mức độ xâm lấn:

Số diện cắt theo hướng đánh dấu

- 1. trên ☐ - 2. Phải ☐ - 3. Dưới ☐ - 4. Trái ☐ - 5. Đáy ☐

Số diện cắt dương tính theo vị trí:

Diện cắt trên: 1.

Diện cắt phải: 2.

Diện cắt dưới: 3.

Diện cắt trái: 4.

Diện cắt đáy: 5.

VI. ĐIỀU TRỊ: Phương pháp PT

Gây tê- Mê

Cách thức PT:.....
.....

Lấy U + tạo hình ☐ - Lấy U+ không tạo hình ☐

Phương pháp tạo hình

- Vạt da xô dịch ☐ - Vạt da dồn đẩy ☐ - Vạt da xoay ☐

- Vạt da hoán vị ☐ - Vạt da có chân nuôi ☐ - Vá da rời ☐

- Không vá da ☐ - Kết hợp từ 2 PP tạo hình ☐

Khoảng cách tới rìa U

-2-3mm ☐ - 4-5mm ☐ - 6-7mm ☐ - 8-9mm ☐ >10mm

VII. Xét nghiệm hóa mô miễn dịch

1. Dương tính: ☐ ☐

2. Âm tính:

Liên quan HMMD và mô bệnh học

Ung thư biểu mô tế bào đáy

- P53 Dương tính ☐ Âm tính ☐ - Ki 67 Dương tính ☐ Âm tính ☐

Ung thư biểu mô tế bào vảy

- P53 Dương tính ☐ Âm tính ☐ - Ki 67 Dương tính ☐ Âm tính ☐

Ung thư phần phụ da

- P53 Dương tính ☐ Âm tính ☐ - Ki 67 Dương tính ☐ Âm tính ☐

VIII. Kết quả giải trình tự gen TP53

Ngày..... tháng..... năm 201.....

Chữ ký bệnh nhân

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Hà Nội, ngày tháng năm 2017

GIẤY XÁC NHẬN

Tôi là: **PGS.TS Tạ Văn Tờ**

Trưởng khoa Giải phẫu bệnh – Tế bào – Bệnh viện K

Xác nhận: Tôi đã đọc và kiểm tra toàn bộ tiêu bản của 71 trường hợp ung thư da của Bệnh viện K trong đề tài “*Nghiên cứu mức xâm lấn và bộc lộ gen TP53, Ki-67 trong ung thư tế bào đáy và tế bào vảy đầu mặt cổ tại Bệnh viện K*” do **BS Nguyễn Văn Hùng**, Nghiên cứu sinh trường Đại học Y Hà Nội yêu cầu.

XÁC NHẬN CỦA BỆNH VIỆN K

Người đọc kết quả

PGS.TS. Tạ Văn Tờ

Hà Nội, ngày tháng năm 2016

XÁC NHẬN DANH SÁCH BỆNH NHÂN NGHIÊN CỨU

- Bệnh viện K xác nhận Nghiên cứu sinh Nguyễn Văn Hùng đã nghiên cứu về những nội dung “*Nghiên cứu mức xâm lấn và bộc lộ gen TP53, Ki-67 trong ung thư tế bào đáy và tế bào vảy đầu mặt cổ tại Bệnh viện K*” trên những bệnh nhân trong danh sách dưới đây.

- Bệnh viện đồng ý cho Nghiên cứu sinh Nguyễn Văn Hùng được sử dụng các số liệu liên quan trong bệnh án để công bố trong công trình luận án tiến sỹ.

STT	Họ và tên	Tuổi	Số hồ sơ	Số GPBL	Thẻ MBH
1	Dương thị N.	60	121-8374	12-11457	UTTB đáy
2	Lâm thị L.	57	121-10596	12-18397	UTTB đáy
3	Lê Ngọc G.	62	121-8646	12-11638	UTTB đáy
4	Lê Xuân T.	42	121-10858	12-19149	UTTB đáy
5	Nguyễn Danh K.	83	09305-12	12-16161	UTTB đáy
6	Nguyễn Đức D.	62	09692-12	12-14956	UTTB đáy
7	Nguyễn Duy V.	63	10937-12	12-19820	UTTB đáy
8	Nguyễn Thị T.	67	08457-12	12-13569	UTTB đáy
9	Nguyễn thị V.	85	7338-12	12-08568	UTTB đáy
10	Nguyễn Văn D.	62	10732-12	12-18646	UTTB đáy
11	Nguyễn Văn T.	71	09389-12	12-13884	UTTB đáy
12	Nguyễn Văn T.	85	10636-12	12-18402	UTTB đáy
13	Triệu Văn H.	47	10673-12	12-19148	UTTB đáy

14	Vũ Thị K.	43	07123-12	12-09479	UTTB đáy
15	Bùi Thị S.	75	121-7830	12-9463	UTTB đáy
16	Nguyễn Thị N.	68	7078-12	12-07957	UTTB vảy
17	Đỗ Như L.	56	04505-12	12-02615	UTTB vảy
18	Nguyễn Thị X.	74	04943-12	12-03219	UTTB vảy
19	Tổng thị P.	74	11039-12	12-20171	UTTB vảy
20	Đặng Thị L.	80	12-1-07579	12- 11251	UTTB vảy
21	Ngô Thị T.	55	131-01397	13-24776	UTTB vảy
22	Nguyễn Văn H.	56	06662-13	13-37572	UTTB vảy
23	Trần Thị T.	70	13-1-07506	13-39527	UTTB vảy
24	Nguyễn Thị N.	83	1162-11	13-40461	UTTB vảy
25	Vũ Duy K.	86	07872-13	13-40327	UTTB vảy
26	Nguyễn Khắc C.	50	13-1-09902	13-43165	UTTB đáy
27	Đỗ Văn K.	80	09398-13	13-44443	UTTB vảy
28	Nguyễn Cao H.	92	09622-13	13-45314	UTTB vảy
29	Lê Thị B.	54	10116-13	13-46040	UTTB vảy
30	Ngô Mạnh Q.	64	10420-13	13-46653	UTTB vảy
31	Nguyễn Thị T.	77	13-1-09559	13-47024	UTTB vảy
32	Nguyễn Văn S.	77	01100-14	14-52896	UTTB vảy
33	Hà Thị H.	48	01324-14	14-53434	UTTB vảy
34	Nguyễn Thị T.	82	02494-14	14-55940	UTTB vảy
35	Cù thị L.	77	12/1/8211	12- 13083	UTTB đáy
36	Lê Thị A.	62	12/1/7629	12- 14171	UTTB đáy
37	Hoàng Văn V.	40	12-1-10925	12- 19745	UTTB đáy
38	Bùi Thị N.	72	12-05937	12-06031	UTTB đáy
39	Bùi Thị M.	50	13-1-04069	13- 32226	UTTB đáy

40	Hoàng Văn H.	58	6631-05	13- 40452	UTTB đáy
41	Hoàng Đăng T.	71	13-1-06753	13- 40453	UTTB đáy
42	Cao Thị L.	73	13-1-07882	13- 40456	UTTB đáy
43	Phùng Hồng K.	82	13-1-01630	13-25049	UTTB đáy
44	Mai Thị K.	76	13-1-01837	13-25948	UTTB đáy
45	Phí Thị P.	72	13-1-02297	13-27926	UTTB đáy
46	Trịnh Ngọc D.	54	13-1-03498	13-27978	UTTB đáy
47	Nguyễn Thị X.	68	9096-11	13-27979	UTTB đáy
48	Nguyễn Thị C.	83	13-1-03784	13-30447	UTTB đáy
49	Thái Thị N.	68	13-1-09292	13-31786	UTTB đáy
50	Phùng Văn C.	79	13-1-06844	13-37674	UTTB đáy
51	Phùng Thị V.	53	13-1-06551	13-39223	UTTB đáy
52	Nguyễn Thị D.	64	9660-10	12-09719	UTTB đáy
53	Nguyễn Thị X.	72	07615-12	12-11116	UTTB đáy
54	Trịnh thị T.	71	09642-12	12-14822	UTTB đáy
55	Nguyễn Thị N.	65	6764-12	12-07034	UTTB đáy
56	Đinh thị C.	65	121-9543	12-16415	UTTB đáy
57	Đặng văn L.	56	121-7957	12-11292	UTTB vảy
58	Nguyễn Thị T.	49	121-7638	12-9221	UTTB đáy
59	Đỗ thị H.	63	12-3-00040	12- 09762	UTTB đáy
60	Ngô Ngọc A.	76	12-1-11303	12-20868	UTTB đáy
61	Hoàng Hồng D.	67	2298077	12-12957	UTTB đáy
62	Nguyễn Văn L.	63	2160015	12-11904	UTTB đáy
63	Trần Văn L.	46	12-107591	12-10930	UTTB đáy
64	Nguyễn Thị T.	57	2220280	12-10097	UTTB đáy
65	Nguyễn Phi G.	84	6482-12	12-06257	UTTB đáy

66	Vũ thị H.	76	2490-08	13-28746	UTTB đáy
67	Nguyễn Xuân S.	69	07609-12	12-11091	UTTB đáy
68	Phạm Huy T.	75	12-1-9521	12-16272	UTTB vảy
69	Nguyễn Song H.	52	5122-09	12-40547	UTTB đáy
70	Lê Minh H.	38	13-1-07598	13- 39373	UTTB đáy
71	Lê Như T.	71	13-1-09667	13- 47324	UTTB đáy

**XÁC NHẬN CỦA CÁN BỘ
HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

XÁC NHẬN CỦA BỆNH VIỆN K

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Hà Nội, ngày tháng năm 201

GIẤY XÁC NHẬN

Tôi là: TS Nguyễn Phi Hùng

Trưởng phòng Sinh học phân tử- Bệnh viện K

Xác nhận: Tôi đã đọc và kiểm tra toàn bộ xét nghiệm gen p53, Ki-67 của 51 trường hợp ung thư da của Bệnh viện K trong đề tài “*Nghiên cứu mức xâm lấn và bộc lộ gen TP53, Ki-67 trong ung thư tế bào đáy và tế bào vảy đầu mặt cổ tại Bệnh viện K*” do **BS Nguyễn Văn Hùng**, nghiên cứu sinh trường Đại học Y Hà Nội yêu cầu.

XÁC NHẬN CỦA BỆNH VIỆN K

Người đọc kết quả

TS. Nguyễn Phi Hùng

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN K

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày tháng năm 201...

XÁC NHẬN DANH SÁCH
BỆNH NHÂN LÀM XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN

Bệnh viện K xác nhận số bệnh phẩm của các bệnh nhân có trong danh sách dưới đây đã được làm xét nghiệm đột biến gen tại Phòng Sinh học phân tử - Khoa Giải phẫu bệnh - Tế bào, Bệnh viện K phục vụ đề tài của nghiên cứu sinh Nguyễn Văn Hùng

STT	Họ và tên	Tuổi	Số hồ sơ	Số GPBL	Thẻ MBH
1	Dương thị N.	60	121-8374	12-11457	UTTB đầy
2	Lâm thị L.	57	121-10596	12-18397	UTTB đầy
3	Lê Ngọc G.	62	121-8646	12-11638	UTTB đầy
4	Lê Xuân T.	42	121-10858	12-19149	UTTB đầy
5	Nguyễn Danh K.	83	09305-12	12-16161	UTTB đầy
6	Nguyễn Đức D.	62	09692-12	12-14956	UTTB đầy
7	Nguyễn Duy V.	63	10937-12	12-19820	UTTB đầy
8	Nguyễn Thị T.	67	08457-12	12-13569	UTTB đầy
9	Nguyễn thị V.	85	7338-12	12-08568	UTTB đầy
10	Nguyễn Văn D.	62	10732-12	12-18646	UTTB đầy
11	Nguyễn Văn T.	71	09389-12	12-13884	UTTB đầy
12	Nguyễn Văn T.	85	10636-12	12-18402	UTTB đầy
13	Triệu Văn H.	47	10673-12	12-19148	UTTB đầy
14	Vũ Thị K.	43	07123-12	12-09479	UTTB đầy
15	Bùi Thị S.	75	121-7830	12-9463	UTTB đầy

16	Nguyễn Thị N.	68	7078-12	12-07957	UTTB vảy
17	Đỗ Như L.	56	04505-12	12-02615	UTTB vảy
18	Nguyễn Thị X.	74	04943-12	12-03219	UTTB vảy
19	Tổng thị P.	74	11039-12	12-20171	UTTB vảy
20	Đặng Thị L.	80	12-1-07579	12- 11251	UTTB vảy
21	Ngô Thị T.	55	131-01397	13-24776	UTTB vảy
22	Nguyễn Văn H.	56	06662-13	13-37572	UTTB vảy
23	Trần Thị T.	70	13-1-07506	13-39527	UTTB vảy
24	Nguyễn Thị N.	83	1162-11	13-40461	UTTB vảy
25	Vũ Duy K.	86	07872-13	13-40327	UTTB vảy
26	Nguyễn Khắc C.	50	13-1-09902	13-43165	UTTB đáy
27	Đỗ Văn K.	80	09398-13	13-44443	UTTB vảy
28	Nguyễn Cao H.	92	09622-13	13-45314	UTTB vảy
29	Lê Thị B.	54	10116-13	13-46040	UTTB vảy
30	Ngô Mạnh Q.	64	10420-13	13-46653	UTTB vảy
31	Nguyễn Thị T.	77	13-1-09559	13-47024	UTTB vảy
32	Nguyễn Văn S.	77	01100-14	14-52896	UTTB vảy
33	Hà Thị H.	48	01324-14	14-53434	UTTB vảy
34	Nguyễn Thị T.	82	02494-14	14-55940	UTTB vảy
35	Cù thị L.	77	12/1/8211	12- 13083	UTTB đáy
36	Lê Thị A.	62	12/1/7629	12- 14171	UTTB đáy
37	Hoàng Văn V.	40	12-1-10925	12- 19745	UTTB đáy
38	Bùi Thị N.	72	12-05937	12-06031	UTTB đáy
39	Bùi Thị M.	50	13-1-04069	13- 32226	UTTB đáy
40	Hoàng Văn H.	58	6631-05	13- 40452	UTTB đáy
41	Hoàng Đăng T.	71	13-1-06753	13- 40453	UTTB đáy

42	Cao Thị L.	73	13-1-07882	13- 40456	UTTB đáy
43	Phùng Hồng K.	82	13-1-01630	13-25049	UTTB đáy
44	Mai Thị K.	76	13-1-01837	13-25948	UTTB đáy
45	Phí Thị P.	72	13-1-02297	13-27926	UTTB đáy
46	Trịnh Ngọc D.	54	13-1-03498	13-27978	UTTB đáy
47	Nguyễn Thị X.	68	9096-11	13-27979	UTTB đáy
48	Nguyễn Thị C.	83	13-1-03784	13-30447	UTTB đáy
49	Thái Thị N.	68	13-1-09292	13-31786	UTTB đáy
50	Phùng Văn C.	79	13-1-06844	13-37674	UTTB đáy
51	Phùng Thị V.	53	13-1-06551	13-39223	UTTB đáy

**XÁC NHẬN CỦA CÁN BỘ
HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

XÁC NHẬN CỦA BỆNH VIỆN K