

Ứng dụng kỹ thuật Droplet Digital PCR để phát hiện đột biến gene *KRAS* của DNA khối u lưu hành trong máu ở bệnh nhân ung thư tụy

Hà Thị Minh Thi^{1*}, Ngô Thị Diệu Hương¹, Lê Phan Tường Quỳnh¹, Trương Xuân Long¹, Trần Văn Huy¹, Nguyễn Thị Mai Ngân¹, Nguyễn Thị Thanh Thoá¹, Lê Tuấn Linh¹, Phạm Anh Vũ¹, Nguyễn Minh Thảo¹, Vinh Khánh¹, Đặng Công Thuận¹, Nguyễn Văn Cầu¹, Phạm Nguyên Cường², Hồ Hữu Thiện², Đặng Ngọc Hùng²

(1) Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(2) Bệnh viện Trung ương Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Đề tài này nhằm hai mục tiêu: (1) Xác định đột biến gene *KRAS* của ctDNA (*mutKRAS* ctDNA) ở bệnh nhân ung thư tụy và các bệnh lý tụy lành tính bằng kỹ thuật ddPCR. (2) Khảo sát mối liên quan của *mutKRAS* ctDNA và giai đoạn lâm sàng ung thư tụy. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 49 bệnh nhân ung thư tụy và 47 bệnh nhân bệnh tụy lành tính được xác định *mutKRAS* ctDNA bằng kỹ thuật ddPCR. **Kết quả:** Tỷ lệ bệnh nhân *mutKRAS* ctDNA (+) trong nhóm ung thư tụy là 69,4%, cao hơn nhóm u nang tụy lành tính (21,1%) và viêm tụy mạn (7,1%), $p < 0,0001$. Tỷ lệ allele đột biến (MAF) của *KRAS* trong ctDNA có mối liên quan với giai đoạn lâm sàng ung thư tụy, MAF trung bình của nhóm giai đoạn IV là $8,4 \pm 12,2\%$, cao hơn nhóm giai đoạn III ($2,8 \pm 2,4\%$) và giai đoạn I-II ($1,1 \pm 1,6\%$). MAF có giá trị tiên lượng ung thư tụy giai đoạn IV với ngưỡng trên 5,55%, diện tích dưới đường cong ROC là 0,739, $p = 0,019$. **Kết luận:** ddPCR phát hiện tỷ lệ cao bệnh nhân ung thư tụy có *mutKRAS* ctDNA. *KRAS* MAF có giá trị tiên lượng tiến triển nặng của bệnh.

Từ khóa: ung thư tụy, ddPCR, *KRAS*, ctDNA.

Application of droplet digital PCR for detecting *KRAS* mutation in circulating tumor DNA in patients with pancreatic cancer

Hà Thị Minh Thi^{1*}, Ngô Thị Diệu Hương¹, Lê Phan Tường Quỳnh¹, Trương Xuân Long¹, Trần Văn Huy¹, Nguyễn Thị Mai Ngân¹, Nguyễn Thị Thanh Thoá¹, Lê Tuấn Linh¹, Phạm Anh Vũ¹, Nguyễn Minh Thảo¹, Vinh Khánh¹, Đặng Công Thuận¹, Nguyễn Văn Cầu¹, Phạm Nguyên Cường², Hồ Hữu Thiện², Đặng Ngọc Hùng²

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Hue Central Hospital

Abstract

Background: This study aimed to: (1) Identifying *KRAS* mutation in ctDNA (*mutKRAS* ctDNA) in patients with pancreatic cancer (PC) and those with benign pancreatic diseases using ddPCR; (2) Investigating the association between *mutKRAS* ctDNA and the clinical stages of PC. **Materials and methods:** 49 patients with PC and 47 patients with benign pancreatic diseases were measured *mutKRAS* ctDNA using ddPCR. **Results:** The positive *mutKRAS* ctDNA accounted for 69.4% in the PC group, which was statistically significantly higher than that in the benign pancreatic tumor/cyst group (21.1%) and the chronic pancreatitis group (7.1%), $p < 0.0001$. *KRAS* mutant allele fraction (*KRAS* MAF) in ctDNA associated with the clinical stages of PC categorized by the TNM staging system, the mean *KRAS* MAF in ctDNA of the stage IV group was $8.4 \pm 12.2\%$, which was statistically significantly higher than that of stage III group ($2.8 \pm 2.4\%$) and stage I-II group ($1.1 \pm 1.6\%$). The *KRAS* MAF had predictive significance for metastatic PC, with a cut-off value $> 5.55\%$, AUC=0.739, $p = 0.019$. **Conclusion:** ddPCR identified a significant prevalence of patients with PC harboring *mutKRAS* ctDNA. The *KRAS* MAF in ctDNA had the prognostic value for severe progression in PC.

Key words: pancreatic cancer, ddPCR, *KRAS*, ctDNA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tụy là một trong những bệnh lý ác tính có tỷ lệ tử vong cao ở cả hai giới trên toàn cầu, với tiên lượng rất nặng, tỷ lệ sống thêm toàn bộ sau 5 năm dưới 5% [1]. Cơ hội cải thiện tiên lượng cho bệnh

nhân tụy thuộc vào việc chẩn đoán sớm và theo dõi diễn tiến cũng như tái phát bệnh. Tuy nhiên, vị trí giải phẫu của tụy là một trở ngại lớn cho thủ thuật sinh thiết mẫu mô tụy có tổn thương để làm xét nghiệm mô bệnh học [2]. Do đó, hầu hết các bệnh nhân ung

*Tác giả liên hệ: Hà Thị Minh Thi. Email: htmthi@huemed-univ.edu.vn; htmthi@hueuni.edu.vn
Ngày nhận bài: 13/1/2025; Ngày đồng ý đăng: 11/2/2025; Ngày xuất bản: 25/3/2025

thư tụy được chẩn đoán khá muộn, khoảng 85% được chẩn đoán ở các giai đoạn tiến triển hoặc di căn, điều này làm giảm hiệu quả điều trị và tăng tỷ lệ tử vong [3].

Nghiên cứu về sinh học phân tử đã chứng minh sự xuất hiện và phát triển của bệnh ung thư là kết quả của sự tích tụ các đột biến di truyền trong DNA. Các mảnh DNA mang đột biến từ tế bào khối u đã phóng thích và lưu hành trong máu, được gọi là ctDNA (circulating tumor DNA) [4]. Các ctDNA phản ánh toàn cảnh cấu trúc di truyền của khối u nên xét nghiệm phân tích ctDNA trong máu ngoại vi được xem là kỹ thuật sinh thiết lỏng. CtDNA là một thành phần của DNA ngoại bào (cell-free DNA: cfDNA) lưu hành trong máu, đó là những đoạn DNA nhỏ được phóng thích từ những tế bào chết theo chương trình (apoptosis) hoặc do quá trình hoại tử [5]. Đáng lưu ý, ctDNA có kích thước nhỏ (dưới 170 bp) và chỉ chiếm một tỷ lệ rất ít, có thể dưới 1%, trong toàn bộ cfDNA của máu ngoại vi [6]. Vì vậy, để phát hiện đột biến của ctDNA cần phải phân tích mẫu cfDNA trong huyết tương bằng các kỹ thuật sinh học phân tử tiên tiến có độ nhạy cao như PCR kỹ thuật số vi giọt (droplet digital PCR: ddPCR) hoặc giải trình tự thế hệ mới (next-generation sequencing: NGS). Trong đó, ddPCR cho phép phát hiện các đột biến đặc hiệu với tỷ lệ allele đột biến (mutant allele fraction: MAF) ở mức rất thấp, có thể từ 0,01% hoặc thậm chí thấp hơn [6].

KRAS là một trong những gene bị đột biến thường gặp nhất ở ung thư tụy, khoảng 75 - 95% bệnh nhân ung thư tụy có mang đột biến gene này trong khối u [4]. Nhiều tác giả trên thế giới đã phát hiện được đột biến gene KRAS của DNA khối u lưu hành trong máu (*mut*KRAS ctDNA) ở phần lớn bệnh nhân ung thư tụy [7]. Vì vậy, phát hiện *mut*KRAS ctDNA bằng kỹ thuật ddPCR được kỳ vọng là một chỉ điểm sinh học mới giúp chẩn đoán sớm, theo dõi và tiên lượng ung thư tụy. Từ thực tế đó, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm hai mục tiêu: (1) *Xác định đột biến gene KRAS của ctDNA ở bệnh nhân ung thư tụy và các bệnh lý tụy lành tính bằng kỹ thuật ddPCR.* (2) *Khảo sát mối liên quan của đột biến gene KRAS của ctDNA và giai đoạn lâm sàng ung thư tụy.*

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân có bệnh lý tụy được khám và điều trị tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế và Bệnh viện Trung ương Huế trong thời gian từ tháng 07 năm 2022 đến tháng 11 năm 2024, gồm có hai nhóm như sau:

- Nhóm ung thư tụy: 49 bệnh nhân.
- Nhóm bệnh lý tụy lành tính: 47 bệnh nhân, trong đó có 28 bệnh nhân viêm tụy mạn và 19 bệnh nhân u nang tụy lành tính (u tụy, u đặc giả nhú, u nang thanh dịch, u nhú nhầy nội ống, nang tụy, nang giả tụy).

• Tiêu chuẩn chọn vào nhóm nghiên cứu:

- Bệnh nhân được chẩn đoán bệnh lý tụy dựa vào các tiêu chuẩn chẩn đoán như sau:

+ Đối với nhóm ung thư tụy, có cả hai tiêu chuẩn:

* Có hình ảnh tổn thương tụy gợi ý ung thư qua siêu âm nội soi và/hoặc chụp cắt lớp vi tính (computerized tomography scan: CT scan) và/hoặc chụp cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging: MRI).

* Kết quả mô bệnh học xác định ung thư biểu mô tuyến tụy.

+ Đối với nhóm bệnh lý u nang tuyến tụy, có cả hai tiêu chuẩn:

* Có hình ảnh tổn thương tụy qua siêu âm nội soi và/hoặc chụp cắt lớp vi tính (computerized tomography scan: CT scan) và/hoặc chụp cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging: MRI).

* Kết quả mô bệnh học kết luận lành tính.

+ Đối với nhóm viêm tụy mạn: có hình ảnh tổn thương điển hình viêm tụy mạn tính trên siêu âm nội soi (theo tiêu chuẩn Rosemont) hoặc CT scan hoặc MRI (theo tiêu chuẩn M-ANNHEIM) [8–10].

- Bệnh nhân được lấy 10 ml mẫu máu ngoại vi trong ống chống đông chuyên dụng cho tách chiết cfDNA (Streck Cell-Free DNA BCT® CE) trước khi được điều trị bằng phẫu thuật và/hoặc hoá trị liệu và/hoặc xạ trị.

• Tiêu chuẩn loại trừ:

+ Mẫu cfDNA tách từ huyết tương không đạt số lượng và chất lượng để thực hiện xét nghiệm tìm đột biến KRAS của ctDNA.

+ Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.2.2. Thu thập thông tin

Bệnh nhân các nhóm ung thư tụy và bệnh tụy lành tính được thu thập thông tin chung (tuổi, giới), triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng.

Nhóm ung thư tụy được phân giai đoạn theo hệ thống TNM (tumor, node, metastasis) của Hiệp hội Ung thư Hoa Kỳ (American Joint Commission on Cancer: AJCC), phiên bản lần thứ 8 [11].

2.2.2. Tách chiết cfDNA

- Mỗi bệnh nhân được lấy 10 ml máu tĩnh mạch ngoại vi trong ống Streck Cell-Free DNA BCT® CE

(Streck, Hoa Kỳ). Chuyển ngay ống mẫu đến phòng thí nghiệm Di truyền phân tử (Bộ môn Di truyền Y học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế) để tách huyết tương. Nếu chưa tách chiết cfDNA ngay thì mẫu huyết tương được giữ âm sâu -80°C cho đến khi thực hiện.

- Tách chiết cfDNA từ 2 ml huyết tương mỗi mẫu bằng kit QIAamp ccfDNA/RNA (Qiagen, Đức) theo protocol của nhà sản xuất.

- Mẫu DNA sau khi tách chiết được đo nồng độ bằng máy đo huỳnh quang Quantus Fluorometer (Promega, Hoa Kỳ) với bộ kit hoá chất QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, Hoa Kỳ). Nồng độ DNA được đo theo đơn vị ng/ml.

2.2.3. Xác định đột biến gene KRAS của ctDNA (*mut*KRAS ctDNA) trong mẫu cfDNA tách từ huyết tương bằng kỹ thuật ddPCR

- Sử dụng kit KRAS G12/G13 Screening (Bio-Rad, Hoa Kỳ) gồm ống Supermix 2' và ống Assay mix 20' tương ứng. Bộ sinh phẩm này phát hiện được 7 loại đột biến trên hai codon 12 và 13 của gene KRAS, bao gồm G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V và G13D.

- Thành phần phản ứng: tổng thể tích 22 ml, bao gồm 11 ml Supermix 2', 1,1 ml Assay mix, 9,9 ml cfDNA.

- Tạo vi giọt (droplet) bằng máy QX200 Droplet Generator, sau đó chuyển vào đĩa ddPCR và dán bằng máy PX1 PCR Plate Sealer (BioRad, Hoa Kỳ).

- Thực hiện phản ứng ddPCR trên máy luân nhiệt C1000 Touch (BioRad, Hoa Kỳ), điều kiện nhiệt độ như sau: hoạt hoá enzyme 95°C 10 phút; tiếp theo là 40 chu kỳ với mỗi chu kỳ gồm biến tính ở 94°C 30 giây, gắn mỗi và kéo dài ở 55°C 1 phút, bất hoạt enzyme ở 98°C 10 phút; cuối cùng giữ ở 4°C cho đến khi đọc kết quả.

- Đọc kết quả bằng phần mềm QuantaSoft trên máy vi tính được kết nối với máy đọc QX200 Droplet Reader (BioRad, Hoa Kỳ).

- + Các giọt phản ứng được chia thành 4 nhóm, bao gồm giọt chỉ chứa sản phẩm đột biến, giọt chỉ

chứa sản phẩm không đột biến, giọt chứa cả sản phẩm đột biến và không đột biến, giọt không có sản phẩm, được phát hiện dựa trên các giá trị ngưỡng của biên độ (amplitude) theo phân phối Poisson. Phải có ít nhất hai giọt dương có đột biến mới được xác định dương tính *mut*KRAS ctDNA [12].

- + Xác định số bản sao tương ứng allele đột biến (A) và không đột biến (B) trong mỗi 20 ml phản ứng.

- + Tỷ lệ allele đột biến MAF (mutant allele fraction) được tính theo công thức:

$$MAF (\%) = A / (A + B)$$

Các kỹ thuật tách chiết cfDNA từ huyết tương và phát hiện *mut*KRAS ctDNA bằng kỹ thuật ddPCR được thực hiện tại Bộ môn Di truyền Y học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

2.2.4. Xử lý số liệu

Kết quả xét nghiệm *mut*KRAS ctDNA được ghi nhận dương tính hoặc âm tính, nếu dương tính thì kết quả được biểu diễn bằng MAF theo tỷ lệ %. Tỷ lệ phát hiện được xác định cho mỗi nhóm ung thư tụy, u/nang tụy lành tính, viêm tụy mạn. So sánh các tỷ lệ phát hiện bằng kiểm định Chi bình phương hoặc Fisher's exact (nếu có hơn 20% các tần số < 5). Xác định giá trị chẩn đoán ung thư tụy của xét nghiệm *mut*KRAS ctDNA thông qua tính độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương, giá trị tiên đoán âm và độ chính xác. Đối với nhóm ung thư tụy, tính trung bình MAF của gene KRAS trong ctDNA (KRAS MAF) cho mỗi phân nhóm theo hệ thống TNM bao gồm giai đoạn I-II, III và IV. Trị trung bình MAF được so sánh giữa mỗi hai phân nhóm bằng t-test one-tailed để kiểm định giả thuyết giá trị trung bình MAF càng cao ở nhóm giai đoạn càng tăng. Các kiểm định được thực hiện trên phần mềm thống kê trực tuyến VassarStats. Vẽ đường cong ROC theo KRAS MAF để xác định giá trị tiên đoán giai đoạn muộn (giai đoạn IV) của ung thư tụy bằng phần mềm SPSS version 26.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

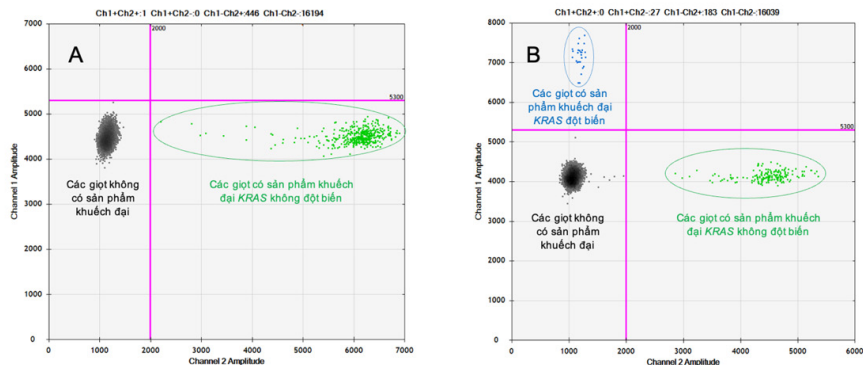
3.1. Đặc điểm chung của các nhóm nghiên cứu

Bảng 1. Phân bố tuổi và giới

Đặc điểm	Ung thư tụy (n = 49)	U nang tụy lành tính (n = 19)	Viêm tụy mạn (n = 28)	p
Giới				
Nam (%)	22 (44,9)	9 (47,4)	23 (82,1)	0,005
Nữ (%)	27 (55,1)	10 (52,6)	5 (17,9)	
Tuổi (X ± SD)	64,7 ± 10,8	45,1 ± 17,4	51,5 ± 16,4	<0,0001

Có sự khác biệt về phân bố giới tính và tuổi trung bình ở ba nhóm bệnh lý tụy được nghiên cứu. Đáng lưu ý nam giới chiếm đa số ở nhóm viêm tụy mạn, tuổi trung bình ở nhóm ung thư tụy cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các nhóm u nang tụy lành tính và viêm tụy mạn.

3.2. Phát hiện *mutKRAS* ctDNA bằng kỹ thuật ddPCR



Hình 1. Kết quả xét nghiệm *mutKRAS* ctDNA bằng kỹ thuật ddPCR (A. Âm tính, B. Dương tính)

Bảng 2. Phân bố *mutKRAS* ctDNA ở các nhóm bệnh lý tụy

<i>mutKRAS</i> ctDNA	Ung thư tụy (%)	U nang tụy lành tính (%)	Viêm tụy mạn (%)	p
Dương tính	34 (69,4)	4 (21,1)	2 (7,1)	< 0,0001
Âm tính	15 (30,6)	15 (78,9)	26 (92,9)	
Tổng	49	19	28	

Tỷ lệ có đột biến *KRAS* trong ctDNA huyết tương ở nhóm bệnh nhân ung thư tụy cao hơn có ý nghĩa thống kê so với hai nhóm lành tính (u nang tụy lành tính và viêm tụy mạn).

Giá trị chẩn đoán được xác định dựa trên nhóm 49 bệnh nhân ung thư tụy và 47 bệnh nhân bệnh tụy lành tính (bao gồm u nang tụy lành tính và viêm tụy mạn) như sau:

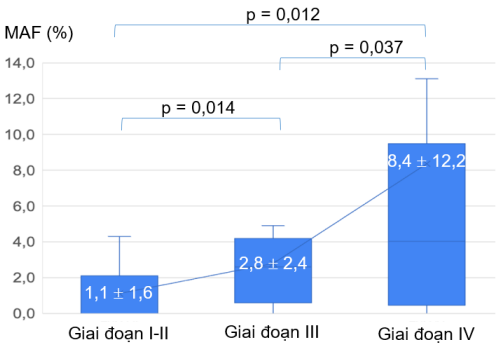
- Độ nhạy: 69,4%
- Độ đặc hiệu: 87,2%
- Giá trị tiên đoán âm: 73,2%
- Độ chính xác: 78,1%
- Giá trị tiên đoán dương: 85,0%

3.3. Mối liên quan của *mutKRAS* ctDNA với giai đoạn ung thư tụy

Bảng 3. Tỷ lệ có *mutKRAS* ctDNA ở các nhóm giai đoạn ung thư tụy theo hệ thống TNM

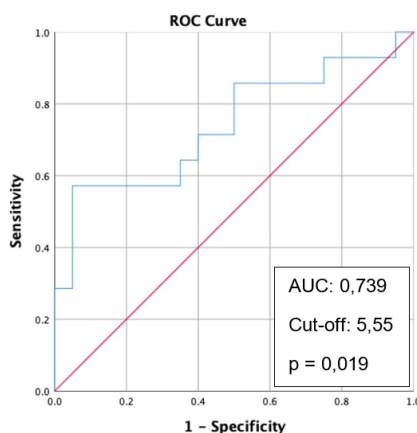
<i>mutKRAS</i> ctDNA	Giai đoạn I-II (%)	Giai đoạn III (%)	Giai đoạn IV (%)	p
Dương tính	6 (46,2)	14 (77,8)	14 (77,8)	0,144
Âm tính	7 (53,8)	4 (22,2)	4 (22,2)	
Tổng	13	18	18	

Sự khác biệt về tỷ lệ dương tính với *mutKRAS* ctDNA trong các nhóm giai đoạn ung thư tụy không có ý nghĩa thống kê.



Biểu đồ 1. Trung bình tỷ lệ allele đột biến *KRAS* MAF trong ctDNA của các nhóm giai đoạn ung thư tụy theo hệ thống TNM

Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị trung bình *KRAS* MAF trong ctDNA giữa các nhóm ung thư tụy. Trung bình *KRAS* MAF tăng dần theo các giai đoạn ung thư tụy.



Biểu đồ 2. Đường cong ROC của giá trị *KRAS* MAF trong ctDNA trong tiên đoán giai đoạn IV ở bệnh nhân ung thư tụy

Chú thích: Khảo sát trên 34 bệnh nhân có đột biến *KRAS* trên ctDNA huyết tương.

Giá trị diện tích dưới đường cong AUC = 0,739 và $p < 0,05$ cho thấy *KRAS* MAF có giá trị mức độ trung bình trong tiên đoán bệnh nhân ung thư tụy ở giai đoạn IV, với giá trị ngưỡng là MAF > 5,55%.

4. BÀN LUẬN

Ung thư tụy là bệnh lý ác tính đường tiêu hoá được dự báo sẽ có tỷ lệ tử vong tăng cao, đứng hàng thứ hai trên toàn cầu trong 10 năm sắp đến do khó chẩn đoán sớm, điều trị kém hiệu quả, sự gia tăng tỷ lệ mới mắc ở mọi lứa tuổi và hai giới [3]. Chúng tôi đã khảo sát các bệnh nhân bệnh lý tụy bao gồm nhóm ung thư tụy và hai nhóm bệnh tụy lành tính là u/nang tụy lành tính và viêm tụy mạn. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tuổi trung bình và phân bố giới tính ở các nhóm bệnh lý tụy. Đáng chú ý là nam giới chiếm đa số ở nhóm viêm tụy mạn, đến 82,1%. Điều này phù hợp với nguyên nhân hàng đầu của viêm tụy mạn là do sử dụng thức uống có cồn và hút thuốc [10]. Nam giới cũng được xem là một trong những yếu tố nguy cơ của ung thư tụy và tần suất mắc bệnh này ở nam thường được ghi nhận cao hơn nữ, chẳng hạn một khảo sát của Hoa Kỳ trong giai đoạn 2009-2018 cho thấy tần suất ung thư tụy ở nam là 14,8/100.000, trong khi ở nữ là 11,6/100.000 [13]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy tỷ lệ nữ trong nhóm ung thư tụy cao hơn nam giới, 55,1% so với 44,9%. Kết quả này phù hợp với điều tra của Gehrel trên 6855 bệnh nhân ung thư tụy đã ghi nhận nữ chiếm 51,2% [14]. Một nghiên cứu gần đây của Samaan cho thấy tỷ lệ ung thư tụy đang tăng nhanh hơn ở phụ nữ trẻ tuổi so với nam giới [15], nhận định này lý giải cho sự tăng nhẹ tỷ lệ nữ trong nhóm ung thư tụy so với nam trong nghiên cứu chúng tôi.

Phần lớn bệnh nhân ung thư tụy có mang đột biến gene *KRAS* trong tế bào khối u, trong đó chiếm

đa số là đột biến tại codon 12 [7]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật ddPCR với đa môi đặc hiệu với 7 đột biến tại các codon 12 và 13 gene *KRAS* để phát hiện *mutKRAS* ctDNA ở các mẫu cfDNA được tách từ huyết tương của bệnh nhân ung thư tụy hoặc bệnh tụy lành tính (Hình 1). Qua đó bước đầu đánh giá giá trị chẩn đoán và tiên lượng ung thư tụy của xét nghiệm này ở bệnh nhân Việt Nam. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 2 cho thấy tỷ lệ phát hiện *mutKRAS* ctDNA là 69,4% ở nhóm ung thư tụy, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với hai nhóm lành tính là u/nang tụy lành tính (21,1%) và viêm tụy mạn (7,1%), $p < 0,0001$. Tỷ lệ phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi nằm trong khoảng biến thiên về tỷ lệ phát hiện của các nghiên cứu trên thế giới thực hiện trên các nhóm mẫu bao gồm cả 4 giai đoạn theo hệ thống TNM của ung thư tụy [16]. Trong đó, nghiên cứu của tác giả Kim (Hàn Quốc, 2018) có tỷ lệ bệnh nhân ung thư tụy được phát hiện có *mutKRAS* ctDNA dương tính là cao nhất, đến 77,9% [7], các tác giả Hadano (Nhật Bản, 2016) và Earl (Tây Ban Nha, 2015) có tỷ lệ phát hiện thấp nhất, chỉ 31% và 26% [17,18]. Một trong những nguyên nhân quan trọng dẫn đến sự khác biệt này là các nghiên cứu của Kim và của chúng tôi đều sử dụng bộ sinh phẩm phát hiện đến 7 loại đột biến khác nhau tại codon 12 và 13 của gene *KRAS*, trong khi các tác giả Hadano và Earl chỉ sử dụng bộ sinh phẩm cho phép phát hiện 3 loại đột biến tại codon 12. Việc sử dụng bộ sinh phẩm có khả năng phát hiện nhiều đột biến bằng kỹ thuật ddPCR đã giúp chúng tôi phát hiện 69,4% bệnh nhân ung thư tụy có *mutKRAS* ctDNA trong huyết tương, kết

quả này cho thấy chúng tôi có tỷ lệ phát hiện tương đối cao so với hầu hết các nghiên cứu khác [3,16]. Đáng chú ý, trong nhóm bệnh tụy lành tính, chúng tôi phát hiện có 6 trường hợp dương tính với *mutKRAS* ctDNA (Bảng 2). Theo Yang, đột biến gene *KRAS* và tình trạng viêm có thể cùng xuất hiện trong giai đoạn khởi đầu rất sớm của ung thư tụy và có vai trò thúc đẩy sự tác động lẫn nhau, gây mất ổn định genome của tế bào tụy, từ đó hình thành ung thư tụy [19]. Vì vậy, đây là những trường hợp cần theo dõi sát trong thời gian tiếp theo để có thể phát hiện sớm sự xuất hiện của ung thư tụy.

Dựa trên kết quả nghiên cứu từ 49 bệnh ung thư tụy và 47 bệnh nhân nhóm bệnh tụy lành tính, chúng tôi ghi nhận giá trị chẩn đoán của xét nghiệm *mutKRAS* ctDNA bằng kỹ thuật ddPCR bao gồm độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương, giá trị tiên đoán âm, độ chính xác lần lượt là 69,4%, 87,2%, 85,0%, 73,2%, 78,1%. Theo Buscail, độ nhạy của ddPCR trong phát hiện *mutKRAS* ctDNA là 43 - 78%, cao hơn nhiều so với các kỹ thuật PCR truyền thống chỉ 27 - 47% [3]. Mặc dù, ddPCR là kỹ thuật sinh học phân tử nhạy nhất trong việc phát hiện đột biến đích trên ctDNA, tuy nhiên qua kết quả nghiên cứu của chúng tôi và tất cả các nghiên cứu khác trên thế giới, có thể thấy xét nghiệm *mutKRAS* ctDNA trong huyết tương có giá trị chẩn đoán chưa cao. Điều này được giải thích do lượng ctDNA trong huyết tương phụ thuộc vào sự phóng thích DNA từ tế bào ung thư tụy mang đột biến [3]. Sự tương đồng giữa phát hiện đột biến tại khối u và phát hiện đột biến ctDNA trong huyết tương chỉ đạt khoảng 25 - 75% tùy theo từng nghiên cứu [3], do có những trường hợp ctDNA xuất hiện trong huyết tương nhưng ở mức dưới ngưỡng phát hiện, nhất là những trường hợp ung thư giai đoạn sớm, chưa di căn.

Sự xuất hiện của ctDNA trên ngưỡng phát hiện cũng như tỷ lệ allele mang đột biến (MAF) được cho là có liên quan đến sự tiến triển bệnh và có giá trị tiên lượng. Thật vậy, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận tỷ lệ phát hiện *mutKRAS* ctDNA ở các nhóm ung thư tụy giai đoạn I-II chỉ 46,2%, trong khi ở các nhóm giai đoạn III và IV đều có tỷ lệ phát hiện khá cao, 77,8% (Bảng 3). Kết quả của chúng tôi cũng tương đồng với các tác giả như Cheng (2017) và Kim (2018) với tỷ lệ ở nhóm di căn đều cao, lần lượt là 72,3% và 86,1% [7,20]. Đáng lưu ý, khi so sánh giá trị trung bình của *KRAS* MAF giữa các nhóm giai đoạn ung thư tụy, kết quả ở Biểu đồ 1 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm giai đoạn IV so với nhóm giai đoạn III và nhóm giai đoạn I-II, $8,4 \pm 12,2\%$ so với $2,8$

$\pm 2,4\%$ và $1,1 \pm 1,6\%$. Nghiên cứu của Wang (Trung Quốc, 2019) cũng cho thấy *KRAS* MAF có liên quan với các giai đoạn ung thư tụy, với MAF của nhóm giai đoạn IV cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các nhóm khác, tác giả ghi nhận nhóm giai đoạn I-II có MAF nhỏ hơn 2%, tương tự nghiên cứu của chúng tôi [4]. Ngoài ra, Biểu đồ 2 cho thấy đường cong ROC có diện tích dưới đường cong 0,739, $p < 0,05$ chứng tỏ *KRAS* MAF trong ctDNA được xác định bằng kỹ thuật ddPCR có giá trị tiên lượng ung thư tụy. Cụ thể, *KRAS* MAF lớn hơn 5,55% có giá trị tiên đoán giai đoạn di căn (giai đoạn IV). Kết quả của chúng tôi phù hợp với tác giả Kim (Hàn quốc, 2018), ghi nhận phần lớn bệnh nhân ung thư tụy di căn có MAF cao, với MAF từ 1-10% và trên 10% lần lượt chiếm tỷ lệ 33,3% và 30,6%. Ngoài ra, tác giả Kim cũng nhận định *KRAS* MAF trong ctDNA có giá trị tiên lượng, liên quan đến thời gian sống thêm toàn bộ (OS) và thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (PFS) [7].

Tóm lại, lần đầu tiên ở Việt Nam, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử tiên tiến ddPCR để phát hiện đột biến *KRAS* của ctDNA trong huyết tương bệnh nhân bệnh lý tụy. Bước đầu, chúng tôi ghi nhận tỷ lệ cao bệnh nhân ung thư tụy được phát hiện *mutKRAS* ctDNA, góp phần hỗ trợ chẩn đoán. Đặc biệt, tỷ lệ *KRAS* MAF trong ctDNA có giá trị tiên lượng tiến triển nặng của bệnh. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi vẫn còn một số hạn chế như chưa đủ thời gian theo dõi diễn tiến bệnh vì vậy chưa phân tích được các mối liên quan với thời gian sống thêm toàn bộ và thời gian sống thêm bệnh không tiến triển.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu trên 49 bệnh nhân ung thư tụy và 47 bệnh nhân bệnh tụy lành tính, chúng tôi có một số kết luận như sau:

5.1. Tỷ lệ bệnh nhân được phát hiện *mutKRAS* ctDNA bằng kỹ thuật ddPCR trong nhóm ung thư tụy là 69,4%, cao hơn so với các nhóm lành tính là u nang tụy lành tính (21,1%) và viêm tụy mạn (7,1%).

5.2. Tỷ lệ allele *KRAS* đột biến (*KRAS* MAF) trong ctDNA có mối liên quan với giai đoạn ung thư tụy, với *KRAS* MAF trung bình của nhóm giai đoạn IV là $8,4 \pm 12,2\%$, cao hơn các nhóm giai đoạn III ($2,8 \pm 2,4\%$) và giai đoạn I-II ($1,1 \pm 1,6\%$).

Lời cảm ơn

Đây là kết quả của đề tài khoa học và công nghệ cấp Tỉnh (mã số TTH.2021-KC.22) được ngân sách nhà nước tỉnh Thừa Thiên - Huế (thành phố Huế) đầu tư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016 Mar 3;531(7592):47–52.
2. Yadav DK, Bai X, Yadav RK, Singh A, Li G, Ma T, et al. Liquid biopsy in pancreatic cancer: the beginning of a new era. *Oncotarget*. 2018;9(42):26900–33.
3. Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar 1;17(3):153–68.
4. Wang ZY, Ding XQ, Zhu H, Wang RX, Pan XR, Tong JH. KRAS Mutant Allele Fraction in Circulating Cell-Free DNA Correlates With Clinical Stage in Pancreatic Cancer Patients. *Front Oncol*. 2019 Nov 29;9:1295.
5. Qi T, Pan M, Shi H, Wang L, Bai Y, Ge Q. Cell-Free DNA Fragmentomics: The Novel Promising Biomarker. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 1;24(2):1503.
6. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Feb 20;32(6):579–86.
7. Kim MK, Woo SM, Park B, Yoon KA, Kim YH, Joo J, et al. Prognostic Implications of Multiplex Detection of KRAS Mutations in Cell-Free DNA from Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Chem*. 2018 Apr 1;64(4):726–34.
8. Gardner TB, Adler DG, Forsmark CE, Sauer BG, Taylor JR, Whitcomb DC. ACG Clinical Guideline: Chronic Pancreatitis. *American Journal of Gastroenterology*. 2020 Mar 1;115(3):322–39.
9. Shimizu K, Ito T, Irisawa A, Ohtsuka T, Ohara H, Kanno A, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for chronic pancreatitis 2021. *J Gastroenterol*. 2022 Oct 1;57(10):709–24.
10. Anaizi A, Hart PA, Conwell DL. Diagnosing Chronic Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2017 Jul 1;62(7):1713–20.
11. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th edition. New York: Springer; 2017.
12. Watanabe F, Suzuki K, Tamaki S, Abe I, Endo Y, Takayama Y, et al. Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer. *PLoS One*. 2019 Dec 1;14(12):e0227366.
13. Moshayed N, Escobedo AL, Thomassian S, Osipov A, Hendifar AE. Race, sex, age, and geographic disparities in pancreatic cancer incidence. *Journal of Clinical Oncology*. 2022 Feb 1;40(4_suppl):520–520.
14. Gehrels AM, Wagner AD, Besselink MG, Verhoeven RHA, van Eijck CHJ, van Laarhoven HWM, et al. Gender differences in tumor characteristics, treatment allocation and survival in stage I–III pancreatic cancer: a nationwide study. *Eur J Cancer*. 2024 Jul 1;206:114117.
15. Samaan JS, Abboud Y, Oh J, Jiang Y, Watson R, Park K, et al. Pancreatic Cancer Incidence Trends by Race, Ethnicity, Age and Sex in the United States: A Population-Based Study, 2000–2018. *Cancers (Basel)*. 2023 Feb 1;15(3):870.
16. Huerta M, Roselló S, Sabater L, Ferrer A, Tarazona N, Roda D, et al. Circulating tumor dna detection by digital-droplet PCR in pancreatic ductal adenocarcinoma: A systematic review. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 1;13(5):1–14.
17. Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, et al. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2016 Jun 28;115(1):59–65.
18. Earl J, Garcia-Nieto S, Martinez-Avila JC, Montans J, Sanjuanbenito A, Rodríguez-Garrote M, et al. Circulating tumor cells (Ctc) and kras mutant circulating free Dna (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 2015 Oct 24;15(1):797.
19. Yang F, Li L, Kong XY. The Positive Feedback Loop Between Inflammation and Mutant KRAS Genes Promotes Malignant Transformation in Chronic Pancreatitis. *Cancer Screening and Prevention*. 2022 Dec 2;1(1):39–46.
20. Cheng H, Luo G, Jin K, Fan Z, Huang Q, Gong Y, et al. Kras mutation correlating with circulating regulatory T cells predicts the prognosis of advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Med*. 2020 Mar;9(6):2153–9.