

**BÍ ẨN CỦA BỆNH VIÊM GAN SIÊU VI B
QUA NGHIÊN CỨU LÂM SÀNG, THỰC NGHIỆM
VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ**

Bác sĩ NGUYỄN HỮU CHÍ

Từ hơn 50 năm qua, y học đã tiến hành nhiều công trình nghiên cứu về siêu vi gây viêm gan loại B (hepatitis B virus = HBV), từ đó đặt nền móng cho chẩn đoán, theo dõi, điều trị cũng như dự phòng. Kết quả tốt nhất có thể kể đến vai trò của thuốc chủng ngừa viêm gan siêu vi B (VGSV B). Nhờ thuốc chủng này mà tỉ lệ mắc bệnh, tỉ lệ biến chứng nguy hiểm như xơ gan, ung thư gan đã giảm đáng kể. Về chẩn đoán xác định người mắc bệnh cần điều trị cũng như thời gian điều trị được đa số chuyên gia đồng ý, nhưng cách giải thích cũng như cơ chế tác dụng của từng loại thuốc vẫn còn nhiều điểm bất đồng. Một trong những ưu tư của y học toàn thế giới hiện nay là bệnh VGSV B chưa được chữa khỏi, biến chứng nguy hiểm vẫn tiếp tục xảy ra...

Nhiều nghiên cứu thực nghiệm, lâm sàng và sinh học phân tử đã và đang thực hiện, cố gắng soi sáng một số vấn đề, nhưng đến nay bệnh VGSV B vẫn còn nhiều uẩn khúc chưa được giải đáp. Trong phạm vi bài này, chúng tôi cố gắng đưa ra những điều đã biết cũng như nhiều điều chưa biết để chúng ta xác định một liệu trình điều trị thích hợp cho từng bệnh nhân, đồng thời tư vấn giải thích diễn tiến tự nhiên cũng như tiên lượng dưới tác dụng điều trị cho bệnh nhân và gia đình.

Phần 1:

50 NĂM SAU KHI PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN CHÂU ÚC, CHÚNG TA ĐÃ BIẾT ĐƯỢC NHỮNG GÌ VỀ BỆNH VGSV B?

Qua nhiều tài liệu về VGSV B, chúng tôi nhận thấy bài tổng quan mạch lạc và cô đọng về tiến bộ y học 50 năm kể từ khi phát hiện kháng nguyên châu Úc của tác giả A.S-Fong Lok đăng trong tạp chí Journal of Viral Hepatitis 2016;23:5-14, vì vậy chúng tôi chọn lựa và dịch lại để giới thiệu với độc giả.

Dịch bệnh vàng da-niêm đã được ghi nhận từ nhiều thế kỷ, nhưng người đầu tiên mô tả được bệnh này lại là Hippocrates. Mãi đến thập niên 50 của thế kỷ trước bệnh này mới được xác định không phải do tắc mật, mức độ tổn thương tế bào gan lan tỏa lại thay đổi, vì vậy bệnh “viêm gan” này mới được chia làm hai loại, một loại là viêm gan nhiễm trùng (infectious hepatitis), một loại là viêm gan huyết thanh (serum hepatitis). Nghiên cứu trên người cho thấy cả hai loại viêm gan này đều có tính lây nhiễm, nhưng chúng ta lại không thể nuôi cấy để xác định nguyên nhân gây bệnh. Việc xác định chủ yếu dựa vào các nghiên cứu trên động vật.

Vào năm 1965, khi nghiên cứu về đặc điểm di truyền của bệnh nhân hemophilia có truyền máu, Baruch Blumberg và cộng sự ghi nhận trong huyết thanh của những bệnh nhân này có một loại kháng nguyên "mới" phản ứng với huyết thanh của thổ dân châu Úc, chính vì vậy kháng nguyên này mới có tên gọi là kháng nguyên châu Úc. Nhiều năm trôi qua, trước khi xác định kháng nguyên này là nguyên nhân chính gây viêm gan huyết thanh, tên gọi của kháng nguyên này thay đổi từ kháng nguyên có liên quan đến viêm gan (hepatitis-associated antigen), kháng nguyên viêm gan huyết thanh (serum hepatitis antigen) và gần đây nhất là kháng nguyên bề mặt (hepatitis B surface antigen = HBsAg). Nhờ vào phát hiện này mà Blumberg đã nhận được giải Nobel Y học năm 1976.

Một thời gian sau khi xác định kháng nguyên châu Úc là nguyên nhân của viêm gan huyết thanh, xét nghiệm này được triển khai rộng rãi và đưa vào thị trường. HBsAg được phát hiện ở bệnh nhân viêm gan B cấp và mạn, kể cả người mang siêu vi không triệu chứng. Vào năm 1975, Tổ Chức Y Tế Thế Giới (TCYTG) đề nghị tầm soát HBsAg cho tất cả người hiến máu, kể cả người bán máu, kết quả được ghi nhận là số người mắc bệnh viêm gan sau truyền máu giảm đáng kể so với năm 1970. Tỷ lệ viêm gan sau truyền máu tiếp tục giảm nhờ vào cải tiến kỹ thuật tầm soát HBsAg và bổ sung thêm xét nghiệm tìm kháng thể đối với phần lõi (hepatitis B core antibody = anti-HBc). Trong hơn một thập niên, nhờ vào xét nghiệm tìm acid nucleic tỷ lệ viêm gan sau truyền máu tiếp tục giảm nhưng giá thành vẫn còn cao. Một nghiên cứu 12,8 triệu người hiến máu trong khoảng thời gian từ 2009 đến 2011 tại Hoa Kỳ cho thấy khi bổ sung thêm xét nghiệm tìm acid nucleic, tỷ lệ viêm gan sau truyền máu giảm từ 1/592.000-1/754.000 xuống còn 1/765.000-1/1.006.000.

Kỹ thuật nhìn rõ hạt từ siêu vi toàn vẹn và hạt từ siêu vi rỗng

Vào năm 1970, David Dane là người đầu tiên dùng kính hiển vi điện tử nhìn được ba loại hạt từ: loại thứ nhất là những hạt từ to đường kính vào khoảng 42 nm, có lớp vỏ và nucleocapsid, loại thứ hai hình cầu nhỏ rỗng, đường kính 20-22nm và loại thứ ba hình ống dài, rỗng. Hiện nay hạt từ to được gọi là hạt từ siêu vi toàn vẹn (virion = hạt từ Dane). Vì lý do gì không rõ, hai loại hạt từ rỗng lại được sản xuất 1.000 lần nhiều hơn hạt từ Dane. Chính vì việc sản xuất thái quá này mà chúng ta không ghi nhận được sự liên quan giữa nồng độ HBsAg và HBV DNA (HBsAg định lượng chỉ được thực hiện và đánh giá sau năm 2000). Sự hiện diện của các hạt từ rỗng đã được nhận biết từ lâu, được xem là chất gây miễn dịch (immunogen) không gây nhiễm trùng được sử dụng như là thành phần của thuốc chủng ngừa từ huyết thanh (plasma-derived vaccine).

Hiểu biết về HBV và chu trình tăng sinh

Tiến bộ về kỹ thuật sinh học phân tử vào thập niên 80 của thế kỷ trước giúp chúng ta biết thêm về cấu tạo của HBV. Đây là loại siêu vi mang DNA, tăng sinh qua con đường sao chép ngược từ pregenomic RNA. Điều này mang lại cho chúng ta hai ứng dụng lâm sàng: tăng sinh HBV DNA có tỉ lệ sai lầm cao hơn các loại siêu vi DNA khác, hai là thuốc nào ức chế được tiến trình sao chép ngược thì sẽ ức chế được HBV. Vì vậy chúng ta không ngạc nhiên khi lamivudine, adefovir, tenofovir ức chế được HBV cũng ức chế được HIV.

Hiểu biết của chúng ta về sinh học phân tử HBV và sinh bệnh học của bệnh VGSV B cũng như các bệnh gan liên quan đến HBV (như HCC) đều phải dựa vào mô hình nghiên cứu thực nghiệm trên động vật (chuột chũi, sóc, vượn trong tự nhiên vô tình nhiễm phải siêu vi có cấu tạo tương tự như HBV). Tất cả những loại siêu vi gây nhiễm cho chuột chũi, sóc, vượn và HBV đều cùng một họ Hepadnavirus.

Bản đồ di truyền bộ gien HBV gồm một khối DNA 3,2 kb có 4 khung đọc mở chồng chéo lên nhau. Siêu vi toàn vẹn chứa đôi dây DNA xoắn không hoàn toàn, được chỉnh sửa để chui vào nhân tế bào gan, kể đến kết hợp với histone để hình thành DNA vòng kín kết hợp đồng giá (covalently close circular DNA = cccDNA). Rồi chính cccDNA là khung chép mã tạo ra RNA của siêu vi, dịch mã tạo ra các protein của siêu vi. cccDNA có thời gian bán hủy rất dài trong tế bào gan không phân chia, không chịu ảnh hưởng của các loại đồng phân nucleos(t)ides được công nhận trong điều trị VGSV B. Nồng độ cccDNA tăng dần thêm bằng cách tái xâm nhập vào tế bào chất của tế bào gan mới, hình thành nucleocapsid, không phụ thuộc vào nhiễm trùng mới. Điều này giải thích tại sao khi dùng các loại đồng phân nucleos(t)ides, nồng độ HBV DNA và HBsAg giảm và khi ngưng thuốc tái phát xuất hiện ở hầu hết bệnh nhân. Một số nghiên cứu ước tính nếu chúng ta dùng đồng phân nucleos(t)ides > 50 năm mới có thể loại trừ được HBsAg. Nhiều phương cách điều trị mới được triển khai, chẳng hạn như sử dụng các loại thuốc mới, kết hợp hoặc không với thuốc điều hòa miễn dịch. Tất cả phương cách này ức chế hình thành cccDNA, tăng cường thoái hóa hoặc giảm bớt sao chép mã/dịch mã để làm sao đạt được mục đích cuối cùng là chữa khỏi bệnh VGSV B.

Lúc đầu HBV được chia làm 4 serotypes: adw, adr, ayw và ayr, có một quyết định kháng nguyên chung “a”. Kháng thể đối với quyết định kháng nguyên này có tính bảo vệ chống lại tất cả các serotypes. Nhờ đó mà thuốc chủng chống HBV mới có hiệu quả cao chung cho các chủng loại HBV. Theo đà tiến bộ của sinh học phân tử, quan niệm về serotypes đã được chuyển đổi thành genotypes. Hiện nay, có ít nhất là 10 loại genotypes của HBV (A đến J), thay đổi theo từng vùng địa dư. Nghiên cứu ở các nước châu Á cho thấy genotypes B và C chiếm ưu thế. Genotype C có liên quan đến tình trạng chuyển huyết thanh HBeAg tự nhiên muộn, đáp ứng chuyển đổi huyết thanh HBeAg khi điều trị bằng interferon thấp, nguy cơ bị HCC cao. Các nghiên cứu toàn cầu trên bệnh nhân VGSV B do HBV genotypes A-D cho thấy genotype A có tỉ lệ mất HBeAg và HBsAg cao ở người mang HBeAg (+) khi điều trị bằng interferon, nhưng lại không có liên quan giữa HBV genotype với việc sử dụng đồng phân nucleos(t)ides.

Năm 1972, một kháng nguyên mới được phát hiện, đó là HBeAg, liên quan đến tính lây nhiễm và tổn thương gan. Nhưng đến thập niên 80, nhiều nghiên cứu trên bệnh nhân HBeAg (-) cho thấy siêu vi vẫn tăng sinh, viêm nhiễm hoại tử tế bào gan vẫn xảy ra! Năm 1989, người ta ghi nhận bệnh nhân HBeAg (-) với nồng độ siêu vi trong máu cao có đột biến ở codon dừng (stop codon) nằm ngay vùng precore và chính đột biến này làm cho HBV không sản xuất được HBeAg. Biến thể precore và core promoter được tìm thấy ở hầu hết bệnh nhân VGSV B có HBeAg (-). Đồng thời người ta cũng ghi nhận sự liên quan rất chắc chắn giữa genotypes và biến thể precore và core promoter, thay đổi theo tỉ lệ VGSV B HBeAg (-) ở từng vùng khác nhau trên thế giới. Nghiên cứu ở các nước châu Á cho thấy biến thể core promoter, không phải biến thể precore, có liên quan đến nguy cơ HCC.

Lợi ích lâm sàng của xét nghiệm HBV genotype, cũng như xét nghiệm biến thể precore và core promoter hiện tại không rõ ràng, không ảnh hưởng nhiều đến điều trị bệnh nhân, trừ trường hợp bệnh nhân HBeAg (+), genotype A muốn dùng interferon.

Vào năm 2012, một phần nhỏ trong chu trình tăng sinh của HBV được phát hiện, đó là chất vận chuyển muối mật, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). Đây là một thụ thể giúp HBV và HDV xâm nhập vào tế bào gan (entry receptor). Điều này giúp chúng ta giải thích được ái tính (hepatotropism) của HBV và HDV với tế bào gan, đồng thời có thể đây là mục tiêu để triển khai các thuốc mới ức chế HBV và HDV. Nghiên cứu lâm sàng về một trong những chất ức chế NTCP (Myrcludex) hiện đang tiến hành.

Thành công của thuốc chủng ngừa VGSV B

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh HBV có thể lây lan và gây viêm gan cho các loài động vật. Trong quá trình thực hiện các nghiên cứu này, người ta ghi nhận có những thành phần của HBV không gây lây nhiễm. Đây là tiền đề chuẩn bị cho sự phát triển thuốc chủng ngừa VGSV B có nguồn gốc từ huyết tương (plasma-derived vaccines): thành phần kháng nguyên trong thuốc chủng là các hạt tử HBsAg rỗng (không chứa HBV DNA) không gây nhiễm nhưng có khả năng tạo miễn dịch bảo vệ. Độ an toàn và hiệu quả của thuốc chủng này được xác nhận qua các nghiên cứu lâm sàng ở dân số có nguy cơ như trẻ sơ sinh, con của bà mẹ HBsAg (+), đàn ông có hoạt động tình dục đồng phái, bệnh nhân chạy thận (haemodialysis patients). Tất cả kết quả này đưa đến việc công nhận thuốc chủng ngừa có nguồn gốc từ huyết tương vào năm 1981. Tuy nhiên, thuốc chủng này không bao lâu sau đó đã bị thay thế bằng thuốc chủng ngừa tái hợp DNA (recombinant DNA vaccines).

Độ an toàn và hiệu quả của thuốc chủng ngừa VGSV B đã được chứng minh, được đề nghị cho tất cả đối tượng có nguy cơ. Khả năng diễn tiến mạn tính ở trẻ em lây nhiễm HBV rất cao nên TCYTTG đề nghị chủng ngừa phổ quát cho tất cả trẻ sơ sinh. Vào cuối năm 2013, 183/192 quốc gia thành viên của Liên Hiệp Quốc đã bắt đầu chương trình tiêm chủng HBV và có đến 81% trẻ em được chích ngừa đủ 3 mũi. Chương trình tiêm chủng VGSV B cho trẻ sơ sinh đã làm giảm đáng kể tỉ lệ mang HBV ở trẻ em lớn và thanh thiếu niên. Thành công đáng kể của chương trình tiêm chủng ở các nước có chương trình tiêm chủng phổ quát cho trẻ sơ sinh với mức độ bao phủ cao. Ở Đài Loan, tỉ lệ mang HBV ở trẻ em và thanh thiếu niên giảm từ khoảng 10% xuống còn < 1%, tỉ lệ (incidence) HCC giảm > 80%, tỉ lệ tử vong vì bệnh gan mạn tính và HCC giảm > 90%. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở nhiều quốc gia khác. Tuy nhiên, tỉ lệ tiêm chủng vẫn còn thấp ở một số quốc gia châu Á và châu Phi. Nghiên cứu gần đây của TCYTTG cho thấy tỉ lệ HBsAg giảm từ 4,2% vào năm 1990 xuống còn 3,7% vào năm 2005, nhưng con số tuyệt đối người nhiễm mạn tính lại tăng từ 223 triệu lên 240 triệu trong cùng thời gian.

Thuốc chủng ngừa VGSV B có thể dùng chung với globulin miễn dịch (hepatitis B immune globulin) để ngăn ngừa lây nhiễm mẹ-con với kết quả > 90%. Thất bại của thuốc chủng có thể do mẹ mang HBeAg (+) hoặc có nồng độ HBV DNA cao. Những nghiên cứu gần đây cho thấy dùng các đồng phân nucleos(t)ides cho người mẹ mang thai 3 tháng cuối có nồng độ siêu vi cao tương đối an toàn và hiệu quả, giảm được tỉ lệ thất bại do thuốc chủng ngừa. Dựa vào những dữ kiện này, người mẹ mang thai có HBsAg (+) nên làm thêm xét nghiệm HBV DNA. Nếu như nồng độ này > 10⁶ IU/ml tốt nhất nên dùng tenofovir. Cách điều trị này có thể làm giảm tỉ lệ lây nhiễm mẹ-con gần 100%, kèm theo trẻ sơ sinh được phòng ngừa thụ động (globulin miễn dịch) và chủ động (thuốc chủng ngừa).

Sử dụng các chỉ điểm nhiễm HBV để chẩn đoán và theo dõi diễn tiến

Sau khi phát hiện được HBsAg, nhiều chỉ điểm huyết thanh được triển khai bằng các phương pháp khác nhau như điện di miễn dịch nghịch chiều (counter immunoelectrophoresis), ngưng kết thụ động nghịch chiều (reverse passive haemagglutination), sau đó được thay thế bằng

miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassays) và miễn dịch men (enzyme immunoassays). Hiện nay những xét nghiệm này được dùng trong chẩn đoán lâm sàng và trong nghiên cứu.

Vào cuối thập niên 70, HBV DNA được thực hiện bằng kỹ thuật lai phân tử (molecular hybridization), có mức độ phát hiện (giới hạn thấp) tương đương khoảng 1 triệu IU/ml và là phương pháp bán định lượng. Sau đó xét nghiệm này đã được thay thế bằng xét nghiệm phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực (real-time polymerase chain reaction) với mức phát hiện ở giới hạn thấp chỉ vào khoảng 10-20 IU/ml và giới hạn cao lên đến gần 10^{10} IU/ml. Vì vậy, đối với bệnh nhân có kết quả HBV DNA dưới ngưỡng phát hiện bằng kỹ thuật cũ vẫn được xem là có nồng độ siêu vi cao với kỹ thuật hiện nay. Tuy nhiên, giá thành của các kỹ thuật này còn cao, vượt quá khả năng chi trả của bệnh nhân.

Từ lâu người ta đã ghi nhận một số bệnh nhân bị VGSV B cấp phục hồi hoàn toàn, trong khi đó một số khác lại rơi vào tình trạng nhiễm trùng mạn tính. Nguy cơ diễn tiến từ nhiễm HBV cấp sang mạn tính phụ thuộc vào lứa tuổi bị nhiễm, giảm từ 90% ở trẻ sơ sinh xuống còn khoảng 20% ở trẻ em và còn khoảng 1% ở người lớn miễn dịch bình thường. Chính vì diễn tiến mạn tính quá cao ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ nên người ta luôn nhấn mạnh đến tầm quan trọng của chủng ngừa phổ quát.

Vào thập niên 70-80, diễn tiến của nhiễm HBV mạn tính được chia làm 2 giai đoạn: giai đoạn tăng sinh khi bệnh nhân có HBeAg (+) và bệnh gan đang tiến triển và sau đó giai đoạn không tăng sinh khi bệnh nhân có chuyển huyết thanh từ HBeAg (+) thành anti-HBe (+) và bệnh gan đang phục hồi. Quan niệm đơn giản này gặp trở ngại khi nghiên cứu bệnh nhân có HBeAg (-) nhưng nồng độ HBV DNA vẫn được phát hiện trong máu và viêm nhiễm ở gan vẫn được xảy ra. Trong thời gian này, nghiên cứu tại châu Á cho thấy nhiều bệnh nhân trẻ có HBeAg (+), không hề có triệu chứng, ALT bình thường. Sinh bệnh học của tổn thương gan có thể do đáp ứng miễn dịch, không phải do tác dụng gây độc tế bào của siêu vi nên những bệnh nhân này được xem là đang ở trong tình trạng dung nạp miễn dịch. Khái niệm này được chứng minh qua các nghiên cứu trên chuột cho thấy HBeAg là chất dung nạp miễn dịch (tolerogen).

Các xét nghiệm HBV DNA nhạy cảm hiện nay mô tả được diễn tiến của nhiễm HBV mạn tính và được chia làm 4 giai đoạn. Giai đoạn đầu là giai đoạn dung nạp miễn dịch (immune tolerance) với HBeAg (+), ALT tăng, nồng độ HBV DNA tăng cao. Chuyển đổi huyết thanh HBeAg hiếm xảy ra trong giai đoạn này. Đây là lý do chính mà điều trị bằng thuốc chống siêu vi không được đề nghị cho bệnh nhân trong giai đoạn này, mặc dù nhiều dữ kiện gần đây cho thấy nồng độ siêu vi cao có liên quan đến xơ gan, HCC và tử vong liên quan đến gan. Giai đoạn thứ hai là giai đoạn thải trừ miễn dịch (immune clearance) với HBeAg (+), nồng độ HBV DNA cao thường xuyên hoặc từng đợt, ALT tăng. Hậu quả sau cùng của hoạt hóa miễn dịch là chuyển đổi huyết thanh HBeAg tự nhiên, tổn thương gan gia tăng đặc biệt ở bệnh nhân có nhiều lần ALT tăng và những lần tăng ALT gây gan mất bù. ALT gia tăng từng đợt tái đi tái lại thường gặp ở nam giới và có thể làm tăng tỉ lệ xơ gan, HCC. Nghiên cứu ở bệnh nhân châu Á cho thấy genotype B liên quan đến chuyển đổi huyết thanh sớm HBeAg, tỉ lệ phục hồi bệnh gan cao sau chuyển đổi huyết thanh so với genotype C.

Giai đoạn thứ ba còn gọi là giai đoạn mang mầm bệnh bất hoạt (inactive carrier phase) với HBeAg (-), anti-HBe (+), nồng độ HBV DNA thấp hoặc không phát hiện, ALT bình thường, tổn thương gan rất ít và có tiên lượng tốt.

Giai đoạn thứ tư, giai đoạn tái hoạt hoặc viêm gan với HBeAg (-), có các đặc điểm như sau: HBeAg (-), anti-HBe (+), HBV DNA tăng thường xuyên hoặc từng đợt nhưng thấp hơn giai đoạn HBeAg (+) (ước tính vào khoảng 10^4 - 10^8 so với 10^6 - 10^{12} IU/ml). Hầu hết bệnh nhân ở giai đoạn này đều có mang biến thể HBV đột biến precore và core promoter, ngăn cản hình thành HBeAg. Phân biệt bệnh nhân VGSV B với HBeAg (-) với một người mang siêu vi bất hoạt rất quan trọng, vì có liên quan đến tiên lượng. Sự phân biệt này đòi hỏi nhiều xét nghiệm hàng loạt

trong thời gian ít nhất là một năm. Các nghiên cứu gần đây cho thấy xét nghiệm HBsAg định lượng góp phần không nhỏ vào việc phân biệt tình huống vừa nêu.

Không phải bệnh nhân nào cũng diễn tiến qua 4 giai đoạn. Các nghiên cứu gần đây cho thấy đáp ứng miễn dịch với HBV ở từng giai đoạn rất khác nhau. Hiểu biết các đáp ứng miễn dịch qua từng giai đoạn cũng như yếu tố chuyển đổi qua từng giai đoạn giúp chúng ta thiết kế một kế hoạch điều trị thích hợp cho bệnh nhân.

Theo thời gian, một số ít bệnh nhân mất HBsAg. Tỷ lệ (trung vị) mất HBsAg ước tính vào khoảng 0,5 đến 1%/năm. Tỷ lệ mất HBsAg với mức độ thấp xảy ra không theo đường thẳng trong vòng 40 đến 50 năm đầu nhưng sau đó gia tăng rất nhanh chóng. Bệnh nhân mất HBsAg, thông thường HBV DNA không phát hiện trong huyết thanh, nhưng HBV vẫn còn hiện diện trong gan, nguy cơ tái hoạt HBV vẫn có thể xảy ra khi sử dụng thuốc ức chế miễn dịch. Trường hợp này tiên lượng rất tốt, nếu như mất HBsAg trước tuổi 50, hoặc chưa có xơ gan, hoặc không có nhiễm thêm HCV hay HDV. Nguy cơ HCC vẫn có thể xảy ra nếu như mất HBsAg muộn, hoặc kèm theo xơ gan. Mất HBsAg được xem là kết điểm lý tưởng của điều trị hiện nay, nhưng hiếm khi xảy ra vì vậy mất HBsAg được xem là kết điểm chỉ có trong mơ, không xảy ra trong thực tiễn hàng ngày. Nhiều điều trong diễn tiến tự nhiên của nhiễm HBV được xây dựng từ các nghiên cứu đoàn hệ trong thập niên 80-90 khi chưa có thuốc điều trị. Hầu hết các thông tin vẫn còn đúng, các nghiên cứu hiện nay sử dụng xét nghiệm HBV DNA có độ nhạy cao, cùng các chỉ điểm nhiễm HBV, tỏ vẻ rõ ràng hơn diễn tiến tự nhiên của nhiễm HBV. The Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer (HBV/Reveal-HBV) nghiên cứu hơn 3.500 người mang HBsAg ở Taiwan cho thấy HBV không gây độc tế bào, nồng độ HBV DNA cao là yếu tố tiên lượng độc lập của xơ gan, HCC và tử vong do bệnh gan. Nhiều yếu tố siêu vi khác như HBV genotype, biến thể core promoter, nồng độ HBsAg cũng có giá trị tiên lượng.

Những mẫu bệnh phẩm được lưu giữ vào khoảng thập niên 70 và 30 năm sau được làm lại bằng HBsAg định lượng, HBV DNA định lượng đã cho thấy có tương quan giữa HBsAg định lượng và cccDNA trong tế bào gan. HBsAg định lượng giúp phân biệt bệnh nhân VGSV B HBeAg (-) với người mang mầm bệnh bất hoạt, tiên lượng được diễn tiến với điều trị bằng interferon ở bệnh nhân VGSV B với HBeAg (-) có nồng độ siêu vi thấp. Liên quan mật thiết giữa HBV DNA với diễn tiến của điều trị, vì vậy nhiều chuyên gia đã đề nghị nên khởi động điều trị ngay, không nhất thiết phải dựa vào mức độ tổn thương gan. Tuy nhiên, qua nghiên cứu REVEAL cho thấy rằng nhiều yếu tố kỹ chủ (tuổi, phái), mức độ tổn thương (ALT), có hoặc không có xơ gan cũng là những yếu tố tiên lượng nặng. Muốn xác định bệnh nhân có nguy cơ cao nhất, nhiều mô hình dự đoán cũng được đề xuất. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu này trên người châu Á, chưa được lượng giá từ bên ngoài, cũng không được lượng giá bằng các nghiên cứu đoàn hệ khác (bệnh nhân không phải Châu Á, nhiễm HBV genotype khác B và C). Giá trị của những mô hình này sử dụng khi bắt đầu điều trị và cần được xác định trong quá trình điều trị cũng như theo dõi lâu dài về sau.

Tiến bộ trong điều trị

Thuốc chống siêu vi đầu tiên được công nhận trong điều trị VGSV B là interferon chuẩn vào năm 1992 nhờ vào các nghiên cứu lâm sàng thực hiện vào thập niên 70. Trong thập niên 60-70, VGSV B còn lẫn lộn với nhiều loại VGSV khác nên được điều trị bằng corticosteroids. Đến cuối thập niên 70, người ta phát hiện ra nhiều tác động gây hại của corticosteroids qua các nghiên cứu lâm sàng ngẫu nhiên có kiểm chứng. Sang thập niên 70-80, nhiều thuốc mới cũng được triển khai, tuy nhiên tất cả còn quá độc và khó đánh giá được hiệu quả (kỹ thuật HBV DNA vào thời gian này còn thô sơ, không có độ nhạy cao).

Đầu tiên interferon được chế tạo bằng dòng tế bào lymphoblastoids, sau đó bằng kỹ thuật di truyền. Interferon được dùng qua đường tiêm tĩnh mạch, sau đó tiêm bắp rồi tiêm dưới da. Chưa có nghiên cứu nào về liều lượng, một số chuyên gia về gan đồng ý sử dụng phác đồ 3

lần/tuần dựa vào một nghiên cứu có 6 bệnh nhân. Interferon được xếp vào nhóm ức chế siêu vi và điều hòa miễn dịch, nhưng cơ chế ức chế HBV như thế nào vẫn chưa được xác định rõ ràng. Gia tăng ALT, hoặc ALT gia tăng trong thời gian điều trị bằng interferon được xem là tác dụng có lợi, xác định bệnh nhân đang ở giai đoạn thải trừ miễn dịch. Một thời gian sau, người ta lại ghi nhận bệnh nhân rơi vào xơ gan mất bù, thậm chí một số bệnh nhân gan còn bù lại bị suy gan cấp. Như vậy, interferon chống chỉ định đối với bệnh nhân nặng có nhu cầu bức bách phải điều trị.

Vào năm 2005, interferon chuẩn (IFN) được thay thế bằng pegylated interferon (pegIFN) vì dễ sử dụng (tiêm bắp 1 lần/tuần), hiệu quả cao hơn. PegIFN có tác dụng chống siêu vi yếu hơn các đồng phân nucleos(t)ides, nhưng tác dụng làm mất HBeAg và HBsAg lại cao hơn. Nghiên cứu gần đây cho thấy pegIFN có tác dụng thúc đẩy thoái hóa cccDNA và/hoặc giảm chép mã. Nghiên cứu điều trị phối hợp pegIFN với đồng phân nucleos(t)ides ngay từ đầu cho thấy không có nhiều ưu điểm hơn đơn trị liệu. Một số nghiên cứu cho thấy sử dụng pegIFN cho bệnh nhân VGSV B có nồng độ siêu vi trong máu dưới ngưỡng phát hiện có thêm cơ may mất HBsAg. Nếu kết quả nghiên cứu này được xác định, một số bệnh nhân có cơ may ngưng thuốc, không nhất thiết phải dùng thuốc đến trọn đời. Tuy nhiên, nhằm mục đích gia tăng tối đa các lợi ích và giảm thiểu đến mức thấp nhất bất lợi, chúng ta phải dự đoán đáp ứng với điều trị bằng interferon và đồng phân nucleos(t)ides trước khi bắt đầu điều trị. Một yếu tố dự đoán có lợi khi điều trị bằng interferon mà nhóm đồng phân nucleos(t)ides không có, đó là HBV genotype. Bệnh nhân nhiễm HBV genotype A, HBeAg (+) có tỉ lệ mất HBeAg và HBsAg cao hơn các nhóm genotype khác. Gần đây người ta đề nghị một khi không giảm được nồng độ HBsAg hoặc mức giảm quá ít sau 12 tuần điều trị bằng pegIFN xem như không hiệu quả thì nên ngưng pegIFN (quy luật ngưng thuốc). Tuy nhiên, quy luật này chưa được đánh giá tiền cứu, cũng như có nhiều quy luật khác cũng được đề nghị cho nhiều đối tượng khác nhau: HBeAg (+), HBeAg (-), HBV genotype... Vì vậy, quy luật chưa thể hiện được lợi ích một cách rõ ràng.

Những nỗ lực phát hiện thuốc chống HIV bắt đầu vào thập niên 80 thúc đẩy triển khai các đồng phân nucleos(t)ides chống HBV, tập trung vào việc ức chế men sao chép ngược. Không may, một trong những thuốc nhiều hứa hẹn là fialuridine có tác dụng gây độc cho ty thể, làm toan huyết tăng acid lactic, suy gan và tử vong trong quá trình nghiên cứu lâm sàng giai đoạn 2. Kinh nghiệm đau lòng này đã làm chùn bước triển khai các thuốc mới trong thời gian dài. Mãi đến năm 1998, lamivudine mới được công nhận và đây là bước quan trọng trong điều trị VGSV B. Lamivudine được sử dụng qua đường uống, dễ dung nạp, có thể dùng cho bệnh nhân xơ gan mất bù, kể cả sau ghép gan. Nhiều nghiên cứu ngẫu nhiên, mù đôi, có kiểm chứng cho thấy lamivudine có thể ngăn ngừa được xơ hóa nặng, xơ gan ở bệnh nhân đang có nồng độ siêu vi cao. Tuy nhiên, thành công của lamivudine không kéo dài được bao lâu thì người ta lại phát hiện lamivudine có tính kháng thuốc cao, siêu vi bùng phát gây viêm gan bùng phát, gan mất bù và tử vong.

Adefovir dipivoxyl, một loại đồng phân nucleos(t)ides thứ hai được công nhận vào năm 2002, giải quyết chống lại dòng HBV kháng lamivudine, nhưng bản thân adefovir cũng có vấn đề: tác dụng chống siêu vi yếu, lại có khả năng gây độc cho thận. Trong những trường hợp kháng lamivudine, adefovir được xem là phao cứu sinh, nhưng kiểu điều trị nối tiếp nhau (sequencing treatment), sử dụng lamivudine, kháng lamivudine, sử dụng adefovir, lại dễ phát sinh ra dòng HBV đa kháng.

Sau lamivudine và adefovir, 3 loại đồng phân nucleos(t)ides khác entecavir, tenofovir disoproxyl fumarate và telbivudine cũng được công nhận trong điều trị VGSV B. Hiện nay, entecavir và tenofovir được xem là thuốc hàng đầu vì tác dụng chống HBV mạnh và hàng rào kháng thuốc cao. Tenofovir cũng được sử dụng cho bệnh nhân đã từng điều trị bằng các đồng phân nucleos(t)ides khác, nhưng tenofovir cũng có tác dụng bất lợi cho thận và giảm độ đặc của xương. May mắn, những tác dụng này lại không thường xuyên. Tỉ lệ kháng thuốc thấp chỉ vào khoảng 0-1% sau 6 năm dùng tenofovir hoặc entecavir. Sử dụng phối hợp entecavir và tenofovir

chưa thể hiện tính ưu việt hơn dùng đơn trị liệu, trừ khi bệnh nhân có nồng độ siêu vi ban đầu quá cao. Tỷ lệ kháng thuốc thấp giúp cho tác dụng ức chế siêu vi lâu dài, giảm được nguy cơ xơ hóa và xơ gan. Nhờ vào những tác dụng này biến chứng lâu dài như ghép gan, HCC cũng giảm. Một vấn đề cần đặt ra là ở những quốc gia có thu nhập không cao, tỷ lệ mắc bệnh cao, điều trị lâu dài tạo ra một chi phí quá lớn!

Trong 15 năm gần đây y học tiến bộ không ngừng, làm gia tăng tỷ lệ hiệu quả điều trị, đồng thời cũng phát hiện ra những giới hạn của điều trị hiện nay. Khác hẳn với điều trị VGSV C, tiêu diệt hoàn toàn HBV chưa thực hiện được, nhiều biện pháp điều trị mới cũng được đề xướng như điều trị dựa vào mục tiêu (target therapy), miễn dịch trị liệu tập trung vào việc gia tăng đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và mắc phải để cố gắng tiến đến mục tiêu “tiêu diệt hoàn toàn HBV, làm mất HBsAg”...

Tóm lại, trong vòng 50 năm qua, hiểu biết của chúng ta về VGSV B đã được mở rộng, nhất là trong lãnh vực dự phòng và chẩn đoán. Tuy nhiên, về điều trị còn gặp quá nhiều thử thách, nhất là chưa tìm ra cách nào hiệu quả để tiêu diệt hoàn toàn HBV giúp bệnh nhân khỏi bệnh.

Phần 2:

SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA TIẾN TRÌNH TĂNG SINH HBV

Cấu trúc phân tử của HBV

Vào khoảng thập niên 40 của thế kỷ trước, người ta ghi nhận nhiều mẫu máu của bệnh nhân có truyền máu chứa siêu vi gây viêm gan tạm thời hoặc kéo dài, được gọi là viêm gan sau truyền máu. Liên quan giữa các loại siêu vi này với HCC mới được phát hiện vào thập niên 50. Tác nhân nhiễm trùng chưa biết được đặt tên là HBV để phân biệt với một loại siêu vi A (hepatitis A virus = HAV) lây bệnh qua đường phân-miệng. HAV không gây viêm gan mạn tính. Vào thời điểm này, bản chất của HBV vẫn chưa được biết rõ, chỉ phát hiện bằng xét nghiệm máu. Viêm gan sau truyền máu rất thường gặp, chiếm tỉ lệ khoảng 30-40% ở người nhận máu.

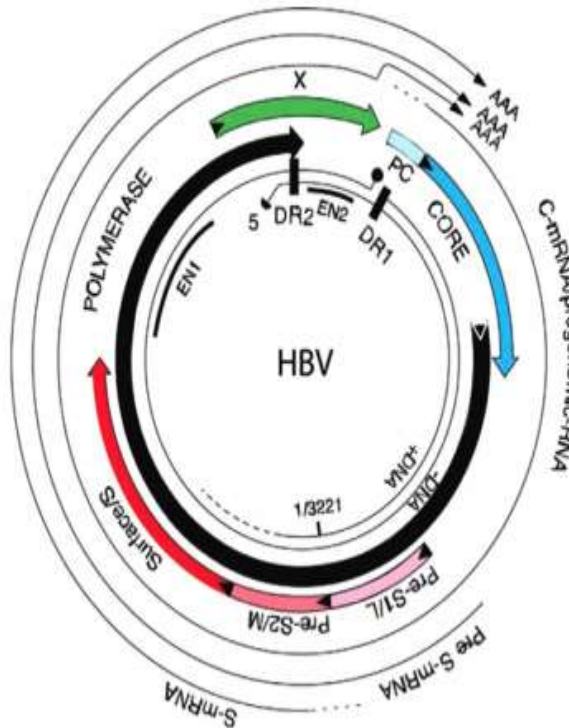
Vào khoảng giữa thập niên 60, khi Blumberg và cộng sự phát hiện ra một loại kháng nguyên trong máu bệnh nhân ung thư máu. Kháng nguyên này được gọi là kháng nguyên Châu Úc vì vô tình nó cũng được phát hiện ở trong máu thổ dân Úc dưới dạng hình ống hoặc hình cầu đường kính khoảng 22nm. Hiện nay kháng nguyên này được gọi là kháng nguyên bề mặt. Những hạt từ mang tính kháng nguyên này là thành phần L (large), S (small), M (medium) của kháng nguyên bề mặt (hepatitis B surface antigen = HBsAg), hiện diện trong máu với nồng độ rất cao. Hạt từ siêu vi toàn vẹn (hạt từ Dane) có lớp vỏ, đường kính 42 nm lại có nồng độ ít hơn. Khảo sát về sinh học phân tử của HBV cho thấy đây là một loại siêu vi thuộc họ Hepadnaviridae. Họ này chia làm hai giống (genera): Orthohepadviridae gây nhiễm trùng cho sinh vật có vú mà HBV là siêu vi tiêu biểu (prototype), còn Avihepadviridae gây nhiễm trùng cho chim có siêu vi gây viêm gan ở vịt (DHBV = duck hepatitis B virus) là tiêu biểu. HBV có bộ gien 3,2 kb gồm một đôi dây DNA vòng xoắn từng phần, mang 4 khung đọc mở (open reading frames = ORF), mã hóa cho protein phân lõi (core and precore proteins), protein bề mặt (PreS1, PreS2, S), men sao chép ngược (reverse transcriptase = Pol protein) và protein X.

Bộ gien của HBV gồm một đôi dây DNA xoắn vòng từng phần, dây bên ngoài toàn vẹn đầy đủ mang điện tích âm, dây bên trong không toàn vẹn mang điện tích dương, dính vào nhau ở phần 5' của hai dây DNA. Hai dây này cách nhau một khoảng trống, có thể chỉnh sửa *in vitro* bằng DNA polymerase nội sinh. Phản ứng nội sinh xảy ra khi có mặt của một deoxynucleotide mà người ta có thể tìm thấy ở nhiều loại ký chủ khác nhau, từ đó phát hiện thêm nhiều loại siêu vi giống HBV như siêu vi gây viêm gan ở chuột chũi (woodchuck hepatitis virus), ở vịt, ở sóc (ground squirrel hepatitis virus).

Mô hình nghiên cứu HBV

Mô hình động vật. Hiểu biết về sinh học phân tử của HBV bị “nghẽn tắc” trong nhiều năm vì thiếu mô hình nghiên cứu *in vitro*. Những nỗ lực tìm kiếm mô hình nghiên cứu trên động vật và trên môi trường tế bào *in vivo* tương tự như tế bào gan người cho chúng ta biết thêm về chu trình tăng sinh của HBV. HBV chỉ gây nhiễm cho người và khỉ đột (chimpanzees), ngoài ra còn có những loại hepadnaviridae như DHBV (gây nhiễm trùng cho vịt), WHV (gây nhiễm trùng ở chuột chũi) tương tự như nhiễm HBV. Lý tưởng là mô hình nhiễm trùng thực nghiệm ở thú vật phải có những thụ thể giống như ở người cho phép siêu vi bám và xâm nhập vào tế bào gan nên chúng ta mới tiến hành được nghiên cứu về tăng sinh siêu vi và thử nghiệm thuốc. Từ nhiều năm qua người ta không biết cách thức xâm nhập của siêu vi vào tế bào gan. Gần đây, người ta mới biết Na-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) là thụ thể cho HBV ở người, nhưng chuột lại không có phân tử này lại có thể cho phép siêu vi xâm nhập. Chính vì vậy nhiều chuyên gia đang tìm kiếm một loại đồng thụ thể nhưng vấn đề này cần có nhiều thời gian để thực hiện.

Chuyển đổi bộ gen của HBV vào chuột bằng cách dùng adenovirus, sẽ làm tăng biểu hiện của các gen siêu vi ở gan, đồng thời hoạt hóa đáp ứng miễn dịch chống HBV. Mô hình này giúp chúng ta nghiên cứu được tình trạng dung nạp miễn dịch và đánh giá các thuốc miễn dịch trị liệu mới như TLR9. Tuy nhiên, mô hình này không dùng để nghiên cứu sinh bệnh học và biện pháp điều trị ung thư do HBV. Nghiên cứu thực nghiệm trên chuột và vịt cũng giúp chúng ta hiểu thêm về tăng sinh siêu vi. HBV tăng sinh gây viêm gan rất giống nhóm retrovirus, trừ giai đoạn DNA của Hepadnavirus chuyển đổi trong minichromosomes thành DNA xoắn vòng kín đồng giá (covalently closed circular DNA = cccDNA). Đoạn DNA này được xem như là một cái khuôn (template) tổng hợp ra RNA của siêu vi. Vịt và chuột chủi cũng là những mô hình thực nghiệm để nghiên cứu nhiễm trùng cấp tính tạm thời hoặc mạn tính, cũng như ảnh hưởng của các đồng phân nucleos(t)ides. Những động vật thí nghiệm này cũng cho chúng ta một nguồn tạo ra môi trường canh cấy tế bào gan. Chính vì vậy bắt đầu từ thập niên 80, phân tích chức năng của bộ gen siêu vi bằng cách dùng kỹ thuật tái hợp DNA (recombinant DNA technique) và thử nghiệm các thuốc ức chế men sao chép ngược trở nên dễ dàng hơn nhờ vào những dòng tế bào u gan có HBV tăng sinh^{3, 18}.



Hình 1 – Sơ đồ cấu tạo bộ gen của HBV (Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* 2015;479-480:672-686 <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.031>)

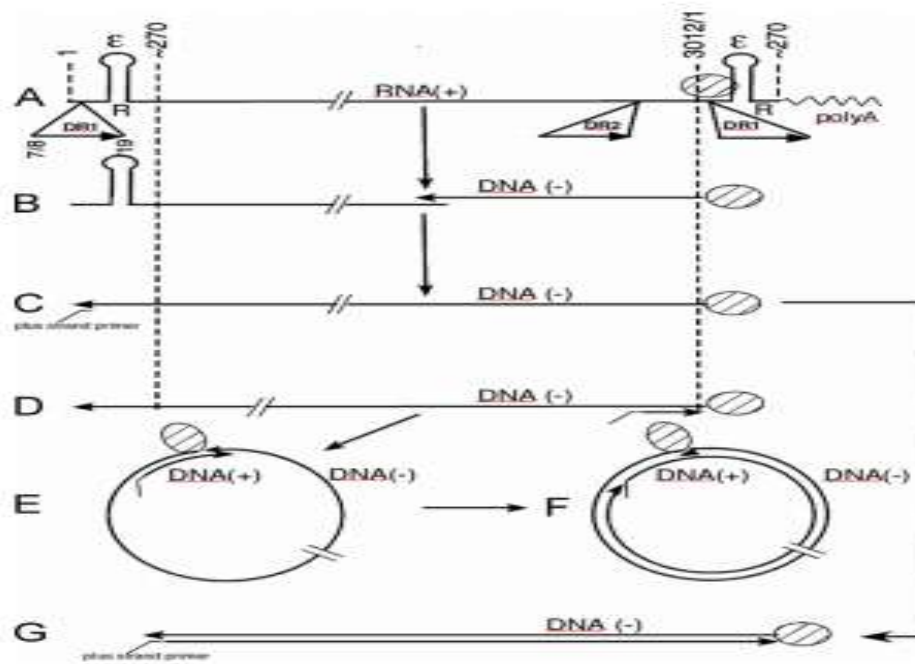
DNA xoắn vòng hở của HBV gồm một dây hoàn chỉnh mang điện tích âm (bên ngoài) và một dây không hoàn chỉnh mang điện tích âm (bên trong), kết thúc ở đoạn nằm ở khung đọc mở core. Đường không liên tục ở điểm tận cùng 5' của mRNA xác định những vị trí so le bắt đầu cho preCore/core và M/S. Tất cả khung đọc mở đều có hướng theo chiều kim đồng hồ. Khoảng trống ở dây DNA mang điện tích dương có thể được lấp đầy *in vitro* bằng men sao chép ngược của HBV, kết dính đồng giá vào đoạn 5' của dây mang điện tích âm. DR1 và DR2 là những đoạn lặp lại trực tiếp (direct repeats) có vai trò quan trọng trong tiến trình tổng hợp DNA cho siêu vi. Tổng hợp dây DNA mang điện tích âm biểu hiện một đoạn tận cùng ngắn dư thừa trong quá trình sao chép ngược để tạo ra pregenomic RNA.

Mô hình tế bào. Bên cạnh việc sử dụng mô hình động vật để nghiên cứu HBV, nhiều mô hình tế bào cũng được triển khai và ứng dụng. Từ thập niên 90 của thế kỷ trước, hầu hết nghiên cứu về HBV đều sử dụng tế bào HepG2.2.15 và HepAD38 để khảo sát tổng hợp HBV DNA, tập hợp siêu vi và bài tiết siêu vi toàn vẹn ra khỏi tế bào gan bị nhiễm trùng. Tuy nhiên, mô hình này

không giống với mô hình chu trình diễn tiến tự nhiên của HBV. Muốn khảo sát hoàn toàn chu trình tăng sinh của HBV, chúng ta nên dùng tế bào gan người nguyên phát (primary human hepatoma = PHHs) và dòng tế bào gan người biệt hóa (HepaRG)¹⁸.

Loại trừ HBV là kết điểm xác định khỏi bệnh

Những nghiên cứu ban đầu ở vịt, chuột chũi và khi đột cho thấy một khi nhiễm HBV cấp tạm thời, siêu vi có thể bị loại bỏ hoàn toàn dù rằng toàn thể tế bào gan có thể bị nhiễm trùng. Điều này đã làm chúng ta rất ngạc nhiên, vì hiện nay chúng ta đâu có biết cơ chế nào loại bỏ được siêu vi ra khỏi nhân của tế bào gan bị nhiễm trùng. Tế bào gan bị nhiễm trùng tự thân có thể tạo ra siêu vi mới dù rằng tốc độ xoay vòng (turnover rate) rất thấp. Theo suy đoán nếu như muốn loại bỏ hoàn toàn cccDNA thì phải tiêu diệt tất cả tế bào gan bị nhiễm trùng, nhưng nếu thực hiện điều này thì suy gan và tử vong sẽ xảy ra. Thực tế cho thấy hầu hết bệnh nhân nhiễm HBV cấp tạm thời lại phục hồi hoàn toàn không có hậu quả biến chứng gì!



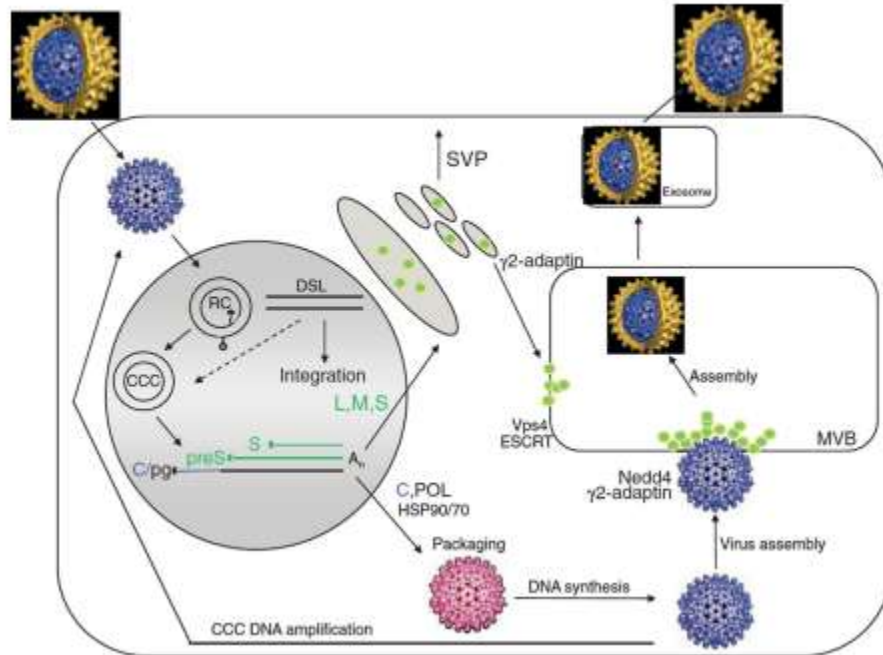
Hình 2 – Sơ đồ tăng sinh HBV DNA (Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* 2015;479-480:672-686 <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.031>)

Tiến trình sao chép ngược bắt đầu bằng việc kết dính protein pol vào bản sao 5' của đoạn epsilon (ϵ), còn được gọi là cấu tạo ban đầu hình vòng tròn (stem-loop structure) nằm ở đoạn cuối của pregenomic RNA (A). Sau đó là tiến trình chép mã 3 nucleotides từ phần bên phải ra của men polymerase chuyển dịch đến bản sao của một đoạn 11 nucleotides (DR1) nằm ở đoạn tận cùng 3'. Bản chất của sự chuyển dịch này được xác định, nhưng cũng đủ để tạo ra các nucleotides (được chép mã từ và DR1). Sao chép ngược được tiếp tục đến đoạn tận cùng 5' của pregenomic RNA (B và C), với một khung sườn (sẽ bị men RNase H thoái hóa và được mã hóa ở trong protein pol). Đoạn tận cùng 18 nucleotides (gồm CAP và DR1) không bị thoái hóa. Bình thường oligonucleotide này chuyển dịch đến DR2 (D). Tổng hợp dây DNA mang điện tích dương bắt đầu và mở rộng đến đoạn tận cùng 5' của dây DNA mang điện tích âm. Sau đó đoạn DNA này cuộn lại thành vòng tròn bằng một đoạn tận cùng của dây mang điện tích âm (E). Tổng hợp dây DNA điện tích dương chấm dứt sớm trước khi hoàn thành (F). Khoảng 10% thời gian, primer RNA để tổng hợp dây mang điện tích dương không chuyển vị được, tạo ra đôi dây DNA xoắn (dsDNA) (G). Cả hai loại DNA tái hợp và dsDNA đều có thể chuyển đổi thành cccDNA khi được đưa vào nhân. DslDNA là cơ chất rất tốt cho sự xấp nhập vào DNA của ký chủ.

Về cơ chế loại trừ HBV không hẳn chỉ phụ thuộc vào cái chết của tế bào gan bị nhiễm trùng. Qua nhiều thực nghiệm trên chuột cho thấy tăng sinh của HBV DNA bị loại trừ, nhưng không gây bệnh lý tế bào, có liên quan đến một số cytokines như interferon γ , TNF α . Loại trừ

cccDNA hiện còn rất mù mờ, nhiễm siêu vi ở chuột không tạo ra cccDNA! Nghiên cứu trên canh cấy tế bào gan chuột nhiễm DHBV lại không phát hiện tình trạng loại trừ cccDNA do cytokines!

Nhiều nghiên cứu trên khi đột và chuột chũi được thực hiện tiếp theo để cố gắng tìm hiểu cơ chế phục hồi trong các nhiễm trùng cấp và tạm thời. Những nghiên cứu này đưa ra hai câu hỏi cơ bản: tế bào gan nào được phục hồi hoàn toàn trong nhiễm HBV cấp tạm thời? Nếu có, làm thế nào để đạt được kết quả này? Từ kết quả của những nghiên cứu này, chúng ta đã có bằng chứng chắc chắn là tế bào gan được phục hồi hoàn toàn, nhưng cũng có một số lớn bị chết, không xác định được đặc điểm của tế bào gan nào chết, tế bào nào phục hồi. Điều này cho thấy cơ chế loại trừ cccDNA trong nhiễm HBV cấp tính vẫn còn mù mờ khó hiểu.



Hình 3 – Sơ đồ chu trình tăng sinh của HBV (Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* 2015;479-480:672-686 <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.031>)

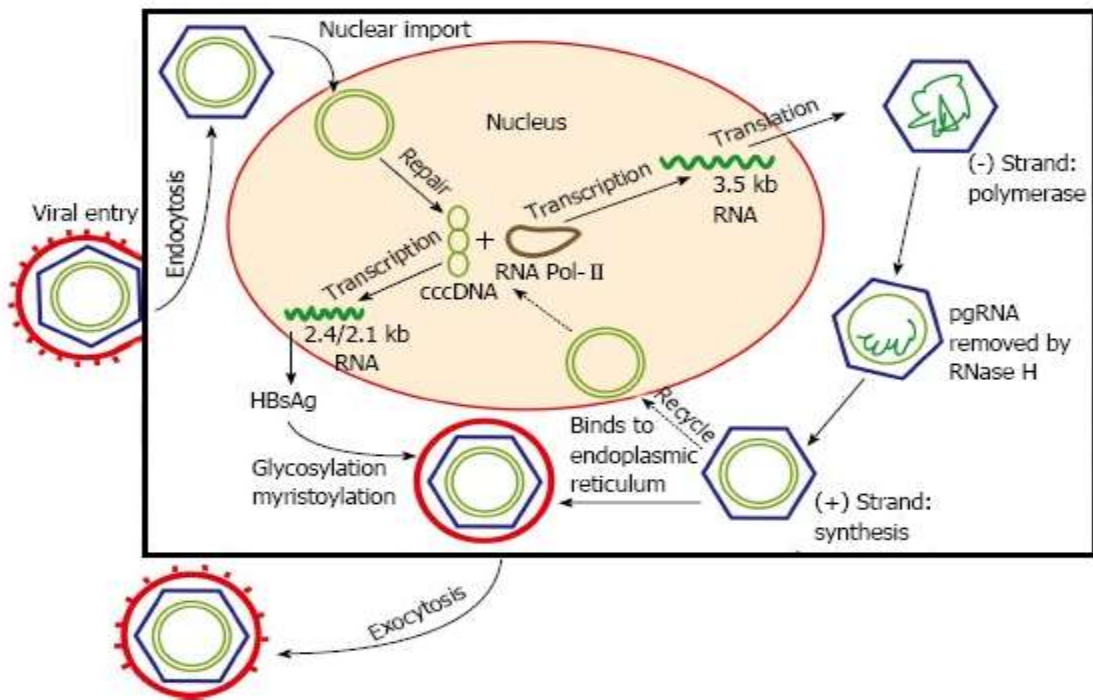
Mô hình tăng sinh của Hepadnavirus: protein lớp vỏ màu vàng, capsid có chứa DNA và capsid chứa RNA. Siêu vi tiếp cận với thụ thể xâm nhập (entry receptors), NTCP (sodium taurocholate cotransporting polypeptide), phân nucleocapsid được đưa vào nhân. Tại đây DNA được tái hợp và chuyển đổi thành cccDNA. Ở giai đoạn đầu của nhiễm trùng, khi mà nồng độ của protein lớp vỏ còn thấp, nucleocapsid mới được hình thành (DNA vòng kín) được chuyển đến nhân và khuếch đại số lượng bản sao cccDNA tăng lên đến 50 cho mỗi tế bào gan bị nhiễm trùng. Cùng thời điểm này, protein lớp vỏ vào đến hệ võng nội bào (endoplasmic reticulum = ER), tập hợp lại hình thành các hạt tử nhỏ của HBV (subviral particles) hoặc chuyển đến MVB (multivesicular bodies), nơi mà hạt tử siêu vi toàn vẹn được tập hợp). Một khi lớp vỏ đã hình thành đầy đủ, nucleocapsid được bài tiết và tiến trình khuếch đại cccDNA dừng lại. Siêu vi trưởng thành có thể mang các exosomes. Siêu vi có dsDNA có thể gây nhiễm cho tế bào gan. cccDNA được hình thành từ dsDNA (double stranded-linear DNA) bằng quy trình tái hợp không đồng nhất, hậu quả là mất hết một đoạn (sequence) và cccDNA không có khả năng hỗ trợ siêu vi tăng sinh. dsDNA cũng có thể xấp nhập vào DNA của ký chủ qua con đường không đồng nhất (đường như con đường này không có vai trò gì trong chu trình tăng sinh phát triển của siêu vi).

Qua nghiên cứu thực nghiệm, tăng sinh HBV vẫn còn nhiều bí ẩn!

Nhiễm HBV là một loại nhiễm trùng sản xuất ra nhiều loại siêu vi mới, nhưng hầu hết không gây bệnh lý tế bào. Bản thân HBV mã hóa cho 7 loại proteins: precore, core, pol, X và 3 loại protein lớp vỏ (S, M, L). Core chính là nucleocapsid của siêu vi, pol mã hóa cho các men tổng hợp DNA như men sao chép ngược, RNase, xảy ra trong nucleocapsid. Protein X rất cần cho việc chép mã của cccDNA. Precore là một protein của phân lõi siêu vi, mang một peptide

chứa tín hiệu chấm dứt N, xảy ra trong tiến trình tiêu hủy protein ở đoạn cuối N và C trước khi được bài tiết từ tế bào gan nhiễm trùng ra ngoài (protein này hiện nay được gọi là HBeAg). Vai trò của HBeAg như thế nào trong chu trình tăng sinh HBV vẫn còn mù mờ chưa rõ ràng, nhưng người ta nghĩ rằng nó ức chế hoặc làm chậm trễ miễn dịch chống siêu vi³.

Xâm nhập tế bào. Đặc điểm của HBV và các loại Hepadnavirus là ái tính với tế bào gan (hepatotropism) và có tính chuyên biệt theo từng loài (species specificity), được kiểm soát ít nhất ở hai mức độ: xâm nhập siêu vi vào tế bào (virus entry) và chép mã cho RNA của siêu vi (transcription of viral RNAs). Phát hiện ra HDV, một loại siêu vi tương tự như HBV cho chúng ta một mô hình rất tốt để nghiên cứu về những yếu tố quyết định của siêu vi giúp siêu vi xâm nhập vào tế bào (HDV sử dụng protein lớp vỏ HBsAg để xâm nhập tế bào). Thực nghiệm cho thấy khi dùng thành phần L được N-myristyl-hóa sẽ cho phép siêu vi gây nhiễm trùng. Cụ thể hơn nếu như chúng ta dùng đoạn lipopeptide từ 48 acid amin đầu tiên của preS1 kết dính vào tế bào gan sẽ giúp cho HBV và HDV gây nhiễm trùng³. Đầu tiên preS1 kết dính vào proteoglycans có chứa heparin sulfate ở bề mặt tế bào (Heparin sulfate proteoglycans = HSPGs), sau đó kết dính vào các thụ thể chuyên biệt ở bề mặt của tế bào gan.



Hình 4 – Sơ đồ chu trình tăng sinh của HBV

(Tang CM, Yau TO, Yu J. Management of chronic hepatitis B infection: Current treatment guidelines, challenges, and new developments. World J Gastroenterol 2014;28:6262-6278)

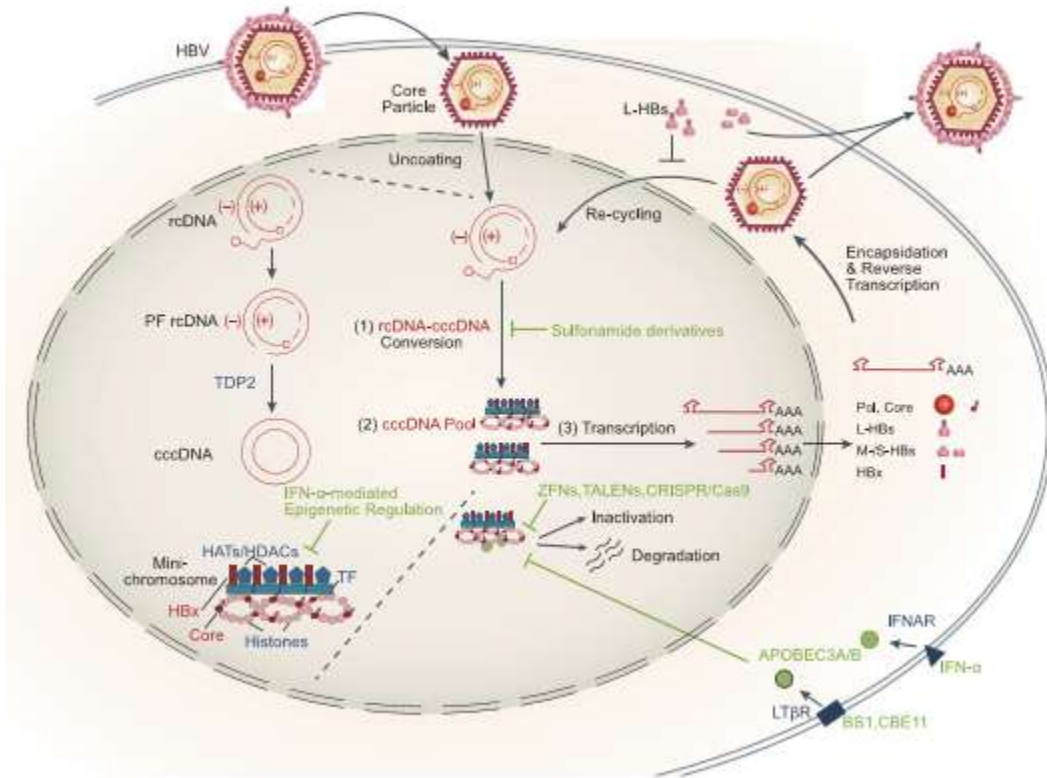
HBV xâm nhập tế bào gan qua con đường endocytosis. Phần nucleocapsid được chuyển đến nhân, tại đây DNA của HBV được chuyển thành cccDNA. Tiếp theo HBV tăng sinh qua tiến trình sao chép ngược. Nucleocapsid trưởng thành chịu trách nhiệm về quá trình tồn tại của siêu vi, liên quan đến quá trình gây nhiễm cho tế bào gan lân cận.

Gần đây người ta dùng một peptide được myristyl-hóa hiện diện ở trong canh cây tế bào gan chuột có thể làm cho những tế bào này nhiễm HBV và HDV. Ngoài ra nhiều nhà nghiên cứu cũng phân định được một chất vận chuyên acid mật như NTCP thật sự là thụ thể của HBV và HDV. NTCP liên quan đến độ nhạy cảm của nhiễm trùng do HBV và HDV ở các dòng tế bào u gan. Ngoài ái tính với tế bào gan, preS1 kết hợp với NTCP cũng có khả năng kiểm soát được tính chuyên biệt theo loài. Nghiên cứu thực nghiệm chức năng của preS1 đối với Avihepadnavirus cho

thấy HDV có thể gây nhiễm cho tế bào chuột mang NTCP của người, trong khi đó HBV lại không gây nhiễm. Như vậy phải có một yếu tố nào khác trong việc xác định tính chuyên biệt theo loài của HBV¹⁸?

Một khi HBV bám được vào thụ thể ở màng tế bào gan, siêu vi tạo ra hiện tượng hòa màng (fusion) để di chuyển vào tế bào chất. Nghiên cứu gần đây cho thấy cholesterol giữ vai trò quan trọng để cho các loại Hepadnavirus xâm nhập tế bào. Ở mô hình thực nghiệm tế bào, caveolin-1 và tiến trình endocytosis liên quan đến clathrin nên rất cần cho nhiễm HBV¹⁸.

Hình thành cccDNA. Các tiến trình sinh học như cởi bỏ lớp vỏ (uncoating), di chuyển nucleocapsid của siêu vi đến màng nhân và chuyển đổi rc DNA thành cccDNA xảy ra sau khi siêu vi xâm nhập vào tế bào phụ thuộc rất nhiều vào các yếu tố chuyên biệt của ký chủ. Điều cần lưu ý là cccDNA không được phát hiện ở chuột chuyển đổi gen (transgenic mouse) mang HBV trong tế bào gan, như vậy đây cũng là yếu tố liên quan đến tính chuyên biệt theo loài trong chu trình tăng sinh phát triển của HBV sau khi siêu vi xâm nhập vào tế bào. Gần đây người ta ghi nhận tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP 2) là một trong những yếu tố của ký chủ liên quan đến hình thành cccDNA. TDP 2 tác dụng vào cầu Tyr-DNA, phóng thích polymerase từ rcDNA *in vitro*¹⁸.



Hình 5 – Hình thành cccDNA và chép mã cùng biện pháp tấn công vào mục tiêu của siêu vi

(Chen J, et al. *New insights into hepatitis B virus biology and implications for novel antiviral strategies. National Science Review* 2015;2:296-313)

Hình thành cccDNA và chép mã bao gồm chuyển đổi rcDNA thành cccDNA từ cccDNA thành pgRNA và sao chép ngược. Phân tử nhỏ tổng hợp có thể ức chế chuyển đổi từ rcDNA thành cccDNA. Công cụ để hình thành bộ gen bao gồm ZFNs, TALENs và CRISPR/Cas9 được thiết kế chuyên biệt cho chuỗi cccDNA có thể là bước tiếp cận quan trọng để loại trừ HBV. Các loại cytokines như IFN-α có thể ức chế chép mã cccDNA bằng cách thay đổi cấu trúc cccDNA với histone và kích thích điều hòa biểu hiện của APOBEC3A.

Giống như các loại siêu vi DNA, cccDNA của HBV được sắp xếp trong tế bào gan dưới dạng minichromosome. Một lần tế bào gan bị nhiễm HBV, một bản sao cccDNA được tạo ra và hình thành dần một lượng lớn (pool) cccDNA trong gan. Kích cỡ cccDNA trong gan thay đổi không cố định theo số lượng tế bào gan bị nhiễm, cũng như phụ thuộc vào giai đoạn nhiễm HBV. Nồng độ cccDNA trong gan bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính giảm từ bệnh nhân HBeAg (+) đến anti-HBe (+). Yếu tố nào của siêu vi và ký chủ điều hòa kích cỡ của cccDNA đến nay vẫn chưa được biết rõ³.

Tập hợp nucleocapsid. Nucleocapsid được hình thành từ nhiều bản sao (240 hoặc 180) protein lõi, cùng với protein Pol được bao quanh bằng pgRNA. Sau khi chuyển đổi từ pg RNA thành rcDNA và trở thành phân tử phát triển đầy đủ trong nucleocapsid, được bao bọc bằng các protein lớp vỏ và bài tiết ra ngoài tế bào ở dạng siêu vi toàn vẹn, hoặc quay lại nhân để tạo ra cccDNA. Bước đầu của tiến trình tập hợp nucleocapsid là hình thành những capsid homodimers, kết nối lại với nhau bằng cầu disulfide giữa các phân tử cystein. Một khi có tín hiệu dịch mã, các dimers tập hợp protein lõi một cách nhanh chóng và khi đạt được nồng độ ngưỡng các phân tử này kết tủa lại hình thành hạt tử capsid¹⁸. Hiện tại, người ta cũng không biết tại sao vẫn có hiện diện của một số oligomers, một số khác lại có dạng trimers hình thành trong nucleocapsids¹⁸.

Sau khi tập hợp được nucleocapsid, phức hợp ribonucleoprotein (RNP) pgRNA-Pol được hình thành. Một đoạn ngắn của RNA gọi là ϵ nằm ở phần tận cùng của 5' của pgRNA chứa phần phình ra ở bên trong và một phần uốn vòng ở phần đỉnh rất cần cho việc hình thành RNP và bao bọc pgRNA trong phân tử capsid và được protein Pol nhận biết một cách chuyên biệt. Phần tận cùng và men sao chép ngược cũng rất cần cho sự kết hợp ϵ -Pol. Một số yếu tố của ký chủ có liên quan đến hình thành phức hợp RNP và bao bọc lấy pgRNA. Những nghiên cứu gần đây cho thấy Hsp90 (heat shock protein 90) có tương tác với men sao chép ngược và gia tăng hình thành phức hợp RNP¹⁸.

Sao chép ngược. Một khi RNP được hình thành và đưa vào nucleocapsid của siêu vi, rồi DNA, rcDNA sẽ được tổng hợp từ pgRNA bằng cách sao chép ngược. Tiến trình này khởi động bằng cách tương tác giữa Pol và pgRNA. Nhưng khởi động hình thành dây DNA xoắn mang điện tích âm chỉ qua một cơ chế duy nhất, đó là protein priming, trong đó protein Pol được xem là protein priming chuyên biệt, nhưng phần phình to bên trong của RNA ϵ được xem như là một cái khuôn cho protein priming. Tiến trình protein priming liên quan đến nhiều yếu tố quan trọng, đầu tiên phải kể đến RNA ϵ . Tyr ở vùng TP của protein Pol được xem là vị trí kết dính dGMP (deoxyguanosine monophosphate) để tổng hợp dây DNA xoắn mang điện tích âm. Vùng TP chứa polymerase rất cần cho sự hình thành cầu nối phosphotyrosyl ban đầu giữa 5' dGMP và Tyr, tiếp theo sau là polymer-hóa DNA. Sau protein priming là dây DNA xoắn mang điện tích âm bắt đầu tổng hợp bằng cách chuyển vị đoạn DNA ngắn từ phần tận cùng 5' của pgRNA vào vị trí tiếp nhận ở đoạn tận cùng 3'. Vào thời điểm này, RNase của Pol thoái hóa pgRNA tách rời đoạn tận cùng 5' để bắt đầu tổng hợp dây DNA xoắn mang điện tích dương. Kéo dài dây DNA xoắn điện tích dương từ đoạn tận cùng 5' đến 3' và không hoàn thành để hình thành rcDNA. Cuối cùng nucleocapsid trưởng thành chứa rcDNA và bài tiết ra khỏi tế bào ở dạng siêu vi toàn vẹn hoặc được đưa trở lại nhân tế bào để nhân rộng thêm nhiều cccDNA¹⁸.

Cơ chế phân tán (disassembly) nucleocapsid và tổng hợp cccDNA vẫn chưa được biết rõ ràng. Nucleocapsid nguyên chất của HBV trong nhân tế bào u gan phụ thuộc vào nhiều yếu tố di chuyển alfa và beta, rcDNA (recombinant DNA) được phóng thích vào nhân, sau đó được chỉnh sửa thành cccDNA. Tuy nhiên, bản chất của các enzym trong tế bào thực hiện việc chỉnh sửa DNA vẫn còn khó hiểu. Polymerase và/hoặc là men sao chép ngược rất cần cho việc nối rộng khoảng trống ở dây DNA mang điện tích dương. Các loại đồng phân nucleosides ức chế men sao chép ngược, ngăn chặn hình thành cccDNA. Endonuclease của tế bào phải loại bỏ một đoạn ngắn có phần cuối dư thừa của rcDNA dây mang điện tích âm (được hình thành từ quá trình tổng hợp DNA) và loại bỏ luôn men sao chép ngược và RNA primer lần lượt trên dây DNA điện tích âm

và dương. Cuối cùng phản ứng thắt chặt đóng lại khoảng trống giữa hai dây DNA. Trong mô hình này rcDNA là tiền thân của cccDNA. Một mô hình khác (chưa được chứng minh) dự đoán chính polymerase kéo dài đoạn tận cùng 3' của cả hai dây DNA, tạo ra dây DNA đôi xoắn theo đường thẳng (double-stranded linear DNA) với đoạn tận cùng dư thừa rất rộng (large terminal redundancy = LTR) cột thắt lại vùng chông chéo dính liền nhau ở rcDNA. Tái hợp giữa LTRs dẫn đến hình thành cccDNA mà không cần endonucleases để hình thành các đoạn cuối của rcDNA. cccDNA khiếm khuyết không hoàn chỉnh được phát hiện, có thể hình thành từ việc tái hợp các LTRs như dsDNA. Tuy nhiên, dsDNA lại không được phát hiện, có thể dsDNA có thời gian tồn tại quá ngắn, hoặc có thể cccDNA được hình thành trực tiếp từ rcDNA³.

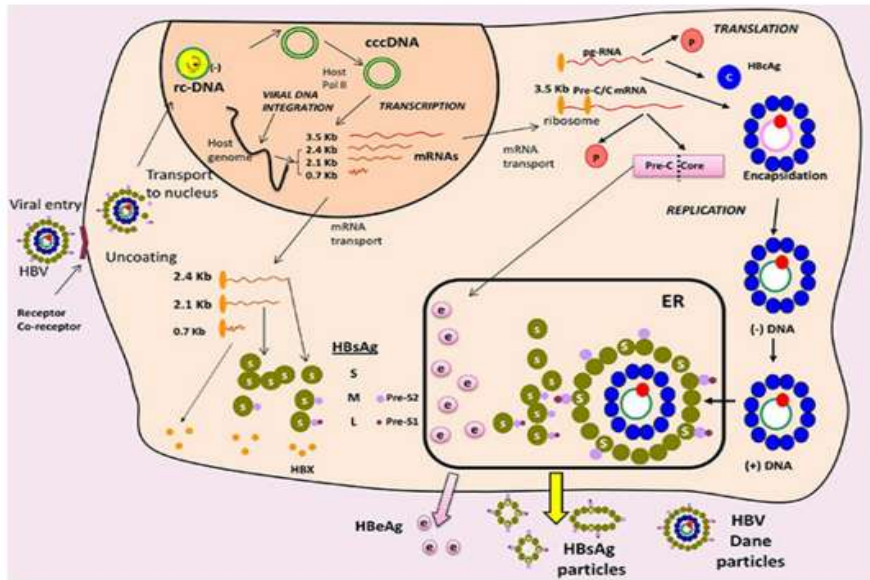
Ở vị nhiễm phải DHBV, cccDNA có thể tìm thấy trong gan vào những ngày đầu tiên. cccDNA kết hợp với histones hình thành mini-chromosome. Đối với HBV, cccDNA là cái khuôn để chép mã cho 6 loại RNA của siêu vi từ 4 promoters khác nhau (core, PreS, S và X). Ở Orthohepadnaviruses, mRNAs được gọi tên là precore/core, preS, M/S và X. Chép mã cho precore/core và M/S được điều khiển bởi core và S promoters. Hai yếu tố kích thích (enhancers) kết dính vào những vị trí chép mã chuyên biệt ở gan là HNF4 và HNF3, rất cần để xác định ái tính của Hepadnavirus đối với gan³.

HBx cũng rất cần cho tiến trình chép mã từ cccDNA (nghiên cứu thực nghiệm trên tế bào HepaRG và HepG2 nhiễm HBV). Tuy nhiên, cơ chế chính xác về hoạt động của HBx vẫn còn mù mờ. Bằng chứng về sự kết dính trực tiếp X vào mini-chromosome được ghi nhận bằng thực nghiệm kết tủa miễn dịch chromatin. Tương tác của X với DDB1 (DNA damage-binding protein 1) và cullin4A-DDB1- ligase được xác định rõ ràng nhất. Tương tác giữa X và DDB1 được xác định rõ ràng bằng nhiều nghiên cứu về sinh hóa, di truyền và cấu tạo, tuy nhiên HBx kết hợp với thành phần nào thì vẫn chưa có câu trả lời thỏa đáng. Nếu như phức hợp Cullin4A-DDB1-HBx kiểm soát được tiến trình chép mã từ cccDNA, nó có thể giữ vai trò nhất định trong việc điều hòa acetyl-hóa histones, hoạt hóa chép mã vì một khi không có HBx, histones ở các mini-chromosomes bị acetyl-hóa tương đối ít. Tuy nhiên, việc phân tích kết quả các nghiên cứu này nên thận trọng vì những sản phẩm này xuất phát từ thành phần giống cccDNA được gây nhiễm qua các plasmid DNA. Giả thuyết hiện tại và vững chắc về vai trò của HBx trong việc chép mã cccDNA là protein này cần cho kiểu nhiễm trùng tự nhiên do WHV ở chuột chũi cũng như nhiễm trùng do các loài Orthohepadnaviruses. Điều thú vị là các loài Avihepadnavirus lại không mã hóa cho gien X, như vậy protein này không cần cho nhiễm trùng ở ký chủ này. Tất cả loài Avihepadnaviruses có core protein to hơn các loài Orthohepadnaviruses và như vậy chúng có hoạt động tương tự như X của HBV và WHV³.

Tất cả các loại mRNAs được di chuyển đến ribosomes theo cơ chế phụ thuộc vào yếu tố điều hòa chép mã cis (posttranscriptional cis-acting regulatory element (PRE), chông chéo với thành phần tận cùng của HBx. Core và polymerase được chép mã từ pregenomic RNA (pgRNA). Precore được chép mã từ precore RNA. Tương tự, protein lớp vỏ M và S xuất phát từ mRNA, mang tên preS2 và M/S, trong khi đó protein L và HBx được chép mã từ PreS1 và X. HBx có thể tạo ra ngay sau khi hình thành cccDNA mini-chromosome, nhưng trong mô gan bị nhiễm trùng, đoạn chép mã HBx tích chứa ít hơn các loại mRNA khác nên ít khi được phát hiện, như thể chúng ta cũng không có bằng chứng xác thực về biểu hiện của HBx ở tế bào gan nhiễm trùng³.

Kết dính polymerase với bản sao epsilon có cấu tạo hình vòng tròn, nằm ở đoạn tận cùng 5' của pgRNA, kích hoạt việc đóng gói (packaging), chuyển tiếp từ core/pol mRNA giúp cho DNA tăng sinh. Một khi kết hợp với RNA, polymerase khởi đầu tiến trình sao chép ngược từ phần có tyrosine của vùng tận cùng N của polymerase (được gọi là vùng TP = terminal protein domain). Tuy nhiên, hiểu biết của chúng ta có một khoảng trống rất lớn về tăng sinh DNA, đó là thông tin về cấu tạo toàn phần của polymerase, đặc biệt là vùng TP. Một vấn đề khác cũng cần được quan tâm, đó là một khi vị nhiễm phải DHBV, phần lớn polymerase được tích lũy trong các cấu tạo có chứa lipid trong tế bào chất, như vậy chức năng của các cấu tạo này không nằm trong

nhân (được capsid hóa) ra sao? Chưa có câu trả lời, nhưng nhiều nghiên cứu cho thấy những cấu tạo này có khả năng ức chế miễn dịch tự nhiên bẩm sinh³!



Hình 6 – Sơ đồ hình thành HBsAg trong nhiễm HBV

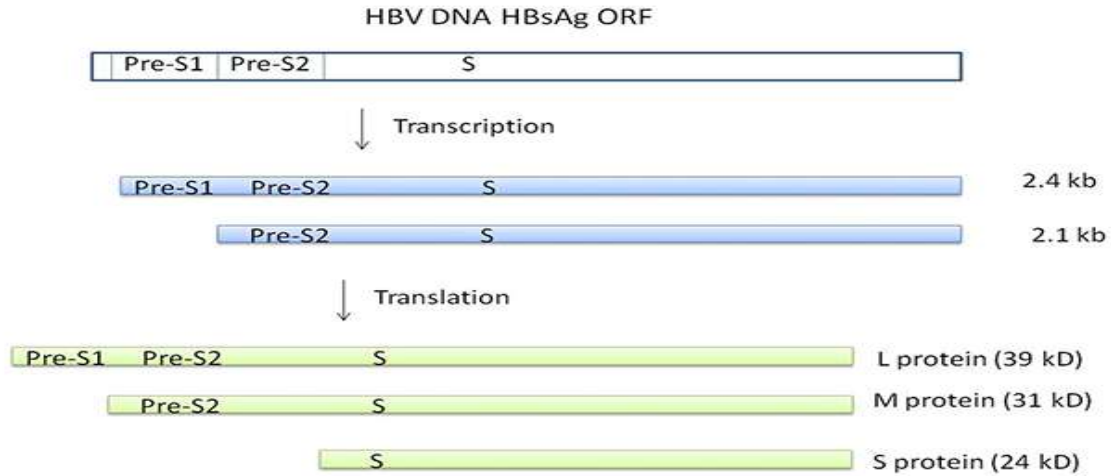
(Hadziyannis E. Quantification of HBsAg in serum: characteristics of the assays. *OA Hepatology* 2013 April 01;1(1):1)

Sau khi chép mã từ cccDNA, HBsAg được tạo ra bao gồm 3 loại hạt từ S, M, L với nồng độ S cao nhất trong nhiễm HBV. Trong quá trình tăng sinh của HBV, sau chép mã từ cccDNA bản sao RNA được hình thành (pregenomic RNA = pgRNA) để tiếp tục mã hóa cho protein precore và core. Như vậy sản xuất protein cho HBV và tăng sinh HBV theo nhiều con đường khác nhau, có thể song hành hoặc riêng lẻ, cũng có thể xảy ra trong khi điều trị bằng các loại nucleos(t)ides uống. HBsAg không phải chỉ được tạo ra từ cccDNA, có thể từ bộ gen được xấp nhập vào tế bào gan của ký chủ (đường như HBV DNA xấp nhập này mới là bộ khung chính sản xuất ra HBsAg ở bệnh nhân VGSV B có HbeAg âm và bệnh nhân bị HCC). HBsAg không những là protein chính bài tiết vào hệ tuần hoàn ở dạng siêu toàn vẹn, mà còn liên quan đến tính gây nhiễm của HBV và là mục tiêu để kháng thể anti-HBs trung hòa sau một nhiễm trùng tự nhiên hay sau khi được chủng ngừa. HBsAg được sản xuất dư thừa và chạy vào hệ tuần hoàn ở dạng không gây nhiễm trùng (hạt từ hình cầu nhỏ hoặc hình ống dài), một số ở dạng siêu vi toàn vẹn (hạt từ Dane).

Sản phẩm cuối cùng của tăng sinh DNA là đôi dây rcDNA xoắn từng phần nằm trong tế bào chất, còn dính với men sao chép ngược (RT) ở đoạn cuối 5' của dây DNA mang điện tích âm và dính với RNA oligomer (xuất phát từ đoạn cuối 5' của pgRNA) ở đoạn cuối 5' của dây DNA mang điện tích dương. Chu trình tăng sinh của Hepadnavirus rắc rối có thể do nucleocapsids chứa DNA, khác với các loại siêu vi khác chứa RNA, có thể tập hợp được các protein lớp vỏ nằm ở bề mặt của hệ lưới nội bào (endoplasmic reticulum = ER). Tuy nhiên, hiện nay chưa có ai biết được tín hiệu nào cần cho sự chuyển tiếp này. Những nghiên cứu về sinh hóa cho thấy có sự khác biệt trong tiến trình phosphoryl-hóa core protein của các hạt chứa RNA và các hạt chứa DNA. Hạt chứa DNA bị phosphoryl-hóa ít hơn ở vùng gần phần tận cùng C của core protein chứa nhiều serine, trong khi đó giảm nồng độ phosphate để bù trừ cho nồng độ phosphate tăng khi tổng hợp DNA, đồng thời tạo ra nhiều vị trí kết nối với protein lớp vỏ bằng cách thay đổi vùng tận cùng C của nucleocapsids. Nhưng chúng ta cũng không có thông tin về cấu tạo vùng tận cùng C của nucleocapsid nên không giải thích được sự khác biệt trong tiến trình tập hợp³.

“Số phận” của nucleocapsid chứa DNA phụ thuộc vào giai đoạn nhiễm trùng ở tế bào gan. Lúc đầu nồng độ protein lớp vỏ thấp, nucleocapsid được vận chuyển vào trong nhân để hình

thành cccDNA. Sau đó nucleocapsid kết hợp với proteins lớp vỏ và trưởng thành, tạo ra hạt từ siêu vi toàn vẹn (virion) phóng thích vào máu³.



Hình 7 – Ba dạng protein của HBsAg

(Hadziyannis E. Quantification of HBsAg in serum: characteristics of the assays. *OA Hepatology* 2013 April 01;1(1):1)

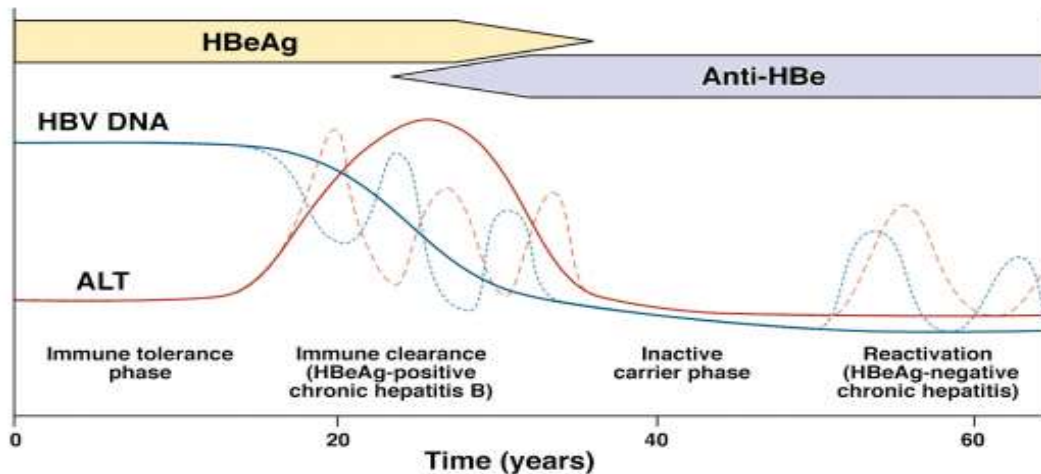
Nghiên cứu về tập hợp DNA phần nào bị trở ngại vì số lượng siêu vi được tạo ra từ một tế bào bị nhiễm trùng tương đối thấp (ước tính vào khoảng 1-10 virions/tế bào gan/ngày). Tại sao? Protein lớp vỏ tích chứa trong ER-bộ Golgi (nơi capsid chứa DNA kết hợp với protein lớp vỏ) được chuyên dịch vào trong lòng các cấu tạo này và rời khỏi tế bào qua con đường bài tiết. Tuy nhiên, tập hợp và bài tiết lại nổi bật và chiếm ưu thế với các hạt từ M và S, ít hơn là L. Nhiều nghiên cứu phát hiện virions sử dụng một con đường khác, phụ thuộc vào protein, bình thường liên quan đến phức hợp sử dụng endosomes cần cho sự di chuyển (endosomal sorting complex required for transport = ESCRT) và hình thành thể nhiều bong bóng nước (multivesicular bodies = MVBs). Bộ máy MVB cũng được sử dụng để đẩy các loại siêu vi có lớp vỏ ra khỏi tế bào, kể cả HIV qua con đường nảy mầm (budding). Người ta thừa nhận rằng MVBs giữ vai trò dự đoán trưởng thành và nảy mầm của HBV, nhưng hiện nay kiến thức về vấn đề này còn nhiều khiếm khuyết, chưa rõ ràng, cần được bổ sung. Vì vậy nhiều vấn đề được nêu ra cần được làm sáng tỏ, chẳng hạn như tín hiệu nào điều khiển HBV vào con đường ESCRT, nơi nào trong tế bào gan bị nhiễm trùng có thể xảy ra hiện tượng nảy mầm³?

Mặc dù vị trí và cơ chế tập hợp siêu vi có thể là tiến trình quan trọng trong việc hình thành các hạt từ siêu vi, nhưng chúng ta cũng nên lưu ý đến cách sắp xếp lại mới cấu hình của vùng tận cùng N của preS1, đó là protein L. Protein này gồm hai phần, một nửa nằm ở phần tiếp xúc với tế bào chất, một nửa nằm trong các khoang chứa ở màng tế bào như là một dạng của hạt từ siêu vi toàn vẹn khi chui khỏi tế bào bằng cách nảy mầm. PreS1 chuyên dịch xuyên quan lớp vỏ, biểu hiện lên trên bề mặt của siêu vi (nơi này là vị trí kết dính với NTCP, một thụ thể của siêu vi). Cuối cùng chúng ta cũng nên lưu ý đến các hạt từ siêu vi “rỗng” được tích chứa trong máu của bệnh nhân nhiễm HBV, nhưng con đường tập hợp và hình thành preS1 ở các hạt từ này vẫn chưa được biết rõ ràng³.

Phần 3:

DIỄN TIẾN TỰ NHIÊN CỦA NHIỄM HBV

Diễn tiến tự nhiên của nhiễm HBV là một tiến trình “động”, bao gồm một phức hợp hợp tương tác giữa HBV và hệ thống miễn dịch của ký chủ. Bao quát hơn, tiến trình này gồm bốn giai đoạn với những khoảng thời gian rất thay đổi. Giai đoạn ban đầu là giai đoạn dung nạp miễn dịch (immune tolerance) với ALT bình thường, HBV tăng sinh ở mức độ cao (nồng độ HBV DNA rất cao), bệnh gan chưa xuất hiện và mức độ tổn thương mô học của gan rất ít hoặc không có. Trong giai đoạn này người mang siêu vi có HBeAg (+) nên tính lây nhiễm rất cao. Giai đoạn dung nạp miễn dịch thường rất ngắn nếu nhiễm trùng xảy ra ở người lớn, nhưng có thể kéo dài 20-30 năm ở trẻ sơ sinh lây nhiễm từ mẹ. Giai đoạn tiếp theo là giai đoạn thải trừ miễn dịch (immune clearance), tế bào gan bị nhiễm trùng bị vỡ tan gây ra viêm gan với biểu hiện viêm nhiễm hoại tử và xơ hóa (fibrosis), nồng độ ALT và HBV DNA cao. Tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh HBeAg và mất HBeAg hàng năm thay đổi từ 10 đến 20%, phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như HBV genotype, tuổi của bệnh nhân lúc bị nhiễm HBV. 80-90% trẻ em bị nhiễm HBV sẽ trở thành người mang HBV mạn tính, trong khi đó chưa tới 5% người lớn bị nhiễm HBV không vượt qua được giai đoạn cấp và trở thành người mang HBV mạn tính. Trước khi loại bỏ siêu vi, nhiều đợt bùng phát xảy ra tạo ra nhiều nguy cơ tích lũy dần dần sẽ đưa đến xơ gan và HCC. Sau khi có chuyển đổi huyết thanh, mức độ tăng sinh HBV giảm, viêm nhiễm cũng giảm (ALT trở về bình thường). Khác với tình trạng mang siêu vi bất hoạt (inactive carrier state = IC), viêm gan với HBeAg âm vẫn có thể xảy ra (HBV tiếp tục tăng sinh với mức độ vừa phải, gây tổn thương như mô gan với ALT tăng). Vì vậy, phân biệt tình trạng mang siêu vi bất hoạt (diễn tiến lâu dài thuận lợi) và viêm gan HBeAg âm rất quan trọng (bệnh gan tiếp diễn và đáp ứng với điều trị kém)^{2, 19}.



Hình 8 – Diễn tiến tự nhiên của một trường hợp nhiễm HBV

(Yapali S, Talaat N, Lok AS. Management of hepatitis B: Our Practice and how it relates to the Guidelines. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2014;12:16-26)

Nhiễm HBV gồm có 4 giai đoạn: giai đoạn dung nạp miễn dịch với HBeAg (+), HBV DNA cao, ALT bình thường, chưa có tổn thương gan cũng không có bằng chứng bệnh gan tiến triển. Giai đoạn tiếp theo là giai đoạn thải trừ miễn dịch với chuyển đổi huyết thanh HBeAg (mất HBeAg và xuất hiện anti-HBe). Hầu hết bệnh nhân đi vào giai đoạn mang mầm bệnh bất hoạt với HBeAg (-), anti-HBe (+), HBV DNA thấp (<2000 IU/ml), ALT bình thường, không có hoặc có rất ít phản ứng viêm nhiễm trên sinh thiết gan. Giai đoạn tái hoạt (reactivation phase) với HBeAg (-), ALT tăng từng đợt hoặc kéo dài, HBV DNA tăng và viêm nhiễm được ghi nhận trên các mẫu sinh thiết gan.

SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA NHIỄM HBV CẤP TẠM THỜI

Nhiễm HBV cho các tế bào gan không gây bệnh lý tế bào, tổn thương mô học là hậu quả của phản ứng miễn dịch mắc phải (adaptive immune reaction) với nhiễm trùng, đặc biệt là việc tạo ra tế bào T gây độc (CTL) chuyên biệt cho từng loại siêu vi. Nhiễm HBV cấp tính tạm thời thường kéo dài không quá 6 tháng. Những hiện tượng nhiễm HBV cấp tính tạm thời ở người được ghi nhận qua các nghiên cứu trên chuột chũi và trên khỉ đột. Sau khi nhiễm phải HBV, siêu vi lan tràn trong những tuần đầu, nhưng cơ thể không tạo ra được miễn dịch bẩm sinh tự nhiên trong vài ngày đầu, không tạo ra được kháng thể trung hòa siêu vi, không tạo được CTLs chống siêu vi. Trong giai đoạn này, HBV lan tràn khắp tế bào gan. Nhiều tuần sau, phản ứng viêm hoặc tổn thương gan rõ ràng vẫn chưa xảy ra. Nếu như trong giai đoạn tiếp theo này, đáp ứng của CTLs chống siêu vi xuất hiện có thể phá hủy gan và dẫn đến nguy cơ tử vong cho ký chủ. Trường hợp hiếm gặp này được gọi là viêm gan tối cấp (fulminant hepatitis). Mặt khác hoạt hóa CTLs, kèm theo phản ứng viêm có thể phá hủy một số tế bào gan trong vòng vài tuần, nhưng số tế bào gan còn lại vẫn sống, có thể thoát khỏi nhiễm trùng, tái tạo quần thể tế bào gan. Nhiễm trùng phục hồi thường không có triệu chứng rõ ràng. Một số nhỏ tế bào gan bị nhiễm trùng, nhưng tăng sinh siêu vi lại bị các đáp ứng miễn dịch ức chế. Ở một số bệnh nhân có hệ thống miễn dịch bị suy giảm (thí dụ như bệnh nhân ung thư dùng hóa trị), viêm gan bùng phát có thể xảy ra.

Cytokines chống siêu vi giữ vai trò quan trọng trong việc phục hồi sau khi nhiễm HBV, nhưng điều ngạc nhiên là không cần đến kháng thể trung hòa. Nhiệm vụ trực tiếp của cytokines là loại bỏ khả năng tăng sinh siêu vi ngay từ trong tế bào chất của tế bào gan bị nhiễm trùng qua một cơ chế không rõ. Tuy nhiên, qua nghiên cứu trên canh cây tế bào gan vịt bị nhiễm DHBV, IFN α gây trở ngại cho việc đóng gói pgRNA trong capsid. Loại trừ cccDNA xảy ra chậm hơn so với việc loại bỏ những chất trung gian DNA tăng sinh (DNA replicative intermediates = RI) trong nucleocapsid. Điều đáng chú ý là trong các nghiên cứu ban đầu cho thấy cccDNA không giảm khi xử lý bằng IFN α hoặc γ canh cây tế bào vịt bị nhiễm DHBV. Điều này dường như phù hợp với nhận xét cccDNA không mất đi khi mà RI DNA bị loại bỏ khỏi nucleocapsid. Tuy nhiên nghiên cứu gần đây cho thấy IFN α , γ hoặc một số cytokines khác có thể tạo ra APOBEC3, rồi hướng đến cccDNA để phá bỏ tiến trình purine hóa (depurination) và thoái hóa (degradation), như vậy giải thích được tại sao siêu vi bị loại bỏ nhưng không gây bệnh lý tế bào. Nghiên cứu vẫn còn nhiều bàn cãi, nhưng tiến trình phá bỏ purine dường như chuyên biệt đối với dây mang điện tích âm của cccDNA. Tóm lại, về cơ bản, kết quả ghi nhận được từ những nghiên cứu *in vivo* và trên tế bào canh cây đến các nghiên cứu sau này về cơ chế loại trừ cccDNA không gây bệnh lý tế bào cần có nhiều dữ kiện thực nghiệm thuyết phục, nhưng rất tiếc là đến nay vẫn chưa thể kết luận được.

Một mô hình khác không yêu cầu phải mất cccDNA không gây bệnh lý tế bào, nhưng với điều kiện là cccDNA vẫn ổn định trong tế bào gan nhiễm trùng, chỉ có thể mất đi nếu như tế bào gan chết. Như vậy, một khi các dòng tế bào gan thoát khỏi được tình trạng nhiễm trùng cần phải loại bỏ RI DNA bằng tiến trình trung gian của cytokines, sau đó qua một hoặc nhiều đợt gián phân (mitosis) làm giảm nồng độ cccDNA và cuối cùng tạo ra nhiều thế hệ tế bào gan không chứa siêu vi. Một mô hình khác được đề nghị là cccDNA mất đi khi tế bào phân chia. Những dữ kiện *in vivo* hiện có phù hợp một cách chắc chắn với cơ chế của mô hình vừa nêu, trong đó gần 70% bị tiêu diệt hoặc cùng với cơ chế loại trừ cccDNA trong giai đoạn phục hồi. Dữ kiện không ủng hộ mô hình cccDNA vẫn tiếp tục tồn tại khi tế bào phân chia và mất đi khi tế bào chết. Nhiều nghiên cứu thực nghiệm vẫn theo đuổi ý tưởng về APOBEC3 tập trung hướng đến cccDNA, hỗ trợ vai trò chức năng của cytokines so sánh với cách phân chia tế bào trong việc loại bỏ cccDNA.

Khả năng cccDNA vẫn tiếp tục sống khi tế bào gián phân ít nhất trong một số tình huống dựa vào vòng đời (turnover) của tế bào gan trong khi dùng các đồng phân nucleosides chống lại tăng sinh DNA ở chuột chũi bị nhiễm WHV. Lúc đầu cccDNA giảm, phù hợp với cách ước tính vòng đời của tế bào gan. Tuy nhiên, giảm cccDNA có tương đương với số lượng hay thành phần của tế bào gan bị nhiễm trùng hay không lại không được khảo sát. Điều này có nghĩa là tế bào

gan chứa đựng nhiều bản sao cccDNA, một khi thoát khỏi nhiễm trùng, cccDNA giảm dần sau nhiều lần phân chia tế bào. Vấn đề cccDNA vẫn tiếp tục tồn tại qua nhiều lần phân chia tế bào được ghi nhận trong một nghiên cứu tế bào gan nhiễm trùng. Các tế bào này vẫn tiếp tục phân chia khi có mặt của các đồng phân nucleosides. Nổi bật của nghiên cứu này là nồng độ cccDNA ổn định trong canh cấy tế bào gan không phân chia, tổng hợp DNA bị các đồng phân nucleosides ức chế. Những kết quả này cho thấy cccDNA mất đi trong giai đoạn phục hồi từ các nhiễm trùng cấp tạm thời đến nhiễm trùng lan rộng, đều qua trung gian của hiện tượng gián phân, phụ thuộc vào hiệu quả của cytokines, làm mất ổn định cccDNA trong giai đoạn gián phân. Tuy nhiên khi phân tích kết quả của những nghiên cứu này, chúng ta phải chấp nhận là nucleosides ức chế hoàn toàn tổng hợp RI DNA mới, như vậy cũng ức chế luôn cccDNA trong chu trình tăng sinh phát triển tế bào. Gần đây chấp nhận này vẫn còn nhiều nghi vấn khi nghiên cứu thuốc chống siêu vi ở vịt nhiễm DHBV. Trong nghiên cứu này tế bào gan vẫn tiếp tục tăng sinh với mức độ có thể dự đoán được. Tóm lại, một khi xác định cytokines làm mất cccDNA trong tế bào gan không phân chia thì “số phận” của cccDNA trong chu trình tăng sinh tế bào vẫn chưa kết luận được.

SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA NHIỄM HBV MẠN TÍNH

Hầu hết các nhiễm trùng mạn tính do HBV bắt đầu từ lúc siêu vi lan tràn khắp các dòng tế bào gan, nhưng đáp ứng miễn dịch lại không hiệu quả, siêu vi không bị loại bỏ. Khoảng 90% trường hợp nhiễm HBV ở người lớn kéo dài không quá một năm, chỉ có 5% trở thành mạn tính. Hầu hết nhiễm HBV mạn tính bắt đầu lúc mới sinh, hoặc trong năm đầu của cuộc sống. Liên quan theo tỉ lệ nghịch giữa tuổi và tần suất (frequency) nhiễm HBV cũng được ghi nhận ở vịt và chuột chũi. Tạo miễn dịch thụ động (passive immunization) và/hoặc là chủng ngừa cho trẻ sơ sinh có nguy cơ nhiễm HBV chu sinh là biện pháp giảm trên 10 lần nguy cơ nhiễm HBV mạn tính và đây được xem là tiến bộ quan trọng làm giảm gánh nặng nhiễm HBV trên toàn thế giới. Tuy nhiên, biện pháp này kém hiệu quả nếu như nồng độ siêu vi trong máu mẹ quá cao.

Nhiễm HBV mạn tính có thể khỏi tự nhiên nhưng hầu hết trường hợp kéo dài suốt đời. Trong quá trình nhiễm HBV mạn tính, ban đầu nồng độ siêu vi rất cao, có thể khoảng 10^9 - 10^{10} IU/ml. Ở người, nồng độ siêu vi giảm dần theo lứa tuổi, đặc biệt sau 30 tuổi nồng độ có thể chỉ còn khoảng 10^{2-3} IU/ml. Tình trạng này cũng được ghi nhận ở vịt và chuột chũi.

Từ 10 năm trước, nhiều tác giả đã công bố chi tiết về nhiễm HBV mạn tính ở một người đã bị nhiễm từ lúc sơ sinh. Vào giai đoạn dung nạp miễn dịch (kéo dài đến gần 30 năm) với đặc điểm là nồng độ siêu vi rất cao (khoảng 10^9 - 10^{10} IU/ml), ALT không tăng (xác định tế bào gan không bị phá hủy). Nếu có điều kiện là sinh thiết gan, chúng ta cũng không ghi nhận viêm nhiễm và/hoặc là xơ hóa. Tuy nhiên, qua nhiều nghiên cứu gần đây về miễn dịch cũng không thể kết luận là tại sao trong giai đoạn này không có tổn thương gan. Sau giai đoạn dung nạp miễn dịch, bệnh nhân đi vào giai đoạn thải trừ miễn dịch, với đặc điểm là biểu hiện viêm nhiễm cấp, nồng độ siêu vi giảm nhưng sau đó tăng trở lại. Giai đoạn này chấm dứt với nồng độ siêu vi giảm, phản ánh tình trạng kiểm soát miễn dịch, tăng sinh siêu vi giảm. Khác với nhiễm HBV cấp tạm thời, triệu chứng viêm nhiễm xảy ra đưa bệnh nhân đi khám bệnh. Trong giai đoạn này tổn thương gan có thể lan rộng, gây hậu quả xơ hóa/xơ gan. Tỉ lệ diễn tiến sang xơ gan và HCC phụ thuộc vào nồng độ siêu vi ban đầu. Nguy cơ HCC gia tăng nhiều lần nếu như nồng độ siêu vi $\geq 10^5$ IU/ml so với bệnh nhân có nồng độ thấp hơn. Điều này phản ánh quân bình không hiệu quả giữa kiểm soát miễn dịch, tăng sinh siêu vi và phá hủy tế bào gan qua trung gian miễn dịch.

Nhiễm HBV kéo dài có thể kèm theo những thay đổi về siêu vi, có thể là hậu quả của việc chọn lọc miễn dịch chống lại các epitopes của siêu vi, phá hủy tế bào gan nhiễm trùng bằng các đáp ứng miễn dịch chống siêu vi. Cụ thể một khi mất HBeAg, có thể do đột biến ở codon dừng (stop codon) hoặc đột biến ở promoter của HBeAg mRNA. Dần dà các đột biến này trở thành một genotype ưu thế ở gan bệnh nhân... Một khả năng khác là dòng đột biến xuất hiện và tăng sinh *in vivo* mạnh hơn dòng HBV hoang dại, lan rộng và gây bội nhiễm cho toàn bộ lá gan,

trở thành genotype nổi bật chiếm ưu thế. Tuy nhiên, nghiên cứu trên vẹt và chuột chũi không ủng hộ giả thuyết này, có thể vì mức độ chống lại tình trạng bội nhiễm thường rất cao. Một tình huống khác đó là khi thay đổi về siêu vi sau khi toàn bộ lá gan bị nhiễm trùng có thể lan rộng theo chiều dọc, tế bào gan bị nhiễm trùng lúc phân chia tạo ra hai tế bào con cũng bị nhiễm vẫn giữ cccDNA và/hoặc là RI RNA trong tế bào chất. Đột biến thường xảy ra cho phép tế bào gan bị nhiễm trùng được tiếp tục sống, trốn tránh tác dụng chống siêu vi của CTLs nên những tế bào gan này vẫn phục hồi được. Tuy nhiên, rất tiếc hiện nay chúng ta chưa đủ dữ kiện để giải quyết tình huống này.

Điều thú vị là một khi dòng siêu vi hoang dại tái xuất hiện và trở thành genotype ưu thế (khoảng 5×10^{11} IU/ml ở người lớn) để lây truyền cho ký chủ mới, dòng tế bào này có thể mang một lợi ích chọn lọc nào đó lây nhiễm cho tế bào gan chưa bị nhiễm. Lợi ích này có thể do mức độ tăng sinh quá cao, cũng có thể dòng siêu vi hoang dại này ức chế các đáp ứng miễn dịch của ký chủ. Trong trường hợp này HBeAg ức chế miễn dịch chống siêu vi đối với core protein. Tác dụng có tính tạm thời nhưng đủ làm chậm tiến trình chống siêu vi giúp cho toàn bộ lá gan bị nhiễm trùng. Như vậy chọn lọc miễn dịch là yếu tố quan trọng, hướng dẫn dòng siêu vi đột biến xuất hiện để trở thành dòng ưu thế.

Nhiễm HBV mạn tính và HCC

Ung thư, kể cả HCC là hậu quả cuối cùng là một tiến trình bệnh lý trong cuộc sống con người. Nghiên cứu tiến trình lâu dài một nhiễm HBV mạn tính rất khó đánh giá, không phải vì thời gian, mà sinh thiết gan lại hiếm khi được thực hiện trừ khi bệnh nhân có triệu chứng (ALT tăng, kéo dài trên 6 tháng). Những bệnh nhân này thường ở ngoài giai đoạn dung nạp miễn dịch, tuổi > 30. Hậu quả không may cho chúng ta là khó nhận biết được giai đoạn muộn của nhiễm HBV (xuất hiện triệu chứng lâm sàng rõ ràng, ngay cả khi làm sinh thiết gan, chúng ta cũng không có yếu tố nào biết được những thay đổi về mô học gan ở giai đoạn đầu).

Giai đoạn tiềm ẩn trong bệnh cảnh lâm sàng là giai đoạn dung nạp miễn dịch thường không gây bệnh lý, tuy nhiên qua những dữ kiện gần đây cho thấy vấn đề này vẫn còn là một thử thách trong tương lai.

Giống như các loại ung thư khác, tiến trình bệnh lý dẫn đến HCC gồm ba giai đoạn: khởi đầu (initiation), gia tăng (promotion) và tiến triển (progression). Giai đoạn khởi đầu với những đột biến trong DNA của ký chủ qua con đường phân chia tế bào. Giai đoạn gia tăng với việc mở rộng các clones trong tế bào gan có đột biến, làm gia tăng nguy cơ chuyển đổi sang ung thư. Giai đoạn tiến triển bao gồm nhiều công đoạn, từng clone tế bào biến thành tế bào ung thư. Nhiều đột biến bổ sung có thể xảy ra trong giai đoạn này.

Hiện nay cơ sở khoa học của giai đoạn tiến triển vẫn chưa được vững chắc. Vấn đề ở đây là bằng chứng của những nghiên cứu gần đây cho thấy có sự khác biệt khá lớn giữa bộ gen trong HCC với bộ gen ở gan bình thường, vì vậy xác định những thay đổi di truyền rất cần thiết, xem xét hiện tượng gì sẽ xảy ra. Trong trường hợp này có phải là việc xấp nhập DNA phản ánh giai đoạn nào? khởi đầu, gia tăng hay tiến triển? Sự phân biệt này rất quan trọng để nhận biết sự phát triển của HCC. Xấp nhập DNA xảy ra với tần suất rất thấp, vào khoảng 0,1-0,01% tế bào gan trong giai đoạn nhiễm HBV cấp tạm thời, gia tăng đến 10-100% tế bào gan trong tiến trình phát triển HCC ở người mang HBV mạn tính. Những nghiên cứu thực nghiệm ban đầu cho thấy vị trí xấp nhập DNA ở từng khối u khác nhau, không phải chỉ bám vào nhiễm thể đơn thuần. Phát triển HCC ở người lại phức tạp, tương phản với những tình huống xảy ra ở chuột chũi trong những nghiên cứu ban đầu.

Xấp nhập DNA của các loại Hepadnaviruses có thể là tiến trình tiền ung thư (pro-oncogenic)?

Ở chuột chũi, hoạt hóa chép mã (transcriptional activation) của N-myc2 được ghi nhận trong 80% trường hợp HCC, liên quan đến xấp nhập WHV ở đoạn 5' hoặc 3' của khung đọc mở,

hoặc ở đoạn cách xa N-myc2. Biểu hiện của N-myc2 thường được ghi nhận ở những vùng tiền ung thư trong tế bào gan chuột bị biến đổi, không tìm thấy ở tế bào gan bình thường. Hiện nay người ta cũng chưa biết rõ là những biểu hiện tiền ung thư có thể do xấp nhập WHV vào tế bào hay không, hay còn có những đột biến bổ sung khác? Trong một số trường hợp HCC ở chuột, người ta cũng ghi nhận có sự xấp nhập WHV DNA trong tiến trình hoạt hóa chếp mã ở vị trí N-myc1 hoặc N-myc.

Y học đã ghi nhận được tính sinh ung thư của C-myc và N-myc2, cụ thể là người ta có thể tạo ra chuột chuyển đổi gen (transgenic mouse) chứa WHV/N-myc2 hoặc WHV/N-myc DNA từ tế bào HCC của chuột chũi. Tất cả chuột mang WHV/N-myc sẽ bị ung thư một năm sau, trong khi đó vào khoảng 55% chuột 11-30 tháng mang WHV/N-myc2 bị ung thư. Như vậy, qua những thí nghiệm vừa nêu hoạt hóa M-myc là một bước quan trọng trong tiến trình sinh ung thư ở chuột chũi, đồng thời kết quả này nhấn mạnh thêm rằng hình thành HCC là một tiến trình nhiều giai đoạn mà hầu hết các bước vẫn còn khó hiểu.

Ở người, liên hệ giữa xấp nhập HBV DNA, hoạt hóa các gen và tiến trình sinh ung thư vẫn chưa rõ ràng. Khảo sát bộ gen của HBV, người ta ghi nhận có một số gen ưu thế nổi bật như telomerase (TERT), histone H3K4 methyltransferase MLL4, cyclin E1 (CCNE1). Tuy nhiên, không có gen nào vừa nêu được tìm thấy ở tế bào HCC. Như vậy cho đến hôm nay chúng ta cũng chưa xác định được một gen cụ thể nào gây hậu quả trực tiếp trên việc xấp nhập HBV DNA vào tế bào gan.

Vai trò của các loại proteins của HBV trong tiến trình sinh ung thư gan

Hầu hết các trường hợp HCC ở người đều có sự xấp nhập của HBV DNA vào tế bào gan ký chủ, nhưng biểu hiện của core protein chỉ chiếm khoảng 15% và ở một số nhỏ tế bào của khối u. Protein vỏ được phát hiện ở 30% trường hợp HCC, nhưng hiện diện ở phần lớn tế bào trong khối u, nhiều hơn core protein. Điều này phản ánh một yêu cầu mạnh mẽ là nên kích thích core protein để có được những yếu tố chếp mã chuyên biệt ở tế bào gan. Biểu hiện của HBx cũng được ghi nhận ở 20-50% trường hợp HCC. Bằng chứng về vai trò của HBx trong tiến trình sinh ung thư ở gan xuất phát từ những nghiên cứu ở chuột chuyển đổi gen mang HBx. HBx không làm tăng nguy cơ HCC, nhưng nó lại hỗ trợ tăng cường cho HCC phát triển ở những con chuột có tiếp xúc với DEN (một chất gây ung thư gan), hay ít ra cũng ức chế tái tạo chỉnh sửa DNA. HBx còn kích thích biểu hiện của các gen tiền ung thư ở giai đoạn cuối của một bệnh gan nào đó. Một điều có vẻ như hợp lý là HBx quan trọng trong tiến trình hình thành HCC ở người, nhưng người ta vẫn chưa biết rõ ràng là ở giai đoạn nào thì protein này mới phát huy được hiệu quả và mức độ biểu hiện HBx ở chuột so với mức độ biểu hiện ở tế bào gan nhiễm HBV như thế nào?

Protein L cũng giữ một vai trò nhất định trong tiến trình sinh ung thư gan. Một khi có biểu hiện thái quá (over expression) của protein L ở HBsAg (của dòng HBV hoang dại) ở chuột chuyển đổi gen sẽ gây ra tổn thương gan nặng nề và HCC. Tế bào gan chết quá nhiều và kéo dài có thể xem như là hậu quả của sự tích lũy thái quá HBsAg trong hệ lưới nội bào (endoplasmic reticulum = ER). Nhưng biểu hiện thái quá của protein L thực ra lại không phải tình huống thường gặp của nhiễm HBV, nó chỉ xuất hiện ở giai đoạn cuối của tiến trình nhiễm HBV mạn tính, khi mà tế bào gan chứa quá nhiều protein L sẽ có hình dạng như thủy tinh (ground glass hepatocytes). Gần đây, người ta ghi nhận HBsAg có đột biến ở vùng PreS2 có liên quan đến tiến trình sinh ung thư. Tế bào gan thủy tinh chứa đột biến PreS2 xuất hiện thành từng chùm, từng vùng (clusters) được xem là sang thương tiền ung thư (preneoplastic). Đột biến ở protein L trong tế bào gan chuột chuyển đổi gen sẵn sàng phát triển thành ung thư: 25% số chuột này bị HCC trong vòng 30 tháng, bắt đầu ở tuổi 22 tháng, trong khi đó 100% chuột chuyển đổi gen mang HBx phát triển thành ung thư ở tuổi 14-22 tháng (nghĩa là tỉ lệ diễn tiến sang ung thư cao hơn và nhanh hơn). Qua thí nghiệm này người ta cũng không biết là đột biến protein L có gây ung thư

hay không, nhưng có thể HBx là chất gây ung thư và đột biến protein L gia tăng thêm hiệu lực của HBx.

Tóm lại, qua những nghiên cứu thực nghiệm vừa nêu, HBx và có thể đột biến protein L góp phần vào tiến trình sinh ung thư ở gan. Như vậy, một khi kích hoạt các gen gây ung thư (oncogenes), người ta cũng không rõ khi nào và bao lâu trong tiến trình biến dạng tế bào những protein này sẽ có được những tác dụng trực tiếp.

Vai trò của các thuốc chống siêu vi và HCC

Dự đoán khả năng gây ra HCC ở bệnh nhân mang HBV kéo dài¹⁰

Nhiễm HBV mạn tính, xơ gan và HCC là một chuỗi liên tục gồm nhiều tiến trình khác nhau. Ở vùng lưu hành, những người nhiễm phải HBV và hầu hết người mang siêu vi đều bị lây nhiễm từ những thời gian rất sớm trong cuộc đời. Qua nhiều nghiên cứu đoàn hệ tại Taiwan cho thấy ảnh hưởng của HBV trên diễn tiến tự nhiên của nhiễm HBV. Nghiên cứu đoàn hệ đầu tiên Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer-Hepatitis B Virus (REVEAL-HBV) cho thấy nồng độ siêu vi cao là yếu tố tiên lượng rất mạnh đến nguy cơ xơ gan và HCC (HBV DNA < 300 copies/ml, tỉ lệ HCC vào khoảng 1,3%, trong khi đó HBV DNA > 10⁶ copies/ml, tỉ lệ này vào khoảng 14,9% với P < 0,001). Sau khi điều chỉnh tình trạng HBeAg, nồng độ ALT, thì nồng độ HBV DNA ban đầu trong huyết thanh > 2000 IU/ml là yếu tố tiên lượng HCC mạnh nhất. Ngoài ra tình trạng HBeAg, ALT là những yếu tố nguy cơ làm tăng nguy cơ xơ gan, HCC và tỉ lệ tử vong ở người mang HBV 30-65 tuổi sau hơn 10 năm theo dõi. Tỉ lệ tử vong vì bệnh gan gia tăng theo nồng độ HBV DNA (thay đổi từ 72,8 đến 815,5/100.000 người-năm). Tỉ lệ này gia tăng ở bệnh nhân mắc bệnh gan mạn tính/xơ gan (thay đổi từ 9,1 đến 267,4/100.000 người-năm đối với người mang HBV DNA < 60 IU/ml và > 200.000 IU/ml). Trong nghiên cứu đoàn hệ thứ hai mang tên SEARCH-B (Study of E antigen seroclearance of Hepatitis B) cho thấy bệnh nhân nào có nồng độ HBsAg < 100 IU/ml vào thời điểm một năm sau khi chuyển huyết thanh HBeAg với nồng độ HBV DNA < 200 IU/ml thì dự đoán sẽ mất HBsAg trong thời gian 6 năm). Người châu Á bị nhiễm HBV rất sớm nên tỉ lệ mất HBsAg rất thấp (vào khoảng 1-2%/năm ở bệnh nhân HBeAg âm và ALT bình thường), vì vậy mất HBsAg tự nhiên được xem là chỉ điểm bệnh phục hồi và diễn tiến lâm sàng tốt. 95,8% bệnh nhân mất HBsAg đều không phát hiện được HBV DNA trong huyết thanh và bệnh nhân nào có nồng độ < 60 IU/ml, tỉ lệ mất HBsAg vào khoảng 5,76%/năm). Sau đó tiếp tục nghiên cứu chi tiết hơn về sự liên quan giữa HBV DNA và nồng độ HBsAg cho thấy cả hai yếu tố nồng độ HBV DNA và HBsAg thấp đều có liên quan đến mất HBsAg, nhưng nồng độ HBsAg có ý nghĩa tiên lượng cao hơn, ngay cả đối với những người có nồng độ HBV DNA < 200 IU/ml, mà HBsAg < 100 IU/ml vẫn có tiên lượng mất HBsAg. ERADICATE-B (Elucidation of Risk Factors for Disease Control or Advancement in Taiwanese Hepatitis B Carriers) là nghiên cứu đoàn hệ thứ ba cho thấy nồng độ HBsAg là yếu tố bổ sung cho HBV DNA để dự đoán biến chứng có liên quan đến bệnh nhân HBeAg âm, HBV DNA < 2000 IU/ml. Những bệnh nhân này nếu có HBsAg > 1000 IU/ml vẫn có nguy cơ HCC, xơ gan. Từ kết quả của ba nghiên cứu đoàn hệ trên, yếu tố dự đoán HCC có liên quan đến nhiễm HBV bao gồm tuổi, phái, tiền sử gia đình có HCC, nồng độ HBV DNA, ALT, HBV genotype các loại biến thể.

- | | | | |
|-----------------|----------------------|------------------------|------------------------------------|
| 1. Tuổi: | 2. Phái tính: | 3. ALT (IU/ml): | 4. Tiền sử gia đình có HCC: |
| 30-34: 0 điểm | Nữ : 0 điểm | < 15: 0 điểm | Không: 0 điểm |
| 35-39: 1 | Nam: 2 | 15-44: 1 | Có: 2 |
| 40-44: 2 | | ≥ 45: 2 | |
| 45-49: 3 | | | |
| 50-54: 4 | | | |
| 55-59: 5 | | | |
| 60-65: 6 | | | |
5. **HBeAg/HBV DNA (copies/ml)/HBsAg (IU/ml)/ genotype**

Âm/ 10^4 / < 100 /bất kỳ	: 0 điểm		
Âm/ 10^4 / $100-999$ /bất kỳ	: 2		
Âm/ 10^4 / ≥ 1000 /bất kỳ	: 2		
Âm/ 10^4-10^6 / < 100 /bất kỳ	: 3		
Âm/ 10^4-10^6 / $100-999$ /bất kỳ	: 3		
Âm/ 10^4-10^6 / ≥ 1000 /bất kỳ	: 4		
Âm/ $\geq 10^6$ /bất kỳ/B hoặc B + C:	5		
Âm/ $\geq 10^6$ /bất kỳ/C	: 7		
	Nguy cơ bị HCC		Tổng số điểm
	Thấp:		< 9 điểm
	Trung bình:		9-12
	Cao:		≥ 13

Vấn đề dùng các thuốc chống siêu vi để giảm nguy cơ HCC: Cho ai và khi nào?

Hầu hết người mang HBV sẽ diễn tiến sang xơ gan và HCC (HCC vẫn có thể xảy ra ở người không bị xơ gan). Mục đích của điều trị bằng thuốc chống siêu vi là ngăn chặn diễn tiến sang xơ gan, hoặc cải thiện xơ gan, hạn chế biến chứng HCC. Hiện nay có hai hướng điều trị, một là dùng interferon/peginterferon, hai là dùng các loại đồng phân nucleos(t)ides để ngăn chặn chép mã của HBV. Mục đích của điều trị bằng interferon/peginterferon là kiểm soát miễn dịch lâu dài bằng cách kích thích các đáp ứng miễn dịch chống siêu vi của ký chủ, tạo hiệu quả loại bỏ nhiễm HBV. Mục đích của điều trị bằng các đồng phân nucleos(t)ides là ngăn chặn tổng hợp HBV DNA, giảm số lượng tế bào gan bị nhiễm trùng (cccDNA có thể mất đi trong vòng đời của tế bào gan). Như vậy hai cách điều trị trên có thể tăng cường thêm vai trò kiểm soát miễn dịch của ký chủ. Tuy nhiên phối hợp hai cách điều trị vừa nêu cũng không tạo ra một sự cải thiện đáng kể, có thể bệnh nhân có đáp ứng và khỏi bệnh với điều trị bằng interferon/peginterferon cũng hiệu quả với các đồng phân nucleos(t)ides.

Vấn đề quan trọng của điều trị bằng các đồng phân nucleos(t)ides là tạo được kiểm soát miễn dịch, cần phải sử dụng lâu dài để ngăn ngừa siêu vi bùng phát. Chính vì điều này mà các thuốc này không được đề nghị cho bệnh nhân còn trong giai đoạn dung nạp miễn dịch, chưa kể độc tính, giá thành và nguy cơ kháng thuốc khi dùng lâu dài. Với những thuốc mới được FDA chấp thuận gần đây, tenofovir và entecavir ít hoặc không tạo ra dòng kháng thuốc. Các hướng dẫn điều trị gần đây giảm được nguy cơ HCC nhiều lần trong thời gian ngắn (khoảng 5 năm). Các loại đồng phân nucleos(t)ides có thể phục hồi tình trạng xơ hóa hoặc xơ gan giai đoạn đầu. Cơ chế phục hồi xơ hóa/xơ gan được thể hiện bằng vách ngăn giữa các tế bào gan mỏng lại, tế bào gan phục hồi và bảo tồn được cấu trúc tiểu thùy gan. Biểu hiện phục hồi có thể nhờ vào tiến trình thoái hóa (enzymatic degradation) các men, phản ứng viêm ngưng lại, tình mạch cửa và tình mạch trung tâm hoạt động thông suốt. Vì vậy, nếu bệnh nhân không có thuyên tắc mạch, xơ gan mới xảy ra và kiểm soát lâu dài và hiệu quả nguyên nhân gây bệnh là có thể phục hồi được.

Hiện nay người ta cũng không biết rõ là nếu như bắt đầu điều trị bằng thuốc chống siêu vi sớm ngay trong giai đoạn dung nạp miễn dịch có thể làm giảm nguy cơ HCC hay không? Nhiều bằng chứng cho thấy miễn dịch chống siêu vi ở giai đoạn dung nạp miễn dịch là hướng đến tế bào gan bị nhiễm trùng, nhưng có người cho biết cũng không chắc là trong giai đoạn này bệnh nhân có nguy cơ HCC hay không? Đối với những hướng dẫn điều trị hiện nay cũng không hoàn toàn ngăn cản được HCC. Tại sao? Có thể nguy cơ HCC đã có sẵn từ rất lâu, ngay cả ở trong giai đoạn dung nạp miễn dịch, vì vậy khó khăn cơ hữu vẫn là làm sao xác định được bệnh nhân nào có thể diễn tiến sang giai đoạn muộn với những sang thương tiền ung thư đã có sẵn. Vì nhiều lý do khác nhau, điều trị ngắn hạn cho người mang HBV chỉ đạt được một số kết quả nhất định, nên hay không nên áp dụng cho mọi giai đoạn nhiễm HBV mạn tính, kể cả ở giai đoạn dung nạp miễn dịch?

Để trả lời câu hỏi vừa nêu với bằng chứng khoa học thuyết phục, chúng ta cần có những nghiên cứu sâu giai đoạn dung nạp miễn dịch. Tiến trình nhiễm HBV là tiến trình động, chuyển biến không ngừng. Những xét nghiệm không xâm lấn và sinh thiết gan không được thực hiện thường quy ở bệnh nhân dung nạp miễn dịch. Nồng độ ALT xác định được mức độ tổn thương tế bào gan. Hầu hết HBV ở bệnh nhân này thuộc dòng hoang dại nên mức độ diễn tiến thường thấp, phụ thuộc vào mức độ tăng sinh của HBV và đáp ứng miễn dịch của ký chủ. Vì vậy bệnh nhân dung nạp miễn dịch cũng có nguy cơ diễn tiến xấu. Nghiên cứu của Andreani và cộng sự²⁰ trong thời gian trung bình 38 tháng ở 40 bệnh nhân HBeAg (+), ALT bình thường và HBV DNA > 10⁶ copies/ml có sinh thiết gan cho thấy 20 bệnh nhân không có xơ hóa và 20 bệnh có xơ hóa nhẹ (F1 theo hệ thống tính điểm METAVIR). Hui và cộng sự²¹ nghiên cứu 57 bệnh nhân ở Hongkong có nồng độ HBV DNA cao, ALT bình thường, sinh thiết gan ban đầu chỉ có tổn thương nhẹ. Bệnh nhân được theo dõi mỗi 6 tháng, trong 5 năm. 9 (16%) bệnh nhân có ALT tăng và số còn lại vẫn còn trong giai đoạn dung nạp miễn dịch. So sánh kết quả sinh thiết ban đầu và lúc chấm dứt nghiên cứu cho thấy 84% không khác biệt gì ở 48 bệnh nhân còn trong giai đoạn dung nạp miễn dịch. Điều này cho chúng ta kết luận đầu cần phải điều trị khẩn cấp cho bệnh nhân dung nạp miễn dịch. Những kết quả này trái ngược với nghiên cứu của Lai và cộng sự²² ở 192 bệnh nhân VGSV B mạn tính (59 ca ALT bình thường kéo dài, 26 ca ALT 1-1,5 X ULN, 107 ca có ALT > 1,5 X ULN), 34% bệnh nhân có ALT bình thường kéo dài có phản ứng viêm độ 2-4, 18% xơ hóa F2-4. Hầu hết bệnh nhân có xơ hóa đều ở nhóm ALT tăng và có liên quan đến tuổi. Một nghiên cứu khác²³ ở Ấn Độ ở 1387 bệnh nhân HBsAg (+) (gồm có 73% HBeAg dương) được sinh thiết và theo dõi > 1 năm. 60% có HBV DNA > 5 log copies/ml, 40% sinh thiết gan có xơ hóa đáng kể (điểm METAVIR \geq F2), vì vậy ALT không phải là chỉ điểm hoàn hảo xác định bệnh gan tiến triển và rất cần sinh thiết gan để xác định, nhất là ở bệnh nhân > 30^{24, 25, 26}.

Ở người nhiễm HBV với nồng độ HBV DNA cao có nhiều nguy cơ bị HCC. Ở bệnh nhân dung nạp miễn dịch, ALT bình thường và nồng độ HBV DNA cao có nguy cơ bị HCC không? Sang thương mô học nặng, nhất là xơ gan rất hiếm gặp ở người dung nạp miễn dịch, vì vậy có thể HCC diễn tiến không qua con đường xơ gan. Cơ chế sinh ung thư có thể có liên quan đến xấp nhập DNA của siêu vi vào nhiễm thể của ký chủ và gây ra những bất ổn về di truyền. Những dữ kiện này ủng hộ quyết định sử dụng thuốc chống siêu vi để giảm nguy cơ HCC. Trong nghiên cứu REVEAL-HBV²⁷ ở 3582 bệnh nhân VGSV B chưa điều trị, kéo dài 11 năm, theo dõi mỗi 6-12 tháng bằng siêu âm và khám lâm sàng, cho thấy bệnh nhân nào có nồng độ HBV DNA \geq 10⁶ copies/ml có nguy cơ xơ gan cao nhất. Tỷ lệ xơ gan tỷ lệ thuận với nồng độ HBV DNA: 4,5%, 5,9%, 9,8%, 23,5% và 36,1% với HBV DNA lần lượt là < 300 copies/ml, 9,9 x 10³ copies/ml, 1-9,9 x 10⁴ copies/ml, 1-9,9 x 10⁵ copies/ml và \geq 10⁶ copies/ml. Liên quan giữa HBV DNA với HCC cũng tương tự như trong xơ gan. Diễn tiến tự nhiên của nhiễm HBV ở người cao tuổi (HBeAg âm, ALT bình thường và HBV DNA không cao) khác hẳn với người dung nạp miễn dịch (HBeAg dương, ALT bình thường và nồng độ HBV DNA cao). Vì vậy, nếu chúng ta theo dõi kỹ và khởi động điều trị sớm khi có biểu hiện của VGSV B đang hoạt động. Một nghiên cứu khác²⁸ tại Taiwan ở 1553 bệnh nhân HBeAg không ủng hộ việc điều trị sớm với mục đích giảm HCC đơn thuần vì tỷ lệ phục hồi cao hơn nguy cơ HCC. Mặt khác, điều trị sớm cũng không giảm được nguy cơ HCC, không thay thế được việc theo dõi thường xuyên và sát sao.

Phần 4:

HƯỚNG ĐIỀU TRỊ MỚI BỆNH VIÊM GAN SIÊU VI MẠN TÍNH

Chúng ta đã biết VGSV B mạn tính sẽ dẫn đến xơ gan, suy gan và HCC, đồng thời hiện đã có nhiều nghiên cứu về bệnh này nhưng miễn dịch sinh bệnh (immunopathogenesis) vẫn còn mù mờ. Tồn tại siêu vi lâu dài, diễn tiến của nhiễm HBV mạn tính phụ thuộc vào nhiều yếu tố của siêu vi và của ký chủ, kể cả một số đặc điểm di truyền vẫn đang được nghiên cứu. Mục tiêu cơ bản của điều trị VGSV B mạn tính là loại trừ hoặc ít nhất cũng khống chế lâu dài siêu vi. Nhiều tiến bộ trong những năm gần đây là triển khai ứng dụng một số thuốc chống siêu vi nhưng vẫn chưa đạt được mục tiêu. Thuốc điều trị VGSV B mạn tính hiện nay có hai nhóm, một nhóm điều hòa miễn dịch và một nhóm chống siêu vi (đồng phân nucleos(t)ides = NA). NA hiệu quả, dễ sử dụng (uống), an toàn và dùng lâu lại gây ra kháng thuốc. Hiện tại có nhiều hướng dẫn quốc tế được công bố, hỗ trợ đắc lực cho thầy thuốc điều trị bệnh nhân nhưng kháng thuốc vẫn còn nhiều thử thách. Xét nghiệm kháng thuốc còn nhiều giới hạn: trong cùng một bộ gen nhưng có thể có nhiều chủng loại khác nhau, rất tiếc xét nghiệm phát hiện kháng thuốc vẫn chưa vượt qua được giới hạn này. Điều trị bằng pegIFN được trợ giúp của HBsAg định lượng góp phần rất lớn trong theo dõi đáp ứng. Trong phần trình bày này, chúng tôi muốn cung cấp cho độc giả những kết quả nghiên cứu về miễn dịch sinh bệnh học để chúng ta hiểu biết thêm những bí ẩn của điều trị bệnh VGSV B².

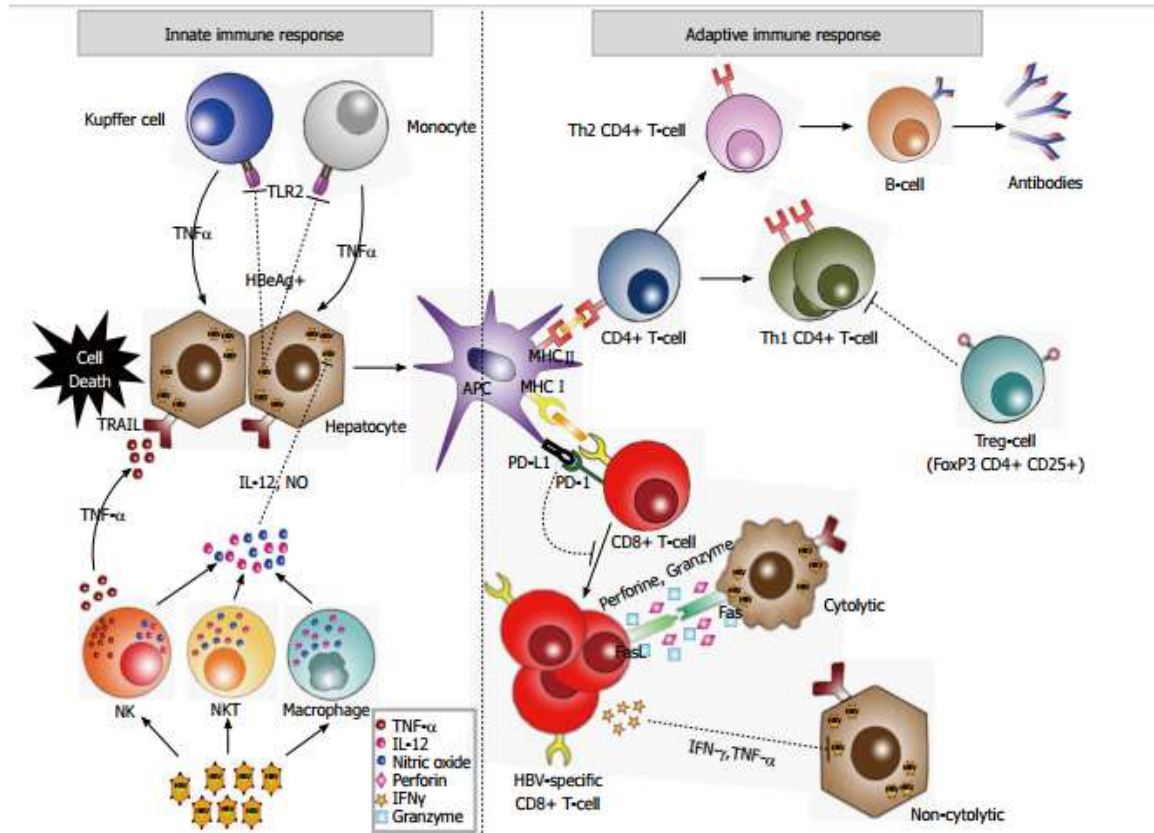
Miễn dịch sinh bệnh học

Ở người nhiễm HBV có nhiều diễn tiến lâm sàng rất khác nhau, phụ thuộc vào lứa tuổi bị nhiễm: 90% trẻ bị lây nhiễm từ mẹ trở thành người nhiễm HBV mạn tính, trong khi đó 90% người bị lây nhiễm ở tuổi trưởng thành lại được phục hồi. Sự việc được biết từ 20 năm nay, đó là tồn tại siêu vi kéo dài và diễn tiến lâm sàng sau nhiễm HBV phụ thuộc vào các yếu tố của siêu vi, yếu tố của ký chủ, bao gồm yếu tố di truyền xác định bằng cơ chế miễn dịch di truyền của ký chủ²⁹.

Đáp ứng miễn dịch bẩm sinh (innate immune response) kiểm soát nhiễm trùng ban đầu trong giai đoạn dung nạp miễn dịch. Nhiều thành phần như tế bào đao phủ tự nhiên (natural killer = NK cells), tế bào T đao phủ tự nhiên (NKT), tế bào răng cưa, cytokines, chemokines, toll-like receptor (TLR) góp phần rất lớn vào các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh. Interferon type 1 do các tế bào nhiễm trùng tiết ra giữ vai trò quan trọng trong việc ức chế tăng sinh siêu vi, nhưng khả năng ức chế chỉ xảy ra rất sớm và không ức chế được siêu vi lâu dài³⁰. Rối loạn miễn dịch trong giai đoạn dung nạp miễn dịch đã được khảo sát trong nhiều nghiên cứu khác nhau. Các nghiên cứu này cho thấy HBV ức chế TLR ở tế bào gan chuột và HBeAg làm giảm biểu hiện của TLR2 ở tế bào gan, tế bào Kupffer và tế bào đơn nhân ở máu ngoại biên của bệnh nhân nhiễm HBV³¹. Mặt khác trong giai đoạn thải trừ miễn dịch, hoạt hóa tế bào NK tạo ra hiện tượng chết theo chương trình liên quan đến yếu tố hoại tử bướu (tumour necrosis factor- related to apoptosis) và làm cho tế bào gan bị hủy hoại³². Gần đây người ta ghi nhận tế bào đơn nhân mang CD16+ ở máu ngoại biên của bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính được quy động đưa đến gan, tại đây chúng được hoạt hóa cực mạnh và tạo ra các cytokines tiền viêm, kích thích tế bào Th17 khởi động đáp ứng miễn dịch phá hủy³³.

Kháng nguyên phù hợp tổ chức (major histocompatibility complex = MHC) lớp I, chủ yếu ở nhóm tế bào T CD8+ và MHC lớp II (chủ yếu ở nhóm tế bào T CD4+) giữ vai trò chủ yếu trong đáp ứng miễn dịch mắc phải (adaptive cellular immune response) chống lại HBV. Nhiều nghiên cứu cho thấy những người bị nhiễm HBV và được phục hồi hoàn toàn thường có đáp ứng của nhiều loại tế bào T chuyên biệt mạnh (vigorous multi-specific T-cell response) chống lại kháng

nguyên của HBV, trong khi đó những người có khiếm khuyết trong đáp ứng của tế bào T (yếu, chuyên biệt đơn thuần = monospecific) lại dẫn đến bệnh gan mạn tính như xơ gan, HCC².



Hình 9 – Sơ đồ đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch tế bào chống HBV (You CR, et al. Update on hepatitis B infection. World J Gastroenterol 2014;7:13293-13305)

Tế bào NK, NKT, tế bào răng cưa, cytokines, chemokines và toll-like receptors góp phần vào đáp ứng miễn dịch bẩm sinh. Ngoài ra, NK, NKT, đại thực bào có thể ức chế tăng sinh của HBV bằng cách sản xuất interleukin (IL)-12 và nitrite oxide (NO). Rối loạn chức năng miễn dịch bẩm sinh trong giai đoạn dung nạp miễn dịch có thể giải thích bằng tiến trình này. HBeAg làm giảm biểu hiện của TLR2 ở tế bào gan, tế bào Kupffer và monocyte. Tuy nhiên, một khi hoạt hóa tế bào NK sẽ làm tế bào gan chết, dẫn đến tổn thương gan. Người mang HBV mạn tính có rối loạn đáp ứng tế bào T. Tế bào T CD8+ làm ly giải tế bào gan bị nhiễm HBV qua cơ chế gây độc và không gây độc tế bào. Cơ chế không gây độc tế bào lại qua trung gian của nhiều loại cytokines chuyên biệt IFN, TNF làm thoái hóa chọn lọc các gen tăng sinh siêu vi nhưng không tiêu diệt được tế bào gan bị nhiễm trùng. Trong VGSV B mạn tính, tế bào Tregs ức chế tế bào T giúp đỡ, gây rối loạn đáp ứng miễn dịch. Thụ thể PG-1 có liên quan đến rối loạn chức năng tế bào T CD8+ chuyên biệt đối với HBV.

Tế bào T CD8+ làm tan vỡ tế bào gan bị nhiễm trùng qua cơ chế tiêu hủy và không tiêu hủy tế bào. Cơ chế tiêu hủy tế bào được chứng minh ở chuột chuyển gen, có biểu hiện của kháng nguyên HBV ở tế bào gan. Chuột chuyển gen lại dung nạp với kháng nguyên của HBV và tổn thương gan không xảy ra. Tuy nhiên, một khi đưa tế bào T tiêu hủy tế bào từ chuột chuyển gen vào chuột cùng gen (syngenic) thì tổn thương gan cấp tính giống như viêm gan cấp ở người sẽ xảy ra. Tiêu hủy tế bào gan nhiễm HBV có thể xảy ra qua con đường của perforin hoặc của hệ Fas đưa đến tình trạng loại trừ siêu vi. Cơ chế không làm tiêu hủy tế bào có thể xảy ra qua trung

gian của một số cytokines như IFN- γ và TNF- α làm thoái hóa bộ gen tăng sinh của HBV nhưng lại không tiêu hủy tế bào bị nhiễm trùng. Một khi HBV là siêu vi không gây bệnh lý tế bào, nó có thể tránh được hoặc gây ra đáp ứng miễn dịch chống siêu vi lan rộng². Hầu hết trẻ sơ sinh nhiễm HBV từ mẹ có thể trở thành mạn tính qua con đường dung nạp miễn dịch. Giải thích tình trạng dung nạp miễn dịch có thể do hệ thống miễn dịch chưa trưởng thành, cũng có thể do tác dụng điều hòa miễn dịch của HBeAg được bài tiết quá nhiều ở máu ngoại biên. Hiệu quả dung nạp miễn dịch của HBeAg đã được chứng minh ở chuột chuyển gen nhiễm HBV. Ngoài ra nhiều nghiên cứu cũng cho thấy đáp ứng của tế bào T gây độc ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính ít mạnh hơn trong viêm gan B cấp, ngay cả khi nồng độ siêu vi trong máu ngoại biên rất cao. Đáp ứng tế bào T gây độc thấp có thể đưa đến dung nạp miễn dịch hoặc gây ra đáp ứng quá mạnh của tế bào T do nồng độ siêu vi cao. Tuy nhiên, hiện diện lâu dài của kháng nguyên là yếu tố quan trọng làm thay đổi chức năng tế bào T chuyên biệt với nhiễm HBV và như vậy loại bỏ được kháng nguyên là yếu tố quan trọng cho phép tế bào T phục hồi chức năng đáp ứng chống siêu vi. Đáp ứng kém của tế bào T CD8+ gây ra hậu quả: giảm tình trạng gây độc tế bào, giảm tăng sinh và giảm sản xuất cytokines chống siêu vi như TNF- α , interleukin 2 (IL-2). Tất cả những yếu tố vừa nêu có liên quan đến loại trừ siêu vi trong nhiễm HBV mạn tính. Ngoài ra tế bào T chuyên biệt trong nhiễm HBV, tế bào NK, tế bào NKT, đại thực bào có thể ức chế tăng sinh HBV bằng cách tạo ra IL-12 và NO (nitrite oxide). Nhiều yếu tố khác cũng có liên quan đến dung nạp miễn dịch chuyên biệt chống HBV như hiệu quả điều hòa miễn dịch của tế bào (CD4+CD25+ FoxP3+ = tế bào Tregs) và rối loạn chức năng tế bào răng cưa. Tế bào Tregs ức chế tế bào T giúp đỡ, làm rối loạn đáp ứng miễn dịch. Ở những người mang HBV mạn tính, giảm số lượng và chức năng tế bào này sẽ giảm hiệu quả miễn dịch chống siêu vi. Nghiên cứu về số lượng tế bào Tregs lưu hành lại cho kết quả trái ngược nhau, có khi tăng, có khi giảm. Một số trường hợp giảm tế bào Tregs lại làm gia tăng chức năng tế bào chuyên biệt đối với HBV, ngay cả khi điều hòa miễn dịch cũng không cần đến tính chuyên biệt đối với HBV. Như vậy, vai trò của tế bào Tregs trong miễn dịch bệnh lý của nhiễm HBV cũng cần được xem xét và làm rõ hơn².

Mặc dù tác dụng điều hòa miễn dịch của tế bào răng cưa trong nhiễm HBV mạn tính còn biết rất ít. Những nghiên cứu gần đây cho thấy rối loạn chức năng tế bào răng cưa sẽ ức chế miễn dịch chống siêu vi, giúp siêu vi tồn tại và phát triển ở gan của người mang HBV mạn tính. Ngoài ra, thụ thể ức chế tiến trình chết theo chương trình (programmed death-1 inhibitor = PD-1 inhibitor), liên quan đến rối loạn chức năng của tế bào T CD8+ chuyên biệt đối với HBV ở chuột và người. Một số dự kiến cho thấy có sự liên quan giữa biểu hiện của PD-1 với tế bào T CD8+ chuyên biệt cho HBV. Nhưng cũng có nghiên cứu chứng minh rằng tăng sinh tế bào T CD8+ gia tăng có liên quan đến PD-1. Dựa vào những nghiên cứu thực nghiệm trên cho phép chúng ta phỏng đoán một khi ngăn cản được hoạt tính của PD-1 có thể bảo toàn hoặc phục hồi được tế bào T CD8+ chuyên biệt cho HBV đã kiệt quệ và đây có thể là biện pháp nhiều hứa hẹn để điều trị VGSV B mạn tính. Tế bào T gây độc (cytotoxic T cells) cũng giữ một vai trò quan trọng trong kiểm soát tăng sinh siêu vi, nhưng hiệu quả không cao vì có sự chọn lọc đột biến trốn thoát (escape mutations) ở các epitopes của tế bào T. Hơn nữa dòng đột biến trốn thoát hiếm khi được ghi nhận, kể cả trong VGSV B mạn tính, ngoại trừ trong một vài báo cáo ghi nhận đột biến của siêu vi có thể phá hủy, tăng cường hoặc đối kháng với khả năng nhận biết kháng nguyên của tế bào T chuyên biệt chống siêu vi, ngoài ra còn có nhiều cơ chế tồn tại lâu dài siêu vi khác bao gồm nhiễm trùng những vị trí có “đặc ân riêng về miễn dịch” (immunologically privileged), ức chế trình diện kháng nguyên siêu vi, rối loạn về biểu hiện của các gen siêu vi².

HƯỚNG ĐIỀU TRỊ MỚI BỆNH VGSVB

Như chúng ta đã biết VGSV B là một vấn đề y tế quan trọng của thế giới, nhất là ở những quốc gia có tỉ lệ mắc bệnh cao. Trong những năm gần đây với sự xuất hiện nhiều loại thuốc chống HCV trực tiếp (direct antiviral agents = DAA), hiệu quả điều trị VGSV C quá ngoạn mục làm cho chúng ta liên tưởng đến điều trị VGSV B cũng có thành công tương tự. Rất tiếc, với

những thuốc chống HBV đã hiện diện trong gần 20 năm qua, nhưng bệnh VGSV B vẫn không bị khống chế, vẫn còn là bệnh chưa có thể chữa khỏi vì cấu tạo quá đặc biệt của HBV.

Trong chu trình tăng sinh phát triển của HBV, cccDNA được hình thành và đây có thể là một cái khuôn giúp HBV sao chép và tạo ra siêu vi mới. Ngoài ra bộ gien của HBV có thể xấp nhập vào bộ gien của ký chủ, tăng cường sản xuất nhiều kháng nguyên của siêu vi và tạo thuận lợi để gây ra ung thư. Khả năng tăng sinh của HBV không dừng lại, siêu vi tiếp tục tồn tại và kéo dài làm cho bệnh tiến triển, đáp ứng miễn dịch bị suy sụp và chính đáp ứng miễn dịch là mấu chốt của tiến trình kiểm soát siêu vi^{2,4}.

Bệnh VGSV B được gọi “chữa khỏi” ở nhiều mức độ khác nhau. Về cơ bản, kết điểm mong muốn nhất là loại bỏ hoàn toàn HBV DNA và HBsAg, sau đó là chuyển đổi HBsAg thành anti-HBs (trường hợp này được gọi là khỏi bệnh chức năng = functional cure). Điều kiện này được nhiều người hài lòng vì làm giảm nguy cơ, cải thiện diễn tiến lâm sàng, ít nhất cũng ở bệnh nhân không xơ gan. Bệnh nhân khỏi bệnh hoàn toàn (complete cure), còn được gọi là khỏi bệnh tuyệt đối (absolute cure), nghĩa là cccDNA bị loại bỏ ra khỏi tế bào gan bị nhiễm trùng giúp bệnh nhân thoát khỏi tình trạng tái hoạt HBV một khi rơi vào tình trạng suy giảm miễn dịch. Tuy nhiên, những kết điểm vừa nêu vẫn còn là thử thách, không thể đạt được với các phương cách điều trị hiện nay¹¹.

Điều trị hiện nay không chữa khỏi bệnh VGSV B và cần nhiều biện pháp mới và thuốc mới

Các nghiên cứu về điều trị hiện nay hướng đến mục tiêu “loại bỏ hoàn toàn HBV” dựa vào những cơ chế đã biết về tình trạng tồn tại và kéo dài của HBV, bằng cách tìm và xác định những vị trí để tấn công trực tiếp vào HBV và/hoặc là bảo tồn được đáp ứng miễn dịch hiệu quả chống siêu vi. Hiện nay, điều trị VGSV B mạn tính có hai hướng tiếp cận khác nhau: điều trị có thời hạn bằng IFN- α (chống siêu vi và điều hòa miễn dịch), điều trị không có thời hạn bằng các loại NAs (có hiệu quả ức chế HBV nhưng không chữa khỏi)^{7,13}.

Điều trị bằng peg-IFN α 2a có khả năng chữa khỏi nhờ vào tác dụng ức chế siêu vi và gia tăng đáp ứng miễn dịch của ký chủ. Tuy nhiên, rất tiếc hiệu quả này chỉ đạt được ở < 10% bệnh nhân, không kể tình trạng HBeAg. Xác định yếu tố dự đoán đáp ứng như nồng độ HBsAg, genotype HBV, nồng độ HBeAg ở bệnh nhân HBeAg (+), đánh giá quy luật ngưng thuốc giúp chúng ta chọn lựa được bệnh nhân có tỉ lệ đáp ứng cao để điều trị. Tuy nhiên, cách chọn lựa này làm tăng tỉ lệ đáp ứng với peg-IFN α 2a vì chúng ta đã loại bỏ những bệnh nhân có những yếu tố không thuận lợi.

Từ khi đưa lamivudine vào sử dụng vào năm 1978, lần lượt có thêm 4 loại NAs khác có tác dụng chống siêu vi mạnh hơn và hàng rào kháng thuốc cũng cao hơn được công nhận. Những thuốc này có tác dụng ức chế HBV DNA đáng kể, nhất là entecavir và tenofovir theo những dữ kiện nghiên cứu hiện nay. NAs ức chế tổng hợp HBV DNA qua con đường tương tác cạnh tranh (competitive interaction) với những cơ chất của HBV polymerase, không liên quan đến việc hình thành cccDNA. Hậu quả ở hầu hết bệnh nhân là tăng sinh HBV tiếp tục gia tăng trở lại khi ngưng thuốc.

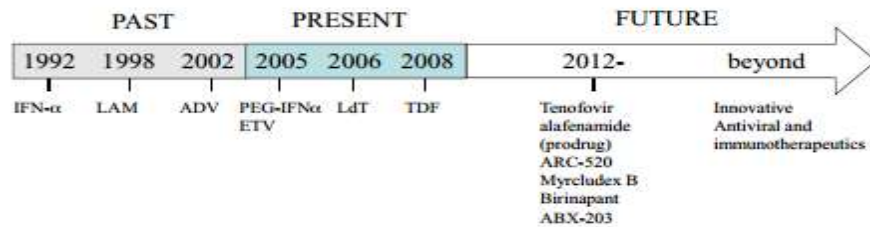
Dựa vào những kết quả này, một câu hỏi được đặt ra là bệnh VGSV B có thể chữa khỏi với các loại NAs hay không? Dữ kiện hiện nay cho thấy tỉ lệ chuyển đổi huyết thanh HBsAg rất thấp trong quá trình điều trị bằng NA, chỉ vào khoảng 0,5-1%/năm. Tỉ lệ giảm nồng độ HBsAg trong huyết thanh đến khi mất hẳn, tùy theo phương pháp định lượng nhưng thường rất thấp và kéo dài. Theo lý thuyết, thời gian mất hẳn HBsAg thông thường vào khoảng 20 đến 30 năm. Hiệu quả này được ghi nhận ở bệnh nhân VGSV B HBeAg (+) và HBeAg (-), nhưng ở bệnh nhân HBeAg (+) có nồng độ HBsAg ban đầu cao và mức độ giảm nồng độ này cũng nhiều hơn so với bệnh nhân HBeAg (-)¹³.

Trong tương lai, hướng tiếp cận điều trị này có thể được cải thiện nếu như chúng ta dùng những loại NAs có tác dụng chống siêu vi mạnh nhất và biện pháp điều trị phải được tối ưu hóa bằng cách sử dụng những công cụ mới để theo dõi diễn biến điều trị. Sự xuất hiện lại siêu vi xem như là tất yếu gây khó khăn cho việc thiết kế các phương cách điều trị mới, đồng thời kích thích các cơ chế miễn dịch cần thiết làm mất kiểm soát miễn dịch. Để ủng hộ cho giả thuyết này, người ta ghi nhận cccDNA giảm đáng kể trong quá trình điều trị bằng NAs. Vì vậy, một khi siêu vi xuất hiện lại chậm giúp cơ thể có thêm thời gian để phục hồi chức năng tế bào T chuyên biệt đối với HBV. Dựa vào giả thuyết này, điều trị phối hợp NA và peg-IFN α 2a có khả năng thúc đẩy hoạt tính chống siêu vi trong khi đó tăng sinh siêu vi cũng bị ức chế (dựa vào nồng độ HBsAg trong huyết thanh), tăng cường giảm nồng độ HBsAg trong huyết thanh. Vì vậy, dùng peg-IFN α 2a khi tăng sinh siêu vi bị các NAs ức chế hoàn toàn là cách điều trị mới đang được đánh giá¹³.

Hướng điều trị mới

Các thuốc có mục tiêu tác dụng trên HBV (target therapy)

Như đã diễn tả ở các phần trên, bệnh VGSV B là một vấn đề y tế toàn cầu với hơn 350 triệu người mắc bệnh, trong đó này có rất nhiều người có nguy cơ bị xơ gan và HCC. Thuốc chủng ngừa hiệu quả và an toàn đã được sử dụng hơn 30 năm qua, nhưng số người mắc bệnh vẫn còn cao, phần lớn lây nhiễm từ mẹ sang con vào giai đoạn chu sinh.



Hình 10 – Phát triển các thuốc chống HBV theo thời gian (Loggi E, et al. *Chronic hepatitis: Are we close to a cure. Digestive and Liver Disease* 2015;47:836-841). Những thuốc mới được xếp vào nhóm “future” nghĩa là đã được nghiên cứu lâm sàng giai đoạn III.

HBV là một loại siêu vi nhỏ, có lớp vỏ và mang DNA, gây nhiễm trùng cho tế bào gan bằng cách tương tác với NTCP nằm ở bề mặt của các tế bào này. Một khi gây nhiễm cho tế bào gan, bộ gen của HBV sẽ được chuyển đổi thành cccDNA có khả năng tạo ra nhiều siêu vi mới. Sự tồn tại lâu dài của cccDNA trong nhân tế bào gan bị nhiễm trùng được xem là cơ chế chính yếu gây ra nhiễm HBV mạn tính. Người ta nghĩ rằng HBsAg là yếu tố quan trọng của hiện tượng trốn tránh miễn dịch (immune evasion) bằng cách “giảm giữ” kháng thể trung hòa chuyên biệt đối với HBsAg và từ đó có thể gây ra dung nạp miễn dịch khi có những kích thích thường xuyên của kháng nguyên nồng độ cao. Ở người lớn, nhiễm HBV cấp tự giới hạn, kích thích đáp ứng miễn dịch hiệu quả kiểm soát nhưng không tiêu diệt được hoàn toàn HBV². Trong VGSV B mạn tính, đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và mắc phải chống siêu vi không hiệu quả gây ra viêm nhiễm mạn tính ở gan và chính điều này sẽ dẫn đến xơ gan và HCC. Đáp ứng tế bào T CD8+ rất cần thiết để loại bỏ HBV. Nhiễm HBV cấp thực nghiệm ở khỉ cho thấy một khi tế bào T CD8+ giảm sẽ làm cho siêu vi tồn tại và kéo dài. HBV là siêu vi không gây bệnh lý tế bào, nhiễm HBV có thể là hậu quả của kiểm soát siêu vi và tổn thương gan. Tuy nhiên, qua nhiều nghiên cứu cho thấy số lượng tế bào T trong máu và trong gan không tương xứng với mức độ tổn thương gan, nhưng vẫn còn khá hơn là kiểm soát siêu vi. Mức độ viêm nhiễm ở gan có liên quan đến nồng độ ALT và luôn có sự hiện diện của nhiều loại tế bào viêm như bạch cầu hạt, bạch cầu đơn nhân³...

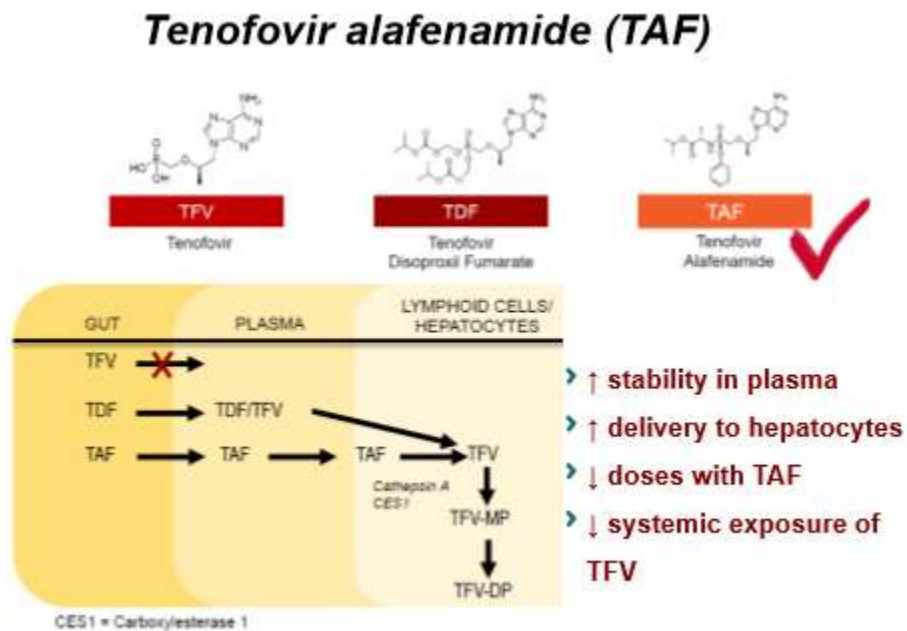
Ongoing clinical trials (partial source: www.clinicaltrials.gov) or recently completed clinical trials evaluating new compounds (alone or in association with already approved CHB drugs).

Class	Compound	Target	Status of development
Peptide	ePA-44	CHB	Phase II
Therapeutic vaccine	Double-plasmid DNA vaccine	HBeAg-positive CHB	Phase II
Cytokines/immunostimulating	IFN- γ ^a	CHB	Phase II
Therapeutic vaccine	Naked DNA vaccine (pCMV52.S)	CHB	Phase I/II
Therapeutic vaccine	ABX 203 (HBs and HBe antigens)	CHB	Phase II/III
Vaccine/immunological/growth factors	HBIG + GM-CSF + HBV Vaccine	HBeAg-negative CHB	Phase I/II
Therapeutic vaccine/immunostimulating	GS-4774 (engineered multi-genotype)	CHB	Phase II
Immunostimulating	GS-9620 (TLR-7 agonist)	CHB	Phase I/II
Cytokines/antivirals	Pegylated Interferon Lambda	HBeAg-positive CHB	Phase II
Peptide/entry inhibitors	Myrcludex B (preS1-derived lipopeptide)	CHB	Phase II
Immunostimulating	Thymosin- α	CHB (cirrhosis)	Phase IV
Apoptosis inhibitor	Birinapant (IAP antagonist)	CHB	Phase I
Antivirals	NVR 3-778 (core inhibitor)	CHB	Phase Ia
Viral transcription inhibitors	ARC-520 (siRNAs)	CHB	Phase II

CHB, chronic hepatitis B; HBIG, hepatitis B immune globulin; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ , interferon-gamma; HBeAg, hepatitis e antigen.

^a Updated information not available; unknown study progress.

Hình 11 – Các nghiên cứu lâm sàng đã và đang thực hiện trong điều trị VGSV B mạn tính
(Loggi E, et al. Chronic hepatitis B: Are we close to a cure. Digestive and Liver Disease 2015;47:836-841)



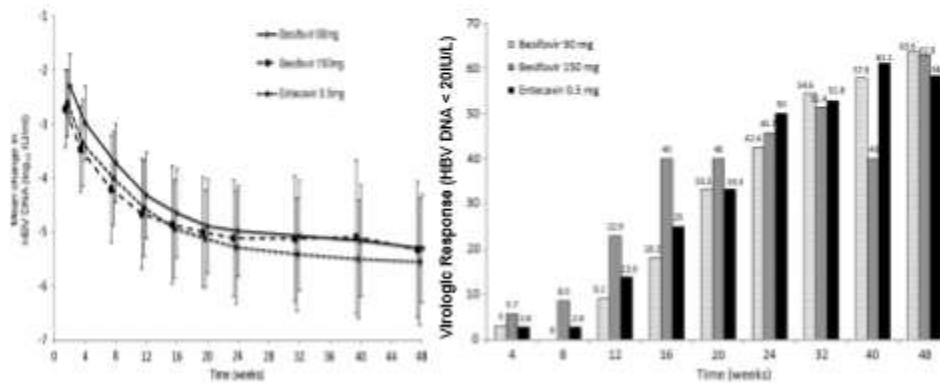
Hình 12 – Tác dụng của TAF trong VGSV B mạn tính (Argarwak et al. AASLD 2013)

Dựa vào những dữ kiện vừa nêu, phương pháp điều trị mới bệnh VGSV B mạn tính là phải loại bỏ hoàn toàn hoặc làm mất hoàn toàn hoạt tính phân tử của toàn thể cccDNA trong tế bào gan nhiễm trùng. Tuy nhiên, trên chu trình tăng sinh của HBV, với nhiều cải tiến hiện nay, ngoài 5 loại NAs đã được công nhận chúng ta có thêm *nhiều thuốc mới ức chế sao chép ngược* như tenofovir alafenamide (TAF, GS-7340), besifovir (LB80380), lagocidovir valactate (MIV-210, có khả năng ức chế HBV hoang dại, HBV kháng lamivudine, adefovir), elucitabine, valtorcitabine. TAF là tiền chất (prodrug) của tenofovir. Ở bệnh nhân nhiễm HIV, hoạt tính của TAF rất mạnh, nồng độ trong tế bào cao và nồng độ trong huyết tương lại thấp hơn TDF³⁴. Qua nghiên cứu lâm sàng ở bệnh nhân VGSV B mạn tính dùng TAF liều 8, 25, 40 và 120 mg so với TDF 300 mg, liên tiếp 28 ngày, cho thấy nồng độ HBV DNA giảm tương đương nhau ở hai nhóm bệnh nhân dùng TAF và TDF³⁵. Ngoài ra, chuyển hóa của TAF không qua thận nên ít có độc tính ở thận. Besifovir là một acyclic nucleotide phosphonate có cấu tạo hóa học giống adefovir và tenofovir, được nghiên cứu đa trung tâm, ngẫu nhiên cho thấy tỉ lệ bệnh nhân đạt được nồng độ HBV DNA dưới ngưỡng phát hiện, bình thường hóa ALT và chuyển đổi huyết thanh HBeAg tương tự với nhóm bệnh nhân dùng entecavir³⁶. TAF và besifovir có hiệu quả và an toàn cho bệnh

nhân VGSV B mạn tính, nhưng vẫn không loại bỏ được cccDNA. MIV-210 là 2,3-dideoxy-3-fluoroguanosine được nghiên cứu đầu tiên trong điều trị nhiễm HIV và hiện nay đang được nghiên cứu thực nghiệm điều trị nhiễm HBV, dòng hoang dại và cả những dòng kháng lamivudine, hoặc adefovir hoặc cả hai. Hiện nay thuốc này đang được nghiên cứu lâm sàng giai đoạn II ở Hàn Quốc¹⁷.

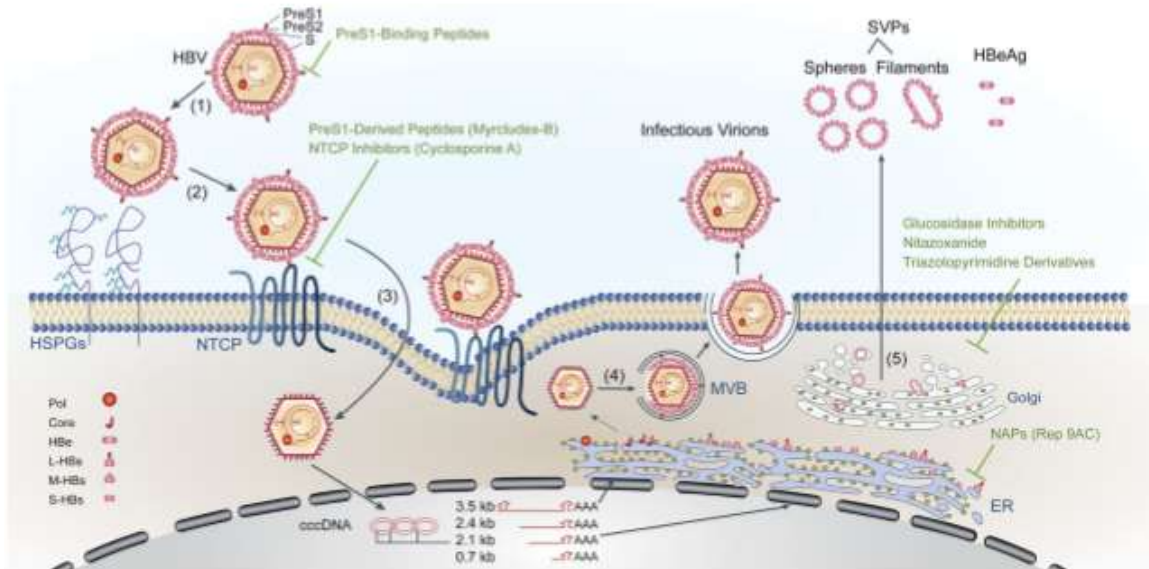
Besifovir

Phase IIb multicentred randomised trial of besifovir (LB80380) versus entecavir in Asian CHB patients



Hình13 – Tác dụng của Besofovir ở bệnh nhân châu Á bị VGSV B
(Lai et al. Gut 2014;63:996-1004)

Một hướng nghiên cứu khác gần với lâm sàng là tác dụng vào giai đoạn sớm của chu trình tăng sinh của HBV, đó là *ức chế ngay giai đoạn siêu vi xâm nhập tế bào*. Nhiều nghiên cứu tiếp theo cho thấy vùng preS1 là thành phần quan trọng gây nhiễm trùng của HBV, vai trò chính là tương tác với các thụ thể trên bề mặt của tế bào gan. Những kết quả này xác nhận chất vận chuyển muối mật (bile salt transporter = NTCP) ở tế bào gan có chức năng như một thụ thể có ái tính cao với HBV và HDV³⁷. HBV có ái tính chuyên biệt với từng mô, vì vậy khi nhiễm phải HBV, điều quan trọng là làm sao sử dụng các hợp chất thích hợp ức chế xâm nhập siêu vi vào tế bào. Dựa vào nhận định này, người ta đã chọn được một peptide myristoyl chứa đoạn acid amin 2 đến 48 của protein L (Myrcludex B) để nghiên cứu lâm sàng. Sau khi đánh giá *in vitro*, Myrcludex B loại trừ được nhiễm trùng ở liều thấp, ức chế siêu vi lan tỏa, ngăn ngừa các nhiễm trùng mới cho tế bào gan. Myrcludex cũng được ghi nhận có tác dụng chọn lọc trên tế bào gan, vì vậy đã vượt qua độc tính cấp tính và dài hạn qua các nghiên cứu lâm sàng¹³ và hiện được đưa vào nghiên cứu lâm sàng giai đoạn II cho bệnh nhân nhiễm HBV/HDV. Myrcludex B làm giảm nồng độ HBV DNA > 1 log ở 75% trường hợp. Dự đoán những kết quả này có nhiều hứa hẹn nhưng còn một số lưu ý cần được quan tâm, đó là giá trị của cách tiếp cận này chỉ nổi bật trong một số tình huống như chống tái nhiễm ở bệnh nhân được ghép tạng, hoặc hạn chế siêu vi lan rộng trong viêm gan B cấp.



Hình 14 – Biện pháp tấn công vào sự xâm nhập và phóng thích HBV (Chen J, et al. *New insights into hepatitis B biology and implications for novel antiviral strategies*. *National Science Review* 2015;2:296-313)

HBV xâm nhập vào tế bào gan qua nhiều tiến trình: 1. HBV bám vào HSPGs (có ái tính thấp), 2. tiếp theo HBV bám vào các thụ thể có ái tính cao, 3. xâm nhập vào tế bào chất qua con đường endocytosis. Các chất ức chế preS1, ức chế NTCP và các peptide kết dính với PreS1 đều có thể ức chế tiến trình xâm nhập tế bào của HBV. Nucleocapsid tương tác với protein lớp vỏ, thành phần của bộ Golgi trước khi phóng thích ra khỏi tế bào ở dạng siêu vi toàn vẹn qua con đường của những khoang rỗng (multivesicular body), 4. nhiều SVPs cũng được phóng thích ra ngoài tế bào qua con đường của bộ Golgi và hệ lưới nội bào (endoplasmic reticulum = ER), 5. các chất ức chế Glucosidase, nitazoxanidase, triazopyrimidine có khả năng ức chế phóng thích SVPs và siêu vi toàn vẹn.

Entry inhibitor: Myrcludex-B

Phase IIa clinical trial

- Safety, tolerability and efficacy of multiple doses of Myrcludex B (0.5mg, 1mg, 2mg, 5mg and 10mg Myrcludex-B SC QD) in comparison with the control group receiving standard therapy with NAs is recently completed

Results:

- Very well tolerated; injection site dermatitis in 3/40 patients
- HBV DNA decline > 1 log₁₀ at Wk 12: 6/8 (75%) patients receiving 10 mg Myrcludex-B
- ALT normalization: 22/40 (55%) patients
- HBsAg levels: no significant changes



Hình 15 – Myrcludex-B trong nghiên cứu lâm sàng giai đoạn IIA trong điều trị VGSV B mạn tính (Urban E et al. *AASLD. LB 20*)

Một khi nhiễm HBV tổn thương gan được xem là do phản ứng viêm hơn là do chính siêu vi gây ra, vì vậy cách tiếp cận miễn dịch là làm giảm phản ứng viêm trong tế bào gan bằng cách kích thích đáp ứng miễn dịch của tế bào T hoặc kích thích trực tiếp miễn dịch bẩm sinh trong tế bào gan. Một cách *loại trừ cccDNA* khác có thể là bất hoạt chức năng trực tiếp, cũng có thể ngăn chặn chép mã. Tiếp cận hấp dẫn nhất là thay đổi cấu tạo di truyền phụ (epigenetic) như RNA interference có khả năng ức chế mRNA của siêu vi. Phương pháp RNA interference (RNAi) có thể tạo ra một đoạn RNA ngắn (short interfering = siRNA) để hình thành mRNA và hậu quả là thoái hóa mRNA. Sau nhiều kết quả khích lệ ở khỉ đột, một nghiên cứu lâm sàng giai đoạn II so sánh hiệu quả của hợp chất ARC-520 được thực hiện. Nghiên cứu này tiến hành ở bệnh nhân HBeAg (-) được điều trị bằng entecavir. Kết quả: chính tinh mạch một liều duy nhất ARC-520 làm giảm gần 50% nồng độ HBsAg, kéo dài đến 43 ngày sau điều trị. Nhiều nghiên cứu tiếp theo nên thực hiện để làm sáng tỏ là giảm HBsAg có phục hồi được đáp ứng miễn dịch chống siêu vi hay không, có kiểm soát được tăng sinh siêu vi và cccDNA hay không? Thử thách quan trọng của nghiên cứu này là làm sao phân phối thuốc đến gan. Hệ thống phân phối thuốc dựa vào một chất có khả năng phóng thích endosome ở tế bào gan và cholesterol-conjugated siRNA-520. Tuy nhiên, đưa bằng chứng này vào thực tiễn lâm sàng vẫn còn một khoảng cách quá xa!

Chúng ta đã biết chính sự hiện diện lâu dài của cccDNA là nguyên nhân thất bại khi dùng NA, ngưng thuốc siêu vi sẽ tái xuất hiện. Những loại thuốc mới phải loại trừ được cccDNA hoặc làm cho chép mã tạo ra cccDNA phải “im lặng” (cccDNA transcription silencing). Nucleases bề gây đôi dây DNA xoắn được sử dụng để ức chế tăng sinh HBV bằng ba protein zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) và RNA-guided cluster regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR) và CRISPR-associated (Cas) protein endonucleases. Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy IFN và một số thành viên của họ TNF- α có thể làm thoái hóa cccDNA theo kiểu chuyên biệt (không ảnh hưởng đến bộ gen của ký chủ) và kiểu không gây bệnh tế bào. Nghiên cứu *in vivo* trên chuột cho thấy khi đưa TALENs vào thì nồng độ HBsAg, HBeAg pregenomic RNA ở gan và gia tăng hoạt tính chống siêu vi khi kết hợp thêm với IFN- α ¹¹.

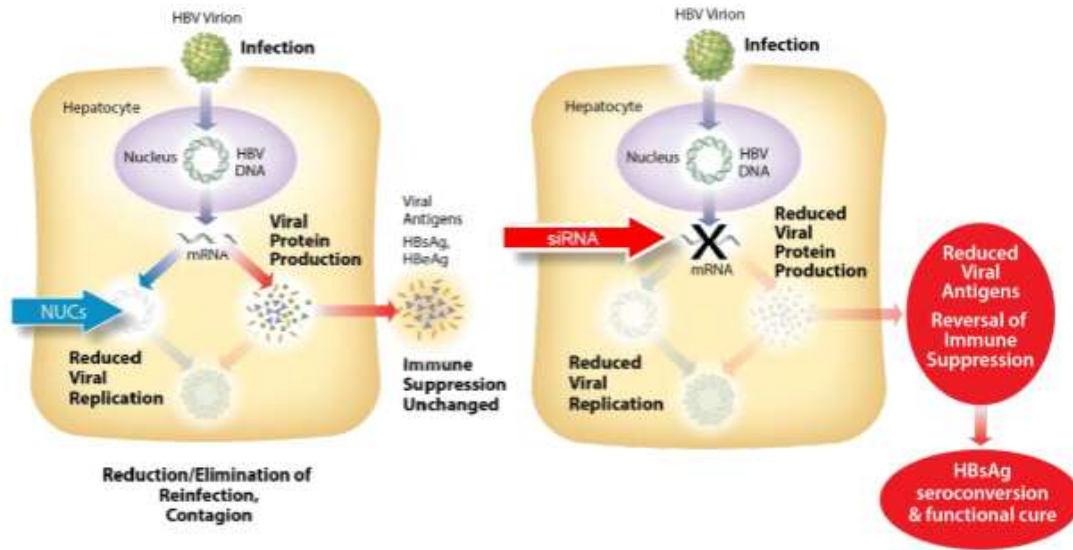
Tuy nhiên, trong mô hình này qua thực hành lâm sàng ghi nhận hoạt tính chống siêu vi của interferon không phù hợp cho VGSV B mạn tính (muốn đạt được mục đích thoái hóa cccDNA chúng ta cần một số lượng IFN- α rất lớn, cũng như công thức và cách sử dụng IFN- α sao cho phù hợp giữa mô hình thực nghiệm và nghiên cứu lâm sàng). Một số nhà nghiên cứu ủng hộ mô hình này vì khi nghiên cứu sự phân phối IFN cho tế bào gan nhiễm HBV có thể gây ra một đáp ứng mạnh và hiệu quả, như vậy cũng sắp xếp được một hệ thống phân phối phù hợp cho nhiều loại cytokines khác. Tự chung những kết quả này cho thấy nếu như được sử dụng thích hợp, những cytokines có hoạt tính chống siêu vi vẫn tiếp tục là khung sườn nền tảng của điều trị VGSV B mạn tính.

Một giai đoạn khác trong chu trình tăng sinh siêu vi có thể là mục tiêu tấn công của nhiều loại thuốc như *ức chế giai đoạn tập hợp capsid của siêu vi, giai đoạn bài tiết siêu vi ra khỏi tế bào gan*. Một loạt những hợp chất được nghiên cứu ở giai đoạn tiền lâm sàng như heteroarylpyrimidines (HAPs = BAY41-4109), phenylpropenamides (AT-61, AT-130), NVR 3-778. Đối với giai đoạn bài tiết siêu vi, nhiều dữ kiện gần đây cho thấy hiệu quả của alisporivir: giảm tăng sinh HBV và giảm bài tiết HBsAg *in vitro*.

Bước tiếp cận mới gần đây được nghiên cứu trong điều trị ung thư và một số bệnh nhiễm, đó là sử dụng các thuốc ức chế protein của quá trình chết theo chương trình (inhibition of apoptosis proteins = IAP), với mục đích là gây ra apoptosis cho các tế bào bị nhiễm siêu vi. Sau nhiều kết quả đáng khích lệ từ nghiên cứu *in vitro* và trên thú vật, hiện nay có một chất đối kháng với IAP là birinapant đang được nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I trên bệnh nhân VGSV B mạn tính.

HBV mRNA-targeting siRNA: ARC-520

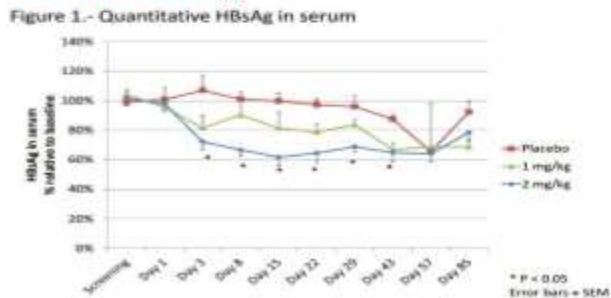
- ARC-520 is comprised of two siRNA sequences targeted against two regions of the HBV genome and is actively targeted to the liver



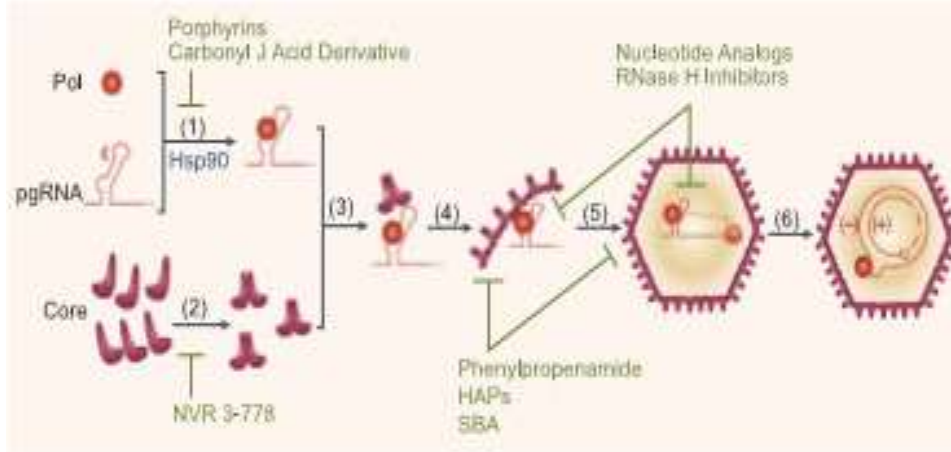
Hình 16 – Sơ đồ tác dụng của ARC-520 (Yuen M, et al. AASLD 2014. Poster # LB 21)

HBV mRNA-targeting siRNA: ARC-520

- Phase IIa clinical trial (Heparc-2004)
 - A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-dose study of ARC-520 (1-4 mg/kg) administered intravenously to patients with chronic immune active HBV infection maintained on entecavir or tenofovir therapy



Hình 17 – Tác dụng của ARC-520 trong nghiên cứu lâm sàng giai đoạn IIa (Yuen MF et al. AASLD 2014)



Hình 18 – Biện pháp tấn công vào sự tập hợp protein Pol và protein lõi trong nucleocapsid.
(Chen J, et al. New insights into hepatitis B biology and implications for novel antiviral strategies. National Science Review 2015;2:296-313)

Tập hợp nucleocapsid được khởi động bằng cách hình thành phức hợp pgRNA-polymerase, gia tăng bởi các protein của ký chủ như Hsp90. 1. Kết hợp Pol-ε và hình thành RNP. 2. Hình thành HBc dimer. 3. Khởi động tập hợp nucleocapsid. 4 và 5. Tập hợp nucleocapsid và protein chếp mã. 6. Nucleocapsid trưởng thành. Nhiều hợp chất như heterodihydropyrimidine (HAP), sulfomoylbenxamide (SBA) có thể làm xáo trộn kết hợp Pol-ε, ảnh hưởng trên hoạt tính của Pol và tập hợp nucleocapsid của siêu vi, vì vậy có thể ức chế tăng sinh siêu vi.

Potential antiviral agents	Mechanisms of action
NAs: MIV-210, elvicitabine, valtorcitabine and clevudine	Inhibition of HBV replication
Lipopeptides: Myrcludex-B	Prevention of viral entry
Disubstituted-sulfonamides: CCC-0975 and CCC-0346	Blockage of the <i>de novo</i> cccDNA synthesis
LTR	Destabilization cccDNA minichromosome
Zinc finger nucleases	Disruption of sequences within viral proteins
Epigenetic regulators	Repression of cccDNA transcriptional activity
Small interfering RNA	Silencing of HBV protein gene expression
Phenylpropenamides: AT-61 and AT-130	Prevention of RNA encapsidation
Heteroaryldihydropyrimidines: BAY41-4109	Nucleocapsid destabilization
Synthetic TLR-7 agonists	Inhibition of HBV replication <i>via</i> pDC activation
IL8 inhibitors	Increase the potency of IFN-α treatment
REP 9AC amphipathic polymers	Inhibition of subviral particles
Inhibitors of PD-1 and TIM3 receptors	Restoration of T cell function
Immunization with DC pulsed with HBV antigens	Induction of viral specific CTLs
Therapeutic vaccines containing viral peptides	Induction HBV-specific responses
Cytokines: IL12, IL2, IFNγ and TNF-α	Restoration of HBV specific T cell activity
Thymosin alpha polypeptide	Induction of T cell function and NK cytotoxicity

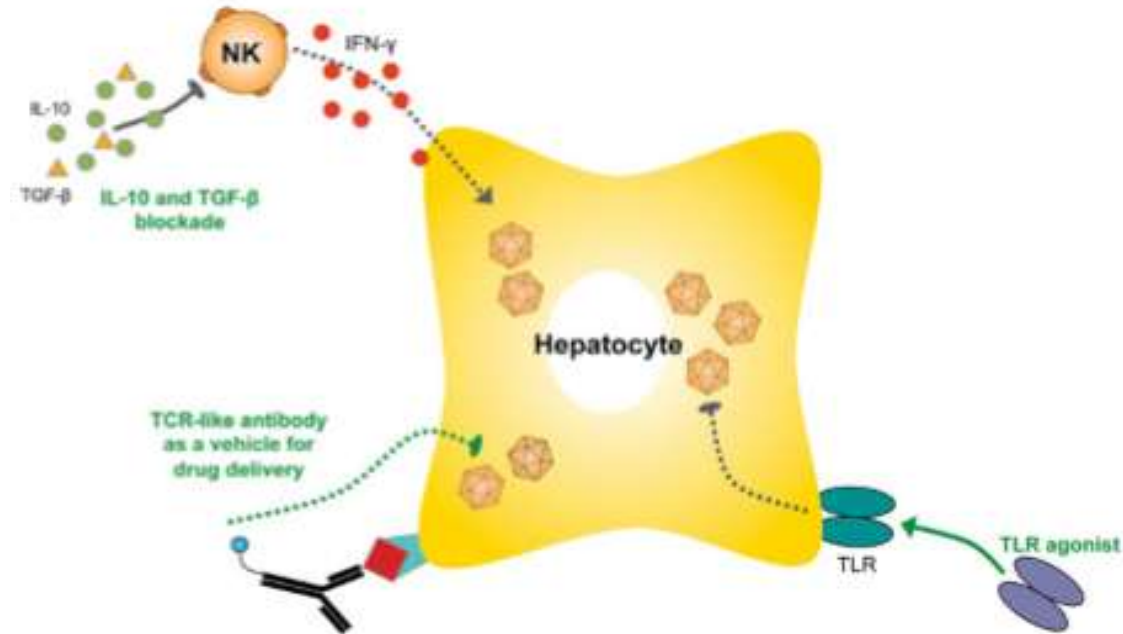
Hình 19 – Cơ chế tác dụng của các thuốc có tiềm năng trong điều trị VGSV B mạn tính trong tương lai (Koumbi L. Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection. World J Hepatol 2015;7:1030-1040)

Tóm lại, muốn có hiệu quả trong VGSV B mạn tính, cách tiếp cận này phải dựa vào vòng đời của tế bào gan (hepatocyte turnover) và điều này phụ thuộc rất nhiều vào khả năng miễn dịch của ký chủ để loại bỏ tế bào gan bị nhiễm trùng. Vì vậy cần xem xét nửa vòng đời tự nhiên của tế bào gan và nếu như không có một hệ thống tăng cường miễn dịch, hiệu quả có lợi của cách tiếp cận này không thể dự đoán được. Ngoài ra mức độ an toàn cũng cần được quan tâm xem xét cẩn thận.

Miễn dịch trị liệu

Sau giai đoạn cấp, ở người lớn, loại trừ tự nhiên HBsAg trong huyết thanh > 90%, có thể do đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và mắc phải (innate and adaptive immune response) quá mạnh. Ngược lại, VGSV B mạn tính có thể là hậu quả của miễn dịch bẩm sinh không hiệu quả. Theo thời gian, miễn dịch càng xấu hơn khi tiếp xúc liên tục với số lượng lớn kháng nguyên siêu vi, cuối cùng là miễn dịch hoàn toàn kiệt quệ hoặc phá hủy luôn tế bào T chuyên biệt đối với HBV.

Như vậy, mục tiêu của điều trị VGSV B hiện nay là sử dụng các biện pháp miễn dịch tương tự như miễn dịch xảy ra trong giai đoạn nhiễm HBV cấp tự giới hạn. Các biện pháp này bao gồm bảo tồn chức năng miễn dịch đã mất trong giai đoạn mạn tính và đây là biện pháp cần được bổ sung vào điều trị hiện nay.



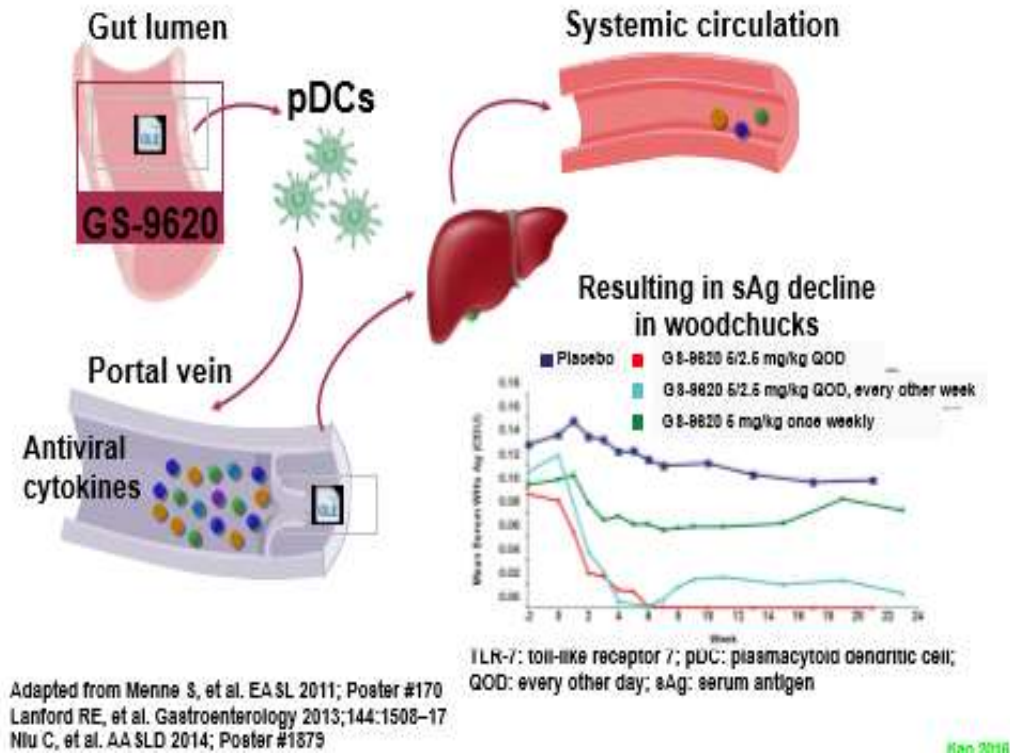
Hình 20 – Mục tiêu tác dụng của miễn dịch bẩm sinh trong nhiễm HBV

(Grimm D, et al. Hepatitis B virus: from immunobiology to immunotherapy. Clinical Science 2013;124:77-85)

Sử dụng TLR agonists để kích thích hệ thống miễn dịch bẩm sinh là bước tiếp cận nhiều hứa hẹn trong miễn dịch trị liệu nhiễm HBV. Hiệu quả chống siêu vi có thể gia tăng (như IFN) bằng cách đưa đến tế bào gan nhiễm HBV kháng thể giống TCR (T-cell receptors). Ngược lại, cách tiếp cận này cũng có thể làm hạn chế bớt tác dụng phụ. Ngoài tác dụng tác dụng trực tiếp trên tế bào gan nhiễm trùng, phục hồi chức năng tế bào NK bằng cách ngăn chặn tác dụng ức chế của cytokines như IL-10 có thể được sử dụng trong điều hòa miễn dịch của miễn dịch bẩm sinh.

Vai trò quan trọng của miễn dịch bẩm sinh là kiểm soát nhiễm HBV và nghiên cứu tập trung vào việc phát triển các thuốc có khả năng tác động vào miễn dịch của tế bào NK. Hệ thống miễn dịch bẩm sinh là bước đầu tiên chống lại nhiễm HBV của ký chủ. Trong tiến trình nhiễm trùng, nhận biết acid nucleic và protein của siêu vi cùng với tổn thương nhu mô gan có khả năng hạn chế lan tỏa siêu vi. Thành phần của siêu vi kích thích miễn dịch bẩm sinh qua các thụ thể (pattern recognition receptors = PRRs). Đây là một tiến trình phức tạp chưa được nhận biết rõ ràng. Tác dụng chống siêu vi ban đầu gồm ba cơ chế chính: sản xuất IFN type I, tiêu diệt tế bào gan nhiễm trùng qua con đường của tế bào NK, sản xuất các cytokines và chemokines tiền viêm góp phần hỗ trợ cho sự hình thành hoàn chỉnh và nhận thêm đáp ứng miễn dịch mắc phải. Vai trò của miễn dịch chống lại HBV vẫn chưa được xác định rõ ràng, vì vậy việc “tuyên mộ” bệnh nhân nhiễm HBV cấp chưa có triệu chứng rất khó khăn. Nhiễm trùng thực nghiệm ở chuột và khi lại gặp trở ngại, quan trọng nhất là rất khó định chuẩn¹⁵.

Toll-like receptor (TLR) 7 agonist GS-9620 acts by modulating the immune system



Hình 21 – Vai trò của TLR-7 trong miễn dịch trị liệu VGSV B mạn tính

Trong VGSV B mạn tính, số lượng tế bào NK rất nhiều, có thể chiếm đến 30-40% số lượng lymphocytes thường trú ở gan. Tác dụng chống siêu vi mạnh của tế bào NK rất mạnh, có thể trực tiếp tiêu hủy tế bào gan nhiễm HBV, cũng có thể gián tiếp điều hòa hoạt động của tế bào T chuyên biệt, góp phần vào sinh bệnh học của tổn thương gan. Hơn nữa, người ta ghi nhận HBV có thể ức chế miễn dịch bẩm sinh qua con đường của các cytokines như IL-10, IL-12, IL-15 và IL-18. Trong nhiễm HBV, ức chế tăng sinh siêu vi cũng có thể qua trung gian ức chế TLR. TLR7 và TLR9 ức chế tăng sinh HBV bằng cách tạo ra một số lượng lớn IFN type II và III khi hoạt hóa tế bào răng cưa. Thực nghiệm ở khỉ và chuột chũi cho thấy TLR7 tổng hợp có khả năng giảm nồng độ siêu vi và HBsAg, gia tăng biểu hiện của IFN và kích thích các gen của IFN. Thuốc này đang được nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I. Điều trị bằng entecavir có thể bảo tồn được biểu hiện của TLR2 ở các tế bào gan bị nhiễm trùng và ức chế tăng sinh HBV. Kết quả này cho thấy nếu phối hợp TLR với NAs có thể là bước tiếp cận nhiều hứa hẹn. Một hợp chất khác đang được nghiên cứu hoạt tính chống siêu vi, đó là REP 9AC (Replicor). Tác dụng của hợp chất này là kích thích đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, ức chế siêu vi ở tế bào gan bị nhiễm trùng².

Interleukin (IL) 8 là chất trung gian quan trọng giữa miễn dịch bẩm sinh và tế bào T. Ở bệnh nhân bị tái hoạt HBV, nồng độ IL8 song hành với nồng độ siêu vi trong huyết thanh. Ức chế chuyên biệt IL8 sẽ làm tăng hoạt tính của IFN ở nhiều dòng tế bào gan bị nhiễm trùng. Bổ sung IL8 tái hợp được ghi nhận có thể giải cứu hoàn toàn tăng sinh siêu vi sau khi điều trị bằng IFN. Phát triển các thuốc ức chế IL-8 cũng là một bước tiếp cận được nghiên cứu thêm trong tương lai gần.

TLR7 agonist: GS-9620

> Phase II clinical trial: *in progress*



- > CHB patients without cirrhosis on oral antiviral treatment for >1 year
- > 50 patients per cohort, stratified by HBeAg status and HBsAg level
- > Placebo (n=5); 1 / 2 / 4 mg GS-9620 PO QOW (n=15, respectively)

Hình 22 – Nghiên cứu lâm sàng GS-9620 đang tiến hành trong VGSV B mạn tính

Vai trò của miễn dịch mắc phải chống lại HBV. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vai trò của tế bào T trong việc kiểm soát nhiễm HBV. Vài tuần sau khi nhiễm phải HBV, đáp ứng của tế bào T CD4+ và T CD8+ đã được phát hiện. Như vậy, vai trò của những tế bào này thế nào?

Ở bệnh nhân nhiễm HBV cấp, siêu vi bị loại bỏ và đáp ứng của tế bào T CD4+ rất mạnh. Ngược lại, đáp ứng của những tế bào này yếu sẽ dẫn đến nhiễm HBV mạn tính. Điều thú vị là khi nghiên cứu ở khi nhiễm HBV, vào thời điểm nhiễm trùng lên cao điểm, tế bào T CD4+ giảm, nhưng chúng ta lại không ghi nhận siêu vi bị loại trừ, cũng không thấy biểu hiện của bệnh gan (cuối cùng siêu vi cũng bị loại bỏ). Nhưng khi số lượng tế bào T CD4+ giảm trước khi nhiễm trùng ở mức cao điểm, nhiễm HBV lại tồn tại và kéo dài. Điều này có nghĩa là tế bào T CD4+ có nhiệm vụ kiểm soát siêu vi nhưng không có tác dụng chống siêu vi trực tiếp. Tái tạo phục hồi chức năng tế bào T CD4+ bị suy giảm rất quan trọng để cho miễn dịch trị liệu thành công. Trong nhiễm HBV mạn tính, hiểu biết về cơ chế suy giảm chức năng tế bào T CD4+ rất quan trọng. Vai trò của tế bào T điều hòa (FoxP3+CD4+Treg) trong nhiễm HBV mạn tính vẫn còn khó hiểu. Treg ức chế tế bào T và cho thấy kiểm soát siêu vi có hiệu quả. Ngoài ra, liên hệ nghịch giữa Treg và ALT cũng được chứng minh. Điều này đưa đến giả thuyết là Treg có tác dụng kháng viêm là chủ yếu, nhưng không có hiệu quả đối với tồn tại kéo dài của nhiễm HBV¹⁵.

Vai trò của tế bào T CD4+ chưa thể kết luận chắc chắn, như vậy còn vai trò của tế bào T CD8+ như thế nào? Nhiều nghiên cứu đã chứng minh được sự liên quan giữa đáp ứng mạnh mẽ của tế bào T CD8+ và loại bỏ HBV. Trong nhiễm HBV cấp tự giới hạn, nồng độ HBV DNA giảm nhanh chóng sau khi tăng sinh siêu vi đạt đến cao điểm. Cơ chế kiểm soát siêu vi qua trung gian của tế bào T CD8+ vẫn còn nhiều bàn cãi. Cơ chế không làm tiêu hủy tế bào (non-cytolytic mechanism) phụ thuộc vào cytokines như IFN γ hoặc TNF α góp phần kiểm soát siêu vi. Hiệu quả tiêu hủy tế bào (cytolytic effects) vẫn chưa được đánh giá đầy đủ. Tế bào gan nhiễm trùng chết có thể liên quan đến việc loại trừ cccDNA ra khỏi gan. Hướng tiếp cận miễn dịch trị liệu nhiễm HBV phải có nhiều tế bào gan bị nhiễm trùng, sau đó xuyên qua cách phục hồi tiêu hủy và tiêu hủy tế bào sẽ có lợi tránh diễn tiến bất lợi do miễn dịch bệnh lý gây ra. Ngoài ra, vai trò quan trọng của tế bào T CD8+ trong việc phát triển xơ gan cũng được chứng minh. Người ta ghi nhận tế bào T CD8+ liên quan đến xơ hóa gan bằng cách kích thích tế bào hình sao *in vitro* và *in vivo*.

Vì vậy can thiệp vào tiến trình liên quan giữa tế bào T CD8+ và tế bào hình sao là mục tiêu điều trị nhiều thú vị và đầy hứa hẹn để giảm nguy cơ xơ hóa và xơ gan do HBV¹⁵.

Target	Mode of action	Compound
Virus		
HBV	Polymerase inhibitor	Tenofovir alafenamide (GS-7340) Besifovir (LB80380)
cccDNA	Site-specific cleavage of DNA	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas
	Inhibition of relax-circular DNA to cccDNA conversion	Disubstituted sulphonamides
	Inhibition of nucleocapsid assembly	Phenylpropenamide derivatives Heteroaryldihydropyrimidines Sulphamoylbenzamide derivatives
HBV RNA	Knock down HBV RNA, viral proteins and HBV DNA	RNA interference
Host		
NTCP	Entry inhibitor	Mycludex-B
Innate immunity	Induce APOBEC3A and APOBEC3B	Lymphotoxin-β receptor agonist
	Exogenous interferon stimulation	Toll-like receptor agonist
Adaptive immunity	CD8 T cells activation	Therapeutic vaccine Programmed death -1 inhibitor

APOBEC, apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3A and 3B; cccDNA, covalently closed circular DNA; CRISPR/Cas, clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated (Cas) systems; HBV, hepatitis B virus; NTCP, sodium taurocholate cotransporting polypeptide; TALENs, transcription activator-like effector nucleases; ZFNs, zinc-finger nucleases.

Hình 23 - Các thuốc điều trị mới hiện đang được nghiên cứu trong bệnh VGSV B mạn tính

(Lin CL, et al. Hepatitis B virus: new therapeutic perspectives. *Liver International* 2016;36 (Suppl. S1):85-92)

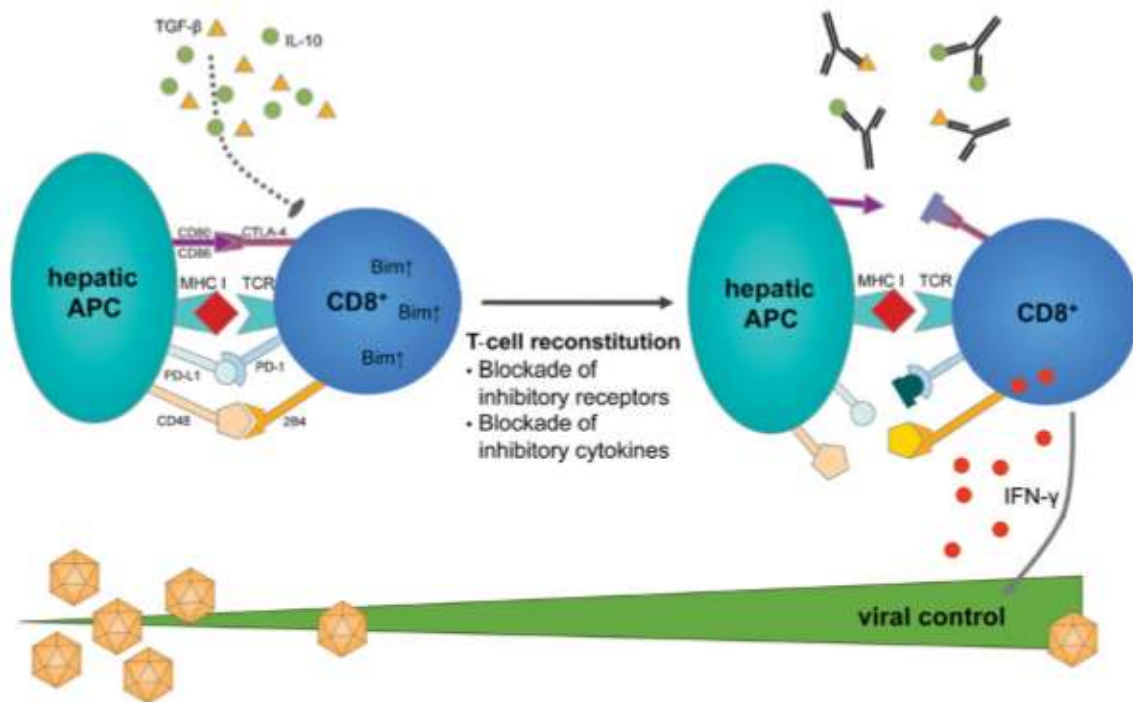
Tóm lại, vai trò của tế bào NK, T CD4+ và T CD8+ trong nhiễm HBV cấp và mạn tính như sau:

- Nhiễm HBV cấp: tế bào NK giảm khi nồng độ siêu vi đạt đến cao điểm, đáp ứng tế bào T CD4+ và T CD8+ mạnh.
- Nhiễm HBV mạn: rối loạn sản xuất IFN γ , tác dụng tiêu hủy tế bào gia tăng, rối loạn chức năng và đáp ứng kém của tế bào T CD4+ và T CD8+.

HBV tồn tại kéo dài liên quan đến rối loạn chức năng tế bào T CD8+, không phụ thuộc vào tuổi của bệnh nhân lúc bị nhiễm trùng, có thể do HBV tiếp xúc lâu dài với kháng nguyên siêu vi, chức năng của các tế bào này bị hư hỏng hoặc bị suy giảm chức năng. Một khi nồng độ siêu vi > 10⁷ copies/ml, tế bào T CD8+ rất khó phát hiện và khi nồng độ HBV giảm trong những tháng đầu dùng thuốc kháng siêu vi, đáp ứng tế bào T CD8+ lại gia tăng. Rất tiếc, đáp ứng này chỉ có tính tạm thời. Nhiều cơ chế giải thích sự suy giảm chức năng của tế bào T. Ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính, bất thường về tế bào T sẽ điều hòa Bcl-2 superfamily Bim (pro-apoptotic member) ở tế bào T CD8+ và khi ngăn chặn Bim sẽ giúp phục hồi chức năng tế bào T. Người ta thừa nhận rằng chính pro-apoptotic phenotype được kích thích bằng cách hoạt hóa dung nạp miễn dịch ở tế bào trình diện kháng nguyên (antigen-presenting cells = APC) ở gan. Tế bào T bị loại

trừ sớm cũng qua trung gian của Bim. Ngăn chặn hệ thống này sẽ là bước tiếp cận nhiều hứa hẹn trong miễn dịch trị liệu nhiễm HBV¹⁵.

Thăng bằng giữa tín hiệu đồng ức chế và đồng kích thích trong giai đoạn trình diện kháng nguyên rất quan trọng để giữ vững chức năng tế bào T CD8+. Vì vậy, khi tín hiệu đồng ức chế quá mạnh sẽ gây ra apoptosis cho các tế bào T CD8+ qua trung gian của Bim. Đồng ức chế qua con đường PD-1 (programmed cell death 1) được chứng minh có liên quan đến suy giảm chức năng tế bào T CD8+ ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính. Ngăn chặn con đường PD-1 có thể là mục tiêu quan trọng của miễn dịch trị liệu VGSV B mạn tính. Ở chuột chuyển đổi gen nhiễm HBV được dùng thuốc ngăn chặn kháng thể chống PD-1, người ta ghi nhận số lượng tế bào T CD8+ ở gan¹⁵.



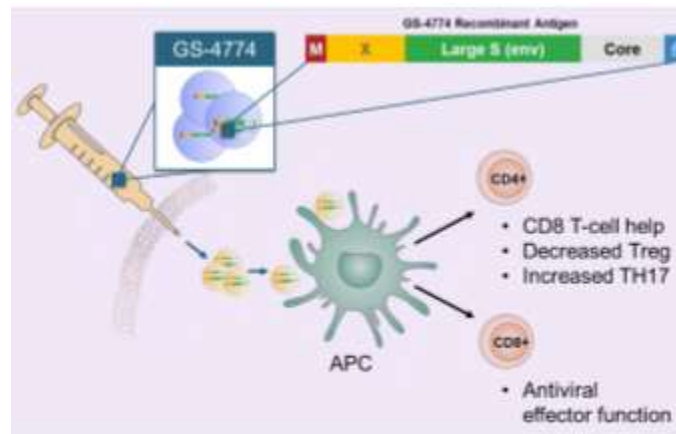
Hình 24 – Cơ chế rối loạn chức năng tế bào T CD8+ trong miễn dịch trị liệu nhiễm HBV mạn tính (Grimm D, et al. *Hepatitis B virus: from immunobiology to immunotherapy. Clinical Science* 2013;124:77-85)

Phục hồi chức năng tế bào T CD8+ bị suy giảm bằng cách tương tác với các tín hiệu ức chế là hướng tiếp cận nhiều hứa hẹn trong miễn dịch trị liệu chống siêu vi. Kiểm soát siêu vi qua trung gian tế bào T CD8+ có thể đạt được bằng cách ngăn chặn các đồng thụ thể ức chế như PD-1 hoặc 2B4 hoặc ngăn chặn cytokines ức chế như TGF-β hoặc IL-10.

Trong nhiễm HBV mạn tính, 2B4 (CD244) và PD-1 có biểu hiện rất rõ ở tế bào T CD8+. Vì vậy khi ngăn chặn 2B4 sẽ giúp phục hồi chức năng tế bào T CD8+, không phụ thuộc vào PD-1. Như vậy, dựa vào những dữ kiện vừa trình bày ở trên, tái tạo phục hồi chức năng tế bào T CD4+ và T CD8+ là những mấu chốt trong miễn dịch trị liệu nhiễm HBV mạn tính. Tập trung vào phục hồi chức năng tế bào T CD8+ chúng ta ghi nhận ba vấn đề: ngăn chặn Bim, điều hòa thụ thể đồng ức chế và đồng kích thích, điều hòa cytokines ức chế và kích thích¹⁵.

Vaccin trị liệu (therapeutic vaccination). Nhiều nghiên cứu về thuốc chủng ngừa và mức độ bao phủ thích hợp nhất là tạo ra đầy đủ miễn dịch chống lại HBV, cũng như sử dụng các biện pháp phòng ngừa thụ động ngăn ngừa tái nhiễm ở bệnh nhân ghép tạng, cuối cùng đã kết luận được rằng chính anti-HBs là thành phần kháng thể trung hòa. Nhiều nghiên cứu về vaccin trị liệu

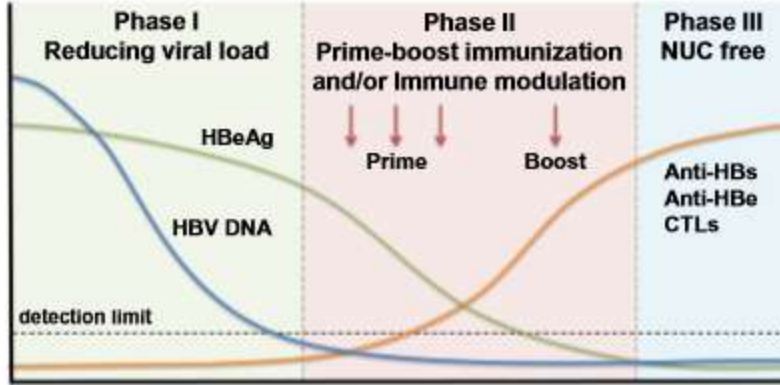
được tiến hành, sử dụng nhiều thành phần kháng nguyên khác nhau. Vaccin tái hợp được dùng trong dự phòng được nghiên cứu áp dụng cho bệnh nhân VGSV B với mục đích tăng cường đáp ứng miễn dịch chống HBV, nhưng chúng ta cũng biết một mình nồng độ HBV DNA cao có thể làm cho đáp ứng miễn dịch kém. Vì vậy, nhiều chuyên gia sử dụng NA để giảm nồng độ HBV DNA trước khi dùng vaccin. Người ta nghĩ rằng một khi nồng độ HBV DNA giảm, trình diện kháng nguyên siêu vi sẽ kích thích đáp ứng tế bào T và như vậy sẽ “bê gãy” được tình trạng dung nạp miễn dịch. Tuy nhiên, khi nghiên cứu ngẫu nhiên có kiểm soát vaccin có chứa HBsAg và NA lại không thấy có gì tốt hơn là dùng NA đơn thuần. Vaccin có chứa DNA có thể phục hồi miễn dịch chống siêu vi bằng cách kích thích đáp ứng tế bào TCD8+, T CD4+ và sản xuất kháng thể. Nhưng khi nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I/II ở bệnh nhân VGSV B mạn dùng NA ít nhất 3 năm và nồng độ HBV DNA dưới ngưỡng phát hiện ít nhất một năm được chích thêm 5 mũi vaccin có DNA vẫn không ngăn chặn được bùng phát siêu vi sau khi ngưng NA và cũng không phục hồi được đáp ứng miễn dịch chống HBV. Như vậy, vaccin trị liệu có nhiều thành công *in vivo* và trên sinh vật thí nghiệm nhưng lại có kết quả thất vọng khi nghiên cứu lâm sàng trên người⁸.



Hình 25 – Vai trò của vaccin trị liệu (GS-4774) trong điều trị bệnh VGSV B mạn tính (Stubb AC, et al. Nat Med 2001; Cereda et al. Vaccin 2011)

Nghiên cứu về vaccin trị liệu để điều trị khỏi bệnh VGSV B cho kết quả quá thất vọng, ít nhất là với công thức ban đầu. Bất lợi chính của phương cách này là chỉ tăng cường tính chuyên biệt của kháng nguyên lớp vỏ. Đây là mục tiêu của một số dòng tế bào nhiễm HBV, nhưng số này rất hiếm trong hệ thống tuần hoàn của bệnh nhân VGSV B mạn tính. Muốn vượt qua những giới hạn này, nhiều biện pháp sử dụng nhiều loại kháng nguyên khác nhau, gây ra một đáp ứng rộng hơn, chuyên biệt hơn bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật tiên bộ hiện nay. Đặc biệt kháng nguyên lõi có tính chuyên biệt thường gặp nhất và liên quan đến kiểm soát miễn dịch. Hiện nay, hiệu quả điều trị của vaccines có mục tiêu tác dụng ở kháng nguyên lõi đang được đánh giá dựa vào một số kết quả khích lệ của các nghiên cứu tiền lâm sàng.

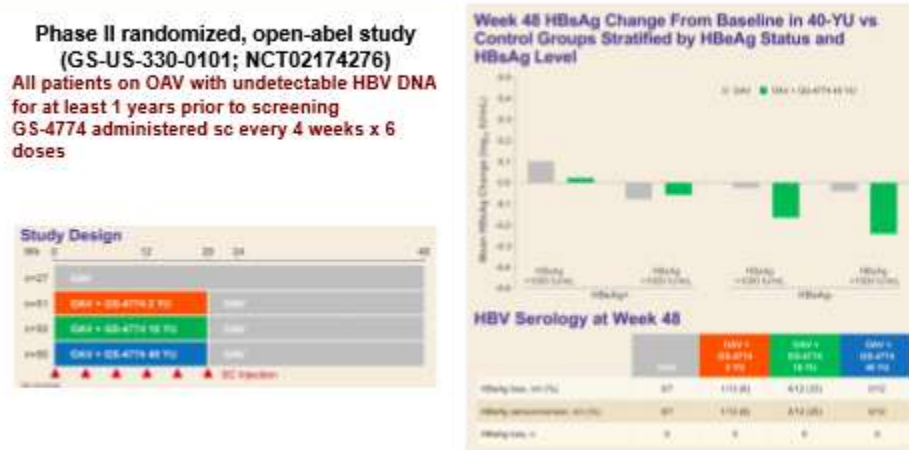
Phối hợp thuốc chống siêu vi, vaccin trị liệu và điều hòa miễn dịch là bước tiếp cận nhiều hứa hẹn trong điều trị VGSV B mạn tính. Kết quả nghiên cứu trên thú vật và tiền lâm sàng cho thấy chữa khỏi bệnh diễn tiến qua ba giai đoạn. Trong giai đoạn I nồng độ siêu vi giảm do tác dụng của các loại NA và có một khoảng trống để giúp cho việc phục hồi miễn dịch. Trong giai đoạn II, đáp ứng tế bào T và xuất hiện hiện anti-HBs nhờ vào vaccin trị liệu, thuốc điều hòa miễn dịch. Tồn tại kéo dài các đáp ứng miễn dịch được tiếp tục theo dõi trong giai đoạn III. Trong giai đoạn này nhiễm HBV được kiểm soát hoàn toàn nhờ vào miễn dịch chống HBV, siêu vi không tái xuất hiện khi ngưng NA. Thuốc điều hòa miễn dịch nhiều hứa hẹn mới được phát hiện gần đây có thể kể đến kháng thể anti-PD-L1, tuy nhiên nghiên cứu này vẫn còn nhiều thử thách. Chúng ta cố gắng chờ đợi trong tương lai không xa!¹⁶



Hình 26 – Cách thức phối hợp mới trong điều trị VGSV B mạn tính (Zhang E, et al. Current status of immunomodulatory therapy in chronic hepatitis B, fifty years after discovery of the virus: Search for the “magic bullet” to kill cccDNA. Antiviral Research 2015;123:193-203)

Muốn loại bỏ cccDNA, phác đồ điều trị được sử dụng lần lượt qua ba giai đoạn: giai đoạn I giảm nồng độ HBV bằng NA hoặc peginterferon, giai đoạn II gây đáp ứng miễn dịch bằng cách điều hòa miễn dịch và vaccines, giai đoạn III kiểm soát HBV không cần đến thuốc chống siêu vi.

Safety and efficacy of GS-4774 in patients with chronic hepatitis B on oral antiviral therapy—Phase II

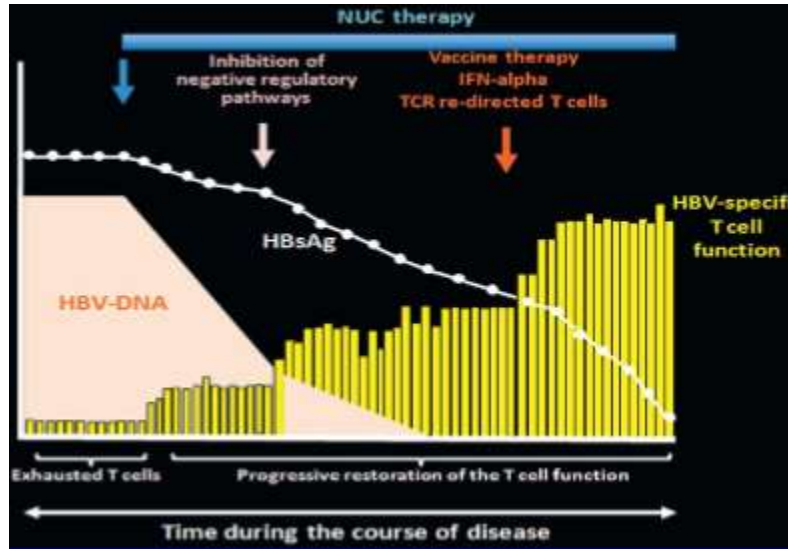


- No clinical significant decline in HBsAg was observed during and after treatment with GS-4774, no HBsAg loss.
- HBsAg loss was only achieved with GS-4774 treatment.

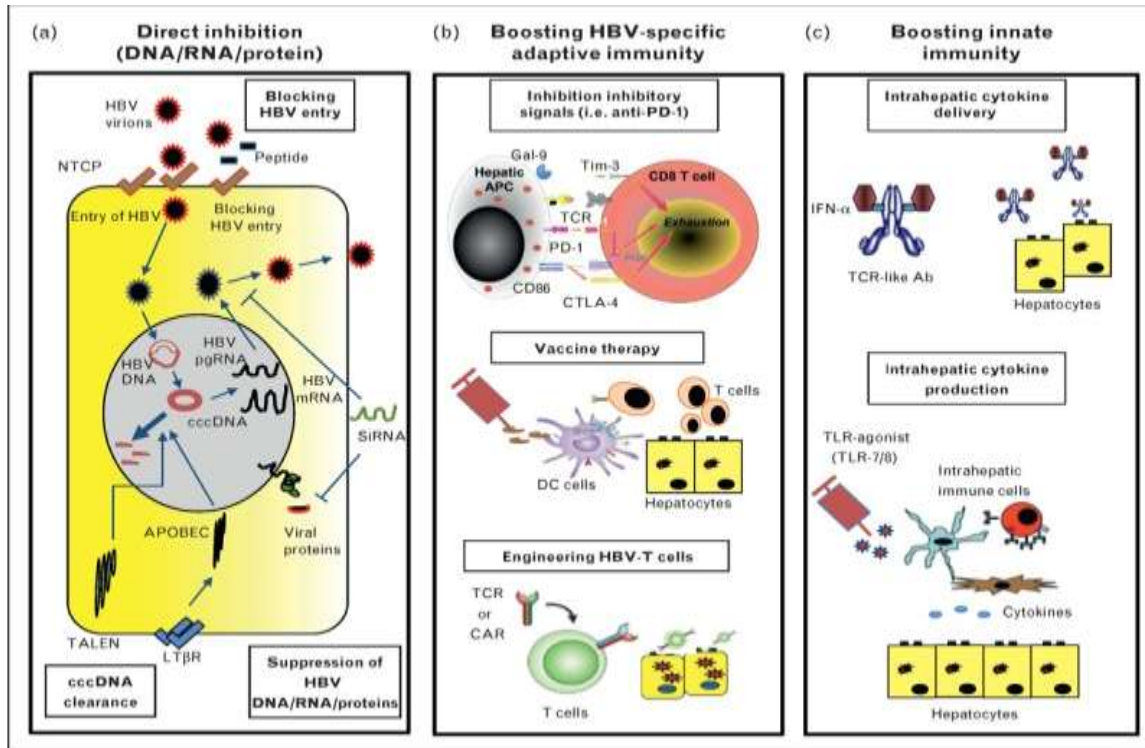
Hình 27 – Nghiên cứu lâm sàng giai đoạn II phối hợp vaccines và NA trong điều trị VGSV B mạn tính (Lok et al. AASLD 2015)

Cytokines và thymosin. Nhiều loại cytokines có liên quan đến khiếm khuyết đáp ứng miễn dịch, có thể được xem như là một hợp chất phụ (adjuvant compound) có thể “đánh gãy” tình trạng dung nạp miễn dịch trong VGSV B mạn tính. Trong số các loại hợp chất chúng ta có thể kể đến IL12. IL12 bảo tồn được đáp ứng kém của tế bào T chuyên biệt cho HBV, giúp điều hòa các thụ thể ức chế PD-1. Phối hợp lamivudine với IL12 tái hợp sẽ làm gia tăng hoạt tính của tế bào T, tạo ra chuyển đổi huyết thanh HBeAg. Điều trị bằng IFN + lamivudine và yếu tố hoại tử bướu (tumour necrosis factor)- α sẽ làm cho việc ức chế cccDNA được mạnh hơn, ức chế tăng sinh HBV và không gây độc tế bào. Thymosin α 1 là một polypeptide tổng hợp 28 acid amin có tác dụng điều hòa tế bào T, IFN và IL12 cũng như gây độc cho tế bào NK. Điều trị bằng thymosin

được chứng minh làm giảm tăng sinh rất đáng kể ở thú vật thí nghiệm. Điều trị lâu dài bằng lamivudine, gần đây là famciclovir phối hợp với thymosin có hiệu quả hơn là đơn trị liệu, có liên quan đến chuyển đổi huyết thanh HBeAg. Tuy nhiên, kết quả của thymosin trong các phác đồ phối hợp còn nhiều mâu thuẫn, cần được nghiên cứu nhiều hơn^{5, 14}.



Hình 28 – Điều hòa miễn dịch tế bào T trong khi điều trị NA bệnh VGSV B mạn tính
(Bertoletti and Ferrari. Gut 2012)



Hình 29 - Sơ đồ các cách tiếp cận mới trong điều trị VGSV B mạn tính
(Bartoletti A, Rivino L. Hepatitis B: future curative strategies – Curr Opin Infect Dis 2014;27:528-534)

Bước tiếp cận khác là điều trị bằng tế bào (cell therapy), dựa vào cách sử dụng nhiều loại tế bào T khác nhau. Những tế bào này được chỉnh sửa để biểu hiện hoạt tính chống siêu vi đặc

hiệu hơn theo một hướng được xác định trước. Lý lẽ của kỹ thuật này là thay thế hoặc tăng cường những chức năng của tế bào T của ký chủ đã mất đi, đồng thời cũng hướng vào các epitopes có tính miễn dịch trội hơn để kiểm soát siêu vi tốt hơn. Những kỹ thuật này, dù mới và có nhiều cải tiến, nhưng vẫn còn đang đánh giá trong bệnh ác tính hoặc bệnh ác tính có liên quan đến siêu vi⁵.

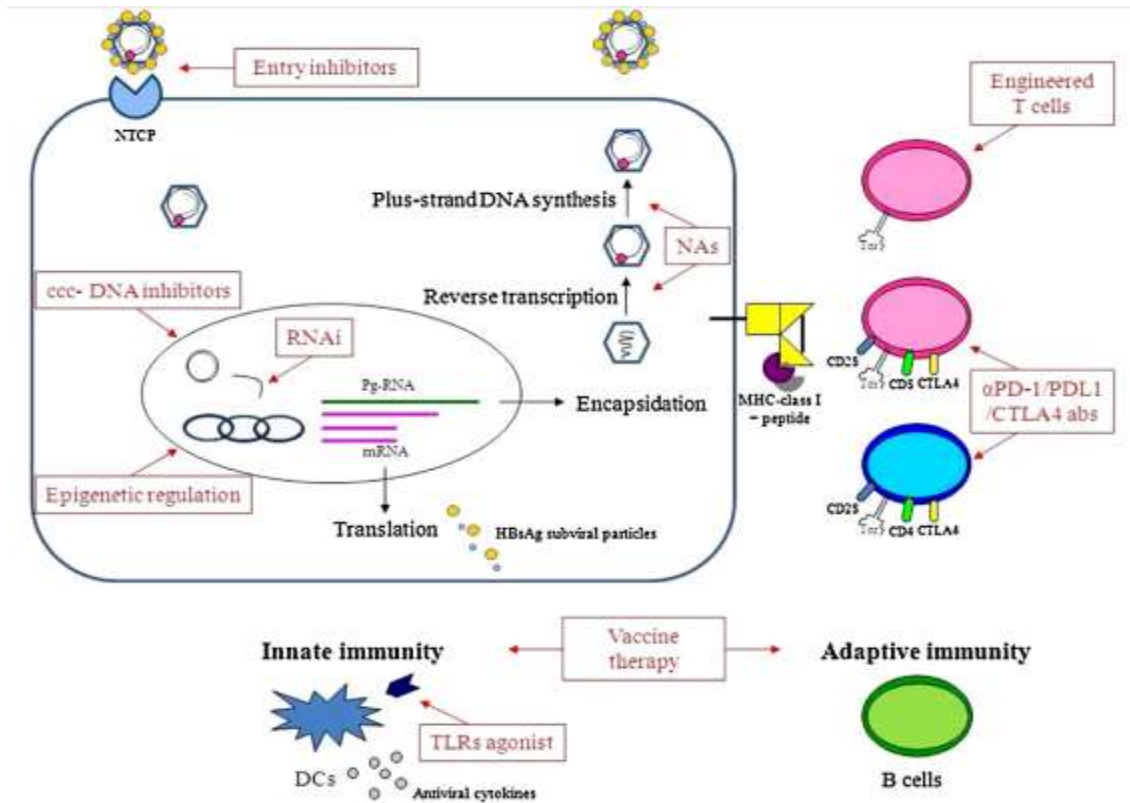
Sử dụng điều trị bằng miễn dịch có kết quả rõ ràng: “huấn luyện” những tế bào tham gia vào điều trị thay đổi uyển chuyển đối với từng bệnh nhân (cung cấp tác dụng chống siêu vi chuyên biệt đã bị mất đi trong VGSV B mạn tính). Biện pháp được sử dụng ngày càng rộng rãi trong lãnh vực ung thư về máu (oncohaematological field). Hiện nay, chúng ta đang cố giữ ý tưởng khai thác những tiên bộ của kỹ thuật này. Biện pháp điều trị này có thể chữa khỏi bệnh VGSV B mạn tính! Tuy nhiên, nhiều yếu tố được đề cập để xác định hiệu quả và an toàn trong VGSV B mạn tính: thứ nhất là hoạt hóa mạnh mẽ tác dụng diệt siêu vi qua trong gian tế bào T và chính điều này có thể gây ra viêm gan bùng phát, thứ hai là chúng ta phải chứng minh rằng nhiều loại tế bào T không cùng cơ chế làm kiệt quệ chức năng tế bào, chẳng hạn như tế bào T tự nhiên bị kiệt quệ có thể do lượng kháng nguyên lưu hành trong hệ tuần hoàn và môi trường dung nạp miễn dịch đã hiện diện từ trước ở gan⁶.

Các thuốc kháng siêu vi	Miễn dịch trị liệu chuyên biệt không dùng kháng nguyên	Miễn dịch trị liệu dựa vào HBsAg
<ul style="list-style-type: none"> - Giảm tăng sinh HBV, không kiểm soát được cccDNA, ngưng thuốc tăng sinh HBV lại tiếp tục xuất hiện. - Gây tổn thương gan tạm thời, không ngăn chặn được biến chứng lâu dài. - Tạo miễn dịch, không bảo tồn được bản chất của miễn dịch. - Không giữ được miễn dịch lâu dài của ký chủ. 	<ul style="list-style-type: none"> - Điều hòa miễn dịch của ký chủ nhưng không giữ được bản chất của miễn dịch. - Không kiểm soát được tăng sinh của ký chủ và tổn thương gan. - Vấn đề quan tâm nhiều nhất là mức độ an toàn của các thuốc này. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tạo được miễn dịch chuyên biệt chống HBsAg nhưng dường như không có tính bảo vệ. - Không đạt được miễn dịch lâu dài. - Chưa gây ra được miễn dịch chuyên biệt đối với HbcAg.

Hình 30 - Phạm vi và giới hạn của các cách tiếp cận mới (Akbar SMF, et al. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:241-246)

Một biện pháp điều trị khác là tăng cường đáp ứng diệt siêu vi của tế bào T, dự đoán có liên quan đến các thụ thể ức chế thuộc họ CD28/CTLA-4 của các chất điều hòa tế bào T. Nhiều nghiên cứu khảo sát ghi nhận phân tử PD-1 có biểu hiện rất rõ ở tế bào T chuyên biệt cho HBV nằm trong hệ tuần hoàn ngoại vi và trong gan, qua con đường kích thích hoặc ức chế các thụ thể, bảo tồn được chức năng chống siêu vi. Như vậy, qua những dữ kiện này biểu hiện của thụ thể ức chế làm cho chức năng miễn dịch suy yếu và cuối cùng là mất kiểm soát miễn dịch⁷.

Đặc điểm miễn dịch của VGSV B mạn tính là đáp ứng của tế bào T CD⁺ và CTL kém, có thể do một lượng lớn siêu vi hoặc kháng nguyên trong gan (môi trường dung nạp = tolerogenic environment), nhất là ở trẻ em. Rối loạn chức năng tế bào T kèm theo khiếm khuyết các đáp ứng kích thích cùng lúc (co-stimulatory pathways), đặc biệt có sự gia tăng biểu hiện của PD-1, T cell immunoglobulin domain, mucin domain-containing molecules-3 (TIM3), CD24 cũng như rối loạn tế bào răng cưa, gia tăng số lượng tế bào Tregs. Bảo tồn được chức năng tế bào T, ít nhất chỉ một phần, cũng ức chế được anti-PD1 mAb, và như vậy thuốc nào chống lại được tiến trình chết theo chương trình đều có thể ức chế được TIM3. Một biện pháp điều trị có tiềm năng khác là hoạt hóa chức năng tế bào răng cưa. Gây miễn dịch cho tế bào răng cưa bằng kháng nguyên của HBV có thể tạo ra đáp ứng của CTL, vượt qua được tình trạng dung nạp miễn dịch, tái hoạt hóa tế bào B. Tế bào Tregs góp phần đáng kể vào tình trạng dung nạp miễn dịch, có thể làm giảm tác dụng của interferon khi điều trị bệnh nhân. CTL chuyên biệt đối với HBcAg của HBV rất cần cho việc kiểm soát siêu vi, có thể hoạt hóa tế bào răng cưa nhưng không gây tổn thương gan. Vì vậy, ức chế tế bào Tregs và HBcAg là một bước tiếp cận nhiều tiềm năng trong miễn dịch trị liệu⁷.

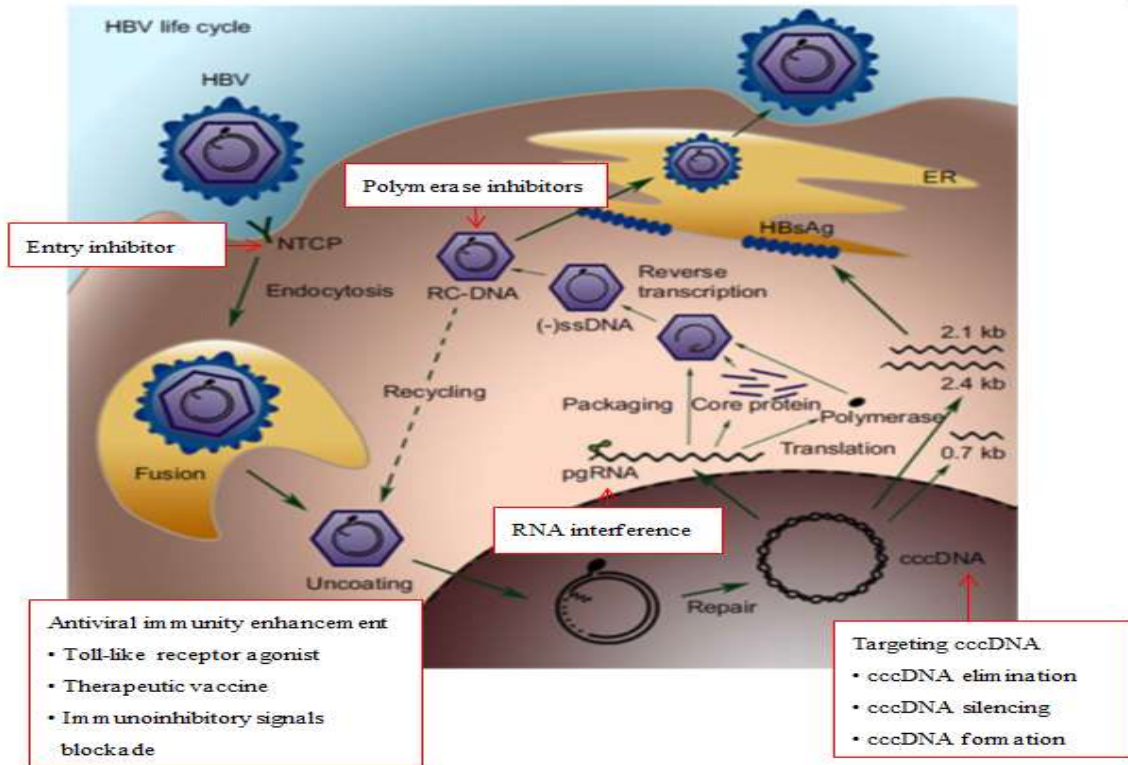


Hình 31 – Sơ đồ các bước tiếp cận để chữa khỏi bệnh VGSV B mạn tính (Loggi E, et al. *Chronic hepatitis B: Are we close to a cure. Digestive and Liver Disease* 2015;47:836=841)

Những hiểu biết của chúng ta khi tiên phong sử dụng miễn dịch trị liệu trong các bệnh ung thư sẽ có nhiều lợi ích khi ứng dụng vào điều trị VGSV B mạn tính, cũng có thể ung thư và VGSV B có cùng cơ chế: hoạt hóa tế bào T. Điều trị bắt đầu với inipilimumab, được FDA công nhận cho điều trị melanoma giai đoạn muộn. Sau đó nhiều loại PD1 và ức chế PD1 được thử nghiệm với nhiều công thức khác nhau ở nhiều loại ung thư. Đối với VGSV B, hiện nay chúng ta chưa có dữ kiện về điều trị này. Kháng thể anti-PD1 được đánh giá trong điều trị VGSV C cho kết quả rất khiêm tốn. Giá trị lâm sàng của các nghiên cứu này còn rất giới hạn vì số lượng bệnh nhân tham gia nghiên cứu còn quá ít và quan trọng là chỉ dùng có một liều anti-PD1. Biện pháp điều trị này sử dụng để chữa khỏi VGSV B hiện nay rất hấp dẫn vì tác dụng sinh học rất mạnh, nhiều lợi ích hơn các loại miễn dịch trị liệu khác, không đòi hỏi những thủ thuật xâm lấn, không có phản ứng chéo hay tác dụng phụ, đồng thời có thể tăng cường các đáp ứng đã có sẵn từ trước.

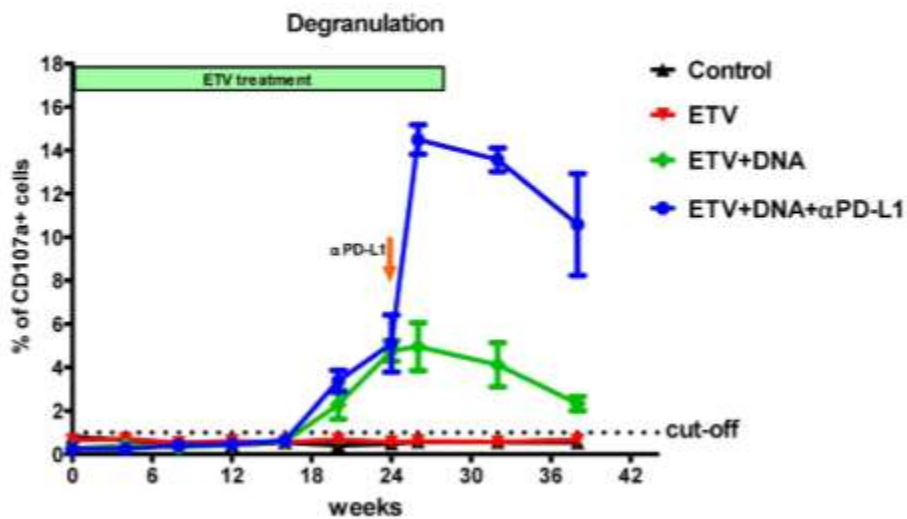
Miễn dịch trị liệu dựa vào kích thích đáp ứng miễn dịch mắc phải, nhưng một số nghiên cứu gần đây lại tập trung vào đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, xem đây là vai trò chủ yếu trong việc kiểm soát miễn dịch. Hoạt hoá miễn dịch bẩm sinh cũng có thể gây ra kích thích đáp ứng miễn dịch mắc phải.

Để chuyển đổi từ lý luận sang điều trị, nhiều nghiên cứu tập trung vào việc gây kích thích Toll-like receptors (TLRs). Điều hòa biểu hiện TLRs trên tế bào gan nhiễm HBV có thể là cơ chế lảng tránh miễn dịch (immune evasion). Sử dụng TLR agonist có thể tái tạo lại được chức năng miễn dịch. Gần đây, TLR7 agonist (GS-9620) được triển khai và có thể giảm nồng độ siêu vi lâu dài ở thú vật thí nghiệm. GS-9620 có thể là thuốc điều trị mới và đang được nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I/II.



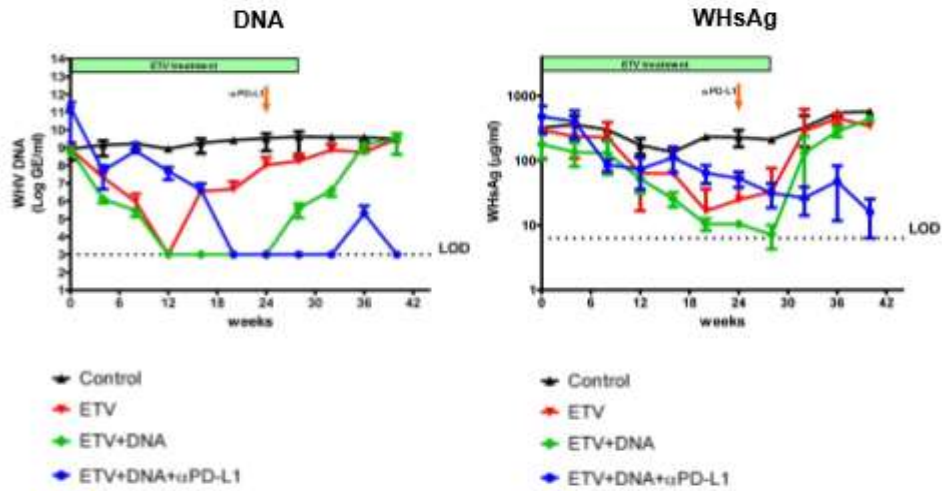
Hình 32 – Mô hình tăng sinh của HBV và cơ chế tác dụng của một số thuốc mới trong điều trị VGSV B mạn tính (Lin CL, et al. *Hepatitis B virus: new therapeutic perspectives. Liver International* 2016;36 (Suppl. S1):85-92)

In vivo PD-L1 blockade synergizes with therapeutic vaccination to enhance WHcAg-specific T cell immunity

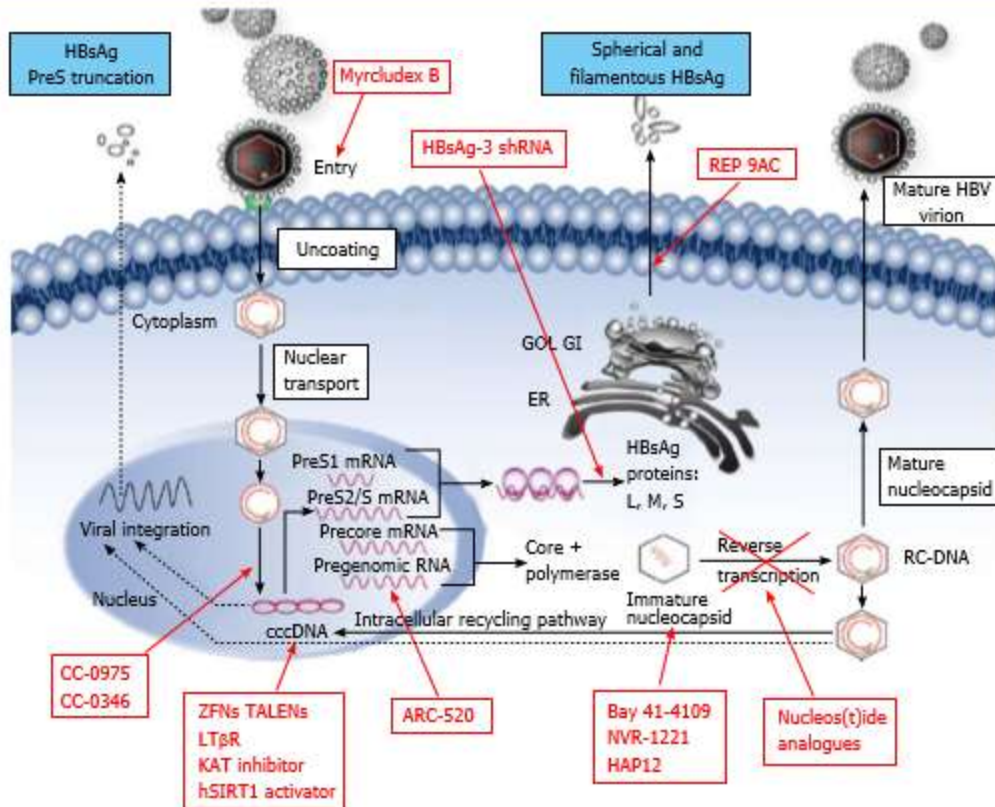


Hình 33 – Nghiên cứu thực nghiệm vai trò của NA và PD-L1 (Liu et al. *Plos Pathog* 2014;10:e1003856)

In vivo PD-L1 blockade synergizes with therapeutic vaccination to control WHV replication



Hình 34 – Nghiên cứu thực nghiệm vai trò của NA và PD-L1 (Liu et al. Plos Pathog 2014;10:e1003856)



Hình 35 – Các thuốc điều trị hiện nay và những thuốc còn đang thực nghiệm trong điều trị VGSV B mạn tính (Phyo WW, et al. Search for a cure for chronic hepatitis B infection: How close are we? World J Hepatol 2015;7:1272-1281)

KẾT LUẬN

Hiện nay, với các thuốc và phác đồ chống HBV được công bố, chưa có cách nào để chữa khỏi bệnh VGSV B. Vì vậy, phát triển thuốc mới và phương cách điều trị mới là những việc khẩn cấp. Nhiều người nghĩ rằng nếu chúng ta thực hiện được chương trình chủng ngừa phổ quát (giảm tỉ lệ mắc bệnh) và nghiên cứu thành công các phương cách điều trị mới có thể kiểm soát được hoàn toàn bệnh VGSV B trong một tương lai không xa.

Nhiều nỗ lực ở nhiều mức độ khác nhau đang tiến dần đến mục tiêu: tập trung vào cấu tạo của HBV, đánh giá khả năng của việc kích thích các đáp ứng miễn dịch. Hiện nay, điều trị bệnh VGSV B mạn tính vẫn chưa được cải thiện quan trọng so với nhiều năm trước đây (chỉ có interferon/peginterferon và NAs). Tuy nhiên, khi nghiên cứu kỹ và sâu rộng cho thấy những nhận định trên chưa hoàn toàn đúng, các thuốc này được tối ưu hóa dần, chắc chắn sẽ được cải thiện trong tương lai. Trong thời gian này, nghiên cứu và hiểu biết thêm về cấu trúc HBV được tiến hành cùng với những phát hiện về rối loạn miễn dịch, tất cả kết quả giúp chúng ta thiết kế những biện pháp mới để điều trị. Ngoài ra từ mô hình nghiên cứu điều trị nhiều bệnh nhiễm siêu vi và ung thư cung cấp cho chúng ta bài học để áp dụng vào điều trị bệnh VGSV B.

Để chữa khỏi bệnh VGSV B mạn tính bằng những biện pháp mới, vấn đề quan trọng là xác định kết điểm tiên phát. Nhưng mô hình nhiễm HBV rất phức tạp và các biện pháp mới phải đối mặt với nhiều vấn đề quan trọng. Muốn đơn giản hóa các vấn đề này, chúng ta phải biết chọn lựa cách tiếp cận: xác định mục tiêu tác dụng trực tiếp trên HBV cùng đáp ứng miễn dịch của ký chủ, tránh những tác dụng phụ nghiêm trọng làm rối loạn tình trạng dung nạp miễn dịch. Nếu muốn dùng kiểu điều trị phối hợp, chúng ta phải chọn những thuốc có tác dụng cộng thêm (additive) hoặc có tác dụng hợp đồng (synergistic) để chống lại HBV. Kiểu điều trị này đang được đánh giá trong các nghiên cứu lâm sàng gần đây. Phục hồi bảo tồn được đáp ứng miễn dịch có thể ức chế hoàn toàn hay từng phần tăng sinh siêu vi, làm giảm nồng độ kháng nguyên trong huyết thanh. Mặt khác, ức chế siêu vi cũng có thể ngăn chặn được các nhiễm trùng mới cho tế bào gan, nhưng loại bỏ hoàn toàn tế bào gan bị siêu vi lại không thực hiện được. Cả hai biện pháp này vẫn còn là thử thách trong việc chữa khỏi hoàn toàn bệnh VGSV B mạn tính. Theo nhiều chuyên gia, hướng điều trị khỏi bệnh VGSV B mạn tính trong tương lai có lẽ nên tích hợp cùng lúc ba biện pháp hỗ trợ bổ sung cho nhau, đó là tác động vào chu trình tăng sinh của HBV, triển khai ngăn chặn lan tỏa siêu vi bằng cách điều hòa miễn dịch và tấn công trực tiếp để loại trừ cccDNA.

Nhìn chung, cấu tạo HBV đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu thực nghiệm và sinh học phân tử, nhưng chức năng của từng thành phần trong tiến trình tăng sinh phát triển, cũng như trong diễn tiến cấp tính và kéo dài vẫn còn nhiều bí ẩn. Phát triển được phương tiện chẩn đoán, sử dụng nhiều thuốc điều trị nhưng kết quả chưa hoàn toàn mỹ mãn. Tuy nhiên, với những hiểu biết và kinh nghiệm trong những năm gần đây, các nghiên cứu đang và sẽ tiếp tục thực hiện để trả lời những bí ẩn của bệnh VGSV B.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lok ASF. Hepatitis B: 50 years after the discovery of Australia antigen. *Journal of Hepatitis* 2016;23:5-14
2. You CR, et al. Update on hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2014;20:13293-13305
3. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* 2015;479-480:672-686
4. Hadziyannis E. Quantification of HBsAg in serum: characteristics of the assays. *OA Hepatology* 2013 April 01;1(1):1
5. Koumbi L. Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection. *World J Hepatol* 2015;7:1030-1040
6. Bertoletti A, Rivino L. Hepatitis B: future curative strategies. *Current Opin Infect Dis* 2014;27:528-534
7. Lin CL, et al. Hepatitis B: new therapeutic perspective. *Liver International* 2016;36 (Supl. S1):85-92
8. Alaluf MB, Shloma A. New therapies for hepatitis B. *Liver International* 2016;36:775-782
9. Akbar SMF, Al-Mahtab M, Hiasa Y. Designing Immune Therapy for Chronic Hepatitis B. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:241-246
10. Lin CL, Tseng TC, Kao JH. What can we learn from hepatitis B virus clinical cohorts? *Liver Int* 2015;35 (Suppl.1):91-99
11. Bedossa P. Reversibility of hepatitis B virus cirrhosis after therapy: Who and Why? *Liver Int* 2015;35(Suppl.1):78-81
12. Vlachogiannakos J, Papatheodoridis GV. HBV: Do I treat my immunotolerant patients? *Liver Int.* 2016;36 (Suppl.S1):93-99
13. Loggi E, et al. Chronic hepatitis B: Are we close to a cure? *Digestive and Liver Disease* 2015;47:836-841
14. Hui CK, Lau GKK. Advances in immunomodulating therapy of HBV infection. *International Journal of Medical Sciences* 2005;2:24-29
15. Grimm D, Heeg M, Thimme R. Hepatitis B virus: from immunobiology to immunotherapy. *Clinical Science* 2013;124:77-85
16. Zhang E, et al. Current status of immunomodulatory therapy in chronic hepatitis B, fifty years after discovery of the virus: Search for the “magic bullet” to kill cccDNA. *Antiviral Research* 2015;123:193-203
17. Phyo WW, et al. Search for a cure for chronic hepatitis B infection: How close are we? *World J Hepatol* 2015;7:1271-1281
18. Chen J, et al. New insights into hepatitis B virus biology and implications for novel antiviral strategies. *Natural Science Review* 2015;2:296-313
19. Yapali S, Talaat N, Lok AS. Management of hepatitis B: Our Practice and how it relates to the Guidelines. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2014;12:16-26
20. Andreani T, Serfaty L, Mohand D, et al. Chronic hepatitis B Virus carriers in the immunotolerant phase of infection: histologic findings and outcome. *Clin Gastroenterol Heatol* 2007;5:636-641
21. Hui CK, Leung N, Yuen ST, et. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. *Hepatology* 2007;46:395-401
22. Lai M, Hyatt BJ, Curry M, Afdhal NH. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2007;47:760-767
23. Kumar M, et al. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently normal ALT. *Gastroenterology* 2008;134:1376-1384

24. Degertekin B, Lok A. Should liver biopsies be performed on all hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2008;135:1802
25. Chen YC, et al. Age-specific prognosis following spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010;51:435-444
26. Wong GL, et al. Clinical factors associated with liver stiffness in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:227-233
27. Iloeje UH, et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678-686
28. Cho JY, et al. Patients with chronic hepatitis B treated with oral antiviral therapy retain a higher risk for HCC compared with patients with inactive stage disease. *Gut* 2014;63:1943-1950
29. Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science* 1996;271:173-178
30. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216
31. Wu J, et al. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 2009;49:1132-1140
32. Dunn C, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promotes a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 2007;204:667-680
33. Zhang JY, et al. Hyper-activated pro-inflammatory and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Plos One* 2011;6:e17484
34. Murakami E, et al. Implication of efficient hepatic delivery by tenofovir alafenamide (GS-7340) for hepatitis B virus therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3563-3570
35. Agarwal K, et al. Twenty-eight day safety, antiviral activity, and pharmacokinetics of tenofovir alafenamide for treatment of chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2015;62:533-540
36. Yuen MF, et al. Two-year treatment outcome of chronic hepatitis B infection treated with besifovir vs. entecavir: Results from a multicentre study. *J Hepatol* 2015;62:526-532
37. Urban S, et al. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014;147:48-64