

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NCS. Đỗ Thị Trang

**NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA NHÓM GEN MÃ HÓA
DEUBIQUITINASE VÀ MỘT SỐ TÍN HIỆU PHÂN TỬ
TRÊN BỆNH NHÂN TĂNG HỒNG CẦU VÔ CĂN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – năm 2022

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NCS. Đỗ Thị Trang

**NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA NHÓM GEN MÃ HÓA
DEUBIQUITINASE VÀ MỘT SỐ TÍN HIỆU PHÂN TỬ TRÊN
BỆNH NHÂN TĂNG HỒNG CẦU VÔ CĂN**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. PGS.TS. Nguyễn Thị Xuân
2. TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân

Hà Nội – năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan mọi kết quả của luận án: “Nghiên cứu vai trò của nhóm gen mã hóa deubiquitinase và một số tín hiệu phân tử trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn” là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng nghiên cứu, cộng tác với các cộng sự khác. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước và quốc tế với sự đồng ý của các đồng tác giả khoa học. Bên cạnh đó, những kết quả còn lại trong luận án cũng chưa được tác giả nào công bố trong bất kỳ công trình khác. Nếu không đúng như các thông tin đã nêu trên, tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về các nội dung trong luận án của mình.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Nghiên cứu sinh

Đỗ Thị Trang

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Thị Xuân – Trưởng Phòng hệ gen học miễn dịch, TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân-Phòng Hệ gen học chức năng, Viện Nghiên cứu hệ gen, người thầy hướng dẫn tạo mọi điều kiện thuận lợi chia sẻ, giúp đỡ những khó khăn cùng tôi trong cả quá trình làm việc và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn đến Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, bộ phận đào tạo của Học viện đã luôn hỗ trợ và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi học tập và thực hiện luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen- GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng và các thầy cô, các anh chị ở Viện đã luôn chỉ bảo, hướng dẫn tận tình cho tôi trong các môn học cũng như phương pháp thực nghiệm và trình bày kết quả.

Trong thời gian học tập và nghiên cứu tại Viện Nghiên cứu hệ gen, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các bạn trong Phòng Hệ gen học miễn dịch đã luôn bên cạnh giúp đỡ và cổ vũ nhiệt tình để tôi hoàn thành tốt các thí nghiệm của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn đề tài Mã số: ĐTĐL.CN-43/21 thuộc Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Với tất cả lòng biết ơn, tôi xin gửi lời tri ân tới bố mẹ, những người thân trong gia đình đã luôn ủng hộ, động viên tinh thần tôi trong thời gian hoàn thành tốt luận án tiến sĩ của mình.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Nghiên cứu sinh

Đỗ Thị Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT DÙNG TRONG LUẬN ÁN	vi
DANH MỤC BẢNG	viii
DANH MỤC HÌNH	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1 Giới thiệu về bệnh tăng hồng cầu vô căn	5
1.1.1 Khái quát bệnh tăng hồng cầu vô căn	5
1.1.2 Một số nghiên cứu về kiểu hình miễn dịch trên bệnh tăng hồng cầu vô căn	6
1.1.3 Một số nghiên cứu về đột biến gen trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	7
1.2 Tế bào đơn nhân máu ngoại vi	10
1.2.1 Khái niệm và đặc điểm sinh học của tế bào đơn nhân máu ngoại vi	10
1.2.2 Chức năng của tế bào đơn nhân máu ngoại vi	13
1.2.3 Các marker sinh học liên quan đến quá trình apoptosis	14
1.2.4 Một số gen kiểm soát miễn dịch	15
1.2.5 Một số cytokine sử dụng trong nghiên cứu	19
1.2.6 Nghiên cứu sử dụng tế bào đơn nhân máu ngoại vi trên bệnh THCVC	22
1.3 Một số gen thuộc nhóm deubiquitinase và mối liên hệ với các tín hiệu phân tử ...	23
1.3.1 Protein A20	25
1.3.2 Protein Otubain-1	28
1.3.3 Protein CYLD	31
1.3.4 Protein Cezanne	36
1.3.5 Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước bệnh tăng hồng cầu vô căn	38
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	41
2.1 Vật liệu nghiên cứu	41
2.1.1 Đối tượng và tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân	41
2.1.2 Dụng cụ, trang thiết bị	43
2.1.3 Hóa chất sử dụng	43

2.2 Sơ đồ thí nghiệm	45
2.3 Phương pháp nghiên cứu.....	46
2.3.1 Xét nghiệm sinh hóa máu.....	46
2.3.2 Tách huyết tương	47
2.3.3 Tách chiết DNA và RNA	47
2.3.4 Khuếch đại gen (PCR)	48
2.3.5 Giải trình tự gen bằng kỹ thuật Sanger và phân tích dữ liệu	49
2.3.6 Tổng hợp cDNA.....	51
2.3.7 Real-Time PCR	51
2.3.8 Một số phương pháp tin sinh sử dụng trong luận án.....	53
2.3.9 Đưa siRNA vào trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	54
2.3.10 Phân lập và nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	54
2.3.11 Đếm tế bào theo dòng chảy	57
2.3.12 Xác định sự di cư tế bào.....	59
2.3.13 ELISA phân tích nồng độ cytokine.....	59
2.3.14 Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh	61
CHƯƠNG 3 : KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	62
3.1 Kết quả nghiên cứu trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	62
3.1.1 Chỉ số sinh hóa máu bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	62
3.1.2 Phân tích sự biểu hiện một số gen deubiquitinase trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	63
3.1.3 Mức độ biểu hiện một số gen tín hiệu trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn.....	64
3.1.4 Biểu hiện một số gen kiểm soát miễn dịch trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	66
3.1.5 Phân tích đột biến gen <i>JAK2</i> trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	67
3.1.6 Phân tích đột biến gen <i>CYLD</i> trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn.....	69
3.1.7 Phân tích đột biến gen <i>A20</i> trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn.....	73
3.1.8 Phân tích đột biến gen <i>Cezanne</i> trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	74
3.1.9 Kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	77
3.1.10 Sự tiết cytokine và kháng nguyên ung thư ở bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	80
3.2 Kết quả nghiên cứu trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	82
3.2.1 Kết quả phân lập và nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi	82

3.2.2 A20 điều hòa kiểu hình miễn dịch tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	84
3.2.3 A20 điều hòa sự tiết cytokine.....	85
3.2.4 A20 điều hòa sự di cư tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	86
3.2.5 Protein A20 điều hòa quá trình apoptosis tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	87
3.2.6 Otubain-1 điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	88
3.2.7 Otubain-1 điều hòa các sản phẩm cytokine	89
3.2.8 Otubain-1 điều hòa tín hiệu trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	90
CHƯƠNG 4: THẢO LUẬN	92
4.1 Đa hình và biểu hiện gen <i>deubiquitinase</i> , gen <i>JAK2</i> và kiểu hình miễn dịch trên bệnh tăng hồng cầu vô căn	92
4.2 Biểu hiện một số gen tín hiệu trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn.....	94
4.3 Vai trò gen <i>A20</i> điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	95
4.4 Vai trò gen <i>Otubain-1</i> điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi	97
CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	100
5.1 Kết luận	100
5.2 Kiến nghị	101
Tài liệu tham khảo.....	103
Phụ lục tài liệu.....	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT DÙNG TRONG LUẬN ÁN

Tên viết tắt	Tên đầy đủ tiếng anh	Nghĩa tiếng việt dùng trong luận án
AML	Acute myeloid leukemia	Bệnh bạch cầu tủy cấp
APC/C	Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome	Phức hợp xúc tiến kỳ sau
CA125	Cancer antigen 125	
CLL	Chronic myeloid leukemia	Bệnh bạch cầu lympho mãn tính
CML	Chronic myelogenous leukaemia	Bạch cầu dòng tủy mạn tính
CNL	Chronic neutrophilic leukaemia	Bạch cầu mạn dòng bạch cầu ái toan
DISC	Death-inducing signaling complex	Chuỗi phản ứng báo hiệu gây chết
DUB	Deubiquitinating enzyme	
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
ET	Essential thrombocythaemia	Tăng tiểu cầu tiên phát
FISH	Fluorescence in situ hybridization	Kỹ thuật sử dụng lai huỳnh quang tại chỗ
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Yếu tố kích thích bạch cầu hạt
HSCs	Hematopoietic stem cells	Tế bào gốc tạo máu
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium	
IRF	Interferon regulatory factor	Con đường điều hòa interferon
JAK	Janus kinase	Janus kinases yếu tố truyền tín hiệu nội bào
JAK	Janus kinase	Janus kinases yếu tố truyền tín hiệu nội bào
MALT1	Mucosa-associated lymphoid tissue	Mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc 1
MPNs	Myeloproliferative neoplasms	Tăng sinh tủy ác tính

NF- κ B	Nuclear factor- κ B	Yếu tố phiên mã NF- κ B
NK	Natural Killer	Tế bào diệt tự nhiên
OD	Optical Density	Đo mức độ hấp thụ quang
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Tế bào đơn nhân máu ngoại vi
Ph	Philadelphia	
PM	Primary myelofibrosis	Xơ tủy nguyên phát
RBC	Red blood cell	Tế bào hồng cầu
RIP1	Receptor-interacting protein 1	
SNP	Single nucleotide polymorphism	Đa hình nucleotide
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Yếu tố hoạt hóa phiên mã
TBT	Dendritic Cell	Tế bào tua
T-CD4 ⁺	Helper T cells	Tế bào T trợ giúp
T-CD8 ⁺	Helper T cells	Tế bào T độc
THCVC	<i>Polycythemia vera</i>	Tăng hồng cầu vô căn
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	Protein kích thích yếu tố hoại tử khối u 3
TNF- α	Tumor Necrosis Factors alpha	Yếu tố hoại tử khối u
TRAF	TNF Receptor-Associated Factors	
UV	Ultra violet	Tia cực tím
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần tế bào trong máu người.....	12
Bảng 1.2. Một số con đường Otubain-1 liên quan.....	31
Bảng 2.1. Các cặp môi đặc hiệu cho phản ứng PCR	48
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR.....	49
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR giải trình tự.....	50
Bảng 2.4. Trình tự môi được sử dụng trong nghiên cứu.....	52
Bảng 3.1. Tỷ lệ bệnh nhân THCVC có chỉ số xét nghiệm sinh hóa máu cao hơn bình thường	62
Bảng 3.2. Sự phân bố kiểu gen của SNP <i>JAK2</i> ^{V617F} ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.....	68
Bảng 3.3. So sánh tần số kiểu gen của gen <i>JAK2</i> ^{V617F} giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.....	68
Bảng 3.4. Sự phân bố kiểu gen của các SNP trên gen <i>CYLD</i> ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.....	70
Bảng 3.5. So sánh tần số kiểu gen của các gen <i>CYLD</i> giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.....	71
Bảng 3.6. Ảnh hưởng gây bệnh THCVC của SNP c.2483 + 6 T> G. Dự đoán bởi chương trình phần mềm SD-Score (A) hoặc MaxEntScan (B).....	72
Bảng 3.7. Sự phân bố kiểu gen của các SNP trên gen <i>A20</i> ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.....	74
Bảng 3.8. So sánh tần số kiểu gen của các gen <i>A20</i> giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.....	74
Bảng 3.9. SNP của các gen <i>Cezanne</i> ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng	75
Bảng 3.10. So sánh tần số kiểu gen của <i>Cezanne</i> giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.....	76
Bảng 3.11. Danh sách bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn.....	1
Bảng 3.12. Danh sách người khỏe	3

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Tế bào ác tính trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn	5
Hình 1.2. Quá trình truyền tín hiệu của protein JAK2 [24]	9
Hình 1.3. Các nhóm tế bào máu và tế bào máu ngoại vi [29].....	11
Hình 1.4. Quá trình trưởng thành và biệt hóa của tế bào gốc tạo máu [28].....	13
Hình 1.5. Các điểm thụ thể kiểm tra miễn dịch và phối tử tương ứng của chúng [38]	16
Hình 1.6. Vai trò của một số gen deubiquitinase [101]	26
Hình 1.7. Hoạt động độc lập và phụ thuộc của protein Otubain-1 [118].....	29
Hình 2.1. Phân lập tế bào PBMC sử dụng Ficoll	55
Hình 3.1. Mức độ biểu hiện gen của gen <i>DUB</i> ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng	64
Hình 3.2. Mức độ biểu hiện của các gen tín hiệu phân tử <i>STAT</i>	65
Hình 3.3. Biểu hiện gen <i>SHP1</i> và <i>SHP2</i> trên bệnh nhân THCVC.....	65
Hình 3.4. Biểu hiện gen <i>Kltho</i> , <i>LAG3</i> , <i>CTLA4</i> , <i>PDI</i> trên bệnh nhân THCVC.....	66
Hình 3.9. So sánh trình tự amino acid tại vị trí p.W736G trong protein <i>CYLD</i>	72
Hình 3.10. Điểm đa hình của gen <i>A20</i> ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng	73
Hình 3.11. Điểm đa hình của <i>Cezanne</i> ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng	75
Hình 3.12. Mối liên hệ giữa SNP W736G và 9 SNP khác trong gen <i>CYLD</i> trên bệnh nhân THCVC	77
Hình 3.13. Hình dot blot của những tế bào CD11b ⁺ và tế bào T CD4 trên bệnh nhân THCVC.	78
Hình 3.14. Biểu đồ biểu hiện về tỷ lệ phần trăm các loại tế bào trên bệnh nhân THCVC so với mẫu đối chứng.	78
Hình 3.17. Kết quả đo nồng độ IL-6, TNF- α , IL-1 β bằng phương pháp ELISA.....	81
Hình 3.18. Kết quả đo nồng độ CA125 bằng phương pháp ELISA.	82
Hình 3.19. Phân lập PBMC bằng phương pháp ly tâm phân lớp theo tỷ trọng.	83
Hình 3.20. Tế bào PBMC được quan sát dưới kính hiển vi (40x)	83
Hình 3.21. Kiểu hình miễn dịch của PBMC khi bất hoạt gen <i>A20</i>	85
Hình 3.22. Kết quả giải phóng các cytokine từ PBMC được bất hoạt gen <i>A20</i>	85
Hình 3.23. Sự di chuyển của tế bào PBMC khi được bất hoạt gen <i>A20</i>	86
Hình 3.24. Phân tích khả năng sống sót của PBMC dưới ảnh hưởng của gen <i>A20</i>	87
Hình 3.25. Ảnh hưởng của <i>Otubain-1</i> đến hoạt động và sự chết apoptosis của PBMC.....	88
Hình 3.26. Kết quả giải phóng các cytokine từ tế bào PBMC bất hoạt gen <i>Otubain-1</i>	90
Hình 3.27. Ảnh hưởng của <i>Otubain-1</i> đến con đường tín hiệu trong PBMC.....	91

MỞ ĐẦU

Bệnh đa hồng cầu hay bệnh tăng hồng cầu vô căn (THCVC) là một trong những bệnh tăng sinh tủy dòng ác tính (Myeloproliferative neoplasms - MPNs) không xảy ra hiện tượng trao đổi đoạn trên nhiễm sắc thể -Philadelphia, đặc trưng bởi sự biến đổi bất thường của các tế bào gốc tủy xương sinh máu, gây ra sự tăng sinh đột biến các tế bào máu như bạch cầu, hồng cầu và tiểu cầu, đặc biệt là sự gia tăng về số lượng hồng cầu. Lượng tế bào hồng cầu cao bất thường dẫn đến giảm tốc độ lưu thông trong mạch máu, tăng nguy cơ đông máu. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra đột biến V617F thuộc gen *JAK2* (rs77375493) chịu trách nhiệm cho phần lớn số ca mắc phải căn bệnh trên và gây tăng khả năng phosphoryl hóa của *JAK2*. Hơn 90% trường hợp bệnh nhân đa hồng cầu có liên quan đến đột biến này. Nguyên nhân khác dẫn đến THCVC có thể là do biểu hiện bất thường của một số gen chức năng và gen tín hiệu ảnh hưởng đến hoạt động sinh học của các tế bào miễn dịch. Đến nay nguyên nhân của bệnh THCVC vẫn chưa được xác định rõ ràng cụ thể.

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC- Peripheral blood mononuclear cells) bao gồm nhiều loại tế bào miễn dịch khác nhau như: tế bào lympho, tế bào NK, tế bào tua và bạch cầu đơn nhân. Tế bào PBMC có chức năng chuyên biệt cao, đóng vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch giúp cơ thể chống lại những tác nhân bên ngoài và giữ cho cơ thể khỏe mạnh. Các nhà khoa học hiện nay đã nghiên cứu và sử dụng liệu pháp miễn dịch tế bào tua (TBT) cho điều trị một số bệnh ung thư như: ung thư tuyến mật, ung thư tuyến tụy, ung thư buồng trứng và ung thư phổi đã đạt được thành công nhất định. Liệu pháp tế bào diệt tự nhiên (NK) đang nổi lên như một lĩnh vực nghiên cứu đầy hứa hẹn, một số nhóm nghiên cứu đã xác nhận về thuốc kháng u hoạt động của tế bào NK ở bệnh nhân bạch cầu tủy cấp. Vai trò của tế bào T điều hòa cũng được nghiên cứu trong quá trình sinh bệnh và điều trị ung thư tuyến tiền liệt. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo rằng hoạt động của tế bào T điều hòa có liên quan trực tiếp đến các bệnh khác nhau như nhiễm trùng mãn tính và ung thư.

Nhóm gen mã hóa deubiquitinase (DUB) bao gồm các gen *A20*, *Otubain-1*, *CYLD*, *Cezanne* đóng vai trò quan trọng trong việc khử protein bằng cách phân cắt chuỗi polyubiquitin của chúng. Vai trò của nhóm gen DUB rất đa dạng, ngoài chức năng khử nó còn tham gia điều hòa sự phát triển của khối u và đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo máu, tạo hồng cầu và các bất thường liên quan. Chuột bất hoạt gen

A20 và *CYLD* làm tăng biểu hiện hoạt động các tín hiệu phân tử như NF- κ B và STAT. Nghiên cứu về miễn dịch đã chỉ ra rằng, gen *A20* và *CYLD* tham gia ngăn chặn phản ứng viêm và sự xâm nhập của bạch cầu tới vị trí viêm, do đó chúng liên quan đến sự phát triển các bệnh ung thư. Tương tự như gen *A20* và *CYLD*, gen *Cezanne* ức chế tín hiệu NF- κ B bằng cách liên kết chuỗi K63-polyubiquitin và sự bất hoạt *Cezanne* có liên quan đến sự tiến triển và tiên lượng xấu trong ung thư biểu mô tế bào gan. *Cezanne* cũng tham gia làm tăng sự tiến triển của khối u trong ung thư biểu mô vảy phổi và ung thư biểu mô tuyến. Gen *Otubain-1* mã hóa cho protein khối u buồng trứng Otubain-1, nó tham gia tách chuỗi ubiquitin từ phân tử TRAF (TNF Receptor-Associated Factors). Otubain-1 đóng vai trò quan trọng trong sự khởi đầu và phát triển ung thư. Gần đây, vai trò của *Otubain-1* trong điều hòa một số con đường liên quan đến ung thư cũng bắt đầu được nghiên cứu rộng rãi. Một số nghiên cứu chứng minh rằng, *Otubain-1* tham gia vào điều hòa các quá trình apoptosis, kháng trị liệu, tăng sinh, di cư và xâm lấn ở một số loại ung thư.

Đề tài sử dụng tế bào đơn nhân máu ngoại vi PBMC từ người tình nguyện hiến máu khỏe mạnh và bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn để xác định biểu hiện/ đa hình của nhóm gen DUB, kiểu hình miễn dịch và một số tín hiệu phân tử liên quan cùng với việc xác định chức năng của một số gen như gen *Otubain-1* và gen *A20* tham gia điều hòa hoạt động tế bào PBMC, từ đó góp phần hiểu biết hơn về ảnh hưởng của nhóm gen DUB trên, ứng dụng trong phối hợp chẩn đoán và điều trị bệnh THCVC và một số bệnh máu ác tính khác.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chỉ ra rằng bệnh nhân THCVC có các gen DUB bao gồm gen *A20*, *CYLD* và *Cezanne* biểu hiện bất hoạt và nồng độ các cytokines IL6, TNF- α tăng cao cũng như tăng số lượng tế bào CD25⁺ CD4 T, Th1 và tế bào T điều hòa trong máu tuần hoàn. Phân tích di truyền của gen *CYLD* đã xác định được 11 SNP, trong đó có SNP W736G chưa được biết đến trước đó, SNP này thuộc exon 15 và có nhiều khả năng gây bệnh. Kết quả của nghiên cứu đóng góp quan trọng hiểu biết thêm về thành phần của tế bào miễn dịch thay đổi trong máu tuần hoàn của bệnh nhân THCVC, đặc biệt là số lượng tế bào T điều hòa tăng cao là một bất lợi cho đáp ứng miễn dịch của bệnh nhân. Sự thay đổi thành phần các loại tế bào miễn dịch, có thể là kết quả từ ảnh hưởng không nhỏ của các gen chức năng điều hòa hoạt động tế bào miễn dịch như gen *A20*, *CYLD* và *Cezanne* khi biểu hiện của chúng thấp hơn so

với bình thường. Những gen này tham gia ức chế phản ứng viêm và ngăn chặn hoạt động quá mức của tế bào miễn dịch. Vì thế, biểu hiện của những gen này bị bất hoạt có thể là một trong những nguyên nhân gây ra số lượng tăng của các loại tế bào CD4 T, Th1 và T điều hòa trong máu tuần hoàn bệnh nhân. Dựa vào kết quả nghiên cứu này, chúng tôi có cơ sở khoa học để có những nghiên cứu sâu hơn về cơ chế điều hòa của các gen DUB, đặc biệt là gen *CYLD*, đến hoạt động hệ miễn dịch của bệnh nhân THCVC, từ đó có thể tiến tới nghiên cứu ứng dụng trong điều trị kết hợp với điều trị gen đích bệnh nhân THCVC.

Luận án được thực hiện với các mục tiêu như sau:

1. Xác định vai trò của gen *A20* và gen *Otubain-1* điều hòa chức năng sinh học tế bào PBMC bao gồm sự thuần thực, sự biệt hóa và sự chết apoptosis.
2. Xác định mức độ biểu hiện mRNA/đa hình của một số gen mã hóa deubiquitinase, gen tín hiệu liên quan và kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân THCVC và người khỏe mạnh.

Nội dung nghiên cứu của luận án:

Đối tượng nghiên cứu là 77 bệnh nhân THCVC và 55 mẫu người khỏe mạnh, sử dụng phương pháp real-time PCR xác định mức độ biểu hiện gen thuộc nhóm DUB bao gồm (*A20*, *Otubain-1*, *Otubain-2*, *CYLD*, *Cezanne*), gen kiểm soát miễn dịch (*Klotho*, *LAG3*, *CTLA4* và *PDI*) và gen tín hiệu phân tử liên quan *SHP-1*, *SHP-2*, *IkB- α* , *STAT-1*, *STAT-3*, *STAT-5*, *STAT-6*. Một số gen DUB được xác định có biểu hiện bất thường được kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger nhằm xác định các đa hình/biến thể gen trên bệnh nhân THCVC. Phân tích kiểu hình miễn dịch của bệnh nhân THCVC bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào dòng chảy và ELISA.

Tế bào PBMC được phân lập bằng phương pháp ly tâm tỷ trọng Ficoll từ 150ml mẫu máu của người tình nguyện hiến máu. Xử lý tế bào PBMC với siRNA-*A20* và siRNA-*Otubain-1* để bất hoạt 2 gen *A20* và *Otubain-1*, từ đó xác định vai trò của hai gen này điều hòa chức năng sinh học của tế bào PBMC bao gồm sự thuần thực, sự biệt hóa, tiết cytokine, di cư và sự chết apoptosis và các tín hiệu phân tử liên quan. Tế bào sau khi xử lý được tách RNA và chuyển cDNA sau đó tiến hành kiểm tra mức độ biểu hiện của các gen tín hiệu phân tử liên quan bao gồm (*SHP-1*, *SHP-2*, *IkB- α* , *STAT-1*, *STAT-3*, *STAT-5*, *STAT-6*). Dịch huyền phù thu được dùng để kiểm tra nồng độ các cytokine bằng phương pháp ELISA. Hoạt động sinh lý của tế bào PBMC thay đổi dưới

ảnh hưởng bất hoạt của gen *A20* và *Otubain-1* được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào dòng chảy.

Những đóng góp mới của luận án:

Bệnh nhân THCVC có hai SNP p.W736G, c.2483 + 6 T> G thuộc gen *CYLD* được dự đoán là có khả năng liên quan đến bệnh. Đặc biệt, bệnh nhân THCVC mang SNP p.W736G có nhiều SNP trong *CYLD*, nhưng không có SNP trong gen *A20* hoặc *Cezanne*.

Bệnh nhân THCVC có biểu hiện bất hoạt các gen *A20*, *CYLD*, *Cezanne* và *Klotho*; nồng độ IL-6 và TNF- α tăng cao; số lượng tế bào T hoạt hóa CD25⁺CD4⁺, tế bào Th1 và tế bào T điều hòa tăng lên đáng kể so với người khỏe.

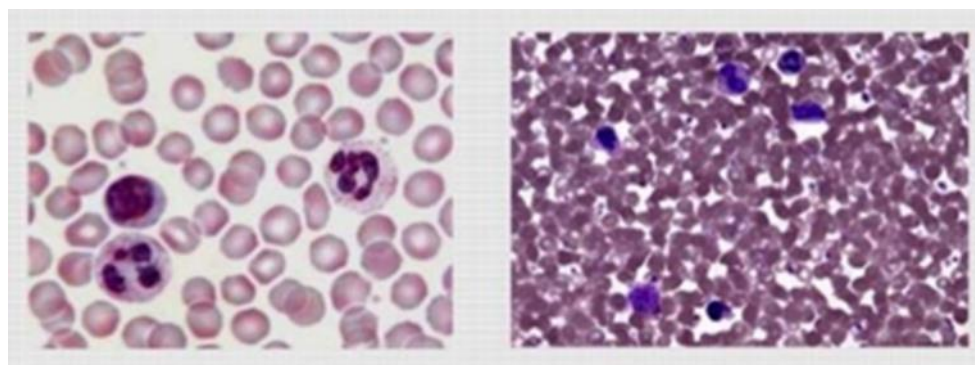
Gen *A20* ức chế hoạt động của tế bào T, B và tủy bào (CD11b⁺CD40⁺, CD3⁺CD25⁺ và CD19⁺CD25⁺), sự tiết TNF- α , IL-1 β và sự di chuyển của tế bào PBMC. Gen *Otubain-1* ức chế hoạt động của tế bào NK (CD56⁺ CD44⁺) và biểu hiện của gen tín hiệu *SHP1* và *STAT6*.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Giới thiệu về bệnh tăng hồng cầu vô căn

1.1.1 Khái quát bệnh tăng hồng cầu vô căn

Bệnh tăng hồng cầu vô căn (Polycythaemia vera- PV) là bệnh ung thư máu thuộc nhóm bệnh tăng sinh tủy ác tính (Myeloproliferative neoplasms- MPNs), đặc trưng bởi sự tăng sinh quá mức các tế bào dòng tủy trưởng thành và chưa trưởng thành. Sự tăng sinh quá mức các tế bào dòng tủy dẫn tới sự tăng sinh vượt mức của các tế bào máu bao gồm: hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) bệnh tăng sinh tủy được phân làm 6 loại bệnh bao gồm: bệnh đa hồng cầu hay còn gọi là bệnh THCVC, tăng tiểu cầu tiên phát (essential thrombocythaemia- ET) và xơ tủy nguyên phát (primary myelofibrosis- PM) được phân loại cùng với bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (chronic myelogenous leukaemia- CML), bạch cầu mạn dòng bạch cầu trung tính và bạch cầu mạn dòng bạch cầu ái toan (chronic neutrophilic leukaemia- CNL) [1]. Tăng sinh tủy là nhóm bệnh phát triển chậm trong đó mỗi loại bệnh trong nhóm đều ảnh hưởng tới nhiều loại tế bào máu khác nhau. Ba trong số các bệnh tăng sinh tủy bao gồm THCVC, tăng tiểu cầu nguyên phát và xơ tủy nguyên phát có đặc điểm chung là không chứa nhiễm sắc thể Philadelphia (Ph) là nhiễm sắc thể số 22 có chứa tổ hợp gen *BCR-ABL1* [2].



Bình thường

THCVC

Hình 1.1. Tế bào ác tính trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

(<https://www.slideshare.net/rumanahameed1/polycythemia-vera-rumana>)

Bệnh THCVC là bệnh phổ biến nhất trong nhóm bệnh tăng sinh tủy với đặc điểm là sự tăng lên bất thường của số lượng tế bào hồng cầu (Hình 1.1). Đây là bệnh phát sinh trong quá trình rối loạn hình thành tế bào gốc tạo máu, tuy nhiên ban đầu

bệnh có thể có những biểu hiện như tăng hồng cầu, tăng bạch cầu và tăng tiểu cầu hay sự kết hợp của các triệu chứng trên với lách to hay xơ tủy nguyên phát [3]. Tại Hoa Kỳ, báo cáo dịch tễ năm 2014 cho thấy có 148.000 người đang mắc bệnh THCVC với tỷ lệ rơi vào khoảng 2,5-10 người/ 100.000 [2]. Bệnh THCVC là bệnh có tỷ lệ mắc và sống sót sau 5 năm phụ thuộc vào độ tuổi. Ở Châu Âu, số liệu thống kê từ những năm 1995 đến 2002 cho thấy, tỷ lệ sống sót sau 5 năm của THCVC là 84,8% (81,5–87,5%) và tỷ lệ sống sót tương đối giảm xuống còn 79,4% ở những người 70 tuổi [4]. Đến thời điểm hiện tại các nhà khoa học vẫn chưa có sự đồng thuận trong chẩn đoán và điều trị chứng bệnh THCVC [5, 6].

1.1.2 Một số nghiên cứu về kiểu hình miễn dịch trên bệnh tăng hồng cầu vô căn

Bệnh THCVC được đặc trưng bởi sự dư thừa hồng cầu và sự tham gia chủ yếu của dòng hồng cầu với sự tăng sinh ấy có thể thay đổi các dòng megakaryocytic hoặc bạch cầu hạt [7]. Năm 2015, nghiên cứu trên 20 bệnh nhân dương tính với $JAK2^{V617F}$ trong đó 14 bệnh nhân mắc bệnh THCVC và 6 bệnh nhân mắc bệnh tăng tiểu cầu tiên phát (ET) đã chỉ ra rằng, interferon- α thay đổi rõ rệt số lượng tế bào T điều hòa ($CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$), tế bào NK và tế bào DC [8]. Nghiên cứu khác chỉ ra rằng tỷ lệ tế bào NK tăng lên ở bệnh nhân THCVC so với nhóm khỏe mạnh, mặc dù khả năng gây độc tế bào của tế bào NK ở bệnh nhân THCVC so với người khỏe mạnh là tương tự nhau [9]. Bệnh nhân THCVC có số lượng tăng các tế bào T $CD8^+$ nhớ cùng với sự biểu hiện của phân tử MHC-1 trên bề mặt tế bào giảm đi, chính vì thế khả năng tiêu diệt tế bào ung thư bị giảm đi đáng kể [10].

Đột biến $JAK2^{V617F}$ được phát hiện trong tất cả các tế bào dòng tủy và một số ít tế bào dòng lympho. Điều này đã đặt ra câu hỏi cho các nghiên cứu trên bệnh THCVC rằng liệu đột biến này có tần suất xảy ra khác biệt trên tế bào dòng lympho và dòng tủy hay không? Nghiên cứu về sự hiện diện của đột biến $JAK2^{V617F}$ trong các tế bào máu ngoại vi từ bệnh THCVC đã phát hiện ra rằng đột biến $JAK2^{V617F}$ trong tế bào B và NK xảy ra ở một số ít bệnh nhân mắc bệnh THCVC. Bên cạnh đó, đột biến $JAK2^{V617F}$ cũng được phát hiện trong tất cả các tế bào T có nguồn gốc từ tế bào $CD34^+$ bệnh THCVC [11]. Ngoài ra, nghiên cứu

trên tế bào NK từ chuột đột biến $JAK2^{V617F}$ đã chỉ ra rằng, tế bào NK trên chuột đột biến có khả năng tăng sinh và hoạt hóa thấp hơn so với tế bào NK kiểu dại. Ngoài ra, tế bào NK từ chuột đột biến $JAK2^{V617F}$ thiếu khả năng điều hòa miễn dịch, do đó hoạt động của hệ miễn dịch trong những con chuột này không bình thường [13].

Tiếp đó, sự thay đổi biểu hiện một số gen như gen *CASP2*, *CASP3*, *DAPK1*, *ALG2* của tế bào $CD34^+$ từ tủy xương của bệnh nhân THCVC đã được chỉ ra liên quan đến sự phát triển ác tính của tế bào gốc tạo máu trong bệnh THCVC. Trong số các gen thay đổi biểu hiện, gen quy định các yếu tố tăng trưởng kích thích xơ hóa (TGF- β 1, TGF- β 2, BMP-2 và VEGF) được biểu hiện ở mức cao hơn đáng kể trong các tế bào $CD34^+$ trong bệnh THCVC [12].

1.1.3 Một số nghiên cứu về đột biến gen trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Nhiều nghiên cứu ở cấp độ phân tử trên những bệnh nhân THCVC để có thể hiểu thêm về cơ chế bệnh sinh, từ đó tìm ra được phương pháp trị liệu phù hợp. Nghiên cứu ở cấp độ phân tử đã cho thấy một số kết quả về các đột biến gen xuất hiện trong bệnh THCVC. Hầu hết các bệnh nhân THCVC đều cho thấy sự xuất hiện của đột biến trên gen *JAK2* và đó chính là đột biến $JAK2^{V617F}$ [14]. Đột biến $JAK2^{V617F}$ được coi là một marker cho việc chẩn đoán và điều trị bệnh THCVC. Kiểm tra đột biến $JAK2^{V617F}$ được cho là cần thiết cho việc xác định và chẩn đoán sớm từ giai đoạn 1 của bệnh THCVC. Năm 2003 Bench và cộng sự đã đưa ra hướng dẫn riêng cho việc chẩn đoán chứng THCVC bằng việc xét nghiệm đột biến $JAK2^{V617F}$ [15].

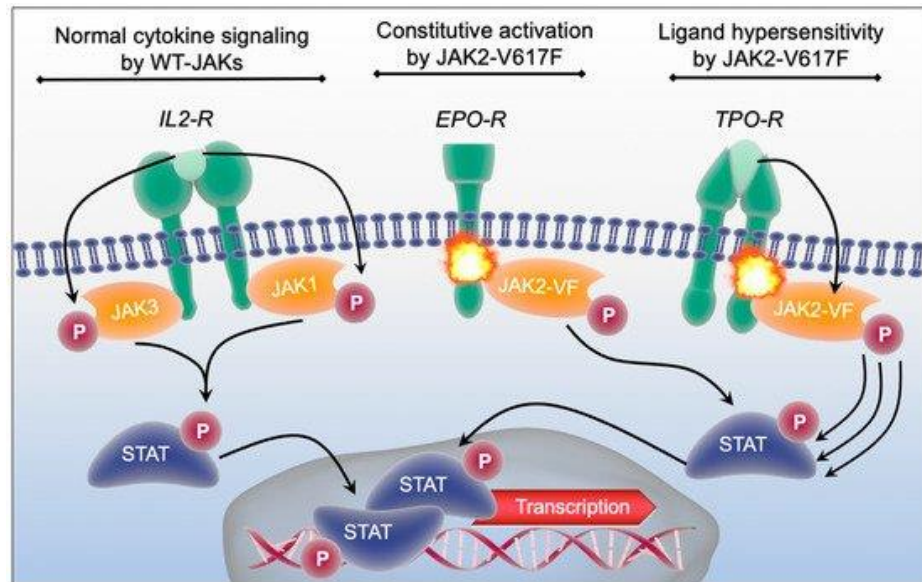
Ngoài đột biến $JAK2^{V617F}$, ở những bệnh nhân THCVC trên gen *JAK2* cũng nhận thấy xuất hiện đột biến trên exon số 12. Không giống như đột biến $JAK2^{V617F}$ xuất hiện ở hầu hết các bệnh nhân THCVC, đột biến trên exon số 12 của gen này chỉ nhận thấy ở 2% đến 3% các bệnh nhân THCVC. Tuy nhiên so với đột biến $JAK2^{V617F}$, đột biến trên exon 12 của gen *JAK2* có xu hướng trẻ hơn với nồng độ hemoglobin cao hơn, số lượng bạch cầu và tiểu cầu thấp hơn cùng với sự gia tăng hồng cầu mà không có bất thường về hình thái bạch cầu hạt [16].

Bên cạnh đột biến trên gen *JAK2*, các đột biến trên gen Calretaculin (*CALR*) cũng được nghiên cứu và báo cáo ở trên những bệnh nhân THCVC. *CALR* nằm ở vị trí chromosome 19p13.2 và chứa 9 exon kéo dài 4,2 kb. Nghiên cứu trên đối tượng là chuột cho thấy, chuột bị loại bỏ *CALR* thường chết trước khi được sinh ra. Chuột mất gen *CALR* sẽ bị suy tim hoặc tim chậm phát triển. Bên cạnh đó, nếu gen *CALR* biểu hiện quá mức cũng dẫn tới sự khiếm khuyết về tim sau khi sinh [17]. *CALR* có vai trò quan trọng và được cho là tham gia vào quá trình cân bằng Ca^{2+} nội môi, giúp phân giải các protein được sản xuất lỗi, bám dính tế bào, đáp ứng miễn dịch ung thư và thực bào. Bất thường của biểu hiện *CALR* đã được báo cáo trong các bệnh ung thư khác nhau [18]. Nghiên cứu của Misa Imai và cộng sự năm 2013 đã báo cáo đột biến *CARL* mới (mất và chèn ở exon 9) và *JAK2* ở bệnh tăng tiểu cầu nguyên phát. Trong tăng tiểu cầu nguyên phát, đột biến gen *CALR* có mức độ huyết sắc tố thấp hơn, số lượng bạch cầu thấp hơn, số lượng tiểu cầu cao hơn và khả năng sống sót tốt hơn so với đột biến trên gen *JAK2* [19]. Cho đến nay, tất cả các đột biến *CARL* được tìm thấy trong tăng sinh tủy đều liên quan đến exon 9. Đột biến gen *CALR* hiếm khi xuất hiện ở bệnh THCVC còn đột biến gen *MPL* thì gần như không có.

Kể từ khi được miêu tả vào năm 1892 đến nay, hơn 125 năm đã qua nhưng nguyên nhân về bệnh tăng hồng cầu vô căn vẫn chưa hoàn toàn được sáng tỏ [20]. Bệnh THCVC được cho rằng xuất hiện do sự rối loạn trong quá trình hình thành các tế bào máu. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để tìm ra cơ chế hình thành bệnh THCVC. Kết quả của nhiều nghiên cứu đưa ra cho thấy đột biến của gen *JAK* là một trong những nguyên nhân dẫn tới THCVC. Đột biến gen *JAK2-V617F* gây tăng khả năng phosphoryl hóa của *JAK2*, dẫn tới tăng sinh quá mức của các tế bào dòng tủy [21]. Trên 90% người mắc bệnh đa hồng cầu nguyên phát đều có đột biến này. Nghiên cứu di truyền tế bào và đột biến gen *JAK2* cho thấy các bất thường về di truyền tế bào trong THCVC không phải là biểu hiện đặc hiệu khi chưa tới 25% số bệnh nhân có bất thường về di truyền tế bào [21].

Sự bất thường trong kiểu nhân (karyotypic) thường gặp nhất ở những bệnh nhân mắc THCVC là mất đoạn 20q, trisomies 8 và 9, tuy nhiên tỷ lệ phát hiện gần như không đáng kể khi đánh giá bằng kỹ thuật sử dụng lai huỳnh quang tại chỗ (FISH-Fluorescence in situ hybridization). Tương tự, các nghiên cứu dựa trên kỹ thuật FISH

trong các tế bào tủy xương từ những bệnh nhân THCVC, với karyotype bình thường không cho thấy sự mất đoạn liên quan đến vùng nhiễm sắc thể 20q11 khi quan sát dưới kính hiển vi [22]. Nhiễm sắc thể 9p24 chứa gen *JAK2*, gần đây đã được chứng minh là mang đột biến điểm V617F soma ở exon 14 xuất hiện trong phần lớn bệnh nhân mắc bệnh THCVC [23].



Hình 1.2. Quá trình truyền tín hiệu của protein JAK2 [24]

JAK (Janus kinases) là một họ protein truyền tín hiệu nội bào bao gồm bốn thành viên: JAK1, JAK2, JAK3 và Tyk2. JAK được kích hoạt khi xảy ra sự gắn của phối tử với các thụ thể trung gian. Thông qua quá trình gắn của phối tử và thụ thể này làm thay đổi cấu trúc không gian của thụ thể truyền tin, hai protein JAK tiếp tục được đưa đến gần nhau, cho phép phosphoryl hóa giữa hai protein JAK và hoạt hóa phân tử JAK. Các protein JAK được kích hoạt sau đó phosphoryl hóa các mục tiêu bổ sung, bao gồm cả các thụ thể và các protein STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) là protein hoạt hóa phiên mã (Hình 1.2). Các protein JAK ảnh hưởng đến việc sản xuất máu từ các tế bào sinh máu tủy xương thông qua việc truyền tín hiệu nội bào. Hoạt động của protein JAK tham gia vào kiểm soát số lượng tế bào hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu được sản sinh trong quá trình tạo máu. Khi protein JAK hoạt hóa quá mức dẫn tới truyền tín hiệu quá mức ở tủy xương gây ra việc tăng sản xuất tế bào máu bất thường. Quá trình này được gọi là hiện tượng “JAK truyền tín hiệu hoạt hóa quá mức”. Nguyên nhân của việc JAK hoạt hóa quá mức trong bệnh THCVC chưa

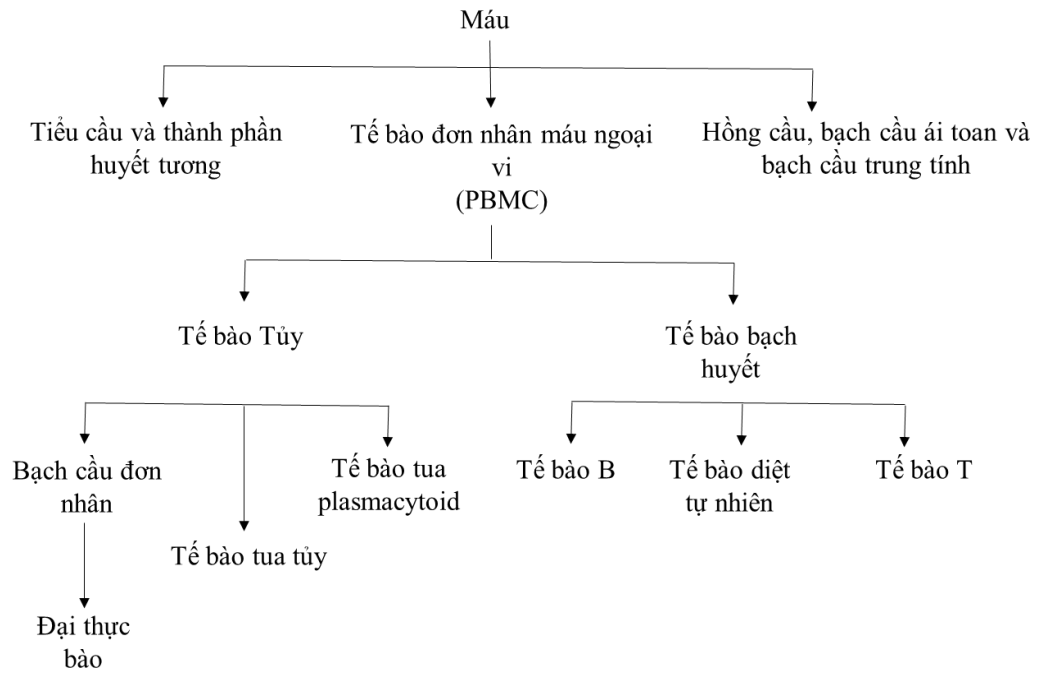
được hiểu rõ tuy nhiên nhận thấy rằng trong hầu hết các bệnh nhân THCVC có sự xuất hiện của đột biến $JAK2^{V617F}$ [25].

1.2 Tế bào đơn nhân máu ngoại vi

1.2.1 Khái niệm và đặc điểm sinh học của tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Máu là hỗn hợp lỏng bao gồm huyết tương, các tế bào máu và các protein. Phần huyết tương chiếm một nửa thể tích máu còn lại là huyết bào. Huyết bào bao gồm các tế bào hồng cầu (red blood cell- RBC) có chức năng mang và vận chuyển oxy tới các mô, tiểu cầu đóng vai trò quan trọng trong quá trình đông máu, các tế bào PBMC và bạch cầu hạt đóng vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch của cơ thể chống lại những tác nhân bên ngoài. PBMC là một hỗn hợp đa dạng của các tế bào miễn dịch với chức năng chuyên biệt cao. PBMC đóng vai trò chính trong hệ miễn dịch của cơ thể hay là thành phần không thể thiếu trong việc bảo vệ cơ thể. Theo một cách hiểu khác, PBMC là các tế bào máu có nhân tròn là một quần thể tế bào lympho (tế bào T, tế bào B và tế bào NK) không đồng nhất với số lượng khác nhau, tế bào tua (TBT) và tế bào đơn nhân tùy thuộc vào từng cá thể riêng biệt.

Các PBMC bắt nguồn từ các tế bào gốc tạo máu (hematopoietic stem cell- HSC) cư trú trong tủy xương. Từ tế bào HSC hình thành nên tất cả các tế bào máu của hệ thống miễn dịch thông qua quá trình tạo máu. Khi các tế bào HSC biệt hóa thông qua quá trình tạo máu, chúng tạo ra các tế bào dòng tủy (bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu hạt, tế bào B, tế bào NK). Những tế bào dòng tủy này là thành phần quan trọng trong hệ thống miễn dịch bẩm sinh và thích ứng của cơ thể, bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân truyền nhiễm như việc nhiễm virus, vi khuẩn và ký sinh trùng hay bảo vệ cơ thể khỏi sự tác động phá hủy các tế bào khối u hay các chất lạ có độc đối với cơ thể. PBMC được đặc trưng cho từng cá thể, trong mỗi cá thể khác nhau thì đều có tần số tế bào khác nhau giữa các cá thể nhưng trung bình hầu hết các PBMC chiếm phần lớn là các tế bào lympho (70-90%) [26]. Dưới đây là sơ đồ các nhóm tế bào máu và tế bào máu ngoại vi.



Hình 1.3. Các nhóm tế bào máu và tế bào máu ngoại vi [29]

Tế bào lympho là nhóm tế bào miễn dịch quan trọng, đóng vai trò thiết yếu trong các phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và dịch thể. Hoạt động miễn dịch của tế bào lympho chủ yếu liên quan đến việc kích hoạt các tế bào miễn dịch T và B. Trong quần thể tế bào lympho, các tế bào T $CD3^+$ là nhóm những tế bào quan trọng nhất với số lượng tế bào chiếm phần lớn (45-70%). Hầu hết các tế bào T tồn tại dưới dạng các tế bào T nghỉ ngơi, các tế bào T 'non' là các tế bào T chưa được kích hoạt bởi một kháng nguyên nào hoặc như các tế bào T nhớ. Các tế bào T non được kích hoạt thông qua việc nhận dạng kháng nguyên từ tế bào trình diện kháng nguyên. Tế bào T sau kích hoạt chỉ chiếm một lượng nhỏ trong tổng số các tế bào T ở các cá thể khỏe mạnh. Sau khi được kích hoạt chuyển sang trạng thái hoạt động, các tế bào T khởi động phản ứng miễn dịch thông qua trung gian tế bào để nhắm vào các kháng nguyên nằm trong một tế bào bị nhiễm bệnh hoặc bị bệnh. Qua quá trình hoạt hóa tế bào, tế bào lympho T thực hiện chức năng bảo vệ cơ thể trước các tác động của môi trường ngoài và trong cơ thể [26].

Tế bào diệt tự nhiên (Natural Killer- NK) là nhóm những tế bào chiếm một phần nhỏ trong quần thể các tế bào lympho (5-10%). Đây là một thành phần không thể thiếu trong hệ thống miễn dịch bẩm sinh của cơ thể, hệ thống phòng thủ tuyến đầu chống lại các tác nhân gây bệnh của cơ thể. Những tế bào này thực hiện chức năng của

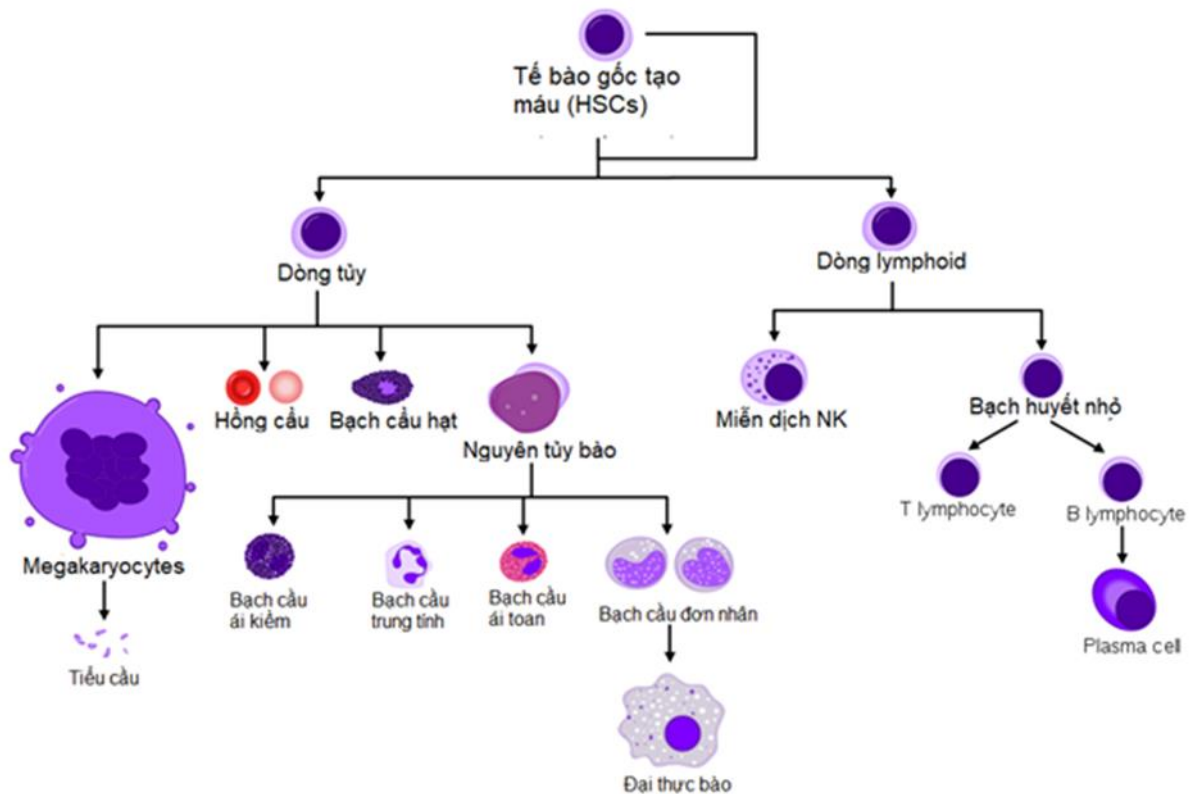
mình như một “yếu tố hiệu quả” của chính chúng mà không cần kháng nguyên. Những tế bào NK là tế bào đóng vai trò lớn trong bảo vệ cơ thể chống lại hoạt động của khối u [26]. Thành phần của PBMC ở người được mô tả chi tiết trong Bảng 1.1 [27].

Bảng 1.1. Thành phần tế bào trong máu người

STT	PBMC người	Tỷ lệ (%)
1	Tế bào bạch cầu	10-30%
2	Tế bào Lympho	70-90%
3	Tế bào T (CD3 ⁺)	45-70%
4	Tế bào T (CD4 ⁺)	25-60%
5	Tế bào T (CD8 ⁺)	5-30%
6	Tế bào B	5-15%
7	Tế bào NK	5-10%
8	Tế bào tua	1-2%
9	Tế bào gốc	0,1-0,2%

Một phần nhỏ của các PBMC là các TBT, nhóm tế bào này chỉ chiếm từ 1-2% trong tổng số lượng các PBMC. Tuy chiếm số lượng nhỏ nhưng nhóm tế bào này có vai trò quan trọng trong quá trình kết nối giữa hệ thống miễn dịch bẩm sinh và hệ thống miễn dịch thích ứng. Các TBT là những tế bào trình diện kháng nguyên cao, có khả năng thực bào các kháng nguyên và trình diện các mảnh của kháng nguyên cho các tế bào của hệ thống miễn dịch thích nghi, dẫn tới sự kích hoạt của các tế bào T và tế bào B [26].

Thành phần cuối cùng trong các PBMC là các tế bào HSC. Đây là nhóm tế bào có tầm quan trọng lớn, các tế bào HSC nằm trong máu và tủy xương có vai trò tạo ra tất cả các tế bào máu, bao gồm: hồng cầu, tiểu cầu, tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu hạt. Tuy có vai trò quan trọng như vậy nhưng quần thể tế bào hiếm này chỉ chiếm một lượng rất nhỏ (0,1%- 0,2%) trong tổng lượng PBMC. Tỷ lệ nhỏ của dòng tế bào này trong các PBMC khiến chúng khó có thể phân lập được từ các mẫu máu toàn phần. Kích thích các tác nhân huy động, ví dụ như yếu tố kích thích bạch cầu hạt (Granulocyte colony-stimulating factor, GCSF) hoặc Plerixafor, có thể làm tăng số lượng tế bào CD34⁺ lên 0,5% làm xuất hiện lượng lớn các tế bào hiếm này (hình 1.4) [28].



Hình 1.4. Quá trình trưởng thành và biệt hóa của tế bào gốc tạo máu [28]

Tế bào gốc tạo máu (HSC) là tế bào có thể sinh trưởng và phát triển thành nhiều loại tế bào máu khác nhau bao gồm bạch cầu, hồng cầu và tiểu cầu. Tế bào gốc tạo máu có khả năng biệt hóa thành các loại tế bào máu khác nhau tế bào hồng cầu có chức năng vận chuyển oxy, tiểu cầu để chống chảy máu và bạch cầu để tạo miễn dịch bảo vệ cơ thể. Tế bào HSC được biệt hóa thành các tế bào dòng tủy và lymphoid. Tế bào dòng tủy và dòng lymphoid đều tham gia vào quá trình hình thành TBT [28].

1.2.2 Chức năng của tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Mỗi nhóm tế bào trong PBMC đều mang một chức năng khác nhau và vai trò khác nhau đối với cơ thể. Tuy vậy chúng thường xuyên hỗ trợ, bổ trợ cho nhau để có thể bảo vệ cơ thể toàn vẹn nhất với các chức năng và vai trò của mình. PBMC khi tiếp xúc với kháng nguyên, nhóm các tế bào làm nhiệm vụ thực bào như TBT hay đại thực bào sẽ trình diện kháng nguyên ra bề mặt. Sau khi các tế bào trình diện kháng nguyên, các tế bào T và B đặc hiệu sẽ được huy động thông qua việc sản xuất các yếu tố viêm hay phân tử truyền tín hiệu đặc hiệu (các cytokine, chemokine). Qua đó hỗ trợ điều hòa các phản ứng miễn dịch, bao gồm cả miễn dịch tự nhiên và miễn dịch đáp ứng của cơ thể.

Các tế bào B bảo vệ cơ thể bằng việc tiết ra các kháng thể đặc hiệu để trung hòa mầm bệnh. Trong khi nhóm các tế bào T gồm các tế bào T trợ giúp (T-CD4⁺, còn được gọi là Th-T helper) và các tế bào T gây độc (CD8⁺) bảo vệ cơ thể bằng việc thực hiện các chức năng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu qua trung gian tế bào. Hệ thống miễn dịch ở da hay niêm mạc ruột là những điểm cần phải liên tục cân bằng giữa phản ứng phòng vệ và dung nạp. Sự cân bằng dựa trên việc lựa chọn hoạt hóa các tế bào T đáp ứng để tăng cường sự phòng vệ chống lại các tác nhân gây bệnh, hoặc thúc đẩy sự biệt hóa thành các loại tế bào T điều hòa khác nhau để tạo ra khả năng dung nạp. Các cơ chế cho phép dung nạp phải bảo vệ cơ thể khỏi phản ứng viêm quá mức trong quá trình nhiễm trùng, hoặc giúp tái cân bằng lại hệ thống miễn dịch khi bị rối loạn. Vì thế, các tế bào miễn dịch bẩm sinh sẽ cần phải liên tục nhận diện và xác định các yếu tố lạ bằng cách sử dụng các marker bề mặt đặc hiệu [29].

PBMC bao gồm các tế bào quan trọng của hệ thống miễn dịch, do đó hầu hết các nghiên cứu cận lâm sàng và lâm sàng đều sử dụng PBMC trong các lĩnh vực liên quan đến miễn dịch, độc tính, bệnh truyền nhiễm, bệnh huyết học, khối u ác tính, phát triển vắc-xin, liệu pháp cấy ghép. Phần lớn, các nghiên cứu PBMC trong ống nghiệm cung cấp nhiều thông tin liên quan đến chức năng tế bào, nhận dạng dấu ấn sinh học và mô hình bệnh [30]. Các nghiên cứu khác *in vivo* thông qua việc sử dụng chuột NUDE/SCID để tạo ra mô hình chuột bị suy giảm miễn dịch, từ đó cho phép nghiên cứu hệ thống miễn dịch của con người và phản ứng của nó với mầm bệnh, độc tố hoặc các loại bệnh ung thư [31].

1.2.3 Các marker sinh học liên quan đến quá trình apoptosis

Annexin V là một thành viên của họ protein nội bào gắn với phosphatidyl serine (PS) trên bề mặt tế bào theo cách phụ thuộc vào canxi. Thông thường PS chỉ được tìm thấy ở bên trong màng của tế bào khỏe. Khi tế bào bị tổn thương ở giai đoạn sớm, màng tế bào bị mất đi tính đối xứng và PS chuyển vị trí ra ngoài bề mặt tế bào. PS có thể tương tác với kháng thể Annexin V nên kháng thể này được dùng để xác định số lượng tế bào biểu hiện PS [32].

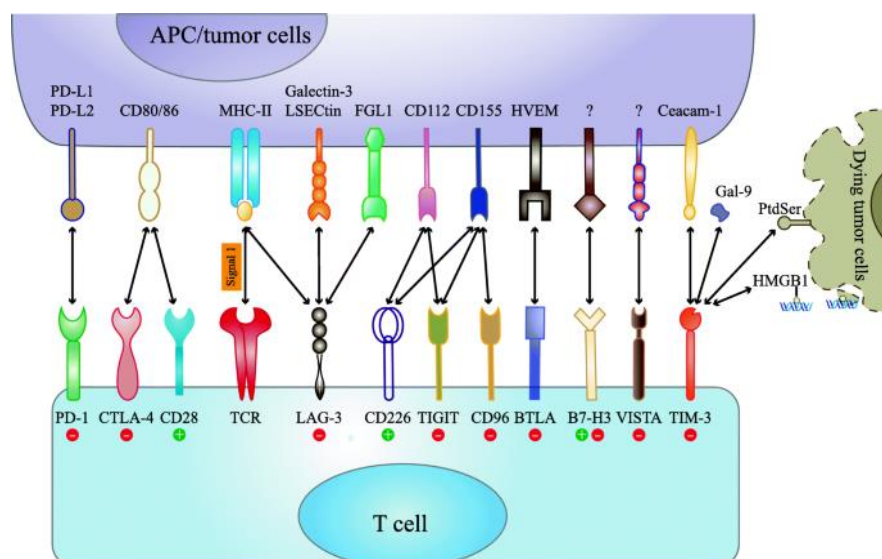
Caspase-3 là protein được mã hoá bởi gen *CASP3*, là thành viên của nhóm protease cysteine-aspartic acid tham gia vào quá trình phân mảnh DNA [33]. Hoạt động của caspase-3 tác động tiêu cực tới ty thể làm mất điện màng sinh học ty thể,

không cung cấp đủ năng lượng cho tế bào dẫn tới sự hoại tử của tế bào. Nghiên cứu này phân tích số lượng tế bào dương tính với kháng thể huỳnh quang caspase-3 bằng kỹ thuật flow cytometry. Dựa vào mật độ tế bào phát huỳnh quang, từ đó xác định được phần trăm số tế bào biểu hiện hoạt động caspase-3. Qua đó xác định được lượng tế bào bị hoại tử.

Propidium iodide (PI) là hóa chất nhuộm tế bào và axit nucleic nhưng không thể thấm qua màng tế bào sống. PI chỉ có thể thấm qua màng tế bào đã chết hoặc tế bào đang ở giai đoạn cuối của apoptosis. Chính vì vậy nhân của tế bào chết hoặc giai đoạn cuối trong chu trình apoptosis sẽ có nhân được nhuộm bởi PI. Thuốc nhuộm PI gắn với sợi đôi ADN bằng cách xen vào các cặp bazơ nitơ. PI được kích thích ở bước sóng 488 nm và phát ra ánh sáng huỳnh quang với một bước chuyển tương đối lớn và phát bước sóng cực đại ở 617 nm. Bởi vì đặc tính của phổ hấp thụ phát xạ này, thuốc nhuộm PI có thể được sử dụng kết hợp với các chất huỳnh quang khác được kích thích ở bước sóng 488 nm như fluorescein isothiocyanate (FITC) và phycoerythrin (PE). Do mang đặc tính như trên nên thuốc nhuộm propidium iodide được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu tỷ lệ sống chết tế bào sử dụng máy flow cytometry, kính hiển vi huỳnh quang hoặc kính laser quét [34].

1.2.4 Một số gen kiểm soát miễn dịch

Miễn dịch là khả năng của cơ thể nhận biết, đáp ứng và loại bỏ các yếu tố lạ (kháng nguyên) gây hại có nguy cơ xâm nhập vào cơ thể. Gen kiểm soát miễn dịch là các chất điều hòa của hệ miễn dịch và có vai trò quan trọng có thể tự dung nạp miễn dịch, ngăn cản hệ miễn dịch tấn công các tế bào một cách không kiểm soát. Các phân tử của điểm kiểm soát miễn dịch là mục tiêu của liệu pháp điều trị miễn dịch ung thư do công dụng tiềm năng của chúng trong nhiều loại ung thư. Có nhiều nghiên cứu về đa hình và biểu hiện gen có chức năng điều hòa hoạt động hệ miễn dịch trên bệnh nhân ung thư. Một trong những gen được nghiên cứu rộng rãi là gen *klotho* [35]. Gen này có vai trò quan trọng ngăn chặn lão hóa, phản ứng viêm và ung thư. Bên cạnh đó, các gen kiểm soát miễn dịch hiện đang được nghiên cứu và sử dụng trong chẩn đoán và điều trị đó là *CTLA4*, *PDI* và *LAG3*. Các gen này là những thụ thể kiểm soát miễn dịch nằm trên bề mặt của tế bào T và có vai trò điều hòa ngược phản ứng miễn dịch (Hình 1.5) [36].



Hình 1.5. Các điểm thụ thể kiểm tra miễn dịch và phối tử tương ứng của chúng [38]

CTLA4, *PD1* và *LAG3* là ba gen biểu hiện với mật độ cao trên tế bào T, điều hòa và đóng vai trò cảm ứng hoạt hóa tế bào này, vì thế biểu hiện của chúng tăng cao bất thường gây ra sự cạn kiệt về số lượng và chất lượng của tế bào T hỗ trợ, đồng thời kích hoạt tế bào T điều hòa tăng sinh và hoạt hóa với số lượng lớn và tế bào T hỗ trợ 17 (Th17) tới vị trí khối u tạo ra hệ miễn dịch đối kháng và ức chế sự phát triển của các loại tế bào T gây độc và tế bào NK [27, 37].

Điều trị bệnh THCVC bao gồm điều trị hóa trị có kết hợp với sử dụng thuốc ức chế các điểm kiểm soát miễn dịch này làm tăng hiệu quả điều trị bệnh rõ rệt [27, 38]. Tế bào PBMC được tách ra từ máu ngoại vi của bệnh nhân THCVC chiếm một lượng lớn các tế bào T, kiểm tra mức độ biểu hiện các gen kiểm soát miễn dịch, xác định được mật độ tế bào T, từ đó đánh giá được vai trò cảm ứng và biểu hiện của loại tế bào này trên bệnh nhân THCVC.

1.2.4.1. Gen *Klotho* (*KL*)

Klotho được Kuro-o và cộng sự xác định vào năm 1997 thông qua một đột biến tự phát của vùng khởi động α -*Klotho*. Vị trí của gen *Klotho* nằm trên nhiễm sắc thể 12 ở chuột và trên nhiễm sắc thể 13 ở người [39]. Gen *Klotho* mã hóa protein α -*Klotho* và đây là một protein xuyên màng được tìm thấy chủ yếu trong thận và tuyến cận giáp. *Klotho* có vai trò quan trọng ngăn chặn quá trình lão hóa ở người và động vật nên nó được xem như một trong những yếu tố quyết định tuổi thọ [40]. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy, chuột bị tách *klotho* có biểu hiện kiểu hình già trước tuổi, trong khi nếu tăng

cường biểu hiện gen *klotho* thì những con chuột này lại sống lâu hơn so với bình thường [41]. Mức độ biểu hiện của gen *klotho* giảm xuống đáng kể ở những người già, nhưng không có sự khác biệt về giới tính [42]. Nghiên cứu di truyền đã chỉ ra tình trạng methyl hoá DNA là nguyên nhân chính dẫn đến biểu hiện gen *klotho* giảm xuống [43].

Việc phát hiện ra gen α -*Klotho* đã tạo ra sự quan tâm to lớn trong nghiên cứu, giúp nâng cao hiểu biết của con người về quá trình lão hóa. Ở người, nồng độ α -*Klotho* trong huyết thanh giảm theo độ tuổi sau 40 tuổi [44, 45]. Sự giảm nồng độ α -*Klotho* này có thể được quan sát thấy ở những bệnh nhân mắc một số bệnh liên quan đến lão hóa như ung thư, tăng huyết áp và bệnh thận [46, 47]. Một nghiên cứu lâm sàng đã chứng minh rằng điểm đa hình (SNP) G395A trong vùng khởi động của gen α -*Klotho* có liên quan đến tăng huyết áp cơ bản, đặc biệt là ở những đối tượng trên 60 tuổi [46]. Tuy nhiên, nghiên cứu này cũng phát hiện ra rằng đột biến A của G395A SNP, có liên quan đến hoạt động của promoter cao hơn, có thể bảo vệ chống lại sự phát triển của tăng huyết áp cơ bản bằng cách điều hòa biểu hiện gen α -*Klotho* [46]. Thiếu *klotho* ở chuột dị hợp tử đột biến $KL^{+/-}$, dẫn đến tăng huyết áp nhạy cảm với muối [48]. Biểu hiện *in vivo* của gen α -*Klotho* được chứng minh là có thể ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh tăng huyết áp và làm giảm tổn thương thận ở chuột tăng huyết áp tự phát [49]. Ngoài ra thiếu *klotho* còn liên quan đến bệnh suy thận mạn tính ở người [50], và nó thúc đẩy bệnh tiểu đường sớm ở chuột [51]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy *Klotho* cũng được biểu hiện trong tế bào β tuyến tụy, thúc đẩy giải phóng insulin và bảo vệ tế bào β trong bệnh tiểu đường type II [52].

1.2.4.2. Gen programmed cell death-1 (PD-1)

PD-1 là một glycoprotein xuyên màng được biểu hiện trên tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$, tế bào B, bạch cầu đơn nhân, tế bào NK và TBT [53, 54]. Các tế bào miễn dịch này là chìa khóa để phản ứng sớm với các bệnh nhiễm trùng. PD-1 là một thành viên của họ đồng thụ thể miễn immunoglobulin (Ig) có chức năng thay đổi kết quả hoạt hóa của thụ thể tế bào T bởi tế bào trình diện kháng nguyên (APC) hoặc tế bào đích bị nhiễm bệnh. Các thành viên của gia đình này có thể được chia thành những thành viên chủ yếu có tác động tích cực, thúc đẩy sự hoạt hóa tế bào T và những thành viên có tác động tiêu cực, hạn chế sự hoạt hóa tế bào T. Vai trò ức chế của PD-1 được xác định ở

những con chuột thiếu biểu hiện PD-1 phát triển bệnh tự miễn tương đối muộn trong cuộc đời [55].

Sự hoạt hóa tế bào T CD8⁺ và CD4⁺ thông qua thụ thể tế bào T dẫn đến sự điều hòa của thụ thể PD-1 trong các nghiên cứu *in vitro*. PD-1 không được biểu hiện trên các tế bào T nghỉ nhưng có thể được tạo ra trong vòng 24 giờ sau khi được kích thích [56]. Thụ thể PD-1 và sự đóng góp tương đối của nó đối với khả năng dung nạp miễn dịch đã được xác nhận bằng cách sử dụng các mô hình động vật về khả năng tự miễn dịch và ung thư. Tuy nhiên, cơ chế phân tử kiểm soát sự biểu hiện PD-1 tương đối rõ ràng. Tế bào T CD4⁺ kích hoạt được biết là biểu hiện đồng thụ thể ức chế, trong đó protein liên kết tế bào lympho T gây độc tế bào 4 (CTLA4) có đặc điểm tốt nhất, vì những con chuột thiếu đồng thụ thể này sẽ chết vì bệnh tự miễn trong vài tuần đầu tiên [57]. Ngoài ra, dòng tế bào T CD4⁺ hạn chế hệ thống miễn dịch là các tế bào T (Treg), các tế bào điều hòa Treg này được đặc trưng bởi sự biểu hiện của yếu tố phiên mã chính Foxp3 và mức độ cao của CTLA-4 và CD25. Mặc dù biểu hiện PD-1 không phải là đặc trưng của tế bào Treg, nhưng sự hoạt hóa PD-1 đã được chứng minh là gây ra biểu hiện Foxp3 tăng cao và duy trì kiểu hình tế bào Treg [58].

Tầm quan trọng của việc duy trì biểu hiện thụ thể PD-1 ở các tế bào T CD8⁺ lần đầu tiên được mô tả trong mô hình virus viêm màng não tủy mạn tính tế bào lympho ở chuột làm bất hoạt biểu hiện PD-1 dẫn đến phục hồi chức năng tế bào T CD8⁺. Thật vậy, một phân tích toàn diện về PD-1 trong các bệnh mạn tính do virus như các bệnh đặc hiệu của virus viêm gan B đã được làm sáng tỏ. Những dữ liệu này cho thấy rằng kích thích thụ thể tế bào T là một yếu tố thúc đẩy biểu hiện PD-1 trong tế bào T CD8⁺. Ngoài kích hoạt thụ thể tế bào T, các kích thích khác gây ra biểu hiện PD-1 bao gồm yếu tố đáp ứng nhạy cảm với interferon (IFN), tín hiệu và chất kích hoạt phiên mã STATs trong đại thực bào [59].

1.2.4.3. Gen lymphocyte-activation gene 3 (LAG3)

LAG3 là mục tiêu điều trị miễn dịch ung thư tiềm năng do vai trò điều hòa âm của nó đối với tế bào T và khả năng kết hợp với PD1 làm trung gian cho tình trạng kiệt sức của tế bào [60]. Hiện nay có một số phương pháp điều trị miễn dịch điều hòa LAG3 ở các giai đoạn phát triển lâm sàng và tiền lâm sàng khác nhau. Các nhà khoa học ngày càng quan tâm đối với LAG3 như một mục tiêu điều trị, điều đó thúc đẩy sự

khám phá, cơ chế hoạt động để hiểu rõ hơn về LAG3. LAG3 được Triebel và cộng sự phát hiện vào năm 1990 dưới dạng một protein xuyên màng có chiều dài 498-axit amin, được xác định trên các dòng tế bào NK và T của người đã hoạt hóa [61].

Gen *LAG3* nằm liền kề với *CD4* trên nhiễm sắc thể số 12 ở người và nhiễm sắc thể số 6 ở chuột. Hơn nữa, LAG3 được dự đoán là có cấu trúc tương đồng cao với CD4 với bốn miền giống siêu họ globulin miễn dịch ngoại bào [61]. Trong các điều kiện sinh lý, LAG3 là một dấu hiệu hoạt hóa cho các tế bào T CD4⁺ và CD8⁺, và giống như các IR khác bao gồm PD1, nó có thể được phát hiện lần đầu tiên sau khi kích thích 24 giờ trong ống nghiệm với biểu hiện đạt đỉnh điểm ở thời điểm 48 giờ trước khi giảm vào ngày thứ 8 ở chuột [62]. Sự biểu hiện của IR là cần thiết để kiểm soát các phản ứng miễn dịch, do đó ngăn ngừa sự kích hoạt tế bào T trầm trọng hơn và sự khởi đầu của tự miễn dịch. Thật vậy, như đã mô tả ở trên, LAG3 có một vai trò quan trọng như một chất điều hòa âm tính và do đó, sự thiếu hụt LAG3 dẫn đến sự nghiêm trọng của bệnh trong một số mô hình tự miễn dịch. Những ảnh hưởng của phân tử LAG3 đến con đường điều trị tiềm năng cho khả năng miễn dịch chống khối u hiện đang được đánh giá trên nhiều loại ung thư ở người trưởng thành.

1.2.5 Một số cytokine sử dụng trong nghiên cứu

1.2.5.1 Interleukin-6

IL-6 là một cytokine được sản xuất bởi nhiều loại tế bào, bao gồm nguyên bào sợi, tế bào nội mô, bạch cầu đơn nhân, tế bào tạo máu bình thường và tế bào lympho. IL-6 có vai trò quan trọng trong cả miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng [63]. IL-6 có thể được sản xuất bởi nhiều loại tế bào khác nhau, bao gồm đại thực bào, tế bào nội mô và tế bào T. Quá trình sản xuất này có thể được bắt đầu để đáp ứng với sự xâm nhập của vi sinh vật hoặc các cytokine khác, chẳng hạn như yếu tố hoại tử khối u (TNF). Là một phần của hệ thống miễn dịch bẩm sinh, IL-6 hoạt động trên tế bào gan để gây ra sự biểu hiện của protein phản ứng C, fibrinogen và amyloid A huyết thanh, còn được gọi là phản ứng giai đoạn cấp tính. Trong phản ứng miễn dịch thích ứng, IL-6 đóng một vai trò quan trọng trong việc kích hoạt các tế bào B sản xuất kháng thể tăng sinh, dẫn đến tăng cường phản ứng kháng thể.

Nồng độ IL-6 tăng cao ở những bệnh nhân bị nhiễm trùng và nhiễm trùng huyết. Ngoài ra, nồng độ IL-6 dường như liên hệ với mức độ nghiêm trọng của nhiễm

trùng huyết, như được xác định bởi các thông số lâm sàng và xét nghiệm [64]. Nồng độ IL-6 tăng cao cũng có vẻ liên quan đến nhiễm trùng khu trú hơn, chẳng hạn như nhiễm trùng khớp giả (PJI) [65]. IL-6 cũng tăng cao trong nhiều rối loạn viêm mạn tính, bao gồm viêm khớp dạng thấp, lupus ban đỏ hệ thống, viêm cột sống dính khớp và bệnh viêm ruột [66]. Có bằng chứng cho thấy IL-6 có liên quan đến bệnh sinh của một số rối loạn viêm mạn tính. Tocilizumab, một kháng thể ngăn chặn chức năng IL-6 bằng cách liên kết với thụ thể IL-6, đã được sử dụng để điều trị viêm khớp dạng thấp. Trong một thử nghiệm ngẫu nhiên, 50% đến 60% bệnh nhân dùng cả hai loại thuốc tocilizumab và methotrexate cho thấy sự cải thiện các dấu hiệu và triệu chứng lâm sàng của viêm khớp dạng thấp so với bệnh nhân chỉ dùng 25% methotrexate [67].

1.2.5.2 Yếu tố hoại tử khối u - alpha

Yếu tố hoại tử khối u - alpha (TNF- α) là một cytokine có tác dụng ức chế và kích thích các quá trình tế bào đa dạng, có vai trò là cơ quan điều hòa các phản ứng miễn dịch. TNF- α được tiết ra chủ yếu ở tế bào đơn nhân và đại thực bào, mặc dù các loại tế bào khác, đặc biệt là tế bào lympho T và B và tế bào lympho dạng hạt lớn đã được chứng minh là sản xuất TNF- α khi được kích thích. Aggarwal và cộng sự đã chỉ ra rằng TNF- α có thể được tiết ra bởi nhiều loại tế bào khối u, bao gồm cả CML, B-cell lymphoma và có thể hoạt động như một chất thúc đẩy khối u nội sinh [68]. TNF- α có thể hoạt động như một chất thúc đẩy sự phát triển khối u nội sinh, có liên quan đến sự hình thành khối u, bao gồm biến đổi tế bào, sống sót, tăng sinh, xâm lấn và di căn. Một số nghiên cứu đã xác định nồng độ TNF- α tăng cao ở các bệnh nhân mắc bệnh CLL và AML. Bên cạnh đó, nó còn đóng vai trò như một yếu tố tiên lượng ở những bệnh nhân mắc bệnh này [69]. TNF- α có vai trò trái ngược nhau trong bệnh ung thư. TNF- α có thể hoạt động trực tiếp hoặc gián tiếp như một yếu tố tăng trưởng khối u tự tiết, trong khi nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng TNF- α gây ra quá trình apoptosis của các tế bào khối u [70]. Nghiên cứu cho thấy nồng độ TNF- α trung bình ở bệnh nhân AML cao hơn đáng kể so với người khỏe mạnh [71]. Và nồng độ TNF- α huyết thanh cao là một yếu tố tiên lượng bất lợi cho khả năng sống sót và không có biến cố ở bệnh nhân AML [69]. Ngược lại, trong nghiên cứu khác, phân tích bệnh nhân AML lúc chẩn đoán hoặc trong thời gian bệnh tái phát cho thấy TNF- α tăng đáng kể ở bệnh bạch cầu mạn tính và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính nhưng không tăng ở bệnh AML [72].

1.2.5.3 Interleukine 1 β

Interleukine 1 β (IL-1 β) là một cytokine tiền viêm, có vai trò rất quan trọng đối với các phản ứng bảo vệ của vật chủ đối với nhiễm trùng và tổn thương. Nó cũng là cytokine được nghiên cứu nhiều nhất trong số 11 cytokine của họ IL-1. IL-1 β được tiết chủ yếu bởi các tế bào dòng tủy [73]. Trong điều kiện bình thường, IL-1 β được tiết ra ở mức độ thấp, và sự biểu hiện hoặc sự hoạt hóa qua trung gian caspase 1 của nó tăng lên khi bị bệnh [74, 75]. IL-1 β được tiết ra liên kết với thụ thể IL-1R1 của nó và kích hoạt dòng tín hiệu kiểm soát sự biểu hiện gen của nhiều yếu tố phiên mã, yếu tố tăng trưởng và các interleukin khác liên quan đến chức năng huyết học [76]. Do đó, IL-1 β đóng một vai trò quan trọng trong các phản ứng tế bào miễn dịch bẩm sinh và thích ứng. IL-1 β kích thích sự trưởng thành của tế bào T và tăng cường sự tăng sinh của tế bào B [77, 78]. Hơn nữa, IL-1 β thúc đẩy sự biểu hiện của các phân tử gây viêm như cyclooxygenase type 2, phospholipase type 2 A, prostaglandin E2, yếu tố hoạt hóa tiểu cầu và oxit nitric [79]. Điều quan trọng là IL-1 β điều hòa chức năng tế bào HSC. IL-1 β tăng được thấy trong giai đoạn tế bào non tiến triển so với giai đoạn mạn tính và người khỏe mạnh, liên hệ với sự mở rộng tế bào non trong tủy xương và máu ngoại vi, tiên lượng xấu và thời gian sống ngắn hơn ở bệnh nhân. Cả IL-1 β nội sinh và ngoại sinh đều thúc đẩy tăng sinh tế bào non, bằng cách cảm ứng các yếu tố tăng trưởng và các cytokine khác như yếu tố kích thích tế bào hạt - đại thực bào. Tiên lượng bệnh nhân kém hơn và tỷ lệ sống thấp hơn được quan sát thấy ở những bệnh nhân có đáp ứng tăng sinh cao hơn với IL-1 β ngoại sinh [80].

1.2.5.4 Interleukin-12p70

Interleukin-12p70 (IL-12) hay còn được biết đến là một heterodimer bao gồm các tiểu đơn vị p40 và p35, được sản xuất chủ yếu bởi các đại thực bào và TBT. Sự sản xuất ban đầu của nó bởi các tế bào này rất quan trọng đối với việc cảm ứng tế bào NK, tạo ra IFN- γ , và sau đó kích hoạt, biệt hóa và tăng sinh các tế bào Th1 đặc hiệu của *M tuberculosis*. IL-12 cũng tạo ra IFN- γ bởi các tế bào Th1, tạo thành một liên kết giữa các đáp ứng bẩm sinh thích ứng và liên kết với thụ thể IL-12, bao gồm hai tiểu đơn vị, IL-12R β 1 và IL-12R β 2, biểu hiện trên tế bào Th1 và NK. Ngoài ra, IL-12 làm tăng khả năng gây độc tế bào của tế bào lympho T CD8⁺ và tế bào NK bằng cách tạo ra sự phiên mã của các gen mã hóa perforin và granzyme và bằng cách điều chỉnh sự biểu

hiện của các phân tử bám dính. IL-12 tăng cường sự trình diện kháng nguyên của đại thực bào và TBT [81].

1.2.5.5 MUC16 (CA 125)

Kháng nguyên ung thư CA 125 là một glycoprotein giống mucin màng có khối lượng phân tử lớn hơn 200 kDa, CA 125 ở người được mã hóa bởi gen MUC16 - một thành viên của gia đình glycoprotein mucin [82]. Trong mô bào thai, CA 125 được thể hiện ở biểu mô màng ối, khoang phôi và ống Muller. Ở mô trưởng thành CA 125 được thể hiện chủ yếu ở các tế bào trung mô và trên bề mặt của các tế bào biểu mô của ống dẫn trứng, các tế bào nội mạc tử cung và nội mạc cổ tử cung. Trong ung thư, CA 125 được thể hiện ở hầu hết các trường hợp u trung biểu mô ác tính và ung thư thể tuyến dạng huyết thanh của buồng trứng. CA 125 là một dấu ấn ung thư được sử dụng phổ biến nhất để phát hiện, theo dõi hiệu quả điều trị ung thư buồng trứng và để phát hiện ung thư tái phát sau điều trị [83]. Xét nghiệm CA 125 có thể được sử dụng để sàng lọc nhằm phát hiện sớm ung thư buồng trứng ở những phụ nữ có nguy cơ cao do có tiền sử gia đình [33]. Khoảng 5-10% ung thư buồng trứng là từ hội chứng ung thư gia đình do những thay đổi di truyền (đột biến) ở các gen nhất định. Hội chứng này được gây ra bởi đột biến di truyền ở các gen *BRCA1* và *BRCA2*, cũng như ở một số gen chưa được xác định khác. Về độ nhạy lâm sàng, mức độ CA 125 huyết thanh tăng ở khoảng 80% số phụ nữ bị ung thư buồng trứng và tăng tỷ lệ với tiến trình của bệnh. Mức độ CA 125 có sự liên quan đến kích thước khối u: mức độ CA 125 có thể bình thường khi khối u nhỏ còn nhỏ (<1cm), mức độ > 35 U/mL thường gặp khi khối u lớn > 2cm. Ở phụ nữ sau mãn kinh có một khối sờ thấy phần phụ và mức độ CA 125 > 35 U/mL có giá trị dự đoán dương tính đối với ung thư buồng trứng là > 95% [83]. Sàng lọc CA125 cũng giúp xác định đáp ứng của bệnh nhân đối với các liệu pháp điều trị bệnh. CA125 cũng biểu hiện ở những loại ung thư khác như ung thư vú, ung thư phổi, và ung thư tuyến giáp [84].

1.2.6 Nghiên cứu sử dụng tế bào đơn nhân máu ngoại vi trên bệnh THCVC

Trong những năm qua, đã có nhiều nghiên cứu sử dụng PBMC để nghiên cứu về bệnh THCVC. Bệnh THCVC có liên quan tới tỷ lệ huyết khối tăng cao bất thường. Các bạch cầu đơn nhân tạo ra một yếu tố mô mạnh (TF) khi tiếp xúc với các chất khác nhau. Sự kích hoạt này có liên quan đến sự hình thành huyết khối trong các rối loạn khác nhau. Kornberg A và cộng sự đã nghiên cứu khả năng yếu tố tham gia vào quá

trình kích hoạt đông máu cũng như sự hình thành huyết khối trong bệnh nhân THCVC. Các PBMCs đã được sử dụng và nghiên cứu của họ cho thấy sau khi kích thích bằng endotoxin, các PBMC từ nhóm chứng là những người bình thường cho thấy TF tăng 3,9- 4,5 lần, trong khi các tế bào từ nhóm nghiên cứu là những người bị THCVC nguyên phát và thứ phát cho thấy TF tăng 21 lần ($p < 0,001$). Các mức tương tự được tạo ra bởi PBMC sau khi xử lý THCVC. TF được tạo ra bởi bạch cầu đơn nhân nhưng không phải tế bào lympho. Mức độ prothrombin mảnh 1+2 (F1 + 2) trong huyết tương được xét nghiệm đồng thời cao hơn đáng kể ở THCVC (2,46 nm) so với bình thường và chứng THCVC nguyên phát và thứ phát (0,22 đến 0,32 nm), hơn nữa, nó có mối liên hệ đáng kể với bạch cầu đơn nhân. Bạch cầu đơn nhân có khả năng tăng đáp ứng để tạo ra TF có thể là nguyên nhân kích hoạt hệ thống đông máu và hình thành huyết khối ở những bệnh nhân THCVC [85].

Khi so sánh các mô hình tế bào lympho ở bệnh nhân mắc THCVC với người hiến máu khỏe mạnh và bệnh nhân mắc THCVC thứ phát, họ quan sát thấy tỷ lệ tế bào T-CD4/T-CD8 có sự thay đổi ($p < 0,01$) chủ yếu do giảm số lượng các tế bào T-CD8 ở những bệnh nhân THCVC. Họ nhận thấy sự gia tăng hoạt động của tế bào lympho ở bệnh nhân THCVC khi so sánh với cả THCVC thứ phát và nhóm chứng: sản xuất IL-2 cao hơn đáng kể ($p < 0,001$) cũng như đáp ứng tăng sinh bạch huyết đối với phytohaemagglutinin (PHA) ($p < 0,001$) và IL-2 ($p < 0,005$). Không có mẫu PBMC nào được kích thích PHA từ THCVC, THCVC thứ phát hoặc nhóm chứng tạo ra hoạt tính ức chế giống erythropoietin. Phát hiện của họ cho thấy dòng bạch huyết bị thay đổi ở bệnh nhân THCVC [86].

1.3 Một số gen thuộc nhóm deubiquitinase và mối liên hệ với các tín hiệu phân tử

Nhóm gen DUB là một họ các enzyme có chức năng loại bỏ các nhóm ubiquitin ra khỏi protein và các phân tử khác. DUB có thể đảo ngược những hiệu ứng này bằng cách phân cắt liên kết peptide hoặc isopeptide giữa ubiquitin và protein cơ chất của nó. Deubiquitinase đóng một số vai trò trong con đường ubiquitin. Một trong những chức năng đặc trưng nhất của DUB là loại bỏ các chuỗi ubiquitin và polyubiquitin khỏi protein. Mặt khác, DUB còn được biết đến là một nhóm enzyme điều hòa sự thoái hóa protein và giúp cân bằng lượng ubiquitin tự do trong cơ thể. Hiện nay có khoảng 100

loại DUB khác nhau được các nhà nghiên cứu xác định và chúng được chia thành 6 loại khác nhau ví dụ điển hình như A20, Otubain-1, Otubain-2, Cezanne CYLD, USP.

Tế bào gốc tạo máu (HSC) chịu trách nhiệm sản xuất các tế bào máu trong suốt cuộc đời của con người. Các HSC đơn lẻ có thể làm phát sinh ít nhất tám dòng tế bào máu riêng biệt. Quá trình tạo máu, tạo hồng cầu và tạo mạch gắn liền với quá trình điều hòa miễn dịch, sinh trưởng, phát triển, biệt hóa và chết theo chương trình của tế bào. Bất kỳ sự rối loạn điều hòa nào của các quá trình này đều có thể dẫn đến các rối loạn huyết học hoặc là cơ sở để hình thành nên các khối u ác tính [87]. Một số nghiên cứu về cơ chế phân tử điều hòa sự phát triển của HSC đã chứng minh rằng sự điều hòa protein bằng con đường ubiquitin là rất quan trọng đối với chức năng của HSC. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng việc đảo ngược quá trình tạo máu bằng các enzyme khử protein (DUB) đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tạo máu; tuy nhiên, thông tin liên quan đến chức năng sinh học của các DUB còn hạn chế [87].

Chức năng của A20 trong nhiều loại tế bào của hệ thống miễn dịch đã được xác định rõ ràng, tuy nhiên, vai trò của nó trong quá trình tạo máu phần lớn vẫn chưa được biết đến. Gần đây một nghiên cứu của Masahiro Marshall Nakagawa và cộng sự đã xác định rằng sự thiếu hụt A20 trong HSC dẫn đến các bệnh lý tạo máu, bao gồm bệnh tự viêm, tăng sinh tủy và giảm bạch huyết [88]. Ngoài ra, nghiên cứu này đã chứng minh rằng sự thiếu A20 trong cơ quan sinh sản tế bào đa năng (MPP- multipotent progenitors) gây ra trạng thái ngủ của HSC và ảnh hưởng đến quá trình tái tạo máu lâu dài [89]. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng A20 đóng vai trò thiết yếu trong việc cân bằng nội môi của quá trình tạo máu ở người trưởng thành bằng cách ngăn chặn quá trình apoptosis và viêm nhiễm [90]. Năm 2015, Melania Tesio và cộng sự đã nghiên cứu vai trò của CYLD trong quá trình tạo máu và cho rằng thời gian ngủ của HSC được kiểm soát bởi CYLD sau quá trình phiên mã [91]. Việc ngừng hoạt động của CYLD sẽ loại bỏ khả năng ngừng hoạt động và tái sản xuất của HSC. Ngoài ra, dữ liệu này còn cho thấy rằng tương tác giữa CYLD-TRAF2 là rất quan trọng để duy trì HSC ở trạng thái ngủ (dHSCs- dormant HSCs) vì nó ngăn chặn sự kích hoạt tín hiệu phân tử p38MAPK, điều hòa giảm các gen liên quan đến trạng thái ngủ và sự xâm nhập của dHSC vào chu kỳ tế bào, cuối cùng là ngăn chặn sự kiệt sức của HSC [91]. CYLD tham gia điều hòa ngược quá trình nguyên phân và chuyển động của tế bào

[92], đóng một vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự di chuyển tế bào và quá trình chết theo chương trình của nó [93].

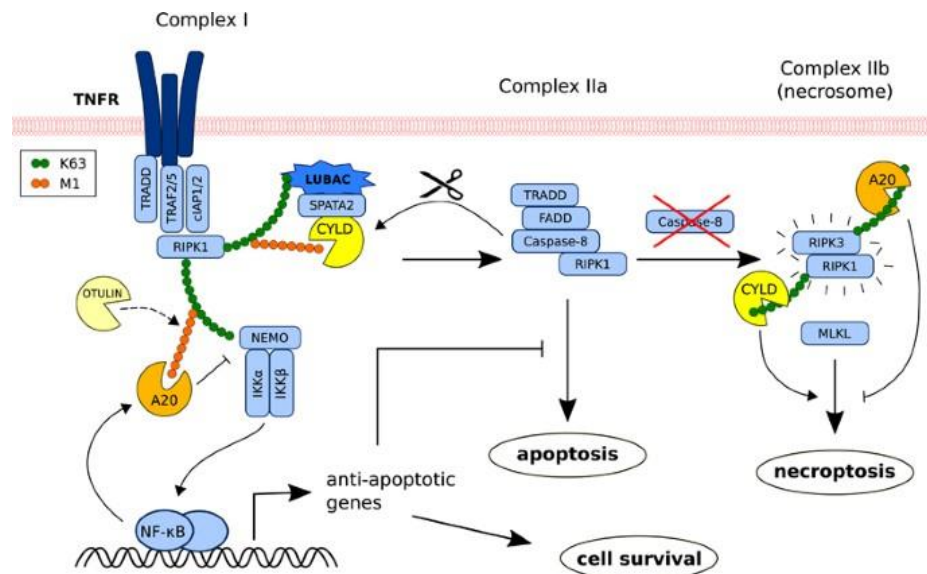
Ngoài ra, Junting Cai đã kiểm tra sự biểu hiện của các DUB trong quá trình tạo hồng cầu bằng cách sử dụng hệ thống nuôi cấy tế bào tiền thân tạo máu CD34⁺ của người *ex vivo*. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng biểu hiện protease 50 (USP50) đặc hiệu ubiquitin được tăng lên trong quá trình tạo hồng cầu. Nồng độ mRNA USP50 tăng lên đáng kể vào ngày thứ 3 và nồng độ protein tăng cao vào ngày thứ 9 của quá trình biệt hóa hồng cầu [94].

USP50 có biểu hiện tăng trong giai đoạn cuối của quá trình tạo hồng cầu và có thể tham gia vào quá trình kiểm soát chu kỳ tế bào. USP50 điều hòa quá trình khử chất béo qua trung gian Ku70 (một protein liên kết ADN) của protein biệt hóa tế bào bạch cầu dòng tủy, đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa quá trình apoptosis trong giai đoạn sau của quá trình tạo hồng cầu. Theo một nghiên cứu gần đây, biểu hiện USP7 được chỉnh đáng kể trong quá trình tạo hồng cầu và có liên quan đến sự biệt hóa chậm của hồng cầu trong giai đoạn cuối, ức chế biểu hiện hemoglobin và tăng sinh tế bào gây ra quá trình apoptosis [87]. Vai trò của DUB rất đa dạng, ngoài chức năng khử DUB còn tham gia điều hòa sự tiến triển của khối u và đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo máu, tạo hồng cầu và các bất thường liên quan. Bệnh THCVC là bệnh ung thư máu thuộc nhóm bệnh tăng sinh tủy ác tính và do rối loạn quá trình tạo máu. Thiết nghĩ các DUB có liên quan đến quá trình tạo máu bất thường và cũng có thể là một trong những nguyên nhân gây nên hiện tượng đa hồng cầu [87].

1.3.1 Protein A20

Protein A20 hay còn gọi là TNFAIP3 (Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 - protein kích thích yếu tố hoại tử khối u 3) là protein được mã hóa bởi gen *A20* và có vai trò như một chất điều hòa ngược phân tử NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B). Protein A20 có chiều dài phân tử là 775 axit amin với khối lượng phân tử 87,6 kDa [95]. Protein A20 có tính bảo thủ cao chứa miền khối u bùồng trứng (OTU) có đầu tận cùng amin ở vùng đầu cuối N và bảy miền ngón tay kẽm (ZnF) trong cùng đầu cuối C của nó. Miền OTU làm trung gian cho hoạt động khử gốc DUB, miền ZnF4 gắn với chuỗi Ub (ubiquitin) liên kết K63 và ZnF7 gắn với chuỗi Ub liên kết M1 và hỗ trợ hoạt động ligase E3 Ub. Do đó, A20 hoạt động như một enzyme chỉnh sửa ubiquitin vì nó có khả năng khử ubiquitin lẫn ubiquitin hóa [96,

97]. Protein này được mã hóa bởi gen *A20* và đây cũng là gen có tỷ lệ bị bất hoạt cao trong các u lympho tế bào B [98]. Bất hoạt hoặc xóa gen *A20* có liên quan đến một số bệnh ác tính [99] dẫn đến tăng sinh tế bào trong bệnh bạch cầu mãn tính dòng tế bào Lympho T, lymphoma (MALT- mucosa-associated lymphoid tissue), u lympho tế bào B trung thất nguyên phát (PMBL- primary mediastinal B-cell lymphoma) và u lympho Hodgkin cổ điển [100].



Hình 1.6. Vai trò của một số gen deubiquitinase [101]

Về vai trò, protein A20 thực hiện vai trò là một DUB loại bỏ các chuỗi polyubiquitin liên kết với K63 khỏi nhiều chất trung gian như RIP1 (Receptor-interacting protein 1), TRAF6, cIAP1 (cellular inhibitor apoptosis protein), TRAF2, M1 polyubiquitin (Hình 1.6). Việc điều hòa tín hiệu NF-κB là một bước quan trọng trong việc kiểm soát và chấm dứt phản ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thu được [102]. Quá trình ubiquitin hóa và tín hiệu phân tử NF-κB có mối liên quan chặt chẽ với nhau. A20 điều hòa chức năng tế bào thông qua cơ chế chống lại quá trình apoptosis để ngăn chặn các tăng tín hiệu phân tử NF-κB do TNF-α (Tumor Necrosis Factors alpha - Yếu tố hoại tử khối u) gây ra. Protein A20 biểu hiện rất mạnh trong tế bào gốc glioma, sự thiếu hụt của A20 làm giảm sự sống của tế bào gốc glioma và liên quan đến sự phát triển của các khối u [103]. Protein A20 cũng biểu hiện rất cao trong các dòng tế bào ung thư vú. Do đó, ở các loại tế bào khác nhau protein A20 có vai trò khác nhau.

Protein A20 điều hòa ức chế một số yếu tố phiên mã trong họ protein STAT, điển hình là STAT1 trong các tế bào dòng tủy (myeloid) tại điều kiện không được kích thích và sau khi kích thích các cytokine INF- γ hoặc IL6. Tuy nhiên, cũng trong điều kiện kích thích đó protein A20 không điều hòa STAT3. Sự tăng cường phiên mã gen *STAT1* khi không có gen *A20* được chứng minh là có phụ thuộc vào con đường tín hiệu JAK-STAT. Những dữ liệu này cho thấy sự tương tác quan trọng giữa các tế bào myeloid và các tế bào cư trú tại các vị trí cố định được quy định bởi protein A20. Trong trường hợp không có gen *A20*, *STAT1* tăng cường biểu hiện nhưng không biểu hiện *STAT3*, dẫn đến tăng cường viêm phụ thuộc *STAT1*. Do đó, protein A20 hoạt động như một chất điều hòa nội sinh mới của STAT1 giúp ngăn ngừa sự khởi phát của quá trình viêm [103]. Một nghiên cứu khác của nhóm nghiên cứu NT Xuân đã chỉ ra rằng protein A20 hoạt động góp phần ức chế sự hoạt hóa của các tín hiệu I κ B- α và STAT-1 trong TBT.

1.3.1.1 Cơ chế điều hòa hoạt động của protein A20

Trong điều kiện thường, protein A20 chỉ xuất hiện với lượng thấp vừa đủ ở hầu hết các tế bào (ngoại trừ tế bào lympho). Khi NF- κ B được kích hoạt bởi TNF hoặc LPS, chúng sản sinh ra một tín hiệu đặc biệt để kích thích biểu hiện của protein A20 tăng lên nhanh chóng [104]. Bên cạnh đó, biểu hiện của protein A20 còn được điều hòa bởi quá trình phosphoryl hóa. Sau khi kích thích bằng TNF hoặc LPS, A20 bị phosphoryl hóa bởi IKK2, làm tăng thêm khả năng ức chế tín hiệu của NF- κ B [105].

Ngoài điều hòa bằng các protein khác, protein A20 có thể được điều hòa bởi nhiều microRNA (miRNA). Vùng chưa được dịch mã 3' (3'UTR) của gen *A20* đã được cho là mục tiêu liên kết của miR-125 [106]. MiR-125b được phát hiện có liên hệ nghịch với mức biểu hiện protein A20, nó làm tăng cường và kéo dài hoạt động của tín hiệu NF- κ B. Hơn nữa, miR-125b thúc đẩy quá trình viêm ở bệnh viêm khớp bằng cách kích hoạt hoạt động tín hiệu NF- κ B [106], và miR-125b cũng được biểu hiện quá mức trong huyết tương hoặc huyết thanh của bệnh nhân viêm khớp [107]. Tương tự, miR-19b cũng có thể điều hòa tích cực tín hiệu NF- κ B thông qua sự ức chế biểu hiện của protein A20. Hơn nữa, miR-19b có tầm quan trọng lớn trong bệnh lý viêm khớp [106], vì sự chuyển hóa miR-19b làm gia tăng hoạt hóa viêm của các nguyên bào sợi nguyên phát trong viêm khớp [108]. Ngược lại, mặc dù miR-29 đã được báo cáo là làm tăng số lượng

mRNA A20 và protein tương ứng trong tế bào ung thư, nhưng thí nghiệm trên chuột cho thấy, tình trạng bệnh lý khớp giảm đi khi thiếu miR-29a [109].

1.3.1.2 Vai trò của A20 đối với tế bào đơn nhân máu ngoại vi

PBMC là loại tế bào thường được dùng để đánh giá các phản ứng miễn dịch. Ngày nay, nhiều nghiên cứu đã sử dụng PBMC để kiểm tra mức độ biểu hiện gen A20 trên các bệnh khác nhau như biểu hiện thiếu gen A20 có thể tham gia vào cơ chế sinh bệnh trong bệnh lupus ban đỏ hệ thống [110]. Mức độ biểu hiện gen A20 tăng trong các PBMC có liên quan đến các giai đoạn miễn dịch của bệnh nhân bị viêm gan B mãn tính. Ngoài ra ở bệnh viêm khớp dạng thấp, biểu hiện A20 thấp hơn đáng kể đã được tìm thấy [99].

Protein A20 hoạt động như một protein chống lại quá trình apoptosis trong một số loại tế bào phụ thuộc vào hoạt động của chuỗi ubiquitin [111]. Khi có tín hiệu gây chết, các thụ thể sẽ kích hoạt một chuỗi các tín hiệu kích hoạt quá trình chết theo chương trình thông qua một chuỗi phản ứng báo hiệu gây chết (death-inducing signaling complex - DISC). Protein A20 là một phần của DISC, chịu trách nhiệm tương tác với caspase-8. Các nghiên cứu chỉ ra rằng protein A20 đảo ngược quá trình ubiquitin hóa qua trung gian cullin3 của caspase-8 và ngăn chặn sự gia tăng hoạt động của caspase-8. Điều này cho thấy, A20 ức chế tín hiệu apoptosis thông qua sự nhận diện và ức chế caspase-8 [112]. Bên cạnh đó, protein A20 ngăn cản apoptosis do TNF gây ra thông qua quá trình bất hoạt c-Jun N-terminal kinase (JNK) trong tế bào. Cụ thể, thông qua hệ thống ubiquitin-proteasome, protein A20 kích thích phân hủy ASK (một kinase MAPK quan trọng trong dòng tín hiệu JNK) từ đó ức chế hoạt hóa JNK và cuối cùng là ngăn cản quá trình apoptosis diễn ra [111].

1.3.2 Protein Otubain-1

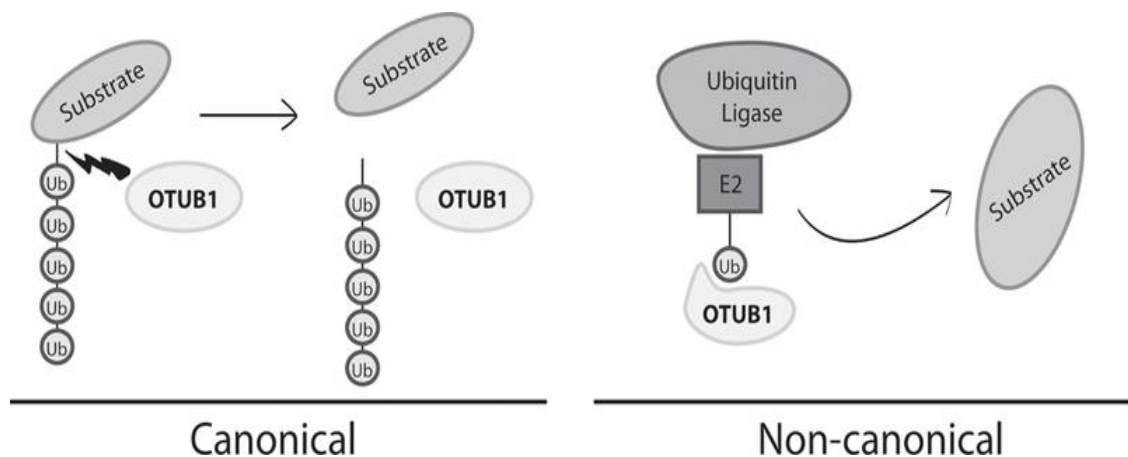
Ubiquitin aldehyde liên kết protein 1 (Otubain-1) vốn được xem là một thành viên thuộc siêu họ protein OUT (ovarian tummor), gần đây nó được coi như một enzyme DUB tách chuỗi ubiquitin từ phân tử TRAFs và ức chế biểu hiện IFN- β [113]. Protein Otubain-1 lần đầu tiên được phát hiện bởi Borodovsky và cộng sự năm 2002, gen *Otubain-1* mã hóa protein này nằm ở vị trí 11q13.1 trên nhiễm sắc thể số 11 và được biểu hiện trong nhiều loại mô của người ví dụ: thận, đại trực tràng, dạ dày, não và gan [114]. Otubain-1 có thể hoạt động như một cysteine protease thủy phân liên kết

isopeptide giữa ubiquitin và protein đích hoặc một phân tử ubiquitin khác. Otubain-1 có liên quan đến việc điều hòa các quá trình sinh lý và bệnh lý. Otubain-1 có liên quan đến cảm ứng năng lượng trong tế bào lympho T CD4⁺ và ảnh hưởng đến sự ổn định của E3 ligase GRAIL (gen liên quan đến năng lượng trong tế bào lympho) [115].

Ngày càng nhiều tài liệu chứng minh rằng Otubain-1 điều hòa nhiều con đường tín hiệu liên quan đến ung thư bao gồm MAPK, ERa, EMT, RHOa, mTORC1, FOXM1 và P53, từ đó thúc đẩy sự tồn tại, tăng sinh, xâm lấn và kháng điều trị của tế bào ung thư [116]. Ngoài ra, các nghiên cứu lâm sàng cho thấy sự biểu hiện của protein Otubain-1 tăng với mức độ cao, xâm lấn và di căn ở một số loại khối u bao gồm ung thư phổi, vú, buồng trứng, u thần kinh đệm, ruột kết và dạ dày [116]. Khoảng 50% số bệnh nhân ung thư đại trực tràng, di căn gan và xương chậu có biểu hiện Otubain-1 cao hơn so với bình thường. Trong nguyên bào sợi chuột NIH3T3, Otubain-1 là một trong những DUB có biểu hiện cao nhất [117].

1.3.2.1 Cơ chế điều hòa hoạt động của Otubain-1

Năm 2010 Durocher phát hiện Otubain-1 có 2 cách hoạt động là độc lập và phụ thuộc [118]. Đối với hoạt động độc lập, Otubain-1 tách chuỗi ubiquitin từ chất nền protein. Hoạt động phụ thuộc là hoạt động ức chế sự vận chuyển ubiquitin vào trong chất nền thông qua việc gắn với enzyme liên hợp ubiquitin E2 (Hình 1.7) [118]. Do đó, Otubain-1 có thể làm giảm sự biểu hiện của protein bằng cách loại bỏ chuỗi ubiquitin hoặc ngăn cản sự liên hợp ubiquitin [119].



Hình 1.7. Hoạt động độc lập và phụ thuộc của protein Otubain-1 [118]

Weiner và cộng sự đã phát hiện ra rằng ubiquitin tự do liên kết với Otubain-1, C-terminator sẽ kích hoạt sự hình thành chuỗi xoắn alpha liên kết với E2/ubiquitin .

Nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng sự điều hòa Otubain-1 liên quan đến trục tín hiệu CXCL12/CXCR7/ERK trong các tế bào ung thư vú MCF7. Các tác giả cho rằng protein Otubain-1 điều hòa kháng thuốc điều trị nội tiết bằng cách loại bỏ ERα và tăng cường phiên mã trung gian Era [120]. Vì trục tín hiệu CXCL12/CXCR7 góp phần vào sự phát triển và tiến triển của các bệnh ung thư liên quan như ung thư tuyến tiền liệt [121] và ung thư buồng trứng [122].

1.3.2.2 Vai trò của protein Otubain-1 đối với tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Các nghiên cứu *in vitro* đã xác định được một DUB-Otubain-1 có thể trực tiếp phân cắt chuỗi ubiquitin khỏi các protein đích và gián tiếp ức chế quá trình phản ứng thông qua việc ngăn chặn chức năng của các enzyme liên hợp ubiquitin (E2s) [123, 124]. Tuy nhiên, chức năng sinh lý *in vivo* của Otubain-1 vẫn chưa được xác định rõ.

Năm 2019, nghiên cứu của Xiaofei Zhou và cộng sự đã xác định Otubain-1 là một chất điều hòa sự hoạt hóa và chức năng của tế bào T CD8 và tế bào NK trong các phản ứng đáp ứng miễn dịch chống nhiễm trùng và ung thư. Bên cạnh đó, Otubain-1 cũng kiểm soát quá trình hoạt hóa AKT (protein kinase B)- một kinase quan trọng để kích hoạt tế bào T, chuyên hóa các chức năng của T effector thông qua sự kích thích IL-15 [125]. Một nghiên cứu khác của TS. Nguyễn Thị Xuân cũng đã phát hiện ra Otubain-1 ngăn chặn sự hoạt hóa kéo dài phân tử p38MAPK do đó làm ảnh hưởng đến chức năng của TBT [126].

1.3.2.3 Otubain-1 điều hòa một số con đường liên quan đến ung thư

Hiện nay, đã có rất nhiều nghiên cứu chứng minh rằng Otubain-1 điều hòa các con đường quan trọng trong sự phát triển và tiến triển của nhiều bệnh ung thư khác nhau. Tuy nhiên, một số nghiên cứu chứng minh Otubain-1 có khả năng ức chế các con đường tăng trưởng như P53 và TGFβ. Otubain-1 cũng liên quan đến các con đường tín hiệu như kích hoạt tín hiệu RAS trong ung thư phổi, ức chế thụ thể estrogen [127], khử FOXM1 trong ung thư biểu mô tuyến vú và buồng trứng [128] và khả năng truyền tín hiệu và di chuyển của TGFβ [129] và nhiều con đường khác nữa được mô tả tại Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Một số con đường Otubain-1 liên quan

Ung thư	Protein của ung thư/con đường được điều hòa trực tiếp bởi hoạt động Otubain-1	Cơ chế điều hòa (độc lập [C] hoặc phụ thuộc [NC])	Ligase/E2 (Cặp enzyme ubiquitin ligase và E2 bị ức chế bởi Otubain-1)	Kết quả
Tín hiệu TGFb	SMAD2	NC	NEDD4L/UBCH5A	Tăng sự di cư
Phục hồi ADN	Histones	NC	RNF168/UBC13	Giảm quá trình ubiquitin của protein histone
Phổi	RAS	NC	RABEX5/UBCH5C	Tăng sự phát triển
Apoptosis	P53	C/NC	MDM2/UBCH5C	Tăng apoptosis
Apoptosis	MDMX	NC	MDM2/UBCH5C	Tăng apoptosis
Apoptosis	c-IAP	C		Giảm apoptosis
mTORC1	DEPTOR	NC		Tự thực bào
Màng trong dạ con	ERa	C/NC		Giảm quá trình phiên mã Era
Vú	FOXM1	C		Tăng sinh, kháng epirubicin
Buồng trứng	FOXM1	C		Gia tăng sinh sôi nảy nở, di cư, xâm lấn
Thực quản	SNAIL	C		EMT, tăng di chuyển, xâm nhập

1.3.3 Protein CYLD

1.3.3.1 Đặc điểm cấu tạo của CYLD

Protein CYLD được mã hóa bởi gen *CYLD* nằm ở vị trí 16q12-13 trên nhiễm sắc thể số 16. *CYLD* được xác định là nguyên nhân chính gây bệnh u vành khăn (cylindromatosis). Ngoài ra, nó còn liên quan đến các khối u lành tính thường gặp ở cổ hoặc nhiều vị trí khác [130]. Protein CYLD là một DUB thuộc họ protein USP (ubiquitin-specific proteases) có chức năng ức chế khối u ở bệnh ung thư đại tràng, phổi, khối u ác tính và đa u tủy [131]. Gen *CYLD* đã được nghiên cứu trên bệnh bạch cầu lympho T cấp tính (Acute lymphoblastic leukemia-T-ALL) [132]. *CYLD* là một

gen dài 60 kb trên nhiễm sắc thể 16q12.1 ở người (Genecards.org). Nó mã hóa cho một enzyme thioesterase có chiều dài 956 axit amin và chứa ba miền Cap-Gly để tương tác với các mục tiêu như NEMO trong con đường NF- κ B [8, 14]. Nó có khả năng phân cắt các nhóm sulfhydryl este và cũng chứa miền xúc tác USP ở đầu C hoạt động trên dư lượng lysine cụ thể trong ubiquitin [133]. Hơn nữa, bộ ba Cys601, His871 và Asp889 trong miền phụ xoắn α 1 của CYLD gây ra sự tấn công nucleophilic vào K63 của ubiquitin [133].

Protein CYLD có ba miền bảo tồn protein-glycine liên kết tế bào (CAP-GLY) và miền xúc tác UCH với mô-típ kẽm. Các miền CAP-GLY kết hợp với các vùng giàu proline chịu trách nhiệm liên kết vi ống và protein đích, trong khi miền UCH làm trung gian cho quá trình khử gốc, và mô-típ kẽm cho phép tương tác vùng và gấp CYLD. CYLD có tính đặc hiệu cao đối với chuỗi ubiquitin K63 [133], tuy nhiên cũng đã được chứng minh là làm trung gian cho quá trình khử vi khuẩn K48 của các protein đích [134]. Các protein đích của CYLD bao gồm u lympho tế bào B3, Histone-deacetylase 6, protein tương tác TRAF, yếu tố tăng trưởng- β -kinase kích hoạt 1, protein tương tác thụ thể 1, gen cảm ứng axit retinoic-1 và protein yếu tố liên kết với thụ thể TNF [135]. Thông qua quá trình khử gốc các protein tín hiệu này, CYLD đã được chứng minh là điều hòa các con đường tín hiệu chính bao gồm NF- κ B, Wnt/ β -catenin và c-Jun NH (2)-kinase -terminal (JNK) [136, 137]. Một số nghiên cứu khác cho rằng, chất ức chế khối u CYLD ức chế NF- κ B cũng như sự hoạt hóa con đường p38MAPK bằng cách loại bỏ một số phân tử tín hiệu điều hòa ngược của những con đường này, do đó ngăn chặn những con đường tín hiệu này [138]. Ngoài ra, CYLD đã được chứng minh là được điều hòa tiêu cực bởi các đường truyền tín hiệu của Notch [139] và Sonic Hedgehog [140] trong bệnh bạch cầu tế bào T và ung thư da, tương ứng. Tất cả các protein mục tiêu hiện được xác định của CYLD, nhiều protein là chất điều hòa tín hiệu của con đường NF- κ B (TRAF, NEMO, TRIP, RIP1, TAK1 và Bcl-3). Do đó, người ta tin rằng sai lệch bộ gen của *CYLD* có thể làm thay đổi hoạt động tín hiệu NF- κ B, cũng có thể góp phần vào sinh lý bệnh của hội chứng da *CYLD* và hình thành các khối u.

CYLD chủ yếu được tìm thấy trong tế bào chất và không gian mỗi nhân của nhiều loại tế bào. Ngoài ra, CYLD xuất hiện ở mức độ thấp trong các tế bào soma, trong đó các tế bào miễn dịch biểu hiện nhiều hơn [141]. Không giống như các

deubiquitinase khác như A20, CYLD được biểu hiện một cách trường thành [142]. Sự điều hòa của cả phiên mã và dịch mã CYLD rất thay đổi, với nhiều cơ chế có sẵn, bao gồm phosphoryl hóa trực tiếp bởi kinase, điều trị bằng các chất ức chế caspase allosteric như zVAD, phân cắt protein, truyền thụ thể bên ngoài huyết thanh và sửa đổi tiếp theo thông qua kinase, kiểm soát bởi các yếu tố phiên mã khác và tương tác gen, và liên kết trực tiếp bởi miRNA [143]. Các loại oxy phản ứng (ROS) do thiếu huyết thanh hoặc các hóa chất tạo ra ROS như meniadone được chứng minh là điều hòa tiêu cực phiên mã của CYLD và các gen điều hòa tế bào khác trong dòng tế bào gan HepG2 trong khi nồng độ huyết thanh điều hòa CYLD thông qua hoạt động của MAPK [144]. Một đánh giá của Sun và nhóm nghiên cứu đã nêu chi tiết về cấu trúc, chức năng và sự điều hòa CYLD [139].

Đến nay, rất ít bằng chứng nói về sự điều hòa biểu hiện CYLD bởi các tác nhân dược lý, nhưng có thể gián tiếp điều hòa nồng độ CYLD bằng các tác nhân tác động lên các yếu tố điều hòa đối với CYLD, chẳng hạn như yếu tố đáp ứng huyết thanh (SRF) hoặc chất ức chế kinase. Bệnh lâm sàng do thiếu chức năng CYLD dẫn đến có thể được điều hòa bởi các tác nhân được biết là điều hòa giảm viêm, chẳng hạn như aspirin. Mức độ biểu hiện CYLD có thể tăng gián tiếp do sự ức chế allosteric của caspase 8 phân cắt CYLD bởi zVAD-FMK. Có thể xảy ra nhiều đột biến của CYLD, với các đột biến trong vùng xúc tác gây ra sự hủy bỏ hoạt động khử chất béo [145]. Không có tài liệu y tế báo cáo hiện tại nào về các đột biến lâm sàng biểu hiện quá mức CYLD.

1.3.3.2 *Mối liên quan giữa CYLD và NF- κ B*

Giống với protein A20, CYLD điều hòa ngược con đường tín hiệu NF- κ B, kiểm soát quá trình viêm và chống lại quá trình apoptosis [133]. Các nghiên cứu cho thấy DUB đóng vai trò quan trọng trong việc đảm bảo truyền tín hiệu và cân bằng nội môi thông qua việc kiểm soát chặt chẽ sự chết theo chu trình của tế bào và kích hoạt phân tử tín hiệu NF- κ B. Thật vậy, CYLD có vai trò loại bỏ các chuỗi polyubiquitin K63 và M1 khỏi một loạt các protein tín hiệu NF- κ B. Vai trò của CYLD trong việc kích thích khử một số protein tín hiệu NF- κ B quan trọng, sự thiếu hụt CYLD dẫn đến kích hoạt NF- κ B dẫn đến biểu hiện gen tiền viêm [136, 146]. Ngoài ra, CYLD còn được biểu hiện chủ yếu trong hầu hết các loại tế bào, nhưng điều hòa phiên mã của nó phụ thuộc vào tín hiệu phân tử NF- κ B [147] cũng như điều hòa giảm biểu hiện *CYLD* qua trung

gian miRNA đã được báo cáo trước đó [148]. Ở cấp độ protein, CYLD được phosphoryl hóa nhanh chóng để đáp ứng với TNF, LPS và các nguyên tố trên nhiều gốc trong một cụm serine giữa các axit amin 418 và 444, [143]. Bên cạnh các DUB như A20, CYLD đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt hoặc ức chế con đường tín hiệu NF- κ B còn có các DUB khác như USP10, USP11, USP21, USP15 và OTULIN cũng tham gia vào điều hòa tín hiệu phân tử này [101].

Vai trò chính của CYLD trong tế bào là điều hòa sự hoạt hóa qua trung gian TNFR của NF- κ B. NF- κ B được giữ dưới sự nén liên tục bởi I κ B cho đến khi nó được phosphoryl hóa bởi IKK (chứa các tiểu đơn vị xúc tác có tên IKK α và IKK β) [149]. Protein IKK có một tiểu đơn vị xúc tác được đặt tên là IKK γ , được polyubiquitin hóa theo kiểu liên kết K63 để ra hiệu cho nó phosphoryl hóa I κ B, sau đó giải phóng p50 và p65 để chuyển vị vào nhân nơi chúng điều hòa quá trình phiên mã của các yếu tố gây viêm [136, 149]. CYLD có thể khử chất béo NEMO, ngăn không cho nó gây ra quá trình phosphoryl hóa I κ B, do đó làm mất tín hiệu [146, 150]. Vì NF- κ B là một yếu tố phiên mã kiểm soát rất nhiều khía cạnh khác của cân bằng nội môi tế bào (apoptosis, viêm, tăng trưởng, v.v.), sự điều hòa của CYLD trên NF- κ B trở thành một tín hiệu trung gian quan trọng cho hệ thống miễn dịch, sự phát triển và chết tế bào.

1.3.3.3 CYLD điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và sự phát tín hiệu tế bào

CYLD là một chất điều hòa chính của phản ứng viêm, đóng một vai trò quan trọng điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa của tế bào. CYLD hoạt động dựa vào gen *Plk1* (Polo-Like Kinase 1) để điều hòa sự xâm nhập của tế bào HeLa vào quá trình nguyên phân [151]. Plk1 là chất ổn định chính của sự hình thành kinetochore và vi ống [152]. CYLD cũng có thể điều hòa sự phát triển vi ống trong tế bào Hela và CV1 bằng cách tương tác trực tiếp với tubulin thông qua miền Cap-Gly của nó [153]. Sự hình thành mạch được điều hòa bởi gen *CYLD* đối với sự di chuyển của các tế bào nội mô mạch máu, tế bào này phụ thuộc vào vi ống [148]. Sự hình thành thoi phân bào là một bước quan trọng trong chu kỳ tế bào và CEP192 (Protein trung thể của 192kD) tương tác trực tiếp với CYLD để hình thành thoi phân bào, điều này đã củng cố thêm bằng chứng về vai trò điều hòa của CYLD trong quá trình phân chia tế bào [93]. Các bằng chứng bổ sung cũng cho thấy sự tham gia của CYLD vào hoạt động của gen *RhoA*, *JNK* và *Akt*, là những chất điều hòa chính của sự tăng sinh [154]. Ung thư biểu mô tế bào đáy, một trong những bệnh ung thư phổ biến nhất ở người, đã được chứng minh là

điều hòa giảm bản sao CYLD do hoạt động của yếu tố phiên mã Snail, yếu tố này lần lượt được kích hoạt bởi gen Kruppel zinc finger *GLI1* [155]. Sự điều hòa giảm này ảnh hưởng đến các tế bào ung thư, tế bào sừng bằng cách tăng sự sinh sôi của chúng, mà CYLD không còn có thể kiểm soát được nữa. Nó đã được chứng minh rằng yếu tố hạ nguồn Notch Hes-1 có thể ức chế biểu hiện CYLD để tăng hoạt động NF- κ B trong tế bào chính của chuột T bệnh bạch cầu nguyên bào cấp tính [156]. Ức chế biểu hiện CYLD trong trường hợp này làm ảnh hưởng đến quá trình duy trì bệnh. Knockout *CYLD* trong tế bào khối u có thể ngăn chặn sự khử gốc liên kết K63 của Dvl (Disheveled), giúp tăng cường tín hiệu Wnt/ β -catenin [157]. Vì con đường Wnt / β -catenin điều hòa mạnh mẽ sự tăng sinh, hơn nữa CYLD tạo áp lực mạnh lên Dvl, do đó điều hòa sự tăng sinh tế bào một cách trực tiếp [139]. Dvl, đóng vai trò là một gen tăng sinh chính và cũng là nền tảng cho sự hình thành trực chính. Quá trình khử gốc Dvl qua trung gian CYLD có thể điều hòa sự hình thành trực chính bằng cả sự ổn định của các vi ống và bằng cách thúc đẩy sự hình thành phức hợp dynactin với Disheveled và NuMA (protein bộ máy phân bào) [158]. Rõ ràng, liên kết của protein bộ máy phân bào của nó trở nên thuận lợi hơn sau khi khử phản ứng, cho thấy một con đường tế bào quan trọng khác được điều hòa bởi CYLD. Kể từ khi phát hiện ra khả năng ubiquitin hoạt động của CYLD như một chất đánh dấu proteasomal và một hỗ trợ dẫn truyền tín hiệu, vai trò của nó trong nhiều con đường đã được nghiên cứu rộng rãi [159]. Vì sự chuyển hóa xung quanh liên kết với K63 là một bộ chuyển đổi tín hiệu tế bào quan trọng, nên về mặt logic việc loại bỏ ubiquitin cũng ảnh hưởng đến đường dẫn tín hiệu. Theo các bằng chứng nghiên cứu trước đây cho thấy, CYLD cũng có chức năng như một cơ quan điều hòa cơ bản của sự phát triển tế bào nhân thực [160].

1.3.3.4. Một số bệnh liên quan đến CYLD

Căn bệnh nổi bật nhất gây ra bởi sự mất chức năng hoặc đột biến di truyền của CYLD là bệnh u vành khăn. Những khối u lành tính này phát triển nhiều từ các tuyến mồ hôi xung quanh đầu, mặt và cổ. Được gọi là hội chứng Brooke-Spiegler, biểu hiện kiểu hình của u xơ trụ di truyền đã được đề cập trong các tài liệu lâm sàng từ năm 1982, với bài báo tiếng Anh đầu tiên được xuất bản 9 năm sau đó. Cũng có một số bằng chứng cho thấy CYLD là nguyên nhân gây ra bệnh Paget của xương, được đánh dấu bằng sự dễ gãy do sự biệt hóa của tế bào tủy xương bị ảnh hưởng [161]. Các nghiên cứu bệnh học thần kinh đã chỉ ra rằng CYLD tích tụ với mật độ cao sau synap

(PSD) và được cho là có liên quan đến việc loại bỏ K63 khỏi các protein PSD, ngăn cản quá trình điều hòa của chúng [162]. Sự tích tụ này có thể gây ra thoái hóa thần kinh [162]. CaM-KII (protein kinase II phụ thuộc calmodulin) làm trung gian cho việc tăng cường CYLD này trong não [163].

1.3.4 Protein Cezanne

Cezanne hay còn được gọi là protein OTUD7B được xác định có trình tự tương đồng với A20 [164]. Cũng giống như protein A20, Cezanne là một DUB thuộc họ OTU và nó điều hòa ngược con đường tín hiệu NF- κ B.

Nhóm nghiên cứu của David Komander đã phát hiện rằng họ OTU gồm các DUB (16 thành viên) cho thấy các đặc điểm liên kết riêng biệt [164]. Trong số đó, OTUD7B/Cezanne thể hiện tính đặc hiệu và hoạt tính rất cao đối với các chuỗi liên kết K11 [164]. Miền OTU xúc tác của Cezanne có liên quan chặt chẽ với miền của TRABID ưu tiên phân cắt polyubiquitin liên kết Lys63. Protein này chia sẻ miền xúc tác mở rộng 320-350 gốc so với các miền OTU khác (~150 Aa), và cấu trúc miền của các enzyme có chiều dài đầy đủ cũng tương tự. Cezanne phân cắt các liên kết Lys11 với hoạt tính cao hơn đáng kể so với các chuỗi liên kết tuyến tính, Lys48- và Lys63. Điều này xác định Cezanne là DUB được mô tả đầu tiên với ưu tiên Lys11.

Cezanne cũng liên quan đến tín hiệu NF- κ B vì nó được điều hòa bởi yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) [165]. Việc kích hoạt yếu tố phiên mã NF- κ B bởi các cytokine như TNF- α dựa vào sự thay đổi ở khắp nơi của các protein tương tác với thụ thể bao gồm RIP1, dẫn đến kích hoạt các kinase xuôi dòng [166]. Sự biểu hiện quá mức của Cezanne dẫn đến việc khử tiết RIP, tuy nhiên, tác dụng ức chế này của Cezanne được cho là do hoạt động không đặc hiệu của nó chống lại các liên kết Lys48 và Lys63 [165]. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây đều cho thấy chất nền ưa thích của Cezanne là polyubiquitin liên kết Lys11 và loại chuỗi này cho đến nay không liên quan đến tín hiệu NF- κ B. Ưu tiên liên kết Lys11 gợi ý rằng Cezanne có thể ổn định các chất điều hòa tiêu cực của tín hiệu NF- κ B vì các liên kết Lys11 có thể hoạt động như các tín hiệu nhắm mục tiêu proteasomal. Tuy nhiên, cũng có thể là các liên kết Lys11 có thể có vai trò không phân hủy. Việc xác định các chất nền Cezanne mới sẽ cung cấp những hiểu biết sâu sắc hơn về vai trò của các liên kết Lys11 trong cơ thể sống. Điều quan trọng là phải hiểu được cơ sở phân tử tính đặc hiệu của Cezanne, và phân tích

thêm các OTU DUB cũng như các enzyme từ các họ DUB khác về tính đặc hiệu đối với chuỗi liên kết Lys11.

Các nghiên cứu tiếp theo của nhóm này đã kết luận được một số cấu trúc tinh thể của Cezanne với chuỗi di-ubiquitin được liên kết thông qua K11, nhưng đáng chú ý là tầm quan trọng với tính đặc hiệu đó trong tế bào vẫn còn khó nắm bắt [167]. Tuy nhiên, đặc điểm liên kết ubiquitin cụ thể này của Cezanne là manh mối đầu tiên cho chức năng tế bào của nó.

Cezanne điều hòa chu kỳ tế bào và chống lại quá trình ubiquitin của phức hợp APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome- Phức hợp xúc tiến kỳ sau). Phức hợp APC/C là một enzyme ligase ubiquitin E3 có chức năng đánh dấu một số protein trong chu kỳ tế bào [168]. Khi protein Cezanne giảm biểu hiện dẫn đến các khiếm khuyết về quá trình phân bào, làm suy yếu sự tăng sinh tế bào. Cezanne được khuếch đại và biểu hiện quá mức trong nhiều bệnh ung thư, bao gồm các khối u ác tính ở vú, buồng trứng và tuyến tụy [168]. APC/C kích hoạt sự suy thoái của các chất điều hòa phân bào thông qua việc tạo ra các chuỗi liên kết K11 và Cezanne có thể đối kháng với quá trình này trên một số chất nền, do đó góp phần vào động học của sự thoái hóa. Điều quan trọng là Cezanne bị bất hoạt dẫn đến các khiếm khuyết phân bào làm suy giảm sự tăng sinh tế bào, tạo thêm vai trò của nó trong việc kiểm soát chu kỳ tế bào. Các nhà khoa học vẫn đang xác định xem Cezanne có các chức năng bổ sung và không phụ thuộc APC/C trong quá trình nguyên phân hay không. Tương tự như vậy, việc tạo hồ sơ của các chất nền phân bào do Cezanne kiểm soát sẽ cho phép chúng ta có được ý tưởng tốt hơn về sự đóng góp của nó đối với quá trình nguyên phân.

Cezanne có liên quan đến sinh học ung thư vì trình tự 93 kb chứa *Cezanne* được chứng minh là được nhân đôi trong bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính và ung thư hạch Burkitt. *Cezanne* đóng vai trò quan trọng trong việc dự đoán, cũng như sự phát triển của khối u. Bên cạnh đó, *Cezanne* còn là dấu ấn sinh học tiềm năng cần cho sự sống của bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan [169]. Đáng chú ý, Cezanne và USP21 cùng nằm trên nhiễm sắc thể 1q và cả hai đều được khuếch đại thường xuyên và biểu hiện quá mức trong nhiều bệnh ung thư bao gồm các khối u ác tính ở vú, buồng trứng và tuyến tụy. *Cezanne* còn được thể hiện cao trong cả ung thư biểu mô vảy phổi, ung thư biểu mô tuyến và liên hệ với tiên lượng xấu hơn.

1.3.5 Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước bệnh tăng hồng cầu vô căn

1.3.5.1 Tình hình nghiên cứu vai trò của gen *DUB* và tín hiệu phân tử liên quan của bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn trên người Việt Nam

Ở Việt Nam, các nghiên cứu mới chỉ dừng lại chủ yếu ở phần mô tả dịch tễ, chẩn đoán và điều trị bệnh THCVC. Bộ Y Tế đã ban hành hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học theo Quyết định số 1494/QĐ-BYT ngày 22/04/2015 bệnh THCVC. Tại đây, bệnh THCVC cũng được nhắc đến thuộc hội chứng tăng sinh tủy mạn ác tính và cơ chế bệnh sinh do đột biến *JAK2 V617F* hoặc *JAK2 exon 12* [170]. Quyết định gần đây nhất của Bộ Y Tế số 1832/QĐ-BYT ngày 01 tháng 07 năm 2022 về việc ban hành tài liệu chuyên môn hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học cũng yêu cầu việc chẩn đoán bệnh THCVC phải có đột biến gen *JAK2 V617F* hoặc *JAK2 exon 12* [171]. Trong một bài báo trên tạp chí Y Học Thành phố Hồ Chí Minh năm 2013 đã tiến hành khảo sát đột biến *JAK2V617F* trên bệnh nhân THCVC nguyên phát, nghiên cứu này đã xác định được các đặc điểm về huyết học, tỷ lệ đột biến *JAK2V617F* trên bệnh nhân THCVC nguyên phát trên 30 bệnh nhân THCVC nguyên phát có độ tuổi trung bình là 53 [172].

Nghiên cứu trước đây của chúng tôi xác định mức độ biểu hiện của một số gen kiểm soát miễn dịch như *klotho*, *LAG3*, *CTLA-4* và *PD-1* giảm ở bệnh nhân THCVC đã chỉ ra rằng hệ miễn dịch đối kháng ở bệnh nhân này chưa hoạt động [173]. Ngoài ra chưa có nghiên cứu nào về vai trò của nhóm gen mã hóa *DUB* và một số tín hiệu phân tử liên quan trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn.

1.3.5.2 Tình hình nghiên cứu vai trò của gen *DUB* và tín hiệu phân tử liên quan trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn trên thế giới

Bệnh THCVC là một trong những bệnh thuộc nhóm tăng sinh tủy đặc trưng bởi sự rối loạn quá trình sản sinh máu. Nghiên cứu về các gen điều hòa và tín hiệu phân tử liên quan trên bệnh nhân THCVC trên thế giới vẫn còn rất hạn chế. Năm 2017, Yu-Cheng Chang và cộng sự đã báo cáo đột biến *Soma* và *Germline* ở 2 bệnh nhân THCVC bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới trên tổng số 30 bệnh nhân [174]. Báo cáo dịch tễ tại Hoa Kỳ năm 2014 cho thấy có 148.000 người đang mắc bệnh THCVC với tỷ lệ rơi vào khoảng 2,5-10 người trên một trăm nghìn dân [2, 175]. Bệnh THCVC là bệnh có tỷ lệ mắc và sống sót sau 5 năm phụ thuộc vào độ tuổi. Ở Châu Âu, số liệu thống kê từ những năm 1995 đến 2002 cho thấy, tỷ lệ sống sau 5 năm

của THCVC là 84,8% (81,5–87,5%) và tỷ lệ sống sót tương đối giảm xuống còn 79,4% ở những người 70 tuổi [4]. Nghiên cứu về đột biến gen *JAK2* trên exon 12 trong bệnh THCVC đã xác định được 4 đột biến soma tăng chức năng ảnh hưởng đến *JAK2* exon 12 ở 10 bệnh nhân âm tính với V617F. Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng những người có đột biến *JAK2* exon 12 có biểu hiện tăng hồng cầu riêng biệt và có hình thái tủy xương đặc biệt và trong đó một số người có biểu hiện giảm erythropoietin, hormone này kích thích sản xuất hồng cầu trong tủy xương [176].

Năm 2013, nghiên cứu của Misa Imai và cộng sự đã báo cáo đột biến *CARL* mới (mất và chèn ở exon 9) và *JAK2* ở bệnh tăng tiểu cầu nguyên phát. Trong tăng tiểu cầu nguyên phát, đột biến gen *CALR* có mức độ huyết sắc tố và số lượng bạch cầu thấp hơn, số lượng tiểu cầu cao hơn và khả năng sống sót tốt hơn so với đột biến trên gen *JAK2* [19]. Cho đến nay, tất cả các đột biến *CARL* được tìm thấy trong tăng sinh tủy đều liên quan đến exon 9. Đột biến gen *CALR* hiếm khi xuất hiện ở bệnh THCVC còn đột biến gen *MPL* thì gần như không có. Trong một bài tổng quan về bệnh THCVC năm 2021 đã nói rằng sau khi mô tả các đột biến *JAK2*, *MPL* và *CALR* các tiêu chuẩn chẩn đoán cho bệnh THCVC đã được sửa đổi và bổ sung làm cho việc xác định các giai đoạn sớm của bệnh là rất khả thi. Những chỉ số xét nghiệm để xác định bệnh nhân có nguy cơ mắc bệnh đã được điều chỉnh và chúng chủ yếu dẫn đến các hướng điều trị nhất định. Do vậy, điều trị bệnh THCVC chủ yếu tập trung vào giảm nguy cơ tăng huyết khối, kiểm soát tăng sinh tủy và quản lý các biến chứng liên quan [177].

Các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm kiểm tra vai trò di truyền bệnh của đột biến *JAK2* được nhấn mạnh bởi nguồn gốc của nó ở cấp độ tế bào gốc và việc chứng minh rằng sự kích hoạt tín hiệu JAK-STAT cao hơn THCVC đột biến *JAK2* ở chuột [5, 12, 13]. Năm 2016. Tổ chức Y tế thế giới WHO đã thảo luận chuyên sâu về phân loại và chẩn đoán đối với bệnh MPN. Trong đó bệnh MPN được phân loại thành các bệnh bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính, bệnh bạch cầu đa nhân trung tính, bệnh đa hồng cầu (THCVC), bệnh xơ hóa tủy nguyên phát (PMF), bệnh tăng tiểu cầu tiên phát (ET), bệnh bạch cầu tăng bạch cầu ái toan mãn tính và không thể phân loại (MPN-U); [178].

Đến nay, chưa có nghiên cứu nào trên thế giới kiểm tra về vai trò của gen *DUB* và tín hiệu phân tử liên quan của bệnh nhân THCVC. Tuy nhiên đã có nhiều nghiên cứu chứng minh rằng Otubain-1 điều hoà các con đường quan trọng trong sự phát triển

và tiến triển của nhiều bệnh ung thư khác nhau. Otubain-1 liên quan đến các con đường tín hiệu như kích hoạt tín hiệu RAS trong ung thư phổi [179], ức chế thụ thể estrogen [127], khử FOXM1 trong ung thư biểu mô tuyến vú và buồng trứng [128] và khả năng truyền tín hiệu và di chuyển của TGFb [129] và nhiều con đường khác. Từ đó hứa hẹn Otubain-1 được dự đoán tham gia vào điều hòa tín hiệu phân tử trên bệnh nhân THCVC.

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

2.1.1 Đối tượng và tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân

2.1.1.1 Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là 77 bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định mắc bệnh THCVC và 55 người khỏe trên lâm sàng và cận lâm sàng tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương và Bệnh viện Quân Y 103, Hà Nội có trong khoảng độ tuổi là 58.7 (19-81) (danh sách bệnh nhân và người khỏe được liệt kê ở phụ lục I). Bệnh nhân được lấy máu tĩnh mạch, cho vào ống chứa chất chống đông EDTA với hàm lượng 1,5 mg/ml. Quy trình lấy máu đảm bảo vô trùng tuyệt đối và bảo quản ở -20°C cho đến khi tách chiết DNA.

Nghiên cứu được thực hiện trong khoảng thời gian từ tháng 12 năm 2018 đến tháng 02 năm 2022 tại Viện Nghiên cứu hệ gen và Học viện Quân y 103.

PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của các tình nguyện viên với thể tích mỗi mẫu là 150 ml. Các tình nguyện viên đã được khám lâm sàng và làm các xét nghiệm cận lâm sàng tại Bệnh viện Huyết học Truyền máu Trung Ương để đảm bảo đủ điều kiện đáp ứng nghiên cứu. Tất cả bệnh nhân và tình nguyện viên đã ký văn bản đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.1.2 Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh tăng hồng cầu vô căn

Các tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh tăng hồng cầu vô căn như sau:

- + Hb > 185 G/L (nam), > 165 G/L (nữ) hoặc Hb > 170 G/L ở nam, > 150 G/L ở nữ nếu kết hợp với Hb tăng bền vững ≥ 20 G/L so với bình thường mà không phải do điều trị chế phẩm sắt, hoặc tăng thể tích khối hồng cầu toàn thể > 25% trị số bình thường;
- + Có đột biến gen $JAK2^{V617F}$.
- + Sinh thiết tủy xương: tủy giàu tế bào, tăng sinh ba dòng tế bào đặc biệt là tăng sinh và loạn sản dòng mẫu tiểu cầu, đôi khi kèm theo xơ hoá tủy;
- + Nồng độ erythropoietin huyết thanh giảm;

- + Tạo cụm EEC (endogenous erythroid colony) khi nuôi cấy cụm tế bào tủy không dùng chất kích thích sinh hồng cầu.
- + Chẩn đoán xác định đa hồng cầu nguyên phát khi có cả 2 tiêu chuẩn chính và 1 tiêu chuẩn phụ hoặc tiêu chuẩn chính số 1 và 2 tiêu chuẩn phụ.
- + Nhiễm sắc thể Ph: âm tính.

2.1.1.3 Tiêu chuẩn loại trừ

- + Loại bỏ các đối tượng bệnh nhân không có đầy đủ các thông tin lâm sàng
- + Bệnh nhân đang bị nhiễm khuẩn huyết.
- + Loại bỏ những bệnh nhân gia đình người bệnh không đồng ý tham gia nghiên cứu
- + Loại trừ bệnh nhân không có hồ sơ nghiên cứu của người bệnh đầy đủ

2.1.1.4 Tiêu chuẩn lựa chọn

a. Tiêu chuẩn chính

- + Hemoglobin > 165 g/l đối với nam và > 160 g/l đối với nữ *hoặc* hematocrit > 0,49 l/l đối với nam và > 0,48 l/l đối với nữ *hoặc* tăng thể tích khối hồng cầu toàn thể > 25% trị số bình thường.
- + Kết quả xét nghiệm mô bệnh học tủy xương cho thấy tình trạng tăng mật độ tế bào với sự tăng sinh cả 3 dòng tế bào tủy trong đó chủ yếu là dòng hồng cầu, tăng sinh bạch cầu hạt và mẫu tiểu cầu. Tuy nhiên, nếu bệnh nhân có tăng hồng cầu kéo dài với mức độ Hemoglobin > 185 g/l đối với nam và 165 g/l đối với nữ thì tiêu chuẩn này không bắt buộc. [171]
- + Có đột biến JAK2 V617F hoặc JAK2 exon 12.

b. Tiêu chuẩn phụ

- Nồng độ erythropoietin huyết thanh giảm.
- Chẩn đoán xác định đa hồng cầu nguyên phát khi có cả 3 tiêu chuẩn chính hoặc 2 tiêu chuẩn chính số 1, 2 và tiêu chuẩn phụ. [171]

2.1.1.5 Thống kê sinh học

Cỡ mẫu được tính theo công thức:

$$n_1 = n_2 = \frac{[Z_{(1-\alpha/2)} \sqrt{2P(1-P)} + Z_\beta \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)}]^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

n_1 : Cỡ mẫu nhóm nghiên cứu (NNC), n_2 : Cỡ mẫu nhóm đối chứng (NĐC), $Z_{1-\alpha/2}$: Hệ số tin cậy 95% ($= 1,96$), Z_β : Lực mẫu ($= 1,645$), P_1 : Tỷ lệ bệnh nhân nhóm nghiên cứu: Ước lượng là 95%, P_2 : Tỷ lệ bệnh nhân nhóm đối chứng: Ước lượng là 95%, $P = P_1 + P_2/2 = 0,59 + 0,55 = 0,725$; kết quả tính toán cỡ mẫu nhóm $n_1 = n_2 = 39,5$. Như vậy, mỗi nhóm ít nhất phải là ≥ 40 bệnh nhân [180].

2.1.2 Dụng cụ, trang thiết bị

Các trang thiết bị, máy móc thực hiện trong nghiên cứu này thuộc Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Học viện Quân Y. Các thiết bị sử dụng chính bao gồm: Máy giải trình tự (Applied Biosystems - Life Technologies); Máy Flow cytometry (FACS Aria Fusion, BD Biosciences, Mỹ); Máy điện di tự động (Agilent Technologies); Máy soi gel & chụp ảnh Gel-Doc (UVP, Mỹ); Bộ điện di (Bio-RAD, Mỹ); Máy Real time PCR (Roche, Mỹ); Máy đọc ELISA (Biotek, Mỹ); Tủ ấm CO₂ (ThermoFisher Scientific Forma); Tủ lạnh -30°C, -80°C, (Angelantoni, Ý); Máy đo quang phổ DU 730 (Beckman, Đức); Máy ly tâm lạnh Eppendorf (Eppendorf, Đức); Máy block nhiệt (Eppendorf, Đức); Bộ pipets (Eppendorf, Đức); Máy Vortex M52 (IKA, Đức); Máy khuấy từ gia nhiệt model RCT (IKA, Đức); Máy PCR Mastercycler pro S (Đức) và các thiết bị chuyên dụng khác.

2.1.3 Hóa chất sử dụng

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi các hãng có uy tín và được liệt kê sau đây:

**Hóa chất tách chiết DNA tổng số từ máu*: Sử dụng bộ kit thương mại QIAmp DNA Maxi Kit (QIAGEN).

* *Hóa chất điện di*: agarose của Affymetrix, Cleveland, Mỹ; Dung dịch TAE 1X; Loading Buffer 6X; Ethidium bromide (Thermo).

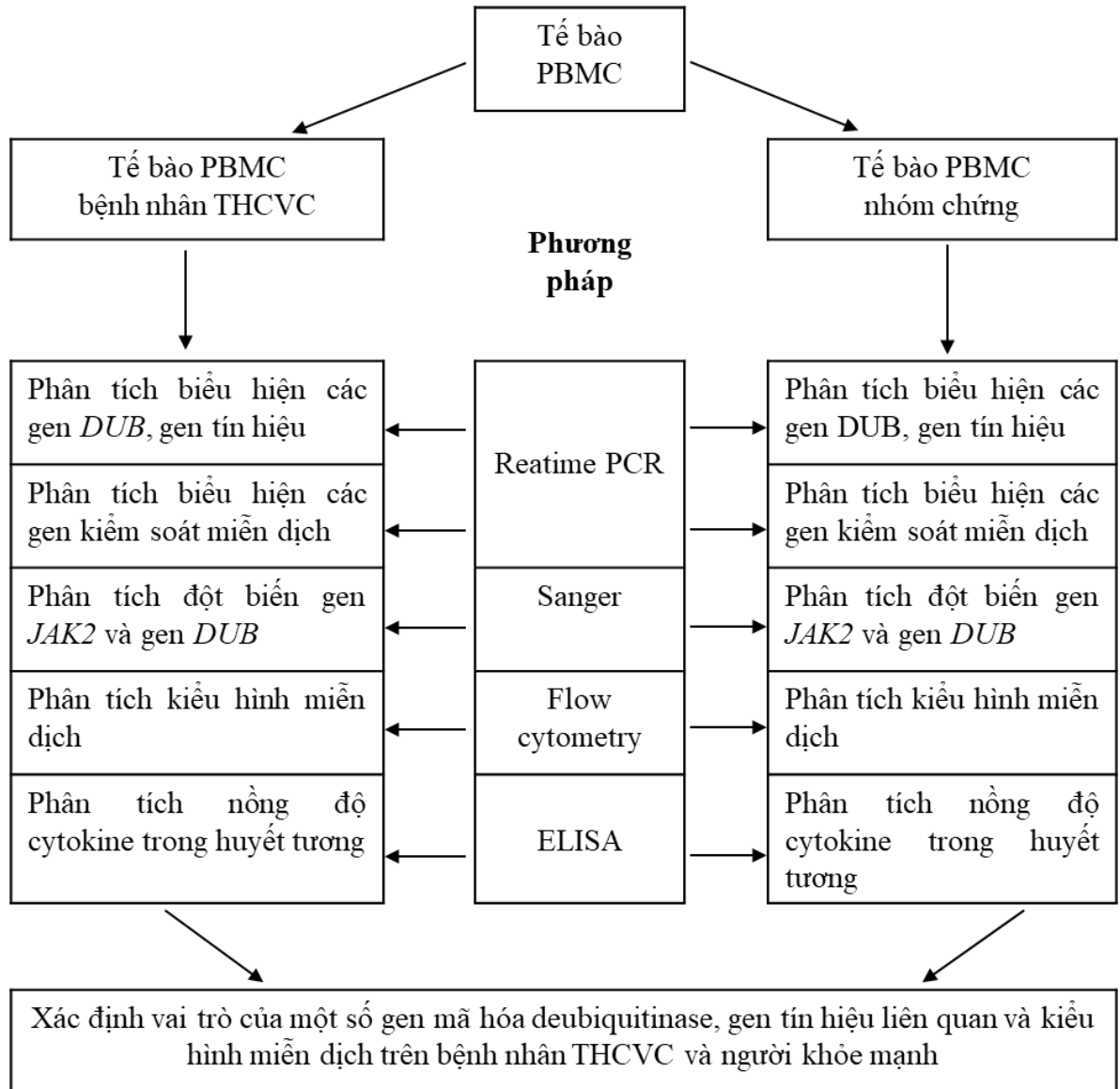
* *Hóa chất thực hiện kỹ thuật PCR*: Taq 2X Master Mix của New England Biolab, Mỹ; dNTPs, nước cất hai lần khử ion và DMSO bioWORLD, Mỹ; Các đoạn mã môi đặt tại công ty Phù Sa, Cần Thơ, Việt Nam.

**Hóa chất đếm dòng chảy tế bào và ELISA miễn dịch tế bào*: FACS buffer (PBS plus 0.1% FCS), FACSAria Fusion, BD Biosciences, CD45, CD19, CD3, CD4, CD8 α , CD11b, CD25, CD40, CD44 và CD86 (hãng eBioscience) nồng độ 10 μ g/mL. Kít ELISA (BioLegend) các cytokine TNF- α , IL-12p70, IL-6 và IL-1 β , CA125.

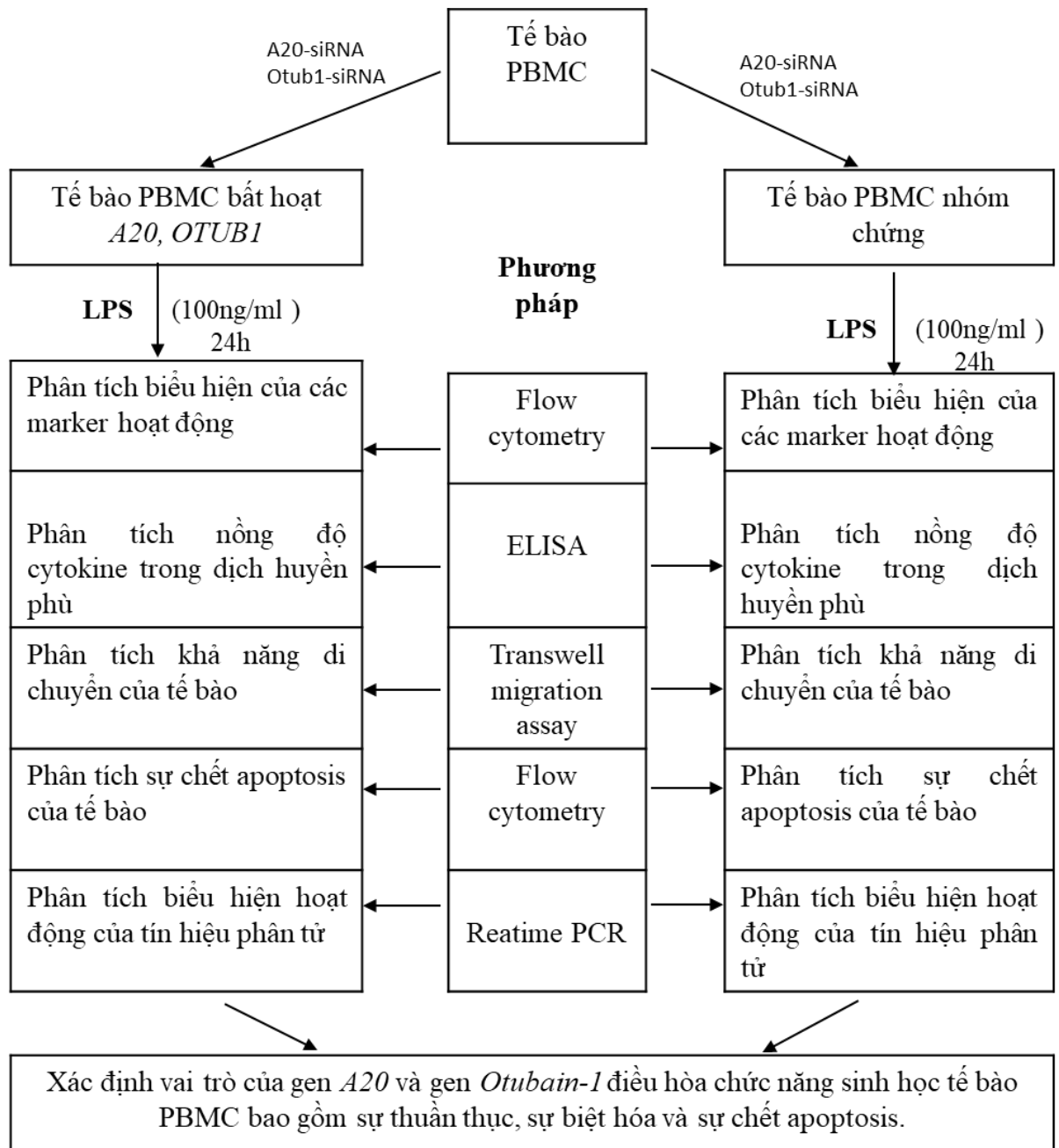
**Hóa chất silience RNA và tách chiết RNA tổng số*: A20 siRNA, OTUB1 siRNA và siRNAs đối chứng ((siRNA được thiết kế trước từ hãng Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen), PBS, TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen),

* *Hóa chất nuôi cấy tế bào*: (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life Sciences) using Hank's buffer (Gibco), PBS, RPMI 1640 medium (Gibco), FBS, L-glutamine (Gibco), Antibiotic-Antimycotic Solution (Sigma), and MEM NEAA (Gibco), lipopolysaccharide (LPS) từ *Escherichia coli* (1 μ g/mL, Sigma)

2.2 Sơ đồ thí nghiệm



Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm thứ nhất- các tế bào PBMC được sử dụng để xác định vai trò của một số gen liên quan



Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm thứ hai- các tế bào PBMC được nuôi cấy và phơi nhiễm với LPS

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Xét nghiệm sinh hóa máu

Mẫu máu tổng số được thu thập để làm các xét nghiệm trong phòng thí nghiệm và định lượng tổng số cholesterol (TC) chất béo trung tính, cholesterol lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL-C), cholesterol lipoprotein tỷ trọng cao (HDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), creatinin và ure. Không có cá nhân nào trong quần thể đối chứng dùng bất kỳ loại thuốc nào hoặc

mắc bất kỳ bệnh cấp tính hoặc mãn tính nào đã biết. Tất cả bệnh nhân và tình nguyện viên đã đồng ý bằng văn bản để tham gia vào nghiên cứu.

2.3.2 Tách huyết tương

Để tách chiết và bảo quản huyết tương dùng cho thí nghiệm ELISA, các mẫu máu được ly tâm ở 3000 rpm trong vòng 10p ở nhiệt độ phòng để phân pha. Bỏ phần dịch đỏ ở phía dưới, thu phần dịch có màu vàng nhạt trong ở phía trên là huyết tương cần cho xét nghiệm. Mẫu huyết tương cần được giữ tươi và sạch và lưu trữ ở 4°C (có thể bảo quản lên đến 2 ngày) hoặc ở -20°C sẽ bảo quản đến khi làm thí nghiệm (có thể bảo quản lên đến 2 năm).

2.3.3 Tách chiết DNA và RNA

2.3.3.1 Tách chiết DNA tổng số và bảo quản DNA tổng số từ máu

Mẫu máu ngoại vi (2 ml mỗi cá thể) được thu vào ống chứa máu EDTA và lưu giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng. Các mẫu sau khi tiếp nhận đã được mã hóa sau đó tách chiết DNA tổng số bằng kit GeneJET. Đầu tiên tiến hành chuẩn bị 20 μ l proteinase K (20 mg/ml) trong ống Eppendorf 1,5 ml. Bổ sung 200 μ l máu và 20 μ l RNase (20 mg/ml). Hỗn hợp được trộn đều bằng máy vortex, spin nhanh và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Sau đó thêm 200 μ l BL buffer vào hỗn hợp và trộn đều, hỗn hợp được ủ ở 56°C trong 10 phút. Bổ sung 200 μ l ethanol 100% và trộn đều hỗn hợp sau đó spin nhẹ, chuyển hỗn hợp lên cột tách chiết đặt trong ống thu và ly tâm với tốc độ 8000 rpm trong 60 giây. Chuyển cột sang ống thu mới và thêm 600 μ l BW buffer, ly tâm ở 8000 rpm trong 60 giây. Sau đó bỏ dịch trong ống thu, đặt lại cột vào ống thu và tiếp tục ly tâm 7000 rpm trong 2 phút để làm khô cột. Chuyển cột sang ống Eppendorf 1,5 ml mới và thêm 70 μ l TE buffer ở đã ủ 56°C vào đáy cột, để cho đệm thấm đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 phút. Tiếp tục ly tâm ở 10.000 rpm trong 1 phút để thu mẫu. DNA lúc này thu được hòa tan trong đệm TE buffer sau khi đi qua cột ở bước ly tâm cuối cùng. Mẫu DNA tổng số thu được kiểm tra bằng điện di trên agarose 0,8% và đo nồng độ, sau đó đem lưu trữ ở -20°C.

2.3.3.2 Tách chiết RNA tổng số

RNA được tách chiết từ tế bào PBMC thu được từ 2ml mẫu máu ngoại vi từ bệnh nhân THCV và người khỏe bằng Trizol theo hướng dẫn của hãng Invitrogen. RNA được tách chiết bằng Trizol theo hướng dẫn của hãng Invitrogen. Để loại bỏ

DNA và tạp chất, bổ sung 1 ml Trizol vào ống chứa tế bào (2×10^6 TB), đảo nhẹ nhàng. Tiếp tục bổ sung 200 μ l chloroform lạnh, đảo nhẹ nhàng và ly tâm 13.000 rpm/10 phút/ 4°C. Sau đó bổ sung 400 μ l isopropanol lạnh đảo đều bằng tay, ly tâm tại điều kiện 13.000 rpm/10 phút/4°C sau đó loại bỏ dịch. Bổ sung 500 μ l ethanol 75% lạnh, đảo nhẹ và tiếp tục ly tâm 13.000 rpm/10 phút/ 4°C, loại bỏ dịch. Bổ sung 50 μ l đến 100 μ l nước DEPC để thu hồi RNA. Sau đó, mẫu được bảo quản ở -80°C để làm các thí nghiệm tiếp theo. Chất lượng của RNA tổng số được đánh giá qua máy quang phổ Eppendorf định lượng RNA Biospectrometer của Đức và điện di trên gel agarose 2%.

2.3.4 Khuếch đại gen (PCR)

2.3.4.1 Thiết kế môi cho phản ứng PCR và giải trình tự gen

Đề tài đã sử dụng phần mềm Primer 3 để thiết kế các cặp môi đặc hiệu. Cặp môi nhân vùng gen được thiết kế dựa trên trình tự nhân chuẩn của các gen *JAK2*, *A20*, *CYLD* và *Cezanne* có nguồn gốc từ người có mã số lần lượt là NM_004972.4, NM_001378743.1, NM_001270508.2 và NM_020205.4 trong ngân hàng GenBank. Thông tin môi được ghi chi tiết trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các cặp môi đặc hiệu cho phản ứng PCR

Môi	Trình tự -F 5' - 3'	Trình tự -R 5' - 3'	Kích thước
<i>JAK2</i>	5'TCCTCAGAACGTTG ATGGCAG 3'	5'ATTGCTTTCCTTTTTC ACAAGAT 3'	453 bp
<i>CYLD</i>	5'TAAGGTCTTGTGCC TGAGCA 3'	5'TTCTTTGGCAGCAGA AATCC 3'	546 bp
<i>A20</i>	5'TGAGCTAATGATGT AAAATCTTGTG 3'	5'AGGAGGCCTCTGCTG TAGTC 3'	731bp
<i>Cezanne</i>	5'GCCTCCTGCATCAA CTTCCT 3'	5'TCAGAGGACAGTGG GATCCA 3'	600 bp

*Phương pháp PCR

Tổng phản ứng là 25 μ l bao gồm 20 ng DNA genome, 0,4 pM môi mỗi loại, và 12,5 μ l Taq 2X Master Mix (New England Biolab, Ipswich, MA) (Bảng 2.2).

Quá trình khuếch đại được thực hiện trong các điều kiện sau đây: Giai đoạn biến tính ban đầu là 2 phút ở 95°C, tiếp theo là 35 chu kỳ của giai đoạn biến tính ở

95°C trong 30 giây; nhiệt độ gắn môi đặc hiệu cho mỗi môi trong 30 giây; 68°C trong 30 giây đến 1 phút và bước cuối cùng ở 68°C trong 5 phút.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (µl)
Taq 2X Master Mix	12,5
Môi xuôi (10pM/ µl)	1,0
Môi ngược (10pM/ µl)	1,0
DNA (20 ng/µl)	1,0
Nước cất	9,5
Tổng	25,0

Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1,2 % có nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới ánh sáng UV.

** Tinh sạch sản phẩm PCR*

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit GeneJET của hãng Thermo theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3.5 Giải trình tự gen bằng kỹ thuật Sanger và phân tích dữ liệu

Đọc giải trình tự các cặp môi trong bảng 2.1. Khuôn dùng cho phản ứng PCR này là sản phẩm PCR đặc hiệu đã tinh sạch, sau khi tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự, các đoạn DNA được điện di mao quản trên máy giải trình tự ABI 3500 Genetic Analyzer. Tín hiệu được ghi tự động, lưu trữ và phân tích trên máy tính.

** PCR cho giải trình tự gen*

Sản phẩm PCR tinh sạch sẽ được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR sử dụng bộ kit BigDye Terminator V3.1 theo hai chiều xuôi và ngược cho mỗi đoạn cần đọc. Mỗi phản ứng PCR cho giải trình tự gen bao gồm: 1 µl BigDye sequencing Buffer 5X, 1 µl môi xuôi hoặc môi ngược 1,6 pM/µl, 1 µl Big Dye, 2 µl DNA đã được tinh sạch, 5.5 µl nước khử ion vô trùng.

Kỹ thuật PCR cho giải trình tự gen được tiến hành trên máy luân nhiệt (MJ Research) với chu trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu với 96°C trong vòng 1 phút, tiếp theo là 25 chu kỳ của sự biến tính ở 96°C trong 10 giây; 50°C trong 5 giây; 60°C trong 4 phút. Giảm nhiệt nhanh đến 4°C và giữ cho đến khi sử dụng.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR giải trình tự

Thành phần	Thể tích
Sản phẩm PCR	4
Môi (1,7 pmol/ul)	1
BigDye Terminator Master Mix (2.5X)	4
BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer (5X)	2
Nước khử ion	9
Tổng	20 µl/phản ứng

*** Tinh sạch sản phẩm PCR cho giải trình tự gen**

Sản phẩm PCR Sequencing sau phản ứng được tinh sạch lấy DNA theo quy trình như sau: Các mẫu trong đĩa tinh sạch được trộn đều bằng vortex và sau đó spin lắng mẫu. Thêm 2,5 µl EDTA 125 mM vào mỗi giếng và gõ nhẹ cho dung dịch trộn đều vào nhau. Bổ sung 60 µl ethanol 100% vào mỗi giếng, trộn đều bằng vortex trong 5 giây sau khi đã dán kín mặt đĩa tinh sạch. Đĩa mẫu được ly tâm với tốc độ 3000 rpm trong 30 phút ở 4°C, lúc này DNA kết tủa bám vào đáy giếng. Bỏ băng dính trên mặt đĩa và đổ bỏ dung dịch trong đĩa lên giấy thấm bằng cách úp ngược đĩa. Bổ sung 60 µl ethanol 80% vào mỗi giếng và dán đĩa lại, không trộn cùn trong giếng ở bước này. Ly tâm đĩa đựng mẫu với tốc độ 3000 rpm ở 4°C trong 30 phút. Tiếp tục đổ bỏ dung dịch trong đĩa bằng cách úp ngược, sau đó ly tâm nhanh đĩa mẫu để loại bỏ hoàn toàn cùn trong các giếng mẫu. Làm khô đĩa mẫu bằng máy cô quay chân không trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.

Lúc này sản phẩm tinh sạch có thể được giữ lạnh ở 4°C và tránh ánh sáng cho tới khi biến tính và giải trình tự.

*** Biến tính sản phẩm PCR và điện di mao quản trên máy giải trình tự**

* Biến tính mẫu: Bổ sung 10 µL Hi-Di vào từng mẫu. Sau đó trộn đều mẫu. Tiếp theo mẫu được biến tính bằng máy PCR ở 95°C trong 2 phút trước khi làm lạnh nhanh bằng đá.

* Mẫu đã sẵn sàng cho giải trình tự và chạy điện di mao quản trên máy giải trình tự gen ABI 3500 Genetic Analyzer: Các nucleotid trên đoạn gen sẽ được biểu hiện bằng các đỉnh (peak) với 4 màu tương đương với 4 loại nucleotid A, T, G, C. Tinh

sạch sản phẩm PCR cho sequencing. Sau khi PCR cho giải trình tự, 3 μ l EDTA và 60 μ l ethanol 100% được bổ sung vào sản phẩm PCR, tiếp theo tiến hành ly tâm 3000 rpm trong 30 phút ở 4°C và sau đó DNA kết tủa được sấy khô ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sử dụng phần mềm Bioedit được để phân tích các kết quả giải trình tự từ máy giải trình tự tự động. Trình tự nucleotide của các mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự tham chiếu bằng phần mềm BioEdit để xác định nucleotide tại vị trí quan tâm. Để xác định có phải là biến thể mới hay không, các biến thể thu được tiến hành lọc trong cơ sở dữ liệu NCBI SNP (dbSNP) và Ensembl. Đánh giá trạng thái cân bằng quần thể Hardy-Weinberg của mỗi biến thể được tiến hành thông qua phần mềm (<http://www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/kitest.htm>) và (<http://courses.atlas.illinois.edu/spring2016/STAT/STAT200/pchisq.html>). Sử dụng công cụ như Polyphen-2, UCSC để dự đoán chức năng của các biến thể mới.

2.3.6 Tổng hợp cDNA

Mẫu cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng cách lấy 1 μ g RNA tổng số pha loãng vào nước cất DEPC thành 12,5 μ l. Sau đó thêm 1 μ l oligo-dT primer (500 μ g/ml, Invitrogen) và ủ ở nhiệt độ 70°C trong 2 phút. Cho thêm vào ống đựng mẫu 2 μ l 10x reaction buffer (Biolabs), 1 μ l dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM mỗi loại), 0,5 μ l chất ức chế Rnase (Roche), 0,1 μ l enzyme phiên mã ngược M-MuLV (Biolabs) và 2,9 μ l nước cất DEPC. Mẫu được trộn đều sau đó ủ ở 42°C trong 1 tiếng. Để dừng phản ứng tổng hợp cDNA, các mẫu được ủ ở 94°C trong 5 phút và dự trữ ở -80°C.

2.3.7 Real-Time PCR

Realtime PCR là kỹ thuật nhân bản ADN đích có trong ống nghiệm thành 2^n bản sao dựa vào các chu kỳ nhiệt và kết quả khuếch đại trong ống phản ứng được hiển thị cùng lúc với phản ứng khuếch đại xảy ra. Các thuật ngữ đường nền (baseline), ngưỡng (threshold), chu kỳ ngưỡng (cycle threshold – Ct), đường chuẩn (standard curve) và hệ số tương quan (R) được dùng để đọc kết quả phản ứng real-time PCR. Sau khi kết thúc chương trình chạy, tất cả các kết quả được hiển thị lên màn hình. Tiến hành kiểm tra các đường chuẩn và mẫu đối chứng âm như sau:

+ Nếu đạt yêu cầu (theo hướng dẫn của kit sử dụng hoặc theo kết quả lý thuyết đã tối ưu) thì tiếp tục phân tích các mẫu khác theo kết quả thu được.

+ Nếu không đạt yêu cầu (mẫu chuẩn không có tín hiệu huỳnh quang, mẫu đối chứng âm bị nhiễm thành dương tính...) thì không đủ cơ sở để phân tích các mẫu khác. Trong trường hợp này phải lặp lại xét nghiệm sau khi đã tìm ra nguyên nhân sai sót ở xét nghiệm trước [181].

+ Đánh giá mức độ biểu hiện gen *A20*, *OTUB1*, *OTUB2*, *CYLD*, *Cezeanne*, *STAT1*, *STAT 3*, *STAT 5*, *STAT 6*; *SHP 1*, *SHP 2* và *GAPDH* dựa trên chu kỳ ngưỡng (Ct) trung bình và độ lệch chuẩn giữa 2 nhóm nghiên cứu theo phương pháp Livak định lượng tương đối [182], sử dụng gen *GAPDH* (gen giữ nhà) là gen tham chiếu theo công thức sau:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} : \Delta\Delta Ct = \Delta Ct(C) - \Delta Ct(T)$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ của gen thử (VD gen } A20) - Ct \text{ của gen tham chiếu (GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta Ct(T) = \Delta Ct(C) - \Delta Ct(T), \text{ trong đó } \Delta Ct(C) \text{ của nhóm chứng và } \Delta Ct(T) \text{ nhóm bệnh [182]}$$

Trong nghiên cứu này, phản ứng real time PCR có tổng thể tích là 20 μ l tổng thể tích gồm 2 μ l cDNA, 2,4 μ l MgCl₂ (3 μ M), 1 μ l cho 2 loại môi (0,5 μ M mỗi loại), 2 μ l cDNA Master SybrGreen I mix (Roche Molecular Biochemicals) và 12,6 μ l nước DEPC. Đoạn cDNA được khuếch đại ở 95°C trong 10 giây, 62°C trong 10 giây, và 72°C trong 16 giây, số vòng nhắc lại là 40 vòng. Phương pháp real time PCR được thực hiện trên hệ thống LightCycler System (Roche Diagnostics).

Bảng 2.4. Trình tự môi được sử dụng trong nghiên cứu

Gen	Môi xuôi (5' - 3')	Môi ngược (5' - 3')	Kích thước
<i>A20</i>	5'TCCTCAGGCTTTGTATTTGA 3'	5'TGTGTATCGGTGCATGGTTTT 3'	125 bp
<i>OTUB-1</i>	5'ACAGAAGATCAAGGACCTCCA 3'	5'CAACTCCTTGCTGTCATCCA 3'	127 bp
<i>OTUB-2</i>	5'CTCACGTCGGCCTTCATCA 3'	5'GCCATGGGCTCTACTTCGT 3'	215 bp
<i>CYLD</i>	5'TGCCTTCCAACCTCTCGTCTTG 3'	5'AATCCGCTCTCCCAGTAGG 3'	256 bp
<i>IκB-α</i>	5'GCAAAATCCTGACCTGGTGT 3'	5'GCTCGTCCTCTGTGAACTCC 3'	227 bp
<i>SHP-1</i>	5'GCCAGTTCATTGAAACCAC 3'	5'GAGGGAACCCTTGCT CTTCT 3'	240 bp
<i>SHP-2</i>	5'GAGAGCAATGACGGCAAGTCT 3'	5'CCTCCACCAACGTCGTATTTTC 3'	77 bp
<i>STAT-1</i>	5'CCCTTCTGGCTTTGGATTGAA 3'	5'CTTCCCGGGAGCTCTCACTGA 3'	172 bp
<i>STAT-3</i>	5'GGAGGAGTTGCAGCAAAAAG 3'	5'TGTGTTTTGTGCCAGAAT GT 3'	320 bp

<i>STAT-5</i>	5'CAGACCAAGTTTGCAGCCAC 3'	5'CACAGCACTTTGTCAGGCAC 3'	479 bp
<i>STAT-6</i>	5'GCCCACTCACTCCAGAGGACCT 3'	5'GGTGTGGGGAAAGTCGACAT 3'	305 bp
<i>GAPDH</i>	5'GGAGCGAGATCCCTCCAAA 3'	5'GGCTGTTGTCATACTTCTCAT 3'	197 bp

2.3.8 Một số phương pháp tin sinh sử dụng trong luận án

2.3.8.1 Polyphen2

Phần mềm PolyPhen 2 được sử dụng để dự đoán sự ảnh hưởng của axit amin thay thế lên cấu trúc và chức năng của protein sử dụng dựa trên sự tương đồng về trình tự, chú thích Pfam, cấu trúc 3D, từ PDB, và một số cơ sở dữ liệu và công cụ khác (bao gồm cả DSSP, ncoils...). Chỉ số Polyphen đưa ra xác suất mà việc thay thế là có hại, vì vậy giá trị gần với mức 1 sẽ được hiểu như là có hại. Dự đoán định tính dựa trên tỉ lệ dương tính giả (False Positive Rate hay còn gọi là tỉ lệ giả) của việc phân loại phương thức được sử dụng để dự đoán. [183]

2.3.8.2 MaxEntScan

Công cụ MaxEntScan được sử dụng để dự đoán ảnh hưởng của đột biến trượt gen lên cấu trúc và chức năng của protein. Phương pháp này dựa trên 'Nguyên tắc Entropy tối đa' và khái quát hầu hết các mô hình xác suất trước đó của các chuỗi như mô hình ma trận trọng lượng và mô hình Markov không đồng nhất.

2.3.8.3 BioEdit

BioEdit là một chương trình soạn thảo bắt cặp trình tự sinh học bằng văn bản cho Windows 95/98/NT/2000/XP/Vista /7. Một giao diện tài liệu nhiều trực quan với các tính năng thuận tiện giúp liên kết và các thao tác của các trình tự tương đối dễ dàng trên máy tính để bàn của bạn. Một số thao tác trình tự và phân tích các lựa chọn và các liên kết đến các chương trình phân tích bên ngoài tạo điều kiện môi trường làm việc cho phép người dùng xem và thao tác chuỗi với các hoạt động đơn giản.

Đây là chương trình phần mềm rất phổ biến khi làm việc với DNA. Trong luận án, phần mềm BioEdit được sử dụng để so sánh trình tự của các đoạn gen, sau khi được giải trình tự bằng phương pháp Sanger.

2.3.8.4 ClustalW

Chương trình ClustalW là phiên bản phần mềm phân tích kết quả thí nghiệm về cấu trúc chuỗi DNA hay protein, bằng phương pháp so sánh đồng thời giữa tất cả các chuỗi mà người yêu cầu đã lựa chọn cung cấp cho chương trình để tìm kiếm phát hiện ra những đặc điểm đồng nhất, đặc điểm gần gũi hay phân ly giữa chúng. Qua đó,

chương trình sẽ xây dựng cây tiến hóa và cung cấp thông tin liên quan để dự đoán đặc tính của chuỗi phân tích. Việc xử lý phân tích cấu trúc chuỗi đã trở thành công cụ hết sức quan trọng ngày nay trong nghiên cứu công nghệ sinh học, đặc biệt là công nghệ gen và protein. So sánh cấu trúc chuỗi DNA/protein cho phép chỉ ra các vùng bảo thủ và vùng phân ly của chuỗi kiểm tra. Trên cơ sở này, nhà nghiên cứu có thể dự đoán được đặc tính chuỗi, hoạch định được các thực nghiệm để kiểm tra lại các đặc tính của chuỗi, hoặc tìm kiếm phương án tác động nhằm thay đổi cấu trúc chuỗi, hay từ đó dự đoán được cấu trúc và đặc tính của các protein mới.

2.3.9 Đưa siRNA vào trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Phương pháp đưa siRNA đặc hiệu gen đích *A20* và *Otubain-1* vào trong PBMC nhằm bất hoạt gen *A20* và *Otubain-1*, từ đó tạo ra đối tượng tế bào để nghiên cứu vai trò, chức năng của gen *A20* và *Otubain-1* trong các quá trình sinh lý và các con đường tín hiệu phân tử trong tế bào.

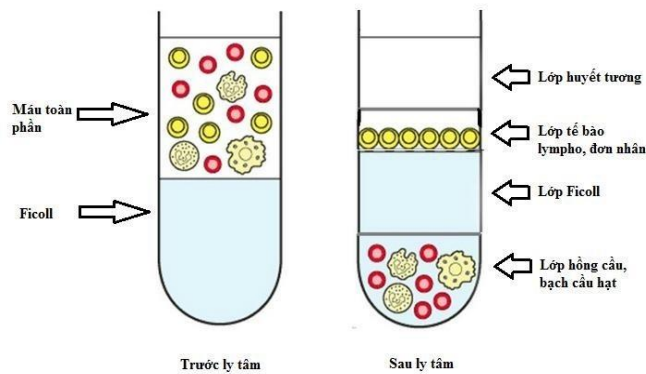
SiRNA đặc hiệu gen đích *A20* và gen đích *Otubain-1* được đưa vào PBMC sử dụng dung dịch Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) theo quy trình của nhà sản xuất. Các tế bào được ủ trong 48 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Sau khi rửa với PBS, các tế bào sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Tiến hành chuẩn bị các dung dịch cần thiết cho thí nghiệm. Pha loãng dung dịch Lipofectamine® RNAi trong môi trường Opti-MEM® của hãng ThermoFisher, pha loãng siRNA trong môi trường Opti-MEM®. Sau đó chuẩn bị hỗn hợp siRNA và Lipofectamine® RNAiMAX pha loãng theo tỷ lệ 1:1 và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ thường. Tế bào được thêm phức hợp siRNA-lipid. Quan sát và phân tích tế bào được biến đổi. Tế bào được ủ trong 48 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Sau khi rửa 3 lần với PBS, các tế bào sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.10 Phân lập và nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi

❖ Nguyên lý

Tỷ trọng của Ficoll là 1.077, cao hơn tỷ trọng của tế bào PBMC nhưng lại thấp hơn tỷ trọng của hồng cầu và bạch cầu hạt. Khi ly tâm, hồng cầu và bạch cầu hạt lắng xuống đáy ống ly tâm, còn lớp buffy coat chứa tế bào gốc tạo máu, bạch cầu lympho và

các tế bào đơn nhân khác nằm ở giữa lớp Ficoll và huyết tương (Hình 2.1). Thu hoạch lớp buffy coat này sẽ thu được sản phẩm sau xử lý máu ngoại vi chứa tế bào PBMC.



Hình 2.1. Phân lập tế bào PBMC sử dụng Ficoll

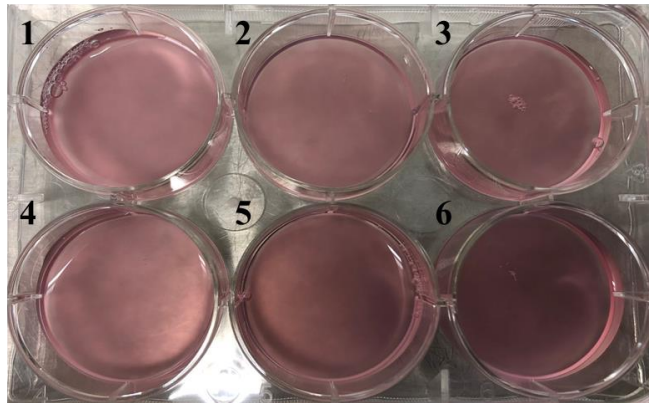
❖ Tóm tắt quy trình thực hiện

Mẫu máu tổng số ban đầu được chia vào 2 ống falcon 50 ml, ly tâm 3000 rpm/10 phút/18°C để tách phân pha huyết tương và tế bào máu. Sau đó đưa mẫu vào trong tủ cấy, hút tách huyết tương, lượng tế bào máu còn lại được bổ sung thêm PBS theo tỷ lệ 1:1, trộn đều. Lấy 15ml Ficoll-Paque ($\rho=1.077\text{g/ml}$) từ bình ra mỗi ống falcon mới để ở nhiệt độ phòng 10 phút. Bổ sung 25 ml đến 30 ml máu nhẹ nhàng vào ống falcon đã chuẩn bị, ly tâm mẫu ở 400 g/40 phút/20°C. Sau khi ly tâm, trong ống falcon sẽ phân thành 3 lớp, dùng pipet thủy tinh hút loại bỏ lớp trên cùng để lại lớp PBMC nhẹ nhàng. Chuyển lớp tế bào PBMC sang ống falcon 50 ml mới, bổ sung lượng PBS (1:1) đảo nhẹ nhàng, ly tâm 300 g/10 phút/ 20°C. Thu tế bào kết tủa lại thành viên bên dưới đáy ống, loại bỏ dung dịch đệm bên trên. Bổ sung MTNC, vortex bằng pipet thủy tinh, ly tâm ở 200 g/15 phút/ 20°C. Loại bỏ dịch bên trên và thu tế bào được kết tủa lại trong ống falcon. Tiếp tục bổ sung 10 ml MTNC, sử dụng tryptan blue để đếm tế bào trong buồng đếm, tùy thuộc vào mục đích chia tế bào vào từng đĩa NCTB. Để mẫu trong tủ nuôi cấy 30 phút sau đó bổ sung siA20, siOtubain-1, lipofectamin và LPS, IL6 theo từng điều kiện và mục đích nghiên cứu.

• Nuôi cấy tế bào

Tổng lượng tế bào thu được chia vào các đĩa petri với mật độ nuôi cấy là 2×10^6 tế bào trên một điều kiện nuôi cấy. Mỗi đĩa nuôi cấy chứa 3 ml môi trường NCTB (44 ml RPMI: 5 ml FBS: 0,5 ml Streptomycin, 0,5 ml L-glutamin). Xử lý siA20 và siOtubain-1 có nồng độ 40 nM/L ($3\mu\text{l/1}$ điều kiện 3ml). Lipofectamin 3000 cũng được

bổ sung theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất vào các điều kiện có xử lý siA20 và siOtubain-1 với mục đích làm suy giảm sự bền vững của màng tế bào. Sau 3 ngày nuôi cấy, bổ sung LPS (nồng độ 1µg/ml) vào điều kiện nuôi cấy.



Hình 2.2. Đĩa nuôi cấy tế bào PBMC

- **Quá trình xử lý tế bào làm bất hoạt gen**

Chuẩn bị lipofectamin+ siRNA phức hợp

- ống Eppendorf 1: 610 µl OPTIMEM +36 µl lipofectamin
- ống Eppendorf 2: 310 µl OPTIMEM + 6 µl siA20
- ống Eppendorf 3: 310 µl OPTIMEM + 6 µl siOtubain-1

Ủ các ống 1, 2, 3 trên ở nhiệt độ phòng 5 phút. Sau đó bổ sung 300 µl ở ống 1 vào các ống 2, 3 ở nhiệt độ phòng 20 phút. Bổ sung vào các đĩa nuôi cấy tế bào hình 2.2 như sau:

Đĩa nuôi cấy tế bào	1	2	3	4	5	6
	Đối chứng	LPS	siA20	siOtubain-1	siA20 +LPS	siOtubain-1 +LPS
Bổ sung ống 2			X		X	
Bổ sung ống 3				X		X
Bổ sung LPS		X			X	X

- **Thu tế bào cho phương pháp đếm tế bào dòng chảy và tách RNA**

Dùng lược vô khuẩn cạo tế bào nhẹ nhàng sau đó dùng pipet thủy tinh hút dịch nuôi cấy vào ống falcon 15 ml. Ly tâm ống falcon chứa tế bào tại điều kiện 1500 rpm, 7 phút ở nhiệt độ phòng để thu cặn tế bào lắng xuống dưới đáy ống.

Sau khi ly tâm, dùng pipet thủy tinh vô khuẩn thu dịch bên trên để sử dụng cho phương pháp ELISA. Tế bào lắng bên dưới được sử dụng cho phương pháp đếm tế bào dòng chảy. Tương tự như vậy, tế bào lắng xuống bên dưới thu được dùng cho tách chiết RNA tổng số.

2.3.11 Đếm tế bào theo dòng chảy

Phương pháp đếm tế bào dòng chảy là sự kết hợp giữa kỹ thuật đo đặc tính hiệu quang học và tán xạ ánh sáng huỳnh quang, bằng cách kết hợp công nghệ đo đặc dòng tế bào với các thiết bị điện tử và xử lý tín hiệu chuyên dụng. Đếm tế bào dòng chảy cho phép phân tích lên đến trên 100.000 tế bào trong một phút. Trong đó, nhiều thông tin về các đặc tính về sinh, hóa và lý của mỗi tế bào được phân tích đồng thời. Đây là một kỹ thuật được dùng để phát hiện kháng nguyên bề mặt tế bào. Nó bao gồm việc đánh dấu tế bào với kháng thể đơn dòng huỳnh quang đặc hiệu cho kháng nguyên bề mặt.

2.3.11.1 Thí nghiệm xác định kiểu hình miễn dịch của bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Mẫu máu bệnh nhân THCVC được ly tâm 3000 rpm/10 phút/ RT để phân pha huyết thanh và huyết tương. Dùng pipet hút nhẹ nhàng phần huyết tương có màu vàng nhạt bên trên sang ống mới. Phần này dùng để làm thí nghiệm ELISA với kháng thể CA125, IL-6, TNF- α , IL-1 β . Bổ sung 2000 μ l lysis buffer (RBC), tùy thuộc vào lượng máu 4 ml tương đương với 2000 μ l RBC vào mỗi ống chứa mẫu đã loại bỏ phần huyết tương, vortex nhẹ nhàng, ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 1500 rpm trong 5 phút nhiệt độ phòng loại bỏ dịch. Thêm 1000 μ l RBC vào mỗi ống mẫu, vortex, ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng sau đó bổ sung 3-5 ml PBS tùy thuộc vào lượng mẫu. Bước này có thể lặp lại 2, 3 lần nếu tế bào còn lẫn nhiều hồng cầu màu đỏ. Ly tâm 1500 rpm trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ dịch. Bổ sung vào mỗi ống effendorf 300 μ l FACS buffer và bổ sung vào mỗi ống chứa tế bào lượng FACS buffer vừa đủ để chia tế bào vào mỗi ống Effendorf trên. Chia tế bào vào các ống 50 μ l/ 1 ống FACS. Vortex nhẹ, ly tâm 1800 rpm trong vòng, 4°C sau đó thấm khô. Tiếp tục bổ sung các loại kháng thể tùy thuộc vào từng thí nghiệm khác nhau. Các kháng thể sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: CD3, CD4, CD19, CD11b, CD11c, CD56, CA125. Bổ sung 500 μ l FACS vào mỗi ống, ly tâm 1500 rpm/6'/4°C loại bỏ dịch. Bước này được thực hiện hai lần. Bổ sung 300 μ l FACS (1:100) buffer vào mỗi ống mẫu, vortex nhẹ nhàng và đo kết quả bằng máy FACSAria Fusion của hãng BD Biosciences.

2.3.11.2 Thí nghiệm xác định sự thuận thực và sự chết apoptosis của tế bào

Tế bào PBMC được phân lập và nuôi cấy và thu hoạch ở mục 2.2.9 sẽ được sử dụng cho thí nghiệm này. Đầu tiên dùng lược cạo và thu tế bào vào ống falcon 15 ml sau đó đem ly tâm 1500 rpm/ 5 phút/ RT. Dịch huyền phù bên trên được thu lại để làm thí nghiệm ELISA. Phần tế bào bên dưới ống được dùng để làm các thí nghiệm phân tích sự thuận thực và apoptosis của PBMC.

Đầu tiên bổ sung 300 μ l FACS buffer vào mỗi ống tế bào sau đó ly tâm rửa 2 lần với FACS buffer để loại bỏ dịch. Tiếp tục bổ sung vào mỗi ống tế bào lượng FACS buffer vừa đủ để chia tế bào vào mỗi ống Effendorf trên. Chia tế bào vào mỗi ống 50 μ l/ống FACS. Vortex nhẹ và ly tâm 1500 rpm/ 5 phút/ 4°C, thấm khô. Sau đó bổ sung các loại kháng thể tùy thuộc vào từng thí nghiệm khác nhau, các kháng thể sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm CD11b, CD19, CD3, CD4, Annexin V, propidium iodide (PI) và caspase-3, vortex nhẹ nhàng và ủ 45 phút ở 4°C. Bổ sung 500 μ l FACS vào mỗi ống, ly tâm 1500 rpm/ 6 phút/ 4°C loại bỏ dịch. Bổ sung 300 μ l FACS (1:100) buffer vào mỗi ống mẫu, vortex nhẹ nhàng, và đo kết quả.

Đối với quá trình apoptosis thông qua chất chỉ thị Caspase-3, tế bào PBMC được rửa 2 lần bằng dung dịch PBS lạnh và cố định bằng dung dịch “Cytotfix/Cytoperm”. Sau đó, tiến hành rửa hai lần bằng dung dịch đệm “Perm/Wash”. Bước tiếp theo là nhuộm các tế bào với kháng thể FITC anti-Caspase-3 pha trong đệm “Perm/Wash” trong 60 phút. Sau hai bước rửa, các tế bào được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy.

Đối với quá trình apoptosis thông qua chất chỉ thị là annexin V. Annexin V là một protein có khả năng gắn với phân tử phosphatidylserine ở bề mặt tế bào. Tế bào apoptosis được đánh giá bằng cách nhuộm với kháng thể Annexin V-FITC. Tiến hành thí nghiệm bằng cách: Tế bào (2×10^6) được rửa hai lần bằng dung dịch đệm rửa annexin (AWB, 10 mM HEPES/ NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂). Sau đó được ngâm lại trong 100 ml dung dịch annexin-V-Fluos (Roche) (20 μ L thuốc thử Annexin-V-Fluos trong 1 mL AWB), ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục rửa tế bào bằng AWB, sử dụng phương pháp đếm tế bào dòng chảy để xác định lượng tế bào chết.

2.3.12 Xác định sự di cư tế bào

Tế bào PBMC được rửa 2 lần bằng PBS và hòa tan trong môi trường RPMI 1640. Khả năng di cư của tế bào được đánh giá ba lần trong một buồng hai tầng có đường kính lỗ rỗng là 3 μm (BD Falcon). Dịch huyền phù của tế bào với nồng độ 2×10^6 tế bào/ml được đặt trong khoang phía trên để di cư xuống buồng dưới, trong đó sử dụng CCL19 (250 ng/mL, PeproTech) hoặc một loại môi trường riêng biệt với vai trò là chất kiểm soát đối với sự di cư của PBMC. Sau đó buồng được đặt trong một máy ủ 5% CO_2 , 37°C trong 24 giờ.

PBMC di cư vào buồng dưới được thu thập và đếm dưới kính hiển vi quang học sử dụng thuốc nhuộm Trypan blue. Số lượng trung bình của PBMC di cư tự phát đã được trừ khỏi tổng số tế bào di cư và sự di cư của tế bào được phân tích bằng cách tính tỷ lệ phần trăm tế bào di cư trên tổng số tế bào lúc đầu cho vào.

2.3.13 ELISA phân tích nồng độ cytokine

Kỹ thuật ELISA định lượng nồng độ các cytokine IL-6, TNF- α , IL-12p70, IL-1 β và CA125 trong dịch huyền phù sử dụng kit ELISA của các hãng thương mại trên thị trường của hãng BioLegend. Các bước tiến hành kỹ thuật ELISA đo nồng độ cytokine được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit thương mại.

Mẫu máu của bệnh nhân THCVC và người khỏe mạnh được ly tâm ở 3000 rpm trong 7 phút để thu lớp huyết tương bên trên. Để phân tích nồng độ IL-6, TNF- α , IL-12p70, IL-1 β , CA125 có trong mẫu huyết tương, sử dụng bộ dụng cụ kit ELISA thương mại và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Human IL-6 ELISA kit (Châu Âu/Mỹ); Human IL-1 β ELISA kit (Châu Âu/Mỹ); Human CA-125 ELISA kit (Châu Âu/Mỹ); Human TNF- α ELISA kit (Châu Âu/Mỹ).

Các bước chuẩn bị hóa chất và tiến hành thí nghiệm ELISA như sau:

❖ Chuẩn bị hóa chất:

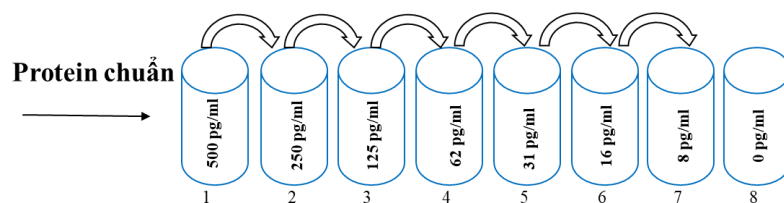
- Dung dịch đệm PBS (Phosphate Buffered Saline) trong 500 ml dung dịch H_2O (2X), pH=7,4
- Dung dịch đệm rửa (washing buffer) : 250 μl Tween-20 trong 500 ml đ PBS
- Dung dịch đệm khóa ($\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$ trong H_2O 2X ; pH=9,5)

- Kháng thể bắt (IL-6, TNF- α , IL-1 β , CA125, IL-12p70) : 50 μ l kháng thể bắt trong bộ kit thương mại với 10ml dung dịch dung dịch đệm khóa
- Dung dịch pha loãng: 10 ml dung dịch pha loãng A (5X) trong bộ kit thương mại + 40 ml PBS
- Protein chuẩn pha ở các nồng độ khác nhau tùy thuộc vào từng loại kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ đường chuẩn protein của IL-6 là : 500; 250; 125; 62; 31; 16; 8 pg/ml
- Kháng thể phát hiện có gắn enzyme (horseradish peroxidase) HRP: 10 ml dung dịch pha loãng + 10 μ l kháng thể phát hiện có gắn enzyme của bộ kit thương mại
- Dung dịch TMB: 10 ml
- Dung dịch H₂SO₄ 2N: 10 ml

❖ *Tiến hành thí nghiệm*

- Cho 100 μ l kháng thể bắt (IL-6, TNF- α , IL-1 β , CA125, IL-12p70) vào mỗi giếng của đĩa ELISA. Đậy nắp lại bằng parafilm, để qua đêm ở 4°C.
- Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa, mỗi lần 300 μ l/giếng/30 giây 1 lần, sau đó thấm giấy khô sau mỗi lần rửa. Bổ sung 200 μ l dung dịch pha loãng /1 giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ
- Rửa đĩa 4 lần bằng dung dịch rửa, mỗi lần 30 μ l/giếng/30 giây 1 lần rồi thấm giấy sau mỗi lần rửa
- Mẫu protein chuẩn được pha loãng trong dung dịch đệm thành 7 nồng độ khác nhau: 500; 250; 125; 62; 31; 16; 8; 0 pg/ml

Chuẩn bị 8 ống Eppendorf 1.5ml sạch được đánh số từ 1 đến 8; ống 1 chứa 500 μ l dung dịch đệm khóa, các ống còn lại chứa 250 μ l dung dịch khóa



Bổ sung 100 μ l protein chuẩn theo thứ tự từ 1 đến 8 vào dãy giếng 1, ủ 2 h ở nhiệt độ phòng.

Các giếng còn lại cho 100 μ l huyết tương mẫu bệnh nhân

- Rửa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa, mỗi lần 300 μ l/giếng. Bổ sung 100 μ l kháng thể phát hiện vào mỗi giếng, ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng
- Rửa 5 lần bằng dung dịch đệm rửa, mỗi lần 300 μ l/1 giếng. Bổ sung 100 μ l kháng thể phát hiện có gắn enzyme -HRP vào mỗi giếng, ủ 15 phút trong bóng tối. Đo mức độ hấp thụ quang (Optical Density - OD) ở bước sóng 450 nm.
- Đọc và ghi kết quả thí nghiệm

2.3.14 Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh

Các nghiên cứu trên đối tượng bệnh nhân được tuân thủ đúng theo y đức và được thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công Nghệ Việt Nam. Tất cả các đối tượng tham gia nghiên cứu đều được cung cấp đầy đủ thông tin, mục tiêu nghiên cứu và tham gia nghiên cứu tự nguyện theo đúng quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của tổ chức trong nước và trên thế giới. Tất cả các thông tin liên quan đến bệnh nhân và nghiên cứu đều được bảo mật. Các gia đình và bệnh nhân có thể rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia. Kết quả phân tích sẽ được thông báo cho gia đình bệnh nhân.

CHƯƠNG 3 : KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Kết quả nghiên cứu trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

3.1.1 Chỉ số sinh hóa máu bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Xét nghiệm sinh hóa máu được thực hiện để xác định nồng độ các chỉ số như LDH (Lactate Dehydrogenase), Hemoglobin (Hb) và các chỉ số khác trong máu bệnh nhân THCVC, từ đó có thể đánh giá sự thay đổi các chỉ số lâm sàng trên người bệnh. Nghiên cứu này đã cho thấy rằng, tỷ lệ bệnh nhân THCVC có chỉ số axit uric, bilirubin gián tiếp, protein toàn phần, globulin và LDH cao hơn người khỏe mạnh tương ứng là 29,87%, 24,68%, 45,45%, 24,68% và 59,74% (Bảng 3.1). Nồng độ các chỉ số sinh học này tăng cao chỉ ra mức độ ảnh hưởng cao của bệnh đến sự tổn thương các cơ quan thận, gan và một số cơ quan khác. Nồng độ LDH tăng cao dẫn đến tăng nồng độ lactat trong máu và tổn thương mô. Ngoài ra, các chỉ số hóa sinh khác như ure, glucose, ferritin, AST và ALT cũng có một số bệnh nhân có các chỉ số này cao hơn bình thường (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Tỷ lệ bệnh nhân THCVC có chỉ số xét nghiệm sinh hóa máu cao hơn bình thường

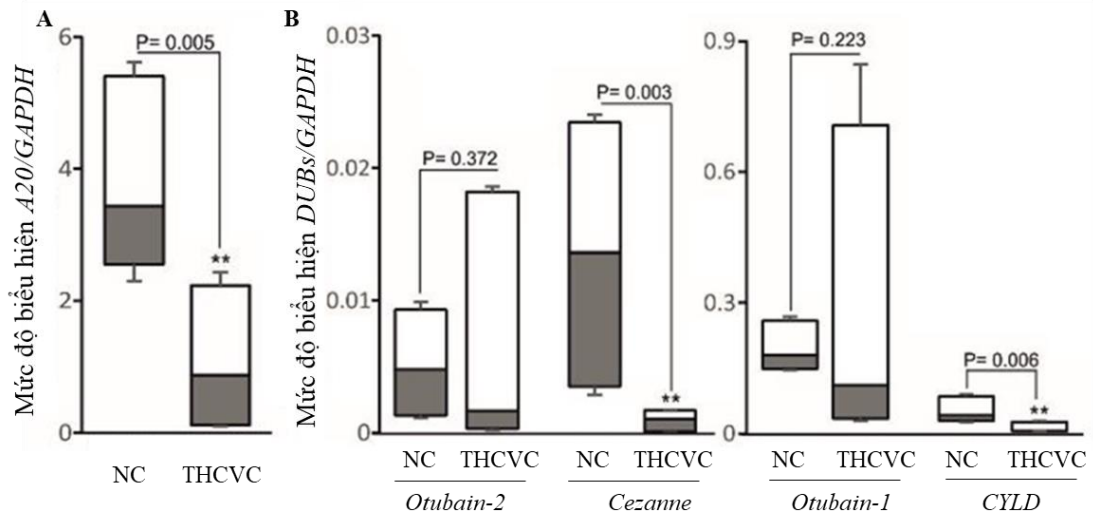
STT	Chỉ số bệnh	Bệnh nhân (n)/ Tổng số bệnh nhân (77)	% Bệnh nhân	Giá trị trung bình	Giá trị bình thường
1	Ure (mmol/l)	12/77	15,58	7,5 ± 1,67	3,3-6,6
2	Glucose (mmol/l)	8/77	10,38	5,36 ± 0,7	3,9-5,6
3	Creatinin (µmol/l)	0/77	0	79,8 ± 20,5	50-110
4	Axid uric (µmol/l)	23/77	29,87	336,8 ± 112,2	< 420
5	Bilirubin toàn phần (µmol/l)	10/77	12,99	14,15 ± 4,8	0-21
6	Bilirubin trực tiếp (µmol/l)	0/77	0	2,4 ± 1,2	0-5
7	Bilirubin gián tiếp (µmol/l)	19/77	24,68	11,75 ± 4,3	0-17
8	Protein toàn phần (g/l)	35/77	45,45	80,8 ± 3,9	60-80
9	Albumin (g/l)	0/77	0	43,8 ± 2,48	35-50

10	Globulin (g/l)	19/77	24,68	37 ± 4	20-35
11	Chỉ số A/G	0/77	0	1,87 ± 2,7	>1
12	Ferritin	8/77	10,38	255 ± 230,69	10-300
13	Calci ion hóa (mmol/l)	0/77	0	1,19 ± 0,07	1,7-2,5
14	AST (GOT) U/l-37°C	8/77	10,38	27,65 ± 6,8	0-40
15	ALT (GPT) U/l-37°C	16/77	20,78	29,3 ± 23,2	0-40
16	LDH U/l-37°C	46/77	59,74	600,4 ± 238,1	0-240
17	Canxi toàn phần (mmol/l)	0/77	0	2,35 ± 0,12	1,7-2,5
18	Định lượng Sắt huyết thanh (μmol/l)	8/77	10,38	15,47 ± 6,7	5,5-25
19	Na ⁺ (mmol/l)	0/77	0	140,11 ± 1,57	135-145
20	K ⁺ (mmol/l)	0/77	0	3,91 ± 0,34	3,5-5,0
21	Cl ⁻ (mmol/l)	0/77	0	104,08 ± 2,41	95-110

3.1.2 Phân tích sự biểu hiện một số gen deubiquitinase trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Nhóm gen DUB đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo máu, tạo hồng cầu và các bất thường liên quan. Bệnh THCVC là bệnh ung thư máu thuộc nhóm bệnh tăng sinh tủy ác tính do rối loạn quá trình tạo máu. Mẫu RNA của bệnh nhân THCVC và mẫu đối chứng được tách chiết và chuyển thành cDNA, sau đó mẫu cDNA được phân tích mức độ biểu hiện một số gen thuộc nhóm DUB bao gồm *A20*, *Cezanne*, *Otubain-1*, *Otubain-2* và *CYLD* để thấy được sự thay đổi về biểu hiện gen các DUB trên bệnh THCVC.

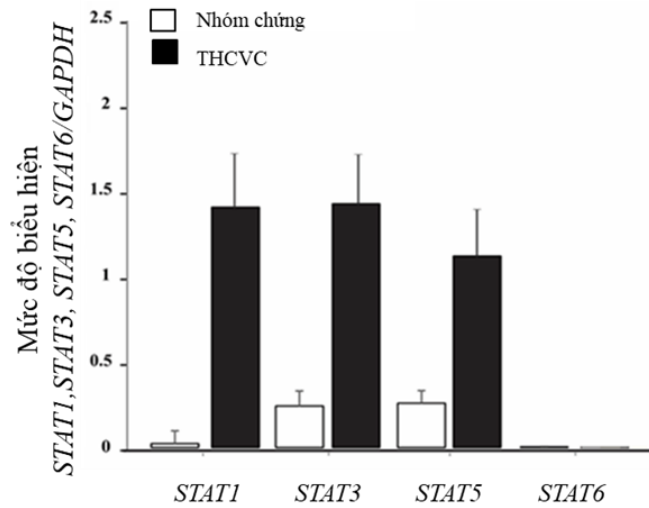
Nghiên cứu đã chỉ ra rằng mức độ biểu hiện mRNA của các gen *A20*, *Cezanne* và *CYLD* giảm đáng kể ở bệnh nhân THCVC so với nhóm đối chứng (Hình 3.1 A), tuy nhiên, không có sự khác biệt trong biểu hiện phiên mã của các gen DUB khác bao gồm gen *Otubain-1* và *Otubain-2* giữa nhóm bệnh nhân và nhóm chứng (Hình 3.1 B). Bằng chứng cho thấy rằng sự biểu hiện bất hoạt của các gen *A20*, *Cezanne* và *CYLD* có thể là kết quả của sự thay đổi di truyền của chúng trong tế bào THCVC.



Hình 3.1. Mức độ biểu hiện gen của gen *DUB* ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng. Giá trị trung bình \pm SEM ($n = 15$) mức độ biểu hiện của các gen *A20*, *CYLD*, *Otubain-1*, *Otubain-2* và *Cezanne* trên mẫu đối chứng và mẫu bệnh nhân THCVC. ** ($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$) chỉ ra sự khác biệt đáng kể so với những người khỏe mạnh (thử nghiệm Mann – Whitney U, $n = 5-7$). Các cột trên biểu đồ biểu thị giá trị trung bình, độ trải giữa (interquartile range- IQR), giá trị tối thiểu và giá trị tối đa.

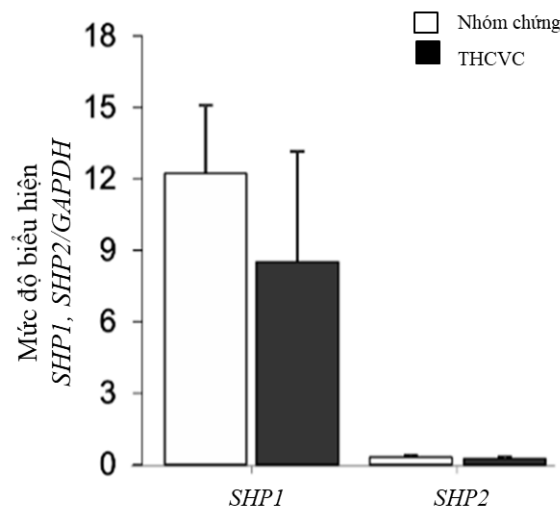
3.1.3 Mức độ biểu hiện một số gen tín hiệu trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Tương tự các nghiên cứu về biểu hiện gen chức năng, khảo sát về gen tín hiệu tham gia kiểm soát chức năng sinh lý tế bào ung thư máu cũng được chú trọng. Nhóm gen *STAT* đã được chỉ ra tham gia điều hòa các phản ứng miễn dịch trên cơ thể người bệnh như khả năng tiết cytokine, sự tăng sinh và biệt hóa của tế bào. Một số nghiên cứu cho thấy sự biểu hiện bất thường của gen tín hiệu *STAT* dẫn tới phát triển bệnh bạch cầu [184, 185].



Hình 3.2. Mức độ biểu hiện của các gen tín hiệu phân tử *STAT*

Kết quả Hình 3.2 chỉ ra rằng mức độ biểu hiện các gen tín hiệu phân tử *STAT* bao gồm các gen *STAT1*, *STAT3* và *STAT5* đều có biểu hiện tăng cao ở bệnh nhân THCVC so với mẫu đối chứng. Điều này phản ánh rằng, gen *STAT* đặc biệt quan trọng điều hòa sự phát triển của bệnh THCVC. Đây là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra sự tăng biểu hiện của 3 gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* trên bệnh nhân THCVC. Hoạt động bộc phát của tín hiệu *STAT3* và *STAT5* cũng được chỉ ra ở bệnh u lympho và bệnh bạch cầu [186]. Các nghiên cứu khác trên bệnh nhân ung thư máu cũng phân tích biểu hiện nhóm gen *STAT*, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào chỉ ra biểu hiện tăng lên của cả 04 gen này trong một bệnh ung thư.

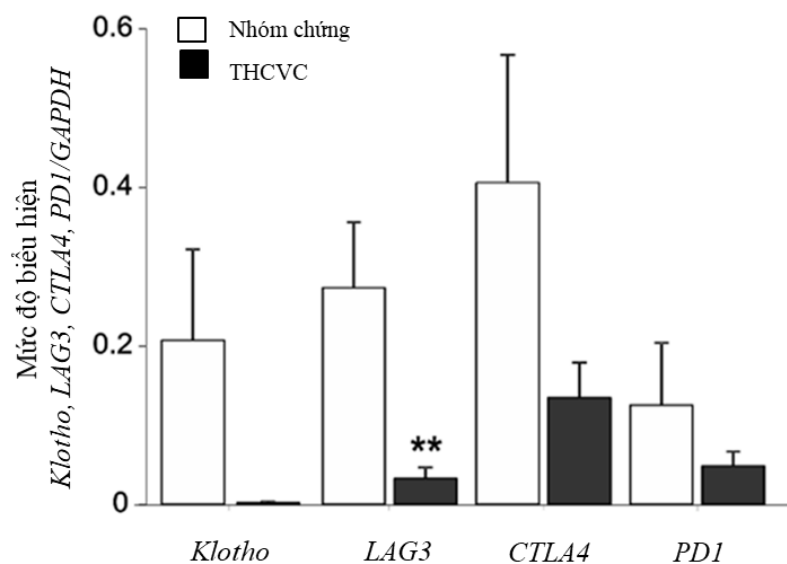


Hình 3.3. Biểu hiện gen *SHP1* và *SHP2* trên bệnh nhân THCVC

Phân tích biểu hiện gen *SHP-1* và *SHP-2* liên quan cho thấy rằng biểu hiện của gen *SHP-2* không thay đổi so với người khỏe, tuy nhiên gen *SHP1* có biểu hiện giảm hơn so với mẫu đối chứng (Hình 3.3). Trên một nghiên cứu khác ở Mỹ cho thấy rằng, biểu hiện của gen *SHP-1* được chỉ ra bị bất hoạt trên bệnh nhân THCVC [187]. Biểu hiện của nhóm gen *SHP* đa dạng phụ thuộc vào độ nặng của bệnh và liên quan đến hoạt động của tín hiệu phân tử JAK/STAT [188].

3.1.4 Biểu hiện một số gen kiểm soát miễn dịch trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Ngoài nghiên cứu về biểu hiện gen chức năng, gen tín hiệu, nghiên cứu này cũng đánh giá ảnh hưởng biểu hiện một số gen kiểm soát miễn dịch đến bệnh nhân THCVC bao gồm các gen: *Klotho*, *LAG3*, *CTLA4* và *PD1*. Vai trò điều hòa hoạt động hệ miễn dịch trên bệnh nhân ung thư của gen *LAG3* được phát hiện muộn nhất trong các gen này. Gen *LAG3* tham gia ức chế hoạt động tế bào tua, từ đó cảm ứng hệ miễn dịch đối kháng thông qua sự gắn kết với phân tử biểu hiện kháng nguyên MHC II, vì thế biểu hiện gen *LAG3* bất thường liên quan đến hoạt động của hệ miễn dịch bẩm sinh và hoạt động của các loại tế bào biểu hiện kháng nguyên [189].



Hình 3.4. Biểu hiện gen *Klotho*, *LAG3*, *CTLA4*, *PD1* trên bệnh nhân THCVC

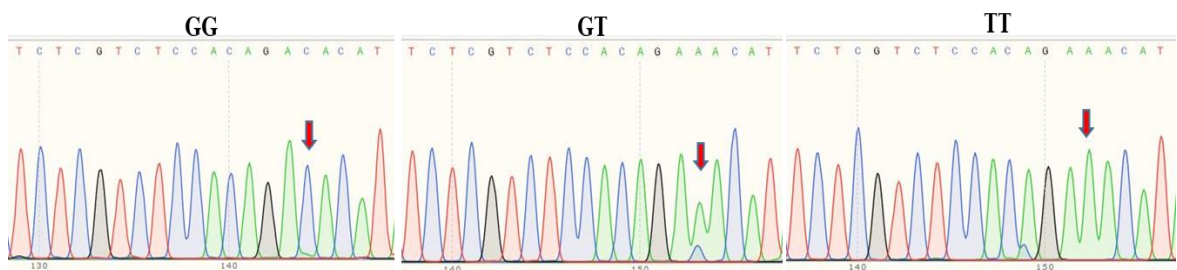
Biểu hiện gen *Klotho*, *LAG3*, *CTLA4*, *PD1* trên bệnh nhân THCVC (cột đen) và người khỏe (cột trắng). ** ($p < 0.01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối chứng và nhóm bệnh nhân (ANOVA).

Kết quả kiểm tra mức độ biểu hiện các gen *LAG3*, *CTLA-4* và *PD-1* cho thấy các gen này đều có mức biểu hiện thấp hơn, trong đó biểu hiện của *LAG3* thấp hơn đáng kể so với mẫu đối chứng (Hình 3.4), chứng tỏ rằng hệ miễn dịch của bệnh nhân THCVC bị ảnh hưởng ít liên quan đến hoạt động kiểm soát miễn dịch của 3 gen *LAG3*, *CTLA-4* và *PD-1*. Trong bệnh nhân bạch cầu, biểu hiện của các gen này thường tăng cao và liên quan đến sự cạn kiệt về số lượng và chất lượng của tế bào T hỗ trợ cũng như tăng về số lượng của tế bào T điều hòa [27, 37]. Sự khác biệt về biểu hiện của các gen này trên bệnh nhân THCVC so với bệnh nhân bạch cầu đóng góp một phần vào công tác phân loại bệnh một cách chính xác. Bên cạnh đó, phân tích gen *klotho* trên bệnh nhân THCVC chỉ ra biểu hiện gen này giảm so với người khỏe. Gen *klotho* là gen tham gia điều hòa chống lão hóa, phản ứng viêm, quá trình chết apoptosis và bệnh ung thư [190]. Do đó, kết quả biểu hiện giảm các gen trên chỉ ra hệ miễn dịch đối kháng chưa hoạt động trong bệnh nhân THCVC. Hoạt động mạnh mẽ của hệ miễn dịch đối kháng liên quan đến mức độ nặng của bệnh.

3.1.5 Phân tích đột biến gen *JAK2* trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

3.1.5.1 Đột biến gen *JAK2* trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Trong nghiên cứu này, tần số kiểu gen của đột biến *JAK2* trên bệnh nhân THCVC được phân tích và thấy rằng, có 51/77 (66,24%) trường hợp THCVC chưa được điều trị dương tính với đột biến *JAK2*^{V617F} (Bảng 3.3). Đột biến này là đột biến sai nghĩa tại vị trí nucleotide số 1849 trên trình tự cDNA biến đổi Guanine thành Thymine. Kết quả giải trình tự Sanger từ sản phẩm PCR tinh sạch chứa điểm đột biến cho thấy tín hiệu giải trình tự rõ ràng, sắc nét, không có tín hiệu nhiễu hay ngoại lai. Kết quả có thể sử dụng để phân biệt dễ dàng các kiểu gen đồng hợp GG (kiểu dại), dị hợp GT hay đồng hợp TT (đột biến gen) mà không gây ra nhầm lẫn (Hình 3.5, Bảng 3.2).



Hình 3.5. Điểm đa hình *JAK2*^{V617F} ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

Kết quả giải trình tự Sanger vị trí JAK2 p.G17F c. G1849T ở các kiểu gen khác nhau với mỗi được sử dụng để giải trình tự là mỗi ngược.

Bảng 3.2. Sự phân bố kiểu gen của SNP JAK2^{V617F} ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

Gen/SNP	SNP ID GenBank	Kiểu đột biến	Thay đổi nucleotide	MAF THCVC	HWE THCVC (<i>p</i>)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (<i>p</i>)	HWE quần thể (<i>p</i>)
JAK2/rs77375493	9:5073770	Missense	G>A	0.442	0.656	0	NaN	0.051

Bảng 3.3. So sánh tần số kiểu gen của gen JAK2^{V617F} giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

SNP	Gen	Mô hình kiểu gen	Nhóm chứng (n=55)	THCVC (n=77)	Giá trị <i>p</i>
rs77375493	JAK2	GG	55 (100%)	26 (33.76%)	<0.001 ⁽²⁾
		GT/TT	0 (0%)	51 (66.24%)	

3.1.5.2 Kết quả dự đoán in-silico của gen JAK2

Kết quả phân tích bằng các phần mềm như PredictSNP [191], Polyphen-2 [183], SIFT, SNAP [192] đều dự đoán rằng đột biến JAK2^{V617F} có khả năng cao làm thay đổi cấu trúc 3D của protein, qua đó làm suy giảm hoạt tính của enzyme tương ứng (deleterious). Ngoài ra, vị trí acid amin số 617 (Valine) ở gen JAK2 cũng cho thấy sự bảo thủ lớn giữa các loài động vật khác nhau, cho thấy vùng trình tự acid amin này đóng một vai trò quan trọng trong cấu trúc và chức năng của protein JAK2 (Hình 3.6).

Species	JAK2 V617									
<i>Homo sapiens (Human)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	D
<i>Monodelphis domestica (Gray short-tailed opossum)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Rattus norvegicus (Rat)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Myotis lucifugus (Little brown bat)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Meleagris gallopavo (Wild turkey)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Loxodonta Africana (African elephant)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Gallus gallus (Chicken)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Xenopus tropicalis (Western clawed)</i>	I	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Tetraodon nigroviridis (Spotted green pufferfish)</i>	V	L	T	Y	G	I	C	V	C	D

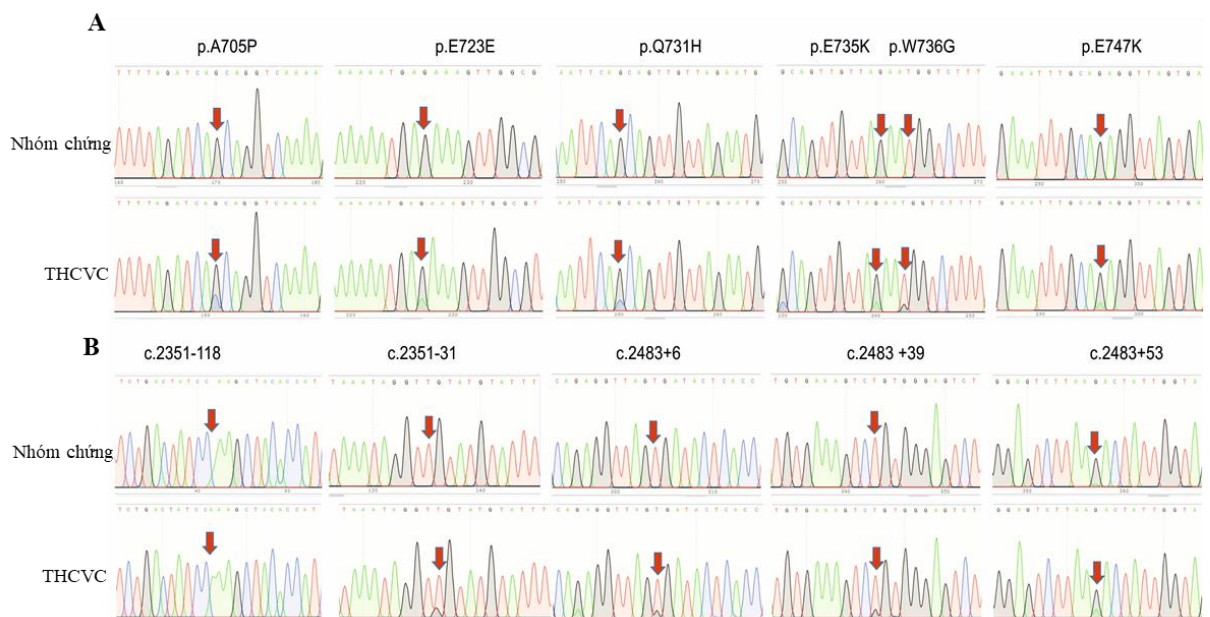
Hình 3.6. So sánh trình tự amino acid tại vị trí JAK2^{V617F} giữa các loài khác nhau

Không chỉ bệnh THCVC, các loại bệnh tăng sinh tủy ác tính khác như bệnh xơ tủy cấp, bệnh tăng tiểu cầu tiền phát đều xuất hiện đột biến này trên gen *JAK2* tại vị trí V617F [193]. Đột biến V617F chịu trách nhiệm cho 95% số ca bệnh đa hồng cầu và khoảng 50%-60% số ca bệnh tăng tiểu cầu tiền phát và bệnh xơ tủy cấp trên toàn thế giới [7]. Đột biến này cũng đã được chứng minh có liên quan đến tình trạng tăng huyết khối, qua đó dẫn đến rối loạn chức năng tim mạch ở các nghiên cứu *in vitro* trên mô hình tế bào nội mô cũng như trên mô hình chuột [194]. Trong nghiên cứu này, các mô hình dự đoán *in-silico* cũng đã dự đoán đột biến V617F có tiềm năng gây ảnh hưởng lớn đến cấu trúc và chức năng của enzyme tương ứng, từ đó có khả năng làm thay đổi mạng lưới phân tử tín hiệu bên trong tế bào gốc tủy xương sinh máu.

3.1.6 Phân tích đột biến gen *CYLD* trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

3.1.6.1 Đột biến gen *CYLD* trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Giải trình tự gen *CYLD* đã xác định được 6 nucleotide ở exon 15 bị thay đổi (Hình 3.7 A), trong đó 5 trong số 6 SNP, bao gồm p.A705P (c.2355 G>C), p.Q731H (c.2435 G>C), p.E735K (c.2445 G>A), p.W736G (c.2448 T>G) và p.E747K (c.2481 G>A) là SNP không đồng nghĩa, đây là những SNP gây ra những thay đổi axit amin cũ và thay thế bằng axit amin mới, và một SNP p.E723E còn lại (c.2411 G>A) là SNP đồng nghĩa. Ngoài ra nghiên cứu còn tìm thấy năm thay đổi nucleotide, bao gồm 2 SNP c.2351-118delA và c.2351-31 T>G trong intron 14 và 3 SNP c.2483 + 6 T>G, c.2483 + 39 T>G và c.2483 + 53 G>A trong intron 15 (Hình 3.7 B).



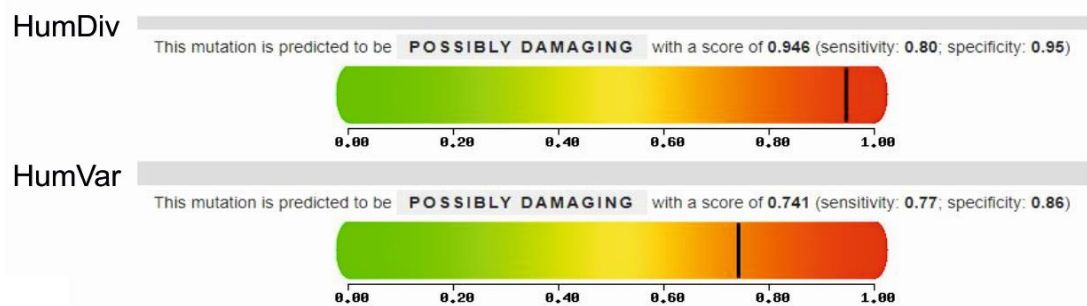
Hình 3.7. Các điểm đa hình của gen *CYLD* ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.

Trong số 11 SNP, sự phân bố của tất cả kiểu gen, ngoại trừ 2 SNP p.E747K và c.2483+53 G> A đều phù hợp với định luật Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0,05$). Tần số alen nhỏ (MAF) của biến thể p.W736G cao hơn đáng kể ở nhóm THCVC so với nhóm đối chứng ($p = 0,022$) và không có sự khác biệt trong 10 SNP còn lại giữa hai nhóm nghiên cứu (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Sự phân bố kiểu gen của các SNP trên gen CYLD ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

Gen/SNP	SNP ID GenBank	Kiểu đột biến	Thay đổi nucleotide	MAF THCVC	HWE THCVC (p)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (p)	HWE quần thể (p)
<i>CYLD/c.2351-118</i>	16:50791440	Intron	Del A	0	0.993	0	0.913	0.938
<i>CYLD/c.2351-31</i>	16:50791527	Intron	T>G	0.006	0.998	0	NaN	0.999
<i>CYLD/c.2355 p.A705P</i>	16:50791562	Exon	G>C	0.02	0.985	0	NaN	0.991
<i>CYLD/c.2411 p.E723E</i>	16:50791618	Exon	G>A	0.033	0.958	0.055	0.913	0.883
<i>CYLD/c.2435 p.Q731H</i>	16:50791642	Exon	G>C	0.111	0.553	0.137	0.504	0.285
<i>CYLD/c.2445 p.E735K</i>	16:50791652	Exon	G>A	0.13	0.424	0.173	0.302	0.138
<i>CYLD/c.2448 p.W736G</i>	16:50791655	Exon	T>G	0.091	0.681	0.01	0.998	0.787
<i>CYLD/c.2481 p.E747K</i>	16:50791688	Exon	G>A	0.169	0.204	0.219	0.118	0.027
<i>CYLD/c.2483+6</i>	16:50791696	Intron	T>G	0.026	0.973	0	NaN	0.985
<i>CYLD/c.2483+39</i>	16:50791729	Intron	T>G	0.039	0.939	0.01	0.998	0.952
<i>CYLD/c.2483+53</i>	16:50791743	Intron	G>A	0.182	0.149	0.219	0.118	0.019

Để đánh giá tác động của SNP không đồng nghĩa trong gen *CYLD* lên chức năng của protein, nghiên cứu đã sử dụng phần mềm tin sinh học Polyphen-2 [195]. Kết quả chỉ ra rằng, trong số 5SNP chỉ có SNP p.W736G được dự đoán là có thể gây bệnh với số điểm là 0,9456 (phạm vi điểm: 0 –1; độ nhạy: 0,8; độ đặc hiệu: 0,95) (Hình 3.8). Chính vì thế, biến thể p.W736G có thể là một trong những SNP không đồng nghĩa gây bệnh có mặt trong gen *CYLD*.



Hình 3.8. Dự đoán chức năng biến thể p.W736G bằng chương trình Polyphen-2

Bên cạnh đó, kiểu gen TG của biến thể p.W736G có tần suất cao hơn ở bệnh nhân THCVC (18,2%) so với người khỏe mạnh (1,81%; $p = 0,018$, Bảng 3.5), trong khi đó, 10 SNP khác trong gen *CYLD* không liên quan đáng kể với kiểu hình THCVC. Các bằng chứng cho thấy đột biến p.W736G trong gen *CYLD* có thể là đột biến gây bệnh THCVC.

Bảng 3.5. So sánh tần số kiểu gen của các gen CYLD giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

SNP	Gen	Mô hình kiểu gen	Nhóm chứng (n=55)	THCVC (n=77)	Giá trị p
<i>c.2351-118</i>	<i>CYLD</i>	AA	49 (89.09%)	75 (97.4%)	0.052 ⁽¹⁾
		DelA	6 (10.91 %)	2 (2.6%)	
<i>c.2351-31</i>	<i>CYLD</i>	TT	55 (100%)	76 (98.7%)	1 ⁽¹⁾
		TG	0	1 (1.3%)	
<i>c.2355 p.A705P</i>	<i>CYLD</i>	GG	55 (100%)	74 (96.1%)	0.121 ⁽¹⁾
		GC	0 (0%)	3 (3.9%)	
<i>c.2411 p.E723E</i>	<i>CYLD</i>	GG	49 (89.09%)	72 (93.5%)	0.335 ⁽¹⁾
		GA	6 (10.91 %)	5 (6.5%)	
<i>c.2435 p.Q731H</i>	<i>CYLD</i>	GG	40 (72.73%)	60 (77.9%)	0.511 ⁽¹⁾
		GC	15 (27.27%)	17 (22.1%)	
<i>c.2445 p.E735K</i>	<i>CYLD</i>	GG	36 (65.46%)	57 (44%)	0.055 ⁽¹⁾
		GA	19 (34.54%)	20 (56%)	
<i>c.2448 p.W736G</i>	<i>CYLD</i>	TT	54 (98.19%)	63 (81.8%)	<0.001 ⁽¹⁾
		TG	1 (1.81%)	14 (18.2%)	
<i>c.2481 p.E747K</i>	<i>CYLD</i>	GG	31 (56.36%)	51 (66.2%)	0.147 ⁽²⁾
		GA	24 (43.64%)	26 (33.8%)	
<i>c.2483+6</i>	<i>CYLD</i>	TT	55 (100%)	73 (94.8%)	0.059 ⁽¹⁾
		TG	0 (0%)	4 (5.2%)	
<i>c.2483+39</i>	<i>CYLD</i>	TT	54 (98.19%)	71 (92.2%)	0.101 ⁽¹⁾
		TG	1 (1.81%)	6 (7.8%)	
<i>c.2483+53</i>	<i>CYLD</i>	GG	31 (56.37%)	49 (63.6%)	0.248 ⁽²⁾
		GA	24 (43.63%)	28 (36.4%)	

3.1.6.2 Kết quả dự đoán in-silico của gen *CYLD*

Tiếp theo, nghiên cứu phân tích tác động của 5 SNP có mặt trong vùng intron liên quan đến bệnh THCVC bằng chương trình dự đoán SD-Score [196]. Nghiên cứu cho thấy rằng, chỉ có SNP c.2483+6 T> G được dự đoán là SNP thay đổi vị trí cắt (splicing SNP) (Bảng 3.6 A). Bên cạnh đó, phần mềm dự đoán MaxEntScan [195] thông qua phân tích điểm của MaxENT (Mô hình Entropy tối đa), MDD (Mô hình phân hủy phụ thuộc tối đa), MM (Mô hình Markov bậc nhất) và WMM (Mô hình ma trận trọng lượng) chỉ ra rằng chỉ số các loại trên của SNP c.2483+6 T>G thấp hơn nhóm đối

chúng (Bảng 3.6 B), điều đó cho thấy rằng SNP c.2483+6 T>G có thể là SNP thay đổi vị trí cắt.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng gây bệnh THCVC của SNP c.2483 + 6 T> G. Dự đoán bởi chương trình phần mềm SD-Score (A) hoặc MaxEntScan (B).

A

Wt.Seq				Mt.Seq				Difference			Prediction	
pos	Wt.Seq (9bases)	SD-Score	Ri	CV	Mt.Seq (9bases)	SD-Score	Ri	CV	Δ SD-Score	Δ Ri		Δ CV
4	GAGGTTAGT	-3.08	7.568	0.87	GAGGTTAGG	-4.163	6.274	0.823	-1.087	-1.294	-0.049	Aberrant

B

Genotype	Sequence	MaxENT	MDD	MM	WMM
Wild type	gagGTTAGT	7.15	12.78	6.8	6.92
Mutant	gagGTTAGG	4.36	8.98	5.11	5.99

Kiểm tra sâu hơn về sự liên kết của protein CYLD bằng phần mềm Polyphen 2 cho thấy rằng trình tự amino acid tại vị trí p.W736 được bảo tồn cao giữa các loài khác nhau bao gồm con người (*Homo sapiens*), chuột (*Rattus norvegicus*), opossum đuôi ngắn xám (*Monodelphis domestica*), quỷ tasmanian (*Sarcophilus harrisii*), mỏ vịt (*Ornithorhynchus anatinus*), dơi nâu nhỏ (*Myotis lucifugus*), gà (*Gallus gallus*), gà tây hoang dã (*Meleagris gallopavo*), ếch móng vuốt phương tây (*Xenopus Tropicalis*), cá rô phi Nile (*Oreochromis niloticus*), cá ngựa vằn (zebrafish *Danio rerio*), cá ba gai (*Gasterosteus aculeatus*), voi châu Phi (*Loxodonta africana*), cá nóc xanh đốm (*Tetraodon nigroviridis*) (Hình 3.9).

Species	p.W 736											
<i>Homo sapiens</i> (Human)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Monodelphis domestica</i> (Gray short-tailed opossum)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Sarcophilus harrisii</i> (Tasmanian devil)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (Duckbill platypus)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	S	
<i>Myotis lucifugus</i> (Little brown bat)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Gallus gallus</i> (Chicken)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Meleagris gallopavo</i> (Wild turkey)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Xenopus tropicalis</i> (Western clawed frog)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	S	
<i>Oreochromis niloticus</i> (Nile tilapia)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	D	
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	D	
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Three-spined stickleback)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	D	
<i>Loxodonta africana</i> (African elephant)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Tetraodon nigroviridis</i> (Spotted green pufferfish)	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	D	

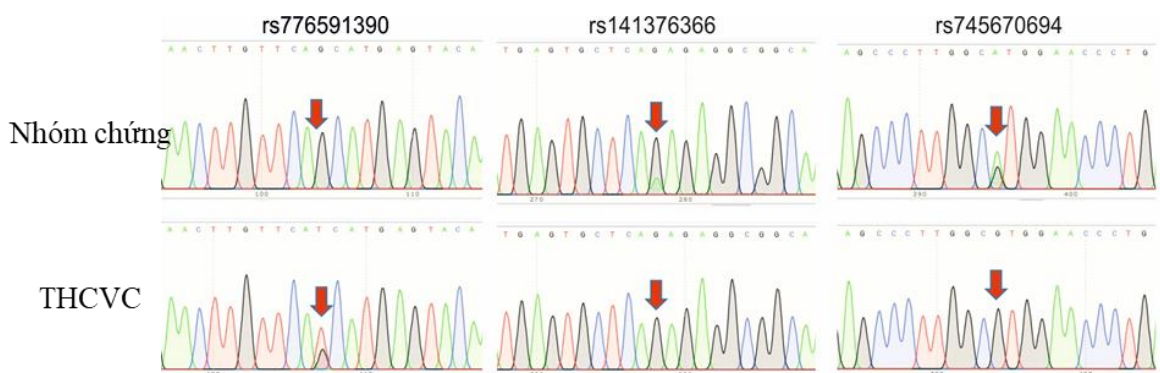
Hình 3.9. So sánh trình tự amino acid tại vị trí p.W736G trong protein CYLD.

Kết quả phân tích bằng phần mềm như Polyphen-2 dự đoán rằng đột biến p.W736G có khả năng cao làm thay đổi cấu trúc 3D của protein, qua đó làm suy giảm hoạt tính của enzyme tương ứng (deleterious). Ngoài ra, vị trí acid amin số 736 (Valine) ở gen *CYLD* cũng cho thấy sự bảo thủ lớn giữa các loài động vật khác nhau, cho thấy vùng trình tự acid amin này đóng một vai trò quan trọng trong cấu trúc và chức năng của *CYLD* (Hình 3.9). Trong nghiên cứu này, các mô hình dự đoán *in-silico* cũng đã dự đoán đột biến p.W736G có tiềm năng gây ảnh hưởng lớn đến cấu trúc và chức năng của enzyme tương ứng, từ đó có khả năng làm thay đổi mạng lưới phân tử tín hiệu bên trong tế bào gốc tủy xương sinh máu.

Hơn nữa, phân tích đột biến 2 gen *JAK2* và *CYLD* ta nhận thấy rằng có mối liên quan giữa các đột biến gen *JAK2* và *CYLD* ở bệnh nhân THCVC. Trong số các bệnh nhân, có 10/14 (71,4%) trường hợp mang đột biến p.W736G và 4 trong 4 (100%) người mang gen đột biến c.2483+6 T>G dương tính với đột biến *JAK2*^{V617F}.

3.1.7 Phân tích đột biến gen *A20* trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Giải trình tự gen *A20* xác định được 3 sự thay đổi nucleotide ở exon 7 bao gồm *rs776591390* G>T, *rs141376366* G>A và *rs745670694* G>A (Hình 3.10). Sự phân bố kiểu gen của 3 SNP trong gen này phù hợp với định luật HWE ($p > 0,05$) (Bảng 3.8). Kết quả MAF của SNP *rs776591390* cao hơn một chút, trong khi MAF của 2 SNP còn lại ở nhóm THCVC thấp hơn so với nhóm đối chứng. Trong số 3 SNP, tần suất SNP *rs776591390* được phát hiện ở một bệnh nhân THCVC (1,29%) và 2 SNP còn lại *rs141376366* và *rs745670694* chỉ được tìm thấy ở các cá thể đối chứng với tần số lần lượt là 1,81% và 3,63% tương ứng (Bảng 3.7).



Hình 3.10. Điểm đa hình của gen *A20* ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

Bảng 3.7. Sự phân bố kiểu gen của các SNP trên gen A20 ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

SNP	Gen	Mô hình kiểu gen	Nhóm chứng (n=55)	THCVC (n=77)	Giá trị p
rs776591390	A20	GG	55 (100%)	76 (98.71%)	1 ⁽¹⁾
		TG	0	1 (1.29%)	
rs141376366	A20	GG	54 (98.19%)	77 (100%)	0.497 ⁽¹⁾
		GA	1 (1.81%)	0	
rs745670694	A20	GG	53 (96.37%)	77 (100%)	0.121 ⁽¹⁾
		AG	2 (3.63%)	0 (0%)	

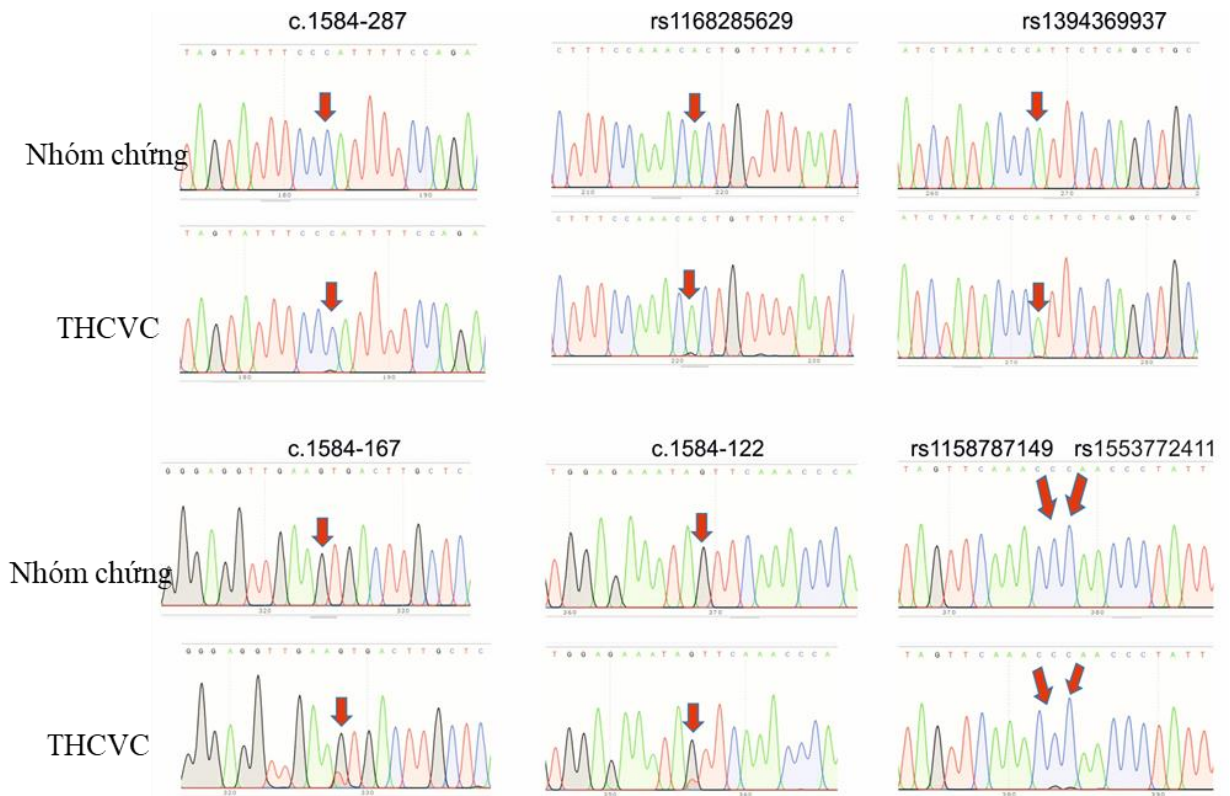
Bảng 3.8. So sánh tần số kiểu gen của các gen A20 giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

Gen/SNP	SNP ID GenBank	Kiểu đột biến	Thay đổi nucleotide	MAF THCVC	HWE THCVC (p)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (p)	HWE quần thể (p)
A20/rs776591390	6:137878495	Missense	G>T	0.006	0.998	0	NaN	0.999
A20/rs141376366	6:137878670	Exon	G>A	0	NaN	0.01	0.998	0.999
A20/rs745670694	6:137878786	Synonymous	G>A	0	NaN	0.108	0.991	0.996

Bên cạnh đó, phân tích dự đoán ảnh hưởng của các SNP trong gen A20 bằng phần mềm tin sinh Polyphen-2 cho thấy rằng, không có mối liên quan nào giữa các biến thể trên với bệnh THCVC ($p > 0,05$).

3.1.8 Phân tích đột biến gen Cezanne trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Cuối cùng, giải trình tự gen *Cezanne* đã xác định được 7 thay đổi nucleotide trong intron 10 và 3 trong số 7 biến thể (*c.1584-287 C>G*, *c.1584-167 G>T* và *c.1584-122 G>T*) là mới chưa được công bố trước đó. Bốn biến thể còn lại (*rs1168285629 A>G*, *rs1394369937 A>G*, *rs1158787149 C>G* và *rs1553772411 C>G*) được báo cáo trong cơ sở dữ liệu SNP của NCBI là SNP không xác định (Hình 3.11).



Hình 3.11. Điểm đa hình của *Cezanne* ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

Sự phân bố kiểu gen của 7 SNP trong gen *Cezanne* phù hợp với định luật HWE ($p > 0,05$) (Bảng 3.9). MAF của 7 SNP ở nhóm THCVC cao hơn một chút so với những người khỏe mạnh. Trong số các SNP này, 5 trong số 7 SNP (c.1584-287 C> G, rs1394369937 A> G, c.1584-167 G> T, rs1158787149 C> G và rs1553772411 C> G) xuất hiện ở bệnh nhân THCVC, nhưng không xuất hiện trong nhóm đối chứng, với tần số lần lượt là 7,79%, 5,19%, 2,6%, 5,19% và 3,89% (Bảng 16).

Bảng 3.9. SNP của các gen *Cezanne* ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

Gen/SNP	SNP ID GenBank	Kiểu đột biến	Thay đổi nucleotide	MAF THCVC	HWE THCVC (p)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (p)	HWE quần thể (p)
<i>Cezanne/c.1584-287</i>	1:149947622	Intron	C>G	0.039	0.998	0	NaN	0.965
<i>Cezanne/rs1168285629</i>	1:149947587	Intron	A>G	0.046	0.916	0.019	0.991	0.921
<i>Cezanne/rs1394369937</i>	1:149947537	Intron	A>G	0.026	0.973	0	NaN	0.985
<i>Cezanne/c.1584-167</i>	1:149947502	Intron	G>T	0.013	0.993	0	NaN	0.996
<i>Cezanne/c.1584-122</i>	1:149947457	Intron	G>T	0.026	0.973	0.010	0.998	0.976
<i>Cezanne/rs1158787149</i>	1:149947449	Intron	C>G	0.026	0.987	0	NaN	0.985
<i>Cezanne/rs1553772411</i>	1:149947450	Intron	C>G	0.019	0.993	0	NaN	0.991

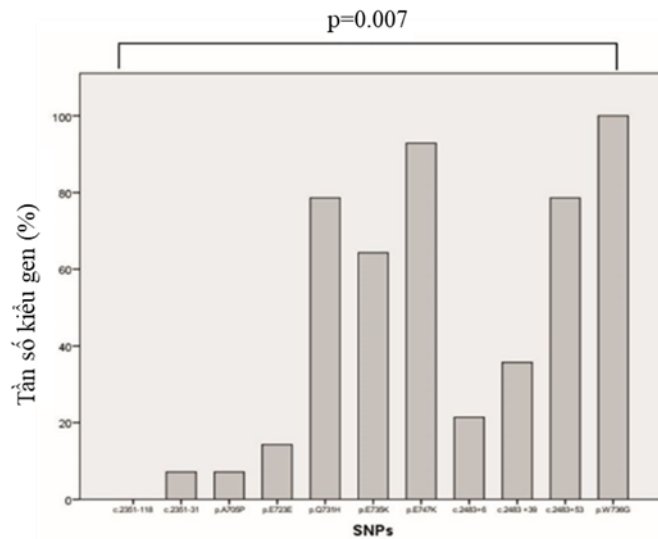
Phân tích các biến thể trên gen *Cezanne* cho thấy, 7 trong số 77 (9,09%) bệnh nhân THCVC mang ít nhất 2 SNP trong gen *Cezanne*. Ngoài ra, để xác định mối liên quan giữa các đột biến trong gen *CYLD* và *Cezanne*, chúng tôi cũng quan sát thấy các mẫu THCVC mang biến thể p.W736G và/hoặc c.2483+6 trong gen *CYLD* không có biến thể trong gen *Cezanne*.

Bảng 3.10. So sánh tần số kiểu gen của Cezanne giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

SNP	Gen	Mô hình kiểu gen	Nhóm chứng (n=55)	THCVC (n=77)	Giá trị p
c.1584-287	<i>Cezanne</i>	CC	55 (100%)	71 (92.21%)	0.007⁽¹⁾
		CG	0 (0%)	6 (7.79%)	
rs1168285629	<i>Cezanne</i>	AA	53 (96.36%)	70 (90.91%)	0.251 ⁽¹⁾
		AG	2 (3.64%)	7 (9.09%)	
rs1394369937	<i>Cezanne</i>	AA	55 (100%)	73 (94.81%)	0.059 ⁽¹⁾
		AG	0 (0%)	4 (5.19%)	
c.1584-167	<i>Cezanne</i>	GG	55 (100%)	75 (97.4%)	0.246 ⁽¹⁾
		GT	0 (0%)	2 (2.60%)	
c.1584-122	<i>Cezanne</i>	GG	54 (98.18%)	73 (94.81%)	0.445 ⁽¹⁾
		GT	1 (1.82%)	4 (5.19%)	
rs1158787149	<i>Cezanne</i>	CC	55 (100%)	73 (94.81%)	0.059 ⁽¹⁾
		CG	0 (0%)	4 (5.19%)	
rs1553772411	<i>Cezanne</i>	CC	55 (100%)	74 (96.11%)	0.121 ⁽¹⁾
		CG	0 (0%)	3 (3.89%)	

Đối với 7 biến thể được kiểm tra ở bảng trên, dựa vào tỷ lệ chênh lệch và khoảng tin cậy, giá trị p cho thấy không có mối liên quan nào giữa các biến thể trên với bệnh THCVC ($p > 0,05$) (Bảng 3.10).

Đáng chú ý là trong số 14 bệnh nhân mang gen SNP W736G trong gen *CYLD*, 13 trường hợp (92,8%) được phát hiện mang SNP p.E747K; 11 (78,6%) trường hợp có cả SNP p. Q731H G> C và SNP c.2483 + 53 G> A; 9 (64,3%) trường hợp được phát hiện mang SNP p.E735K; 3 (21,4%) mang SNP c. 2483 + 6 T> G và 5 (35,7%) trường hợp mang SNP c. 2483 + 39 T> G (Hình 3.12). Theo kết quả thử nghiệm Kruskal – Wallis, có sự liên quan đáng kể giữa các SNP trong gen *CYLD* ($\chi^2 = 7,364$, $p = 0,007$), cho thấy rằng người bệnh THCVC mang SNP W736G có nhiều SNP trong gen *CYLD*. Chúng tôi cũng quan sát thấy rằng các bệnh nhân THCVC mang SNP W736G và SNP c. 2483 + 6T> G trong gen *CYLD* không có SNP trong A20 hoặc *Cezanne* (Hình 3.12).



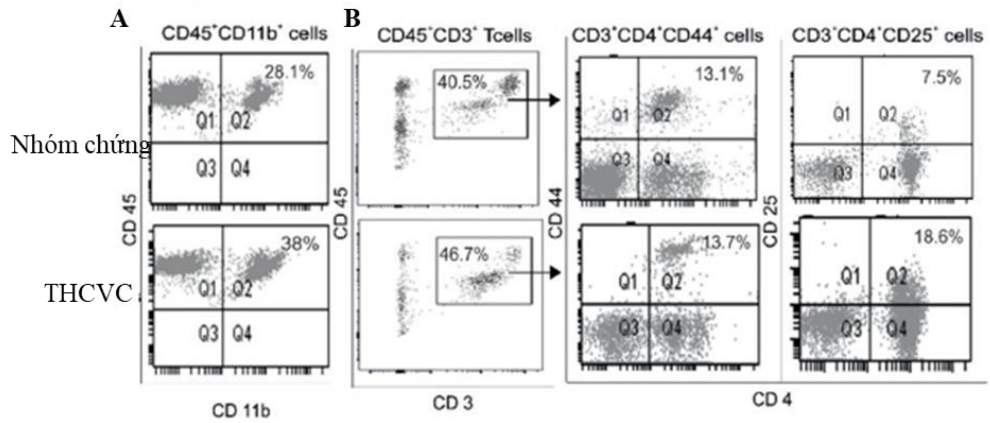
Hình 3.12. Mối liên hệ giữa SNP W736G và 9 SNP khác trong gen *CYLD* trên bệnh nhân THCVC

Giá trị *P* được tính bằng phép thử Kruskal – Wallis (*K* mẫu liên quan). $P = 0,007$ cho thấy có sự liên quan đáng kể giữa các SNP trong gen *CYLD*.

3.1.9 Kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Sự bất hoạt các gen *A20*, *CYLD* và *Cezanne* có thể được gây ra do sự biến đổi các gen này trong bệnh nhân THCVC. Những thay đổi này có thể dẫn đến việc kích hoạt và huy động các tế bào miễn dịch vào cơ quan hệ thống của cơ thể. Do đó, những thay đổi về số lượng và sự hoạt hóa của tế bào dòng tủy ($CD11b^+$) và tế bào T $CD4^+$ có mặt trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) của bệnh nhân THCVC đã được kiểm tra.

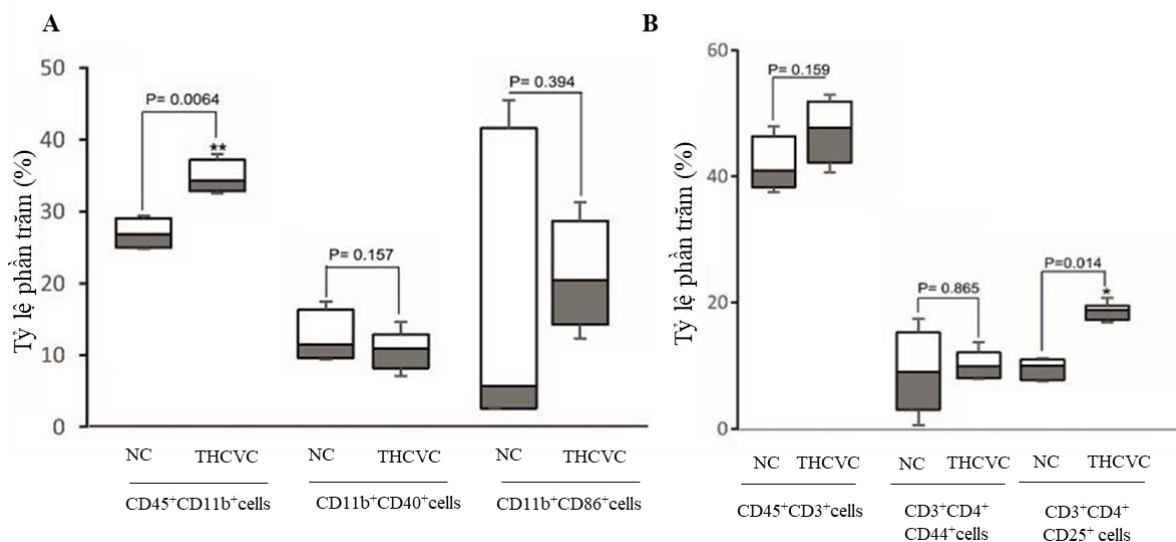
Trong kết quả này, các tế bào $CD45^+$ là tế bào bạch cầu được kiểm tra trong tất cả các thí nghiệm. Phân tích tế bào dòng chảy cho thấy tỷ lệ tế bào $CD11b^+$ tăng lên trong máu tuần hoàn của bệnh nhân THCVC là 38% so với mẫu đối chứng là 28,1%. (Hình 3.13A, 3.14A). Sự hoạt hóa của tế bào T $CD3^+CD4^+$ đã được tăng cường trong bệnh nhân THCVC. Ở đây, tế bào $CD3^+CD4^+CD25^+$ tăng đáng kể ở bệnh nhân THCVC là 18,6% so với mẫu đối chứng là 7,5% (Hình 3.13B). Số lượng tế bào $CD3^+CD4^+CD44^+$ dường như không tăng ở bệnh nhân THCVC và mẫu chứng (Hình 3.13B, 3.14B).



Hình 3.13. Hình dot blot của những tế bào $CD11b^+$ và tế bào T $CD4$ trên bệnh nhân THCVC.

A, Hình dot blot biểu hiện tế bào $CD45^+CD11b^+$ được hiển thị trên mẫu đối chứng (ô trên) và bệnh nhân THCVC (ô dưới). B, Hình dot blot biểu hiện $CD3^+CD4^+CD44^+$, $CD3^+CD4^+CD25^+$ được hiển thị trên mẫu đối chứng (ô trên) và ô bệnh nhân THCVC (ô dưới).

Tuy nhiên, sự hoạt hóa của tế bào tủy $CD11b^+$ trong các trường hợp THCVC được phát hiện là tương tự như ở những người khỏe mạnh, vì số lượng tế bào biểu hiện $CD11b^+CD86^+$ và $CD11b^+CD40^+$ vẫn không thay đổi ở những bệnh nhân này (Hình 3.14A).

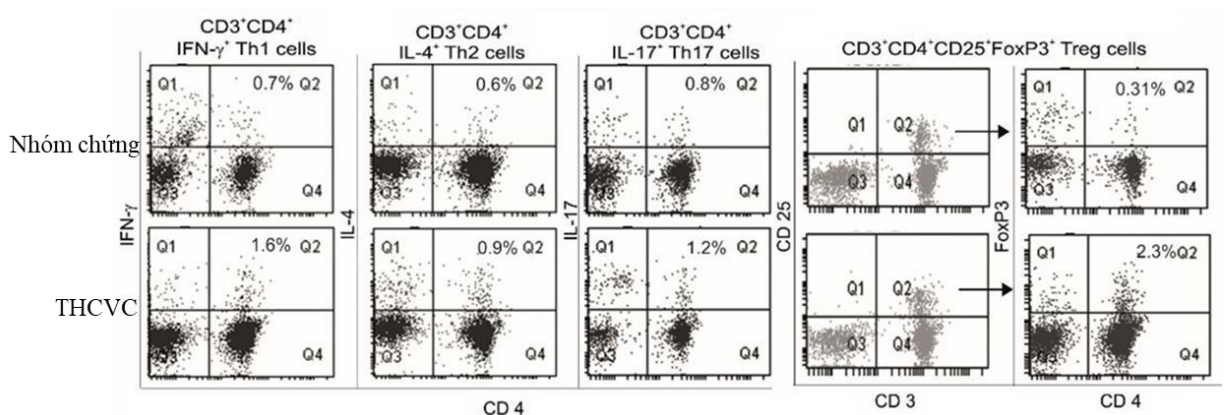


Hình 3.14. Biểu đồ biểu hiện về tỷ lệ phần trăm các loại tế bào trên bệnh nhân THCVC so với mẫu đối chứng.

A,B: Biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm của số lượng tế bào $CD45^+CD11b^+$, $CD11b^+CD40^+$ và $CD11b^+CD86^+$ và $CD45^+CD3^+$, $CD3^+CD4^+CD44^+$ và $CD3^+CD4^+CD25^+$. ** ($p < 0,01$); $p^* < 0,05$ cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa bệnh nhân THCVC so với những người khỏe mạnh (thử nghiệm Mann – Whitney U, $n = 5-7$). Các cột trên biểu đồ biểu thị giá trị trung bình, độ trải giữa (interquartile range- IQR), giá trị tối thiểu và giá trị tối đa.

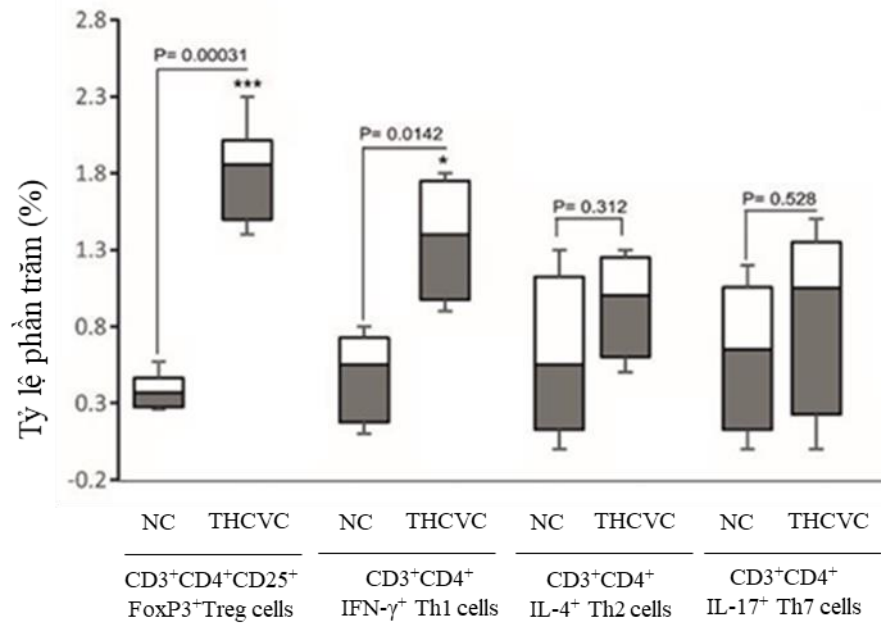
Tiếp theo, phân tích thành phần của tế bào T hoạt hóa cho thấy, các tế bào T biểu hiện $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Treg- tế bào T điều hòa) và $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ (Th1) trong máu ngoại vi bệnh nhân tăng lên đáng kể so với người khỏe. Số lượng tế bào $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ (Th1) và $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ở mẫu chứng lần lượt là 0,7%; 0,31% trong khi ở bệnh nhân THCVC tương ứng là 1,6% ; 2,3% (Hình 3.15). Phù hợp với một nghiên cứu trước đây, các tế bào Treg được huy động vào hệ tuần hoàn để tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của bệnh THCVC [197], cho thấy rằng sự giảm biểu hiện của các gen *A20*, *CYLD* và *Cezanne* ở bệnh nhân THCVC có thể liên quan đến việc làm tăng số lượng các tế bào $CD25^+CD4^+$ T và tế bào T điều hòa trong máu.

Ngoài ra, số lượng tế bào biểu hiện $CD3^+CD4^+IL-4^+$ (Th2) ở bệnh nhân THCVC là 0,9% so với mẫu đối chứng là 0,6%. Lượng tế bào $CD3^+CD4^+IL-17^+$ (Th17) ở hệ tuần hoàn bệnh nhân THCVC là 1,2% trong khi ở mẫu chứng là 0,8% (Hình 3.15, 3.16). Kết quả chỉ ra rằng không có sự thay đổi lớn của hai loại tế bào này trên bệnh nhân THCVC.



Hình 3.15. Hình dot blot biểu hiện khả năng hoạt hóa của các loại tế bào T trên bệnh nhân THCVC.

Các tế bào T hoạt hóa biểu hiện $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ (Th1), $CD3^+CD4^+IL-4^+$ (Th2), $CD3^+CD4^+IL-17^+$ (Th17), $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ được hiển thị ở mẫu đối chứng (ô trên) và mẫu bệnh nhân THCVC (ô dưới).



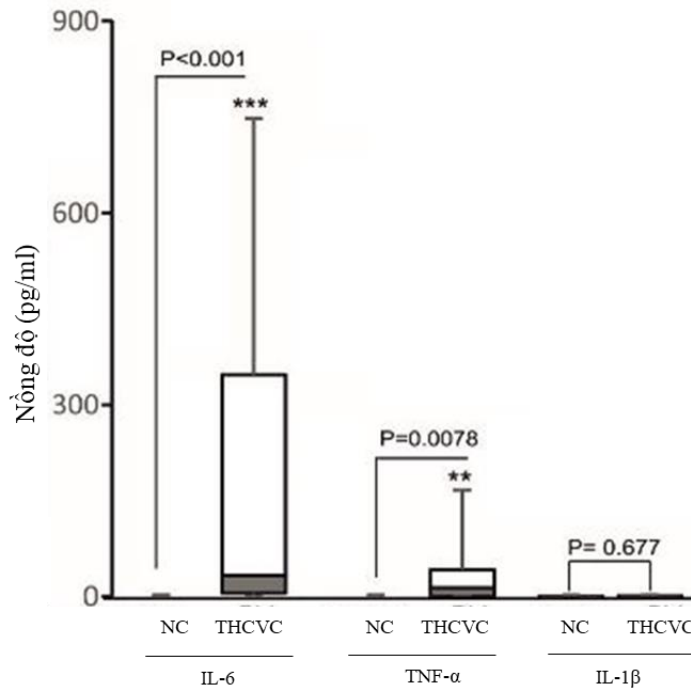
Hình 3.16. Tỷ lệ phần trăm số lượng hoạt hóa của các loại tế bào T trên bệnh nhân THCVC

Biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm của số lượng tế bào $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ (Th1), $CD3^+CD4^+IL-4^+$ (Th2), $CD3^+CD4^+IL-17^+$ (Th17), $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (***) $p < 0,001$; $p^* < 0,05$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với những người khỏe mạnh (thử nghiệm Mann – Whitney U, $n = 5-7$). Các cột trên biểu đồ biểu thị giá trị trung bình, độ trải giữa (interquartile range- IQR), giá trị tối thiểu và giá trị tối đa.

3.1.10 Sự tiết cytokine và kháng nguyên ung thư ở bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Protein A20 và CYLD điều hòa ngược con đường tín hiệu NF- κ B, kiểm soát quá trình viêm và chống lại quá trình apoptosis [133]. Hai protein này cũng được gọi là chất ức chế phản ứng viêm [198]. Mặt khác, mức độ biểu hiện gen của hai gen này giảm đáng kể ở bệnh nhân THCVC so với người khỏe (Hình 3.1), do đó việc sản xuất cytokine trong huyết tương của bệnh nhân THCVC có thể liên quan đến mức độ biểu

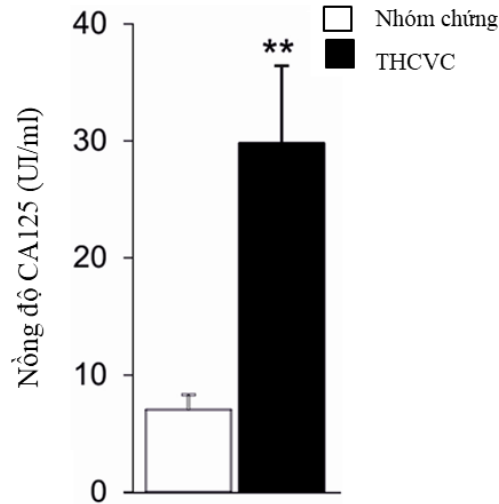
hiện hai gen trên. Tương tự như một nghiên cứu gần đây [199], nghiên cứu cũng chỉ ra rằng mức IL-6 và TNF- α ở bệnh nhân THCVC được tìm thấy cao hơn so với bệnh nhân đối chứng, tuy nhiên, những bệnh nhân này không cho thấy sự thay đổi về mức độ IL-1 β trong huyết tương (Hình 3.17).



Hình 3.17. Kết quả đo nồng độ IL-6, TNF- α , IL-1 β bằng phương pháp ELISA. Biểu đồ thể hiện nồng độ IL-6, TNF- α và IL-1 β thu được từ huyết tương của bệnh nhân THCVC (***) $p < 0,001$; $p^{**} < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với những người khỏe mạnh (thử nghiệm Mann – Whitney U, $n = 5-7$). Các cột trên biểu đồ biểu thị giá trị trung bình, độ trải giữa (interquartile range- IQR), giá trị tối thiểu và giá trị tối đa.

Sàng lọc CA125 cũng giúp xác định đáp ứng của bệnh nhân đối với các liệu pháp điều trị bệnh. CA125 cũng biểu hiện ở những loại ung thư khác như ung thư vú, ung thư phổi, và ung thư tuyến giáp [84, 200]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra mối liên hệ giữa CA125 với các bệnh ung thư bạch cầu [201, 202]. Tuy nhiên, còn ít nghiên cứu về nồng độ của marker ung thư này trong bệnh THCVC. Mức CA-125 đã được kiểm tra bằng ELISA vì hàm lượng của kháng nguyên ung thư này được tìm thấy là cao hơn ở bệnh nhân nữ cao tuổi mắc bạch cầu lympho mãn tính ở độ tuổi 50-75 trong nghiên cứu gần đây của chúng tôi. Dấu hiệu này được coi là dấu hiệu liên quan đến sự phát triển và bệnh sinh của bệnh bạch cầu. Như dự đoán, mức CA-125 ở bệnh

nhân THCVC cao hơn đáng kể so với nhóm chứng khỏe mạnh (Hình 3.18) và 18 trong số 77 (23,4%) bệnh nhân THCVC có mức CA125 cao hơn ngưỡng lâm sàng, 35 UI/mL [203].



Hình 3.18. Kết quả đo nồng độ CA125 bằng phương pháp ELISA.

Giá trị trung bình \pm SEM ($n = 53-77$) của hàm lượng CA-125 thu được từ huyết tương của người cho khỏe mạnh (thanh trắng) và bệnh nhân THCVC (thanh đen). ** ($p < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với những người khỏe mạnh (ANOVA).

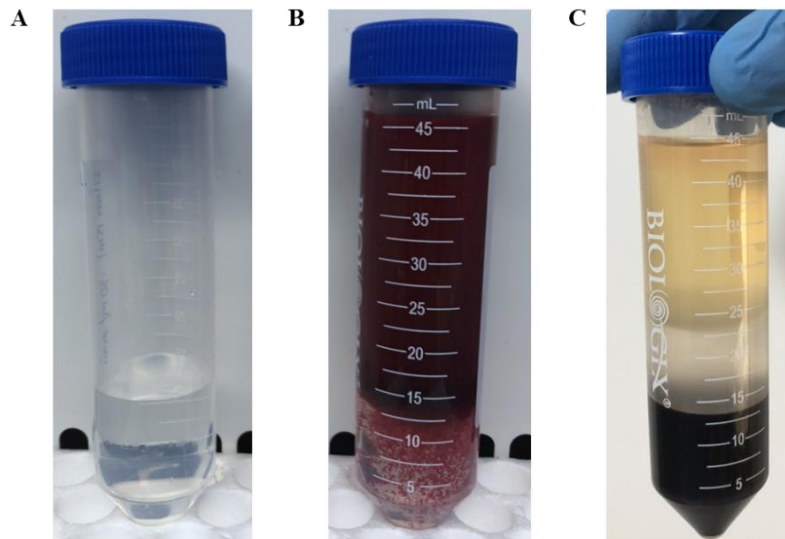
Nhiều nghiên cứu gần đây trong các bệnh máu đã và đang chỉ ra vai trò của CA125. Nghiên cứu của Bairey và cộng sự chỉ ra rằng, mức độ biểu hiện của CA125 trong huyết thanh ở những bệnh nhân bạch cầu lympho mạn là 16,3 U/mL (giá trị bình thường < 35 U/mL). Một nghiên cứu khác trên 14 bệnh nhân bạch cầu lympho mạn cũng cho thấy nồng độ CA125 không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm khỏe mạnh. Nồng độ CA125 ở bệnh nhân bạch cầu lympho cấp đã được phát hiện tăng cao và có sự khác biệt giữa bệnh nhân cao tuổi so với bệnh nhân trẻ tuổi và người khỏe mạnh [204]. Nồng độ CA125 biểu hiện cao trong bệnh THCVC, cho thấy biểu hiện của CA125 trong những bệnh nhân THCVC khác biệt rõ rệt so với những người khỏe mạnh.

3.2 Kết quả nghiên cứu trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi

3.2.1 Kết quả phân lập và nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi

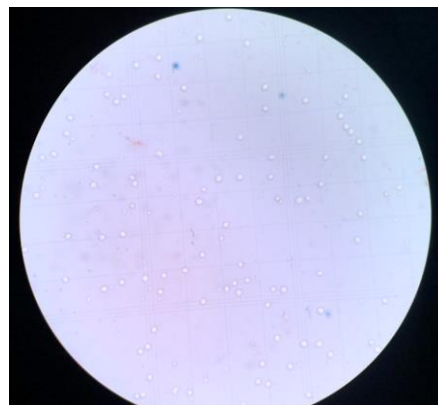
Máu ngoại vi là nguồn chính và phổ biến dùng để phân lập PBMC phục vụ mục đích kiểm tra hệ thống miễn dịch của con người. Việc sử dụng nó được hỗ trợ bởi ly

tâm gradient mật độ Ficoll-Hypaque, một phương pháp đơn giản và nhanh chóng để làm sạch PBMC, tận dụng sự khác biệt về mật độ giữa các tế bào đơn nhân và các yếu tố khác được tìm thấy trong mẫu máu. Do đó, các tế bào được phân bố trong dung dịch theo các lớp dựa trên sự khác biệt về mật độ và kích thước của chúng. Nguyên vật liệu sử dụng trong phương pháp này gồm máu của người khỏe, PBS hoặc dung dịch muối cân bằng, dung dịch Ficoll-Hypaque (mật độ 1.077 g/l) vô trùng, huyết thanh bò FBS. Môi trường nuôi cấy tế bào PBMC là môi trường RPMI-1640. Thu lớp tế bào ở trên lớp Ficoll rất giàu tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) (Hình 3.19).



Hình 3.19. Phân lập PBMC bằng phương pháp ly tâm phân lớp theo tỷ trọng.
(A) Ống chứa 15ml máu, (B) sau khi lấy máu và (C) sau khi ly tâm

Thuốc thử và thiết bị bổ sung cần thiết để phục vụ cho việc đếm tế bào Trypan blue. Dưới đây là hình ảnh PBMC được quan sát dưới kính hiển vi (40x) (Hình 3.20).

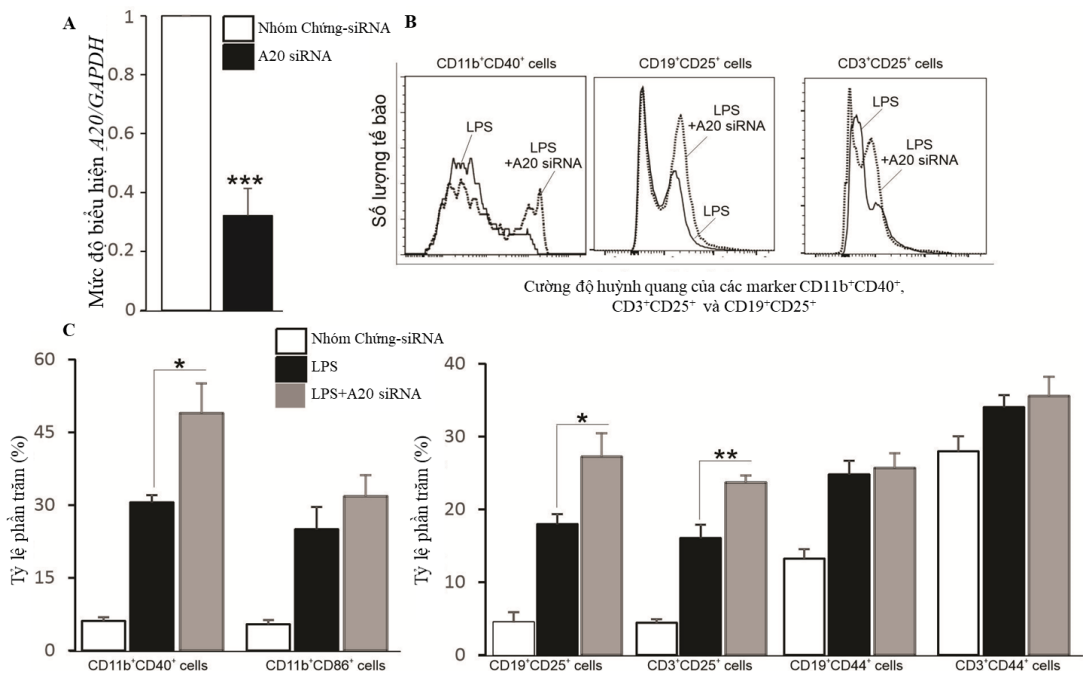


Hình 3.20. Tế bào PBMC được quan sát dưới kính hiển vi (40x)

Để kiểm tra vai trò điều hòa của một số gen (bao gồm gen *A20* và *Otubain-1*) đến chức năng của tế bào PBMC, tế bào này được xử lý cùng siRNA để bất hoạt gen chức năng, sau đó kích hoạt bằng kháng nguyên LPS, sau đó các thí nghiệm tiếp theo được thực hiện để đánh giá vai trò của các gen đó điều hòa chức năng tế bào PBMC thông qua các hoạt động tiết cytokine, sự chết apoptois và biểu hiện một số tín hiệu phân tử trong tế bào.

3.2.2 *A20* điều hòa kiểu hình miễn dịch tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Các loại tế bào dương tính với $CD45^+$ trong quần thể tế bào PBMC được phân tích về tỷ lệ phần trăm và sự hoạt hóa. Đầu tiên, kết quả của việc bất hoạt *A20* đã được kiểm tra bằng kỹ thuật Real-time PCR sau khi xử lý tế bào PBMC với siRNA. Kết quả chỉ ra rằng mức độ biểu hiện gen *A20* đã bị giảm rõ rệt sau khi sử dụng siRNA *A20* (Hình 3.21A). Tiếp theo, khi tế bào PBMC được xử lý bằng LPS dẫn đến hoạt hóa tế bào dòng tủy, tế bào T và B (Hình 3.21B-C) và khi sử dụng *A20* siRNA làm tăng cường hơn nữa tỷ lệ $CD11b^+CD40^+$ (tế bào dòng tủy hoạt hóa), $CD19^+CD25^+$ (tế bào B hoạt hóa) và các tế bào biểu hiện $CD3^+CD25^+$ (tế bào T được kích hoạt). Tuy nhiên, số lượng các tế bào $CD11b^+CD86^+$, $CD19^+CD44^+$ và $CD3^+CD44^+$ tương tự với nhóm đối chứng (Hình 3.21B-C). Bằng chứng cho thấy *A20* ức chế một phần sự hoạt hóa của các quần thể tế bào T và B và tế bào dòng tủy.



Hình 3.21. Kiểu hình miễn dịch của PBMC khi bất hoạt gen *A20*

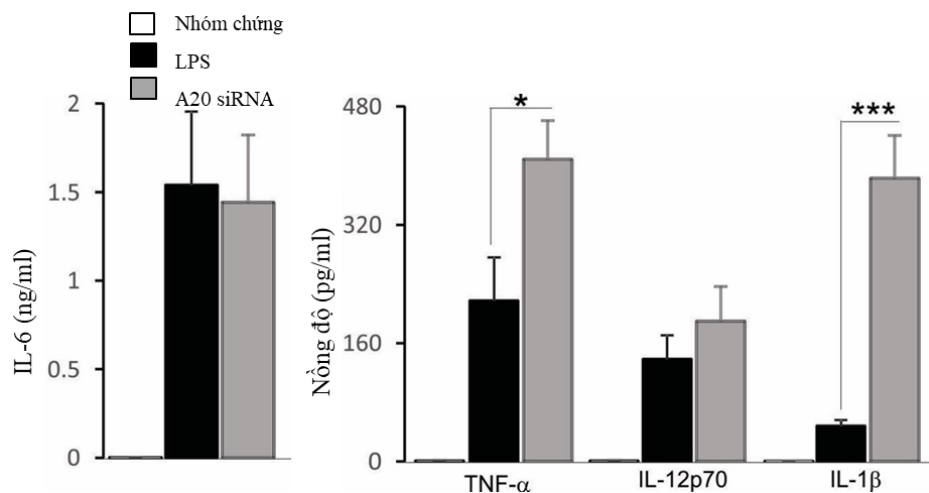
A. Mức độ biểu hiện \pm sai số chuẩn ($n = 6$) của A20 được thể hiện trong mẫu đối chứng siRNA (cột trắng) và PBMC được xử lý bằng siRNA (cột đen). *** ($p < 0,001$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với PBMC được xử lý bằng siRNA A20 (ANOVA).

B. Biểu đồ FACs mô tả mật độ huỳnh quang của các tế bào biểu hiện $CD11b^+CD40^+$, $CD3^+CD25^+$ và $CD19^+CD25^+$, các nhóm này được xử lý với LPS có hoặc không có A20-siRNA.

C Giá trị trung bình \pm SEM ($n = 6$) tỷ lệ các tế bào biểu hiện $CD11b^+CD40^+$, $CD11b^+CD86^+$, $CD19^+CD25^+$, $CD3^+CD25^+$, $CD19^+CD44^+$ và $CD3^+CD44^+$ được hiển thị chưa xử lý (đối chứng, thanh màu trắng) và PBMC được xử lý bằng LPS khi có (thanh xám) hoặc không có (thanh đen) A20-siRNA. Tất cả các mẫu đều được kiểm tra bằng tế bào $CD45^+$. * ($p < 0,05$) và ** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm được xử lý bằng LPS (ANOVA).

3.2.3 A20 điều hòa sự tiết cytokine

Để bất hoạt gen A20 trong tế bào PBMC, phân tử siRNA đặc hiệu đích A20 (siRNA được thiết kế trước, cung cấp bởi công ty Applied Biosystems, Mỹ) được đưa vào tế bào PBMC với nồng độ 40 ng/ml (2×10^5 tế bào/ml), sử dụng chất dẫn Lipofectamine RNAiMAX. Sau đó, chúng tôi tiến hành kiểm tra và so sánh mức độ biểu hiện của các cytokine, kết quả thu được như Hình 3.22.



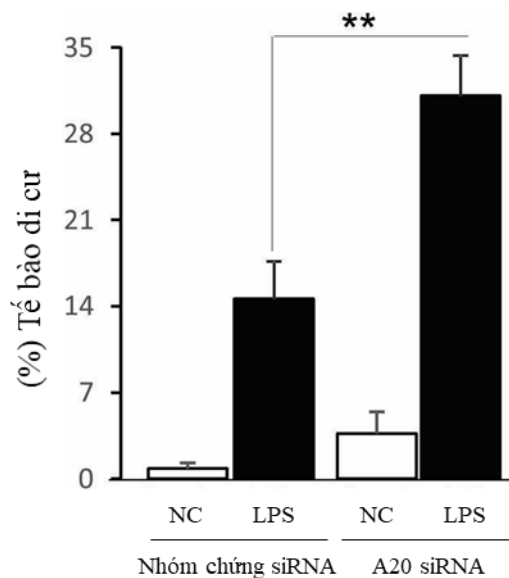
Hình 3.22. Kết quả giải phóng các cytokine từ PBMC được bất hoạt gen A20.

Tế bào PBMC đối chứng (cột trắng), PBMC được xử lý LPS (cột đen), PBMC được bất hoạt gen A20 và xử lý LPS (cột xám). Giá trị trung bình \pm sai số chuẩn ($n = 6$) nồng độ của của IL-6, IL-12p70, TNF- α và IL-1 β , * ($p < 0,05$) và *** ($p < 0,001$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với PBMC được xử lý bằng siRNA A20 (ANOVA).

Như được minh họa kết quả trong Hình 3.22, sau khi xử lý tế bào PBMC với LPS, nhóm tế bào này đã tăng cường sản xuất các cytokine gây viêm IL-6, TNF- α , IL-12p70 và IL-1 β . Hơn nữa, nồng độ các cytokine TNF- α , IL-12p70 và IL-1 β còn được tiết nhiều hơn nữa khi tế bào PBMC được xử lý bằng LPS không có sự hiện diện của gen A20. TNF- α tăng từ 230 lên 400 (pg/ml); IL-12p70 tăng từ 150 lên 180 (pg/ml) và IL-1 β tăng từ 50 lên 385 (pg/ml). Kết quả chỉ ra rằng sự hiện diện của A20 rất nhạy cảm với việc tiết TNF- α và IL-1 β của tế bào PBMC.

3.2.4 A20 điều hòa sự di cư tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Ngoài việc điều hòa các phản ứng miễn dịch bằng cách tiết ra các cytokine khác nhau, sự di chuyển của tế bào cũng là một dấu hiệu chức năng của các PBMC được kích hoạt. Tương tự như tác dụng ức chế của A20 đối với sự trưởng thành chức năng của PBMC, sự di chuyển của tế bào này tăng lên đáng kể khi được bất hoạt gen A20 (Hình 3.23).



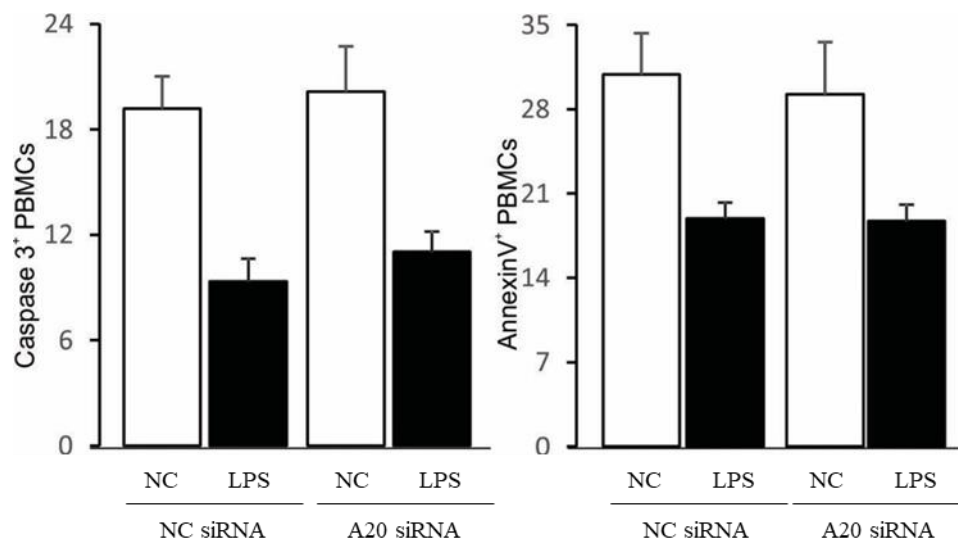
Hình 3.23. Sự di chuyển của tế bào PBMC khi được bất hoạt gen A20.

Ảnh hưởng của A20 đến sự di chuyển của các PBMC. Giá trị trung bình \pm SEM ($n = 6$) tỷ lệ phần trăm PBMC đã di chuyển, không được xử lý (đối chứng) hoặc được xử lý

bằng LPS khi không có hoặc có mặt A20-siRNA. ** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm được xử lý bằng LPS (ANOVA).

3.2.5 Protein A20 điều hòa quá trình apoptosis tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Cùng với hoạt động chức năng tiết các cytokine của tế bào PBMC thì quá trình apoptosis đóng vai trò đặc biệt quan trọng. Nó quy định nhiều yếu tố trong cân bằng nội môi miễn dịch, đồng thời kiểm soát sự khởi đầu, chấm dứt, cường độ và thời gian các phản ứng miễn dịch. Các marker sinh học liên quan đến sự chết apoptosis của tế bào bao gồm nhiều loại khác nhau trong đó có các marker: Annexin V, propidium iodide (PI) và caspase-3.

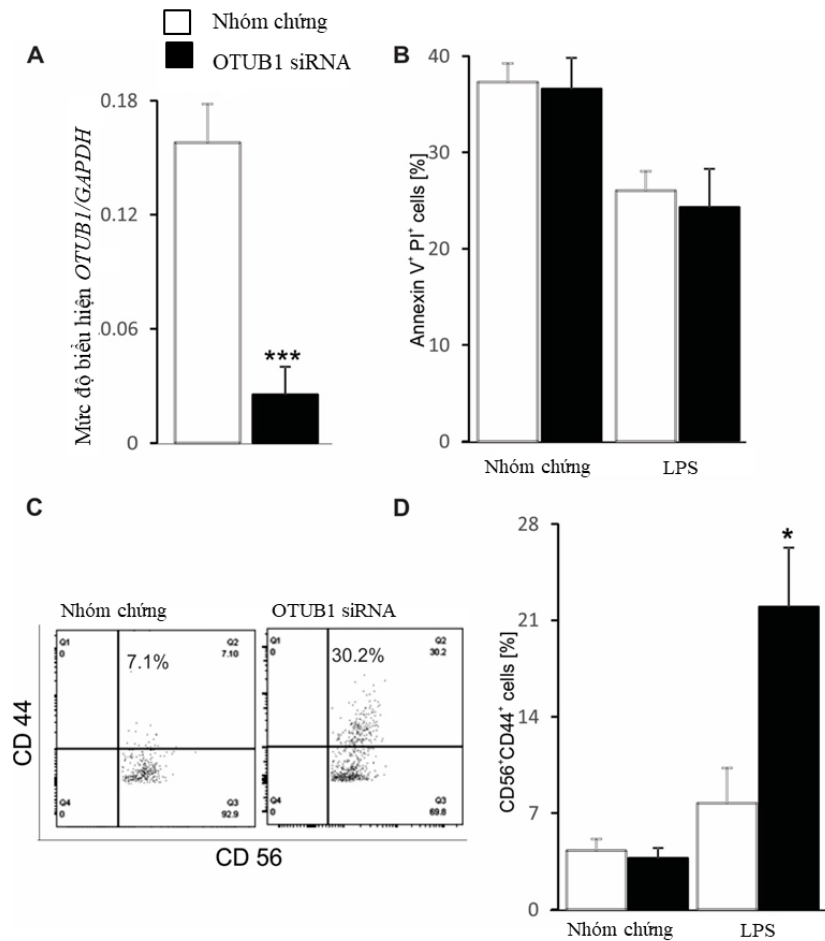


Hình 3.24. Phân tích khả năng sống sót của PBMC dưới ảnh hưởng của gen A20. Giá trị trung bình \pm sai số chuẩn ($n = 6$) tỷ lệ phần trăm của các tế bào PBMC biểu hiện caspase 3⁺ và annexin V⁺ được xử lý bằng siRNA đối chứng hoặc A20 siRNA khi có hoặc không xử lý cùng LPS.

Khả năng sống của tế bào được kiểm tra bằng cách đo liên kết annexin V với màng tế bào và hoạt động của caspase 3. Kết quả được hiển thị trong (Hình 3.24) chỉ ra rằng, LPS giúp bảo vệ các tế bào PBMC chống lại quá trình apoptosis của tế bào, vì tỷ lệ phần trăm của annexin V⁺ và caspase 3⁺ PBMC đã giảm sau khi xử lý bằng LPS. Các kết quả không thay đổi đáng kể khi bất hoạt gen A20 bằng A20 siRNA, chỉ ra rằng sự hiện diện của A20 không nhạy cảm với tín hiệu apoptosis trong tế bào PBMC.

3.2.6 *Otubain-1* điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Protein *Otubain-1* được nghiên cứu rộng rãi trong nhiều con đường liên quan đến ung thư nhưng vai trò của nó trong điều hòa chức năng tế bào PBMC thì vẫn là một ẩn số. *Otubain-1* được chứng minh là góp phần ức chế đáp ứng miễn dịch qua trung gian phân tử NF- κ B đối với các tác nhân truyền nhiễm [205]. Để hiểu các tế bào miễn dịch khác nhau bị ảnh hưởng như thế nào bởi *Otubain-1*, các tế bào đã được bất hoạt gen *Otubain-1* bởi siRNA và sau đó được xử lý bằng LPS. Kết quả của việc bất hoạt *Otubain-1* đã được kiểm tra bằng kỹ thuật Real-time PCR sau khi sử dụng tế bào PBMC với siRNA. Kết quả chỉ ra rằng *Otubain-1* đã bị giảm mức độ biểu hiện rõ rệt sau khi sử dụng siRNA *Otubain-1* (Hình 3.25A).



Hình 3.25. Ảnh hưởng của *Otubain-1* đến hoạt động và sự chết apoptosis của PBMC. A. Mức độ biểu hiện \pm sai số chuẩn ($n = 5$) của *Otubain-1* được thể hiện trong mẫu đối chứng siRNA (cột trắng) và PBMC được xử lý bằng siRNA (cột đen). *** ($p < 0,001$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với PBMC được xử lý bằng siRNA *Otubain-1* (ANOVA).

B. Giá trị trung bình \pm sai số chuẩn ($n = 5$) tỷ lệ phần trăm của các tế bào biểu hiện Annexin V⁺ PI⁻ được xử lý siRNA đối chứng (cột trắng) và PBMC được xử lý bằng siRNA *Otubain-1* (cột đen) khi có hoặc không xử lý cùng LPS (500ng/ml).

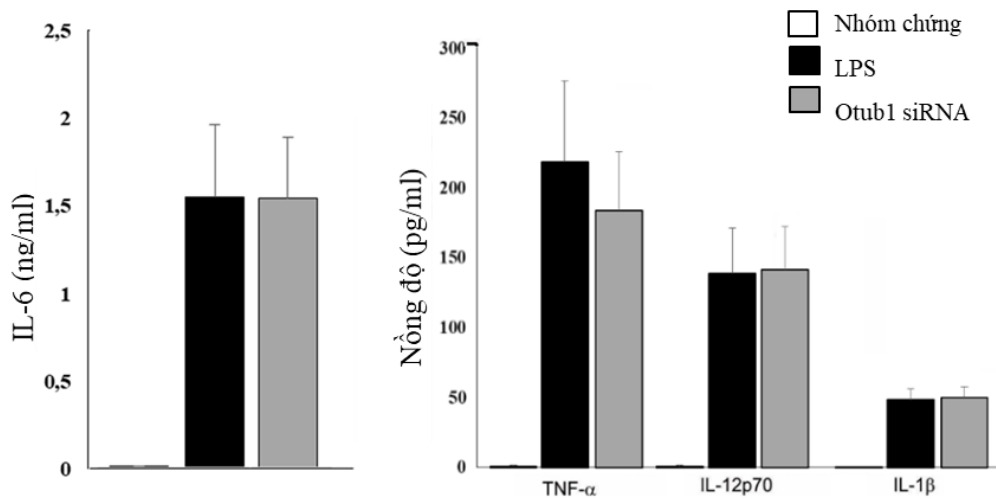
C-D. Hình dot plot (C) và giá trị trung bình \pm sai số chuẩn ($n = 5$) (D) của các tế bào biểu hiện CD56⁺ CD44⁺ được xử lý siRNA đối chứng (hình bên trái) và PBMC được xử lý bằng siRNA *Otubain-1* (hình bên phải) với sự hiện diện của LPS (500ng/ml). * ($p < 0,05$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với PBMC được xử lý bằng siRNA *Otubain-1* (ANOVA).

Phân tích tế bào dòng chảy cho thấy, sử dụng *Otubain-1* siRNA làm tăng đáng kể số lượng tế bào biểu hiện CD56⁺CD44⁺ (tế bào NK đã kích hoạt) biểu hiện trong tế bào PBMC (Hình 3.25 C-D) và không ảnh hưởng đến mật độ của các loại tế bào CD11b⁺CD40⁺ (tế bào dòng tủy được kích hoạt), CD11c⁺CD40⁺, CD11c⁺ CD86⁺ (TBT được kích hoạt), CD19⁺CD25⁺, CD19⁺CD44⁺ (tế bào B được kích hoạt), CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD44⁺ (tế bào T CD4 được kích hoạt), CD3⁺CD8⁺CD25⁺, CD3⁺CD8⁺CD44⁺ (tế bào T CD8 được kích hoạt) và CD56⁺CD25⁺ (tế bào NK được kích hoạt) so với các tế bào có mặt trong PBMC đối chứng. Bằng chứng chỉ ra rằng gen *Otubain-1* điều hòa sự xâm nhập của các tế bào biểu hiện CD56⁺CD44⁺ vào hệ thống tuần hoàn khi kích hoạt bằng LPS.

Để kiểm tra sự chết apoptosis của tế bào PBMC có được điều hòa bởi sự hiện diện của *Otubain-1* hay không, tỷ lệ tế bào AnnexinV⁺, PI⁻ được xác định bằng cách nhuộm tế bào PBMC với kháng thể AnnexinV và PI để phát hiện sự phơi nhiễm phosphatidylserine (PS) với môi trường ngoại bào. Như được hiển thị trong Hình 3.25B, số lượng tế bào annexinV⁺ PI⁻ không thay đổi trong các tế bào PBMC bất hoạt *Otubain-1*, chỉ ra rằng quá trình apoptosis của PBMC không nhạy cảm với *Otubain-1* khi xử lý LPS.

3.2.7 *Otubain-1* điều hòa các sản phẩm cytokine

Tiếp theo chúng tôi đã kiểm tra các sản phẩm cytokine trong phản ứng với LPS để kiểm tra hoạt động tiết cytokine của tế bào PBMC.



Hình 3.26. Kết quả giải phóng các cytokine từ tế bào PBMC bất hoạt gen *Otubain-1*. PBMC đối chứng (cột trắng), PBMC xử lý LPS (cột đen), PBMC bất hoạt gen *Otubain-1* xử lý LPS (cột xám). Giá trị trung bình \pm sai số chuẩn ($n = 6$) của các cytokine IL-6, IL-12p70, TNF- α và IL-1 β .

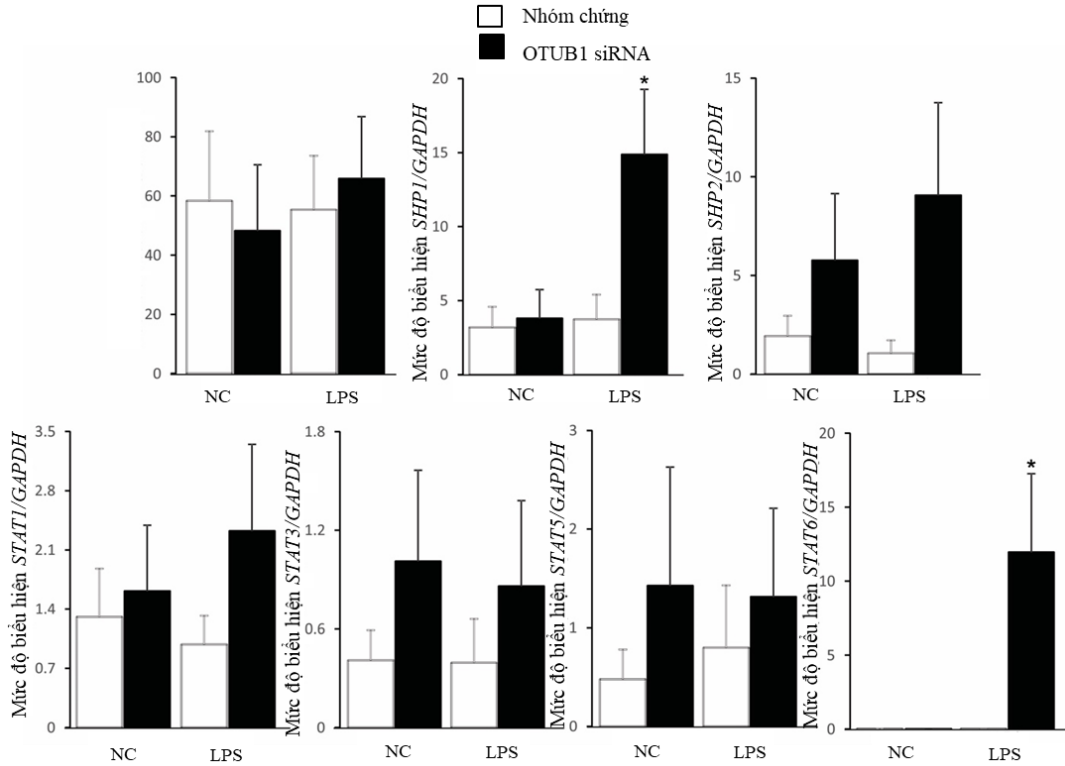
Kết quả được minh họa trong Hình 3.26 chỉ ra rằng, sau khi xử lý tế bào PBMC với LPS, khả năng sản xuất các cytokine gây viêm IL6, TNF- α , IL-12p70 và IL-1 β tăng lên. Tuy nhiên, sự giải phóng các cytokine này không thay đổi so với mẫu đối chứng khi không có sự hiện diện của gen *Otubain-1*. Kết quả chỉ ra rằng sự hiện diện của *Otubain-1* không nhạy cảm với việc tiết IL6, TNF- α , IL-12p70 và IL-1 β của tế bào PBMC.

3.2.8 *Otubain-1* điều hòa tín hiệu trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Nghiên cứu vai trò của *Otubain-1* đến tín hiệu phân tử STAT trong tế bào PBMC lần đầu tiên được xác định trong nghiên cứu này. Kết quả chỉ ra rằng trong số các gen được kiểm tra, nồng độ mRNA của *STAT6* trong tế bào PBMC bất hoạt *Otubain-1* đã biểu hiện tăng so với mẫu đối chứng. Ngoài ra, sự biểu hiện của các gen *SHP1*, *SHP2*, *I κ B- α* , *STAT1*, *STAT3* và *STAT5* không thay đổi khi bất hoạt gen *Otubain-1* (Hình 3.27).

Mặc dù có vai trò quan trọng nhưng vẫn chưa có nghiên cứu nào đánh giá vai trò của gen *Otubain-1* đến điều hòa tín hiệu phân tử SHP-1, SHP2. Xuất phát từ những lí do trên, đề tài đã tiến hành nghiên cứu vai trò của *Otubain-1* với tín hiệu phân tử SHP-1 và SHP-2 trên PBMC. Kết quả *SHP-1* có biểu hiện tăng đáng kể so với mẫu đối

chúng sau khi được kích thích bằng LPS (Hình 3.27), điều này chỉ ra rằng sự bất hoạt gen *Otubain-1* có thể ảnh hưởng đến sự trưởng thành của tế bào PBMC thông qua tín hiệu phân tử SHP-1.



Hình 3.27. Ảnh hưởng của *Otubain-1* đến con đường tín hiệu trong PBMC. Giá trị trung bình \pm sai số chuẩn ($n = 5$) mức độ phiên mã của *IκB-α*, *SHP1*, *SHP2*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* và *STAT6* trong tế bào PBMC được xử lý bằng siRNA đối chứng (cột trắng) hoặc bằng siRNA *Otubain-1* (cột đen) có hoặc không xử lý bằng LPS (500ng/ml). $*(p < 0,05)$ cho thấy sự khác biệt đáng kể với PBMC được xử lý bằng siRNA *Otubain-1* (ANOVA).

CHƯƠNG 4: THẢO LUẬN

4.1 Đa hình và biểu hiện gen *deubiquitinase*, gen *JAK2* và kiểu hình miễn dịch trên bệnh tăng hồng cầu vô căn

Trong nghiên cứu này, 77 bệnh nhân tham gia thuộc nhóm bệnh đa hồng cầu là một trong 3 bệnh thuộc nhóm bệnh tăng sinh tủy ác tính. Nguyên nhân gây ra các căn bệnh trên thường tập trung vào các đột biến trên gen *JAK2* mà chủ yếu là đột biến tại vị trí V617F thuộc gen này [193]. Đột biến này xuất hiện trên 95% số ca bệnh đa hồng cầu và khoảng 50%-60% số ca bệnh tăng tiểu cầu tiền phát và bệnh xơ tủy cấp trên toàn thế giới [7]. Đột biến này cũng đã được chứng minh rằng có liên quan đến tình trạng tăng huyết khối, qua đó dẫn đến rối loạn chức năng tim mạch ở các nghiên cứu *in vitro* trên mô hình tế bào nội mô cũng như trên mô hình chuột [194, 206]. Trong nghiên cứu này, các mô hình dự đoán *in-silico* cũng đã dự đoán đột biến V617F có tiềm năng gây ảnh hưởng lớn đến cấu trúc và chức năng của enzyme tương ứng, từ đó có khả năng làm thay đổi mạng lưới phân tử tín hiệu bên trong tế bào gốc tủy xương sinh máu. Do đó, việc xác định sự hiện diện của đột biến *JAK2*^{V617F} ở bệnh nhân THCVC là tiền đề cho các thí nghiệm tiếp theo để xác định mối liên quan giữa đột biến gen này với đa hình và biểu hiện gen *deubiquitinase* và kiểu hình miễn dịch trên bệnh THCVC.

Đột biến p.V617F (c.1849G> T) trên gen *JAK2* (*JAK2*^{V617F}) được biết đến là đột biến gây bệnh THCVC [207], do vậy đột biến gen này được sử dụng như một dấu hiệu phân tử trong chẩn đoán bệnh THCVC [208]. Gen *JAK2* mã hóa cho thụ thể tín hiệu *JAK2* trên màng tế bào. Tín hiệu này đóng vai trò quan trọng liên quan đến hoạt động của một số con đường truyền tín hiệu khác như JAK/STATs, MAPK và PI3K/AKT. Các tín hiệu phân tử này đều liên quan đến quá trình kiểm soát miễn dịch, sự phát triển của tế bào và quá trình chết theo chương trình [209, 210].

Đầu tiên, sự hiện diện của đột biến *JAK2*^{V617F} ở bệnh nhân THCVC được tiến hành để xác định mối liên quan của các đột biến trong gen *JAK2* với các gen *DUB*. Đột biến *JAK2*^{V617F} xảy ra ở 66,67% bệnh nhân THCVC được chẩn đoán trong nghiên cứu này, trong khi nghiên cứu khác [207] chỉ ra rằng sự hiện diện của đột biến này trong $\geq 90\%$ trường hợp bệnh THCVC. Tần suất xuất hiện của đột biến *JAK2*^{V617F} được biết là tăng theo thời gian trong các trường hợp bệnh THCVC [211]. Một nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng bệnh nhân THCVC không có đột biến *JAK2*^{V617F} vẫn đáp ứng

điều trị bằng các chất ức chế con đường tín hiệu JAK/STAT [212], cho thấy rằng sự kích hoạt con đường tín hiệu JAK-STAT có thể không chỉ gây ra do đột biến JAK2^{V617F} mà còn các đột biến khác.

Hơn thế nữa, biểu hiện bất hoạt các gen *A20*, *Cezanne* và *CYLD* ở bệnh nhân THCVC đã được phát hiện giảm đi so với người khỏe. Trong số 3 gen, *A20* và *CYLD* được coi là chất ức chế tín hiệu JAK/STAT, mà sự kích hoạt của chúng dẫn đến sự phát triển và bệnh sinh của bệnh ung thư máu và ung thư hạch trong đó có bệnh THCVC [213, 214]. Biểu hiện không bình thường và đột biến của gen *CYLD* có liên quan đến sự phát triển của bệnh bạch cầu và ung thư hạch [215, 216]. Nghiên cứu này quan sát thấy rằng 11 SNP trong gen *CYLD*, trong đó p.W736G và c.2483+6 T>G được dự đoán là đột biến mới liên quan đến cơ chế bệnh sinh của THCVC. Điều quan trọng là, 2 đột biến này không được tìm thấy trong 90 mẫu bệnh nhân CML, 32 mẫu bệnh nhân AML, 16 mẫu bệnh nhân ALL và 21 mẫu bệnh nhân CLL trong khảo sát này (dữ liệu chưa được công bố), cho thấy rằng hai đột biến p.W736G và c.2483+6 T>G có thể liên quan đến nguy cơ phát triển bệnh THCVC mà có thể không liên quan đến một số bệnh bạch cầu khác.

Các nghiên cứu khác về sự thay đổi di truyền của gen *A20* chỉ ra rằng các đột biến ở gen *A20* ở exon 5, 6 và 7 có nguy cơ cao đối với bệnh tự miễn và bệnh bạch cầu tế bào dòng lympho [216-219]. Trong nghiên cứu này, SNP *rs776591390* của gen *A20* được phát hiện ở bệnh nhân THCVC với tần suất là 1,29%, cho thấy rằng các đa hình gen *A20* liên quan đến sự tiến triển của bệnh ung thư máu là khác nhau.

Khác với gen *A20* và *CYLD*, tác dụng điều hòa của *Cezanne* đối với việc kích hoạt tín hiệu JAK/STAT cũng như mối liên hệ của SNP với nguy cơ ung thư máu có thể xảy ra nhưng vẫn chưa được làm rõ, mặc dù biểu hiện gen *Cezanne* có liên quan đến tiên lượng xấu trong ung thư biểu mô tế bào gan [220]. Nghiên cứu này lần đầu tiên chỉ ra rằng những thay đổi của 7 nucleotide ở intron 10 trong gen *Cezanne* được tìm thấy ở bệnh nhân THCVC và 7/77 (9,09%) bệnh nhân THCVC mang ít nhất 2 SNP trong gen này. Tương tự như 2 đột biến bất thường trong gen *CYLD*, 7 SNP trong gen *Cezanne* không được phát hiện trên bệnh nhân AML và CML (dữ liệu chưa được công bố). Ngoài ra, MAF của 7 SNP có tần số cao hơn một chút trong các nhóm THCVC so với các nhóm đối chứng, cho thấy những người mang SNP ở *Cezanne* có thể có xu hướng gặp rủi ro về sự phát triển của THCVC.

Bên cạnh các đột biến đã biết liên quan đến cơ chế bệnh sinh của THCVC bao gồm *JAK2*, *MPL* và *CALR*, chúng tôi cho rằng bệnh nhân THCVC mang đột biến p.W736G có nhiều SNP trong gen *CYLD* và không có SNP trong gen *Cezanne*. Điều này chứng tỏ đột biến p.W736G trong *CYLD* gắn liền với cơ chế bệnh sinh của THCVC và độc lập với SNP ở *Cezanne*. *CYLD* được biết là ngăn chặn phản ứng viêm thông qua việc kích hoạt một số con đường tín hiệu bao gồm JAK/STAT [221], do đó nghiên cứu sâu hơn sẽ phân tích xác định vai trò của đột biến p.W736G trong việc điều hòa chức năng của các tế bào miễn dịch cũng như hoạt động của các con đường tín hiệu nội bào.

Để phân tích sự liên quan đến đột biến gen và kiểu miễn dịch ở bệnh nhân THCVC, đột biến *JAK2*^{V617F} được báo cáo là không ảnh hưởng đến những thay đổi chức năng của tế bào T [207], do đó, việc tăng số lượng cũng như hoạt động của tế bào T hỗ trợ (tế bào dương tính với CD3⁺CD4⁺CD25⁺) và tế bào T điều hòa (Treg, tế bào dương tính với CD3⁺CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺) vào hệ tuần hoàn trên bệnh nhân THCVC có thể sẽ liên quan đến hoạt động điều hòa của 2 đột biến gen *CYLD*. Là một phần của phản ứng miễn dịch, tế bào Treg đóng một vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn khả năng miễn dịch đặc hiệu với khối u [222]. Biểu hiện không bình thường của CD25 trên tế bào T hỗ trợ có liên quan đến tiên lượng bệnh xấu ở bệnh nhân AML [223] và bệnh nhân CML [224]. Một nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, bệnh THCVC liên quan đến biểu hiện tăng huyết khối bao gồm: tăng hematocrit, tăng tiểu cầu, hoạt hóa tiểu cầu và hoạt hóa bạch cầu [225], cho thấy có thể có tác động của 2 đột biến gen *CYLD* đối với sự phát triển của huyết khối ở bệnh nhân THCVC.

Ngoài ra, trong nghiên cứu này đã không tìm thấy mối liên quan đáng kể của SNP trong gen *A20*, *Cezanne* và *CYLD* với sự tăng nồng độ IL6 và TNF- α cũng như CA125 ở bệnh nhân THCVC.

Như vậy, đột biến p.W736G của gen *CYLD* có thể tham gia điều hòa sự tiến triển của bệnh THCVC và là một ứng cử gen tốt để nghiên cứu sâu hơn về vai trò của nó trong việc điều hòa hoạt hóa chức năng của tế bào bạch cầu trong bệnh ung thư máu cũng như bệnh THCVC.

4.2 Biểu hiện một số gen tín hiệu trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

Nhóm gen STAT đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong điều hòa sự phát triển một số bệnh ung thư máu. Đây là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra sự tăng biểu hiện của 3

gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* trên bệnh nhân THCVC. Hoạt động bộc phát của tín hiệu *STAT3* và *STAT5* cũng được chỉ ra ở bệnh u lympho và bệnh bạch cầu [186]. Các nghiên cứu khác trên bệnh nhân ung thư máu cũng phân tích biểu hiện nhóm gen *STAT*, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào chỉ ra biểu hiện tăng lên của cả 04 gen này trong một bệnh ung thư. Biểu hiện của *STAT1* tăng cao trong bệnh bạch cầu bao gồm bệnh bạch cầu cấp dạng tiền tủy bào đã được biết đến trong một số nghiên cứu [226, 227]. Mức độ biểu hiện gen *STAT6* tăng cao cũng được tìm thấy trên một số bệnh ung thư máu [228] và tương quan thuận với sự khả năng xâm lấn và di căn của tế bào ung thư [229].

Ngoài nhóm gen *STAT*, nhóm gen *SH2* cũng đóng góp vai trò quan trọng không kém điều hòa các quá trình sinh lý tế bào. Nhóm gen *SHP* là những gen thuộc họ tín hiệu protein tyrosine phosphatase điều hòa sự tăng sinh của tế bào ung thư thông qua các quá trình sinh lý tế bào như sự thuận thực, sự di cư và quá trình chết apoptosis [230]. Nhóm gen này gồm hai loại gen chính là *SHP-1* và *SHP-2*. *SHP-1* có mặt ở hầu hết các loại tế bào gốc tạo máu và có vai trò ức chế khối u và tham gia điều hòa ngược hoạt động sinh học của tế bào bởi quá trình khử phosphoryl hóa một số tín hiệu phân tử như JAKs/STATs và PI3K/AKT/mTOR [231].

Sự methyl hóa vùng promoter của gen *SHP-1* làm giảm biểu hiện của gen này [232, 233]. Ngược với *SHP-1*, *SHP-2* điều hòa thuận sự phát triển và chức năng của tế bào gốc tạo máu [234]. *SHP-2* hoạt hóa tín hiệu ERK thông qua hoạt động xúc tác làm tăng sự sống sót của tế bào ung thư [235]. Chuột thiếu hụt *SHP-2* chết sớm ở giai đoạn phôi thai. Biểu hiện bất thường của gen *SHP-2* là một trong những nguyên nhân gây ra các loại bệnh mãn tính và ung thư [234, 236].

4.3 Vai trò gen *A20* điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Protein *A20* đã được chỉ ra tham gia điều hòa ức chế hoạt động chức năng của một số tế bào miễn dịch bao gồm tế bào T và tế bào B, TBT, tuy nhiên vai trò của *A20* đối với tế bào PBMC thì vẫn chưa được đề cập đến [95, 237]. Ngoài sự hiện diện của các TBT, T và B và PBMC còn bao gồm các loại tế bào khác như tế bào tiền bào tủy, tế bào NK và tế bào bạch cầu đơn nhân. Hơn nữa, sự liên quan giữa biểu hiện các gen DUB với mật độ tế bào và biểu hiện kích hoạt của chúng cần được phân tích sâu hơn để xác định vai trò chức năng của các loại gen DUB điều hòa từng loại tế bào miễn

dịch trong quần thể tế bào PBMC. Do đó, chúng tôi đã quan sát thấy rằng biểu hiện giảm gen *A20* trên tế bào PBMC liên quan đến biểu hiện tăng của CD25 trên bề mặt các tế bào B và T và mật độ CD40 cao hơn trên các tế bào tiền bào tủy cũng như sự tăng cường giải phóng các cytokine gây viêm như TNF- α và IL-1 β , nhưng không liên quan đến hoạt động apoptosis của các tế bào PBMC.

Nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi [198] cho thấy protein A20 ức chế biểu hiện của CD40 trên các tế bào B và sự nhận diện phối tử CD40L trên thụ thể CD40 đã kích hoạt sự tăng sinh và hoạt động của tế bào B [238], do đó tăng biểu hiện CD40 có thể liên quan đến sự tăng số lượng tế bào B xâm nhập vào hệ tuần hoàn. Trong một nghiên cứu chưa được công bố, chúng tôi cũng chỉ ra rằng, bệnh bạch cầu dòng lympho cấp tính có số lượng tế bào biểu hiện CD11b⁺CD40⁺ và CD19⁺CD25⁺ tăng lên. Ngoài ra, chuột thiếu gen *A20* trong tế bào T làm tăng biểu hiện dương tính với marker CD25 [239] và bất hoạt gen *A20* có liên quan đến sinh bệnh học của các u lympho tế bào B khác nhau [240, 241]. Do đó, ảnh hưởng ức chế của gen *A20* với biểu hiện kích hoạt của tế bào PBMC có thể liên quan đến rối loạn điều hòa tế bào miễn dịch ở bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu.

Một nghiên cứu khác cũng cho thấy vai trò điều hòa của gen *A20* với chức năng sinh lý của tế bào miễn dịch như di chuyển tế bào và sự chết apoptosis [95, 198, 242]. Tương tự, chúng tôi đã sử dụng LPS để kích hoạt sự di chuyển của tế bào và quan sát thấy việc di chuyển tế bào được tăng cường trong các tế bào PBMC đã được bất hoạt gen *A20* so với các tế bào đối chứng. Di chuyển tế bào là một trong những bước thiết yếu để các tế bào ung thư di căn. Đến nay chưa có nghiên cứu nào kiểm tra vai trò của gen *A20* trong việc điều hòa apoptosis của các tế bào miễn dịch. Trong nghiên cứu này kết quả đã chỉ ra rằng việc bất hoạt *A20* không ảnh hưởng đến quá trình apoptosis của tế bào PBMC. Trong khi đó, Soizic và cộng sự lại cho rằng, *A20* có tác dụng bảo vệ tế bào khỏi các yếu tố kích thích apoptosis. Nhóm nghiên cứu này ghi nhận rằng *A20* đã tham gia ức chế biểu hiện gen *Fas* và hoạt động của phân tử caspase 3. Tuy nhiên, *A20* lại được báo cáo ở một nghiên cứu khác là không có khả năng ức chế sự chết apoptosis và không ảnh hưởng đến hoạt động của phân tử caspase 3 ở các tế bào ung thư MCF-7 và tế bào Jurket.

Tóm lại, nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng bất hoạt gen *A20* làm tăng hoạt động của tế bào tủy, tế bào B và tế bào T và làm tăng giải phóng TNF- α và IL-1 β từ tế bào PBMC. Tuy nhiên, sự chết apoptosis của PBMC không liên quan đến sự có mặt của gen *A20* trong tế bào PBMC. Vì thế, biểu hiện gen *A20* có thể liên quan đến đáp ứng miễn dịch trong bệnh tự miễn và ung thư.

4.4 Vai trò gen *Otubain-1* điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Nghiên cứu vai trò của gen *Otubain-1* điều hòa hoạt động chức năng của tế bào PBMC là chưa được chú ý đến. *Otubain-1* tham gia hoạt hóa chức năng tế bào T CD8 và tế bào NK trong các phản ứng đáp ứng miễn dịch chống nhiễm trùng và ung thư. Trong nghiên cứu này, bất hoạt gen *Otubain-1* kích hoạt tế bào NK có mặt trong tế bào PBMC (tế bào CD56⁺CD44⁺) và không làm thay đổi hoạt động của tủy bào, tế bào B và tế bào T cũng như không ảnh hưởng đến sự giải phóng cytokine và sự chết apoptosis của tế bào PBMC (Hình 3.25-3.26). Kích hoạt tế bào NK thông qua biểu hiện tăng cường của CD44 đã được chứng minh là tăng hoạt động gây độc của tế bào NK [243]. Tương tự, một nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra rằng gen *Otubain-1* tham gia điều hòa sự trưởng thành và kích hoạt các tế bào NK [244].

Bên cạnh đó, cytokine được tiết ra bởi các tế bào miễn dịch trong tình trạng viêm, nghiên cứu này cho thấy rằng, sự hiện diện của gen *Otubain-1* không liên quan đến phản ứng viêm trong các tế bào PBMC. Trong một nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng IL6 được tiết ra bất thường trong tế bào B của chuột thiếu *Otubain-1*. IL6 có nguồn gốc từ tế bào B và có liên quan đến bệnh sinh của các bệnh tự miễn, mặc dù cơ chế biểu hiện của IL6 trong tế bào B vẫn chưa được xác định rõ ràng [244]. Trong nghiên cứu này, sự hiện diện của *Otubain-1* không nhạy cảm với việc tiết các cytokine IL6, TNF- α , IL-12p70 và IL-1 β của tế bào PBMC.

Tiếp theo, phân tích biểu hiện gen cho thấy biểu hiện của tín hiệu SHP1 và STAT6 tăng khi kích hoạt tế bào PBMC đã bất hoạt gen *Otubain-1* bằng kháng nguyên LPS và không thay đổi của biểu hiện hoạt động của I κ B- α . Nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu trước đó của chúng tôi rằng, sự hiện diện của gen *Otubain-1* trong TBT không nhạy cảm với sự hoạt hóa và sự trưởng thành của TBT qua trung gian NF- κ B khi kích thích bằng LPS [126]. Trong tế bào TBT và tế bào NK, *Otubain-1* được biết đến là gen điều hòa một số con đường nội bào bao gồm MAPK, NF- κ B,

ER α , RAS, p53 và SMAD2 [126, 205, 245] khi tiếp xúc với các tác nhân lây nhiễm. Bên cạnh đó, *Otubain-1* cũng kiểm soát quá trình hoạt hóa tín hiệu phân tử AKT (protein kinase B)- một kinase quan trọng để kích hoạt tế bào T, thông qua sự tiếp xúc với IL-15 [125, 246]. Khác với *Otubain-1*, gen *A20* và *CYLD* tham gia điều hòa hoạt động của tế bào miễn dịch thông qua tín hiệu STAT1 và STAT3 [221, 237]. Do đó, ảnh hưởng của *Otubain-1*, *A20* và *CYLD* với chức năng của PBMC là khác nhau dưới các tín hiệu kích thích đa dạng khác nhau. Một nghiên cứu của NT Xuân cũng đã phát hiện ra rằng, *Otubain-1* ngăn chặn sự hoạt hóa kéo dài phân tử p38MAPK, do đó làm ảnh hưởng đến chức năng của TBT [126]. Tuy vậy, đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào chỉ ra được vai trò của nó trong điều hòa con đường tín hiệu phân tử STAT. Mặc dù ngày càng nhiều các tài liệu chứng minh vai trò của *Otubain-1* điều hòa các con đường tín hiệu phân tử liên quan đến ung thư như MAPK, P53, ER α [116].

Quá trình tăng sinh, thuần thực, biệt hóa và chết theo chương trình apoptosis của tế bào có liên quan đến tín hiệu hoạt động của phân tử STAT [247]. STAT1 và STAT2 điều hòa sự tiết của IFN- γ , trong khi STAT4 và STAT6 điều hòa sự giải phóng của IL-2 và IL-4. Đột biến trên gen *STAT1* ở người dẫn tới giảm khả năng chống chịu với các bệnh nhiễm trùng do nấm hay vi khuẩn [248]. Như vậy, STAT có vai trò rất quan trọng ảnh hưởng đến toàn bộ các tổ chức cơ thể, và liên quan đến nhiều chuỗi phản ứng truyền tín hiệu tế bào. Chuột thiếu hụt STAT1 hay STAT2 cho thấy chúng nhạy cảm với các vi khuẩn gây bệnh và thường nhạy cảm hơn với các hoá chất gây ra sự phát triển của khối u. Các tế bào ung thư ở người thường mất chức năng của tín hiệu STAT điều hòa sự tiết IFN- γ dẫn đến thuận lợi cho sự phát triển của tế bào ung thư [249]. Cho đến nay có rất ít nghiên cứu về vai trò của protein Otubain-1 điều hòa chức năng tế bào PBMC thông qua các dòng tín hiệu STAT. STAT là họ các protein phiên mã nội bào điều hòa nhiều chức năng khác nhau của tế bào như: sự tăng sinh, sự chết theo chương trình và sự biệt hoá [250]. Sự mất kiểm soát của nhân tố này thường gặp ở các khối u nguyên phát làm tăng cường khả năng sống sót của khối u và ức chế miễn dịch. Các nghiên cứu bất hoạt gen *STAT* cho thấy các protein STAT có liên quan đến chức năng của hệ miễn dịch và đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì khả năng miễn dịch và giám sát khối u [251]. Đột biến gen *STAT1* ở người dẫn tới giảm khả năng chống chịu với các bệnh nhiễm trùng do nấm hay vi khuẩn [248].

Kết luận, nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng khi bất hoạt *Otubain-1* ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của *SHP1* và *STAT6* trong tế bào PBMC, không làm thay đổi sự biểu hiện của các gen tín hiệu *IκB-α*, *SHP2*, *STAT1*, *STAT3* và *STAT5* và quá trình chết apoptosis của tế bào PBMC. Hoạt động của tín hiệu SHP1 và STAT6 trong tế bào PBMC đã được bất hoạt gen *Otubain-1* có thể liên quan đến hoạt động của tế bào NK có mặt trong tế bào PBMC.

CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1 Kết luận

- **Đa hình, biểu hiện gen và kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân THCVC**

- Phân tích di truyền trên tổng số 77 bệnh nhân THCVC của gen *CYLD* xác định được 11 SNP, trong đó SNP p. W736G được xác định ở exon 15 là đột biến mới có khả năng gây bệnh và một SNP c.2483 + 6 T> G thuộc intron 15 được dự đoán là đột biến trong vùng nối với tần số xuất hiện lần lượt là 18,2% và 5,2%. Giải trình tự gen *Cezanne* xác định được 7 SNP trong vùng intron 10 và bệnh nhân THCVC mang ít nhất 2 SNP trong gen này. Đặc biệt, bệnh nhân THCVC mang SNP p.W736G có nhiều SNP trong gen *CYLD*, nhưng không có SNP trong gen *A20* hoặc *Cezanne*.

- Đã xác định được mức độ biểu hiện của một số gen liên quan đến hoạt động của hệ miễn dịch bao gồm gen *Klotho* và gen *LAG3* giảm đi ở bệnh nhân THCVC. Mức độ biểu hiện các gen tín hiệu phân tử STAT bao gồm các gen *STAT1*, *STAT3* và *STAT5* đều có biểu hiện tăng cao, trong khi biểu hiện của gen tín hiệu *SHP1* và *SHP2* không bị ảnh hưởng ở bệnh nhân THCVC.

- Bệnh nhân THCVC có biểu hiện bất hoạt các gen *A20*, *CYLD* và *Cezanne*; nồng độ IL-6 và TNF- α tăng cao; số lượng tế bào T hoạt hóa CD25⁺CD4⁺, tế bào Th1 và tế bào T điều hòa tăng lên đáng kể so với người khỏe. Ngoài ra, nồng độ kháng nguyên ung thư CA125 tăng lên trong máu ở bệnh nhân THCVC.

- **Vai trò của gen *A20* điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi**

- Tế bào PBMC được bất hoạt gen *A20* có mật độ và mức độ hoạt hóa của các tế bào biểu hiện CD3⁺CD25⁺, CD19⁺CD25⁺ và CD11b⁺CD40⁺ tăng lên; sự giải phóng tăng một số cytokine TNF- α và IL-1 β ; và sự di chuyển của tế bào được tăng cường. Tuy nhiên, sự chết apoptosis của tế bào PBMC không phụ thuộc vào sự hiện diện của gen *A20*. Chính vì thế, biểu hiện *A20* có thể liên quan đến phản ứng miễn dịch trong bệnh tự miễn và ung thư.

- **Vai trò của *Otubain-1* điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi**

- Tế bào PBMC được bất hoạt gen *Otubain-1* làm tăng mức độ biểu hiện của gen *SHP1* và *STAT6* và không làm thay đổi sự biểu hiện của các gen tín hiệu *I κ B- α* , *SHP2*, *STAT1*, *STAT3* và *STAT5*.

- Bất hoạt gen *Otubain-1* kích hoạt tế bào NK (CD56⁺CD44⁺); và không làm thay đổi hoạt động của tủy bào, tế bào B và tế bào T có mặt trong tế bào PBMC cũng

như không ảnh hưởng đến sự giải phóng cytokine IL-6, IL-12p70, TNF- α và IL-1 β và sự chết apoptosis của tế bào PBMC.

5.2 Kiến nghị

Đột biến gen *CYLD* trên bệnh nhân THCVC cần được xác định chức năng thông qua kỹ thuật chuyển gen để có thể xác định được vai trò của đột biến này liên quan đến hoạt động của tế bào ung thư.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN
ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Do Thi Trang**, Nguyen Hoang Giang, Bui Kieu Trang, Nguyen Thy Ngoc, Nguyen Van Giang, Nguyen Xuan Canh, Nguyen Ba Vuong, Nguyen Thi Xuan. *Prevalence of CYLD mutations in Vietnamese patients with polycythaemia vera*. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2022, 31 (4).1.
2. **Đỗ Thị Trang**, Nguyễn Thị Xuân. *Biểu hiện một số gen kiểm soát miễn dịch và nồng độ CA125 ở bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn*. *Tạp chí công nghệ sinh học*, 2020, 42(1): 1.
3. Nguyễn Thy Ngọc, Bùi Bích Hậu, Phạm Hoàng Nam, Trần Tuấn Anh, **Đỗ Thị Trang**, Nguyễn Thị Xuân. *Đánh giá một số phương pháp xác định đột biến JAK2 V617F phục vụ việc dự đoán nguy cơ mắc bệnh đa hồng cầu và một số căn bệnh tăng sinh tủy ác tính khác*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2021, 19(3): 1.

Tài liệu tham khảo

1. C. E. Swerdlow SH, Harris NL, et al, *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue*. Lyon: IARC, 2008.
2. J. Mehta, H. Wang, S. U. Iqbal, et al., *Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States*. *Leuk Lymphoma*, 2014. 55(3): p. 595-600.
3. J. L. Spivak, *How I treat polycythemia vera*. *Blood*, 2019. 134(4): p. 341-352.
4. M. Maynadie, R. De Angelis, R. Marcos-Gragera, et al., *Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: a HAEMACARE study*. *Haematologica*, 2013. 98(2): p. 230-8.
5. J. L. Spivak, *Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management*. *Blood*, 2002. 100(13): p. 4272-90.
6. J. L. Spivak and R. T. Silver, *The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal*. *Blood*, 2008. 112(2): p. 231-9.
7. W. Vainchenker and R. Kralovics, *Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2017. 129(6): p. 667-679.
8. C. H. Riley, M. K. Brimnes, M. Hansen, et al., *Interferon- α induces marked alterations in circulating regulatory T cells, NK cell subsets, and dendritic cells in patients with JAK2V617F-positive essential thrombocythemia and polycythemia vera*. *Eur J Haematol*, 2016. 97(1): p. 83-92.
9. C. Sanchez, C. Baier, J. G. Colle, et al., *Natural killer cells in patients with polycythemia vera*. *Human Immunology*, 2015. 76(9): p. 644-650.
10. E. M. Cardoso, A. J. Esgalhado, L. Patrão, et al., *Distinctive CD8(+) T cell and MHC class I signatures in polycythemia vera patients*. *Ann Hematol*, 2018. 97(9): p. 1563-1575.
11. F. o. Delhommeau, S. Dupont, C. Tonetti, et al., *Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis*. *Blood*, 2006. 109(1): p. 71-77.
12. U. Steidl, T. Schroeder, C. Steidl, et al., *Distinct gene expression pattern of malignant hematopoietic stem and progenitor cells in polycythemia vera*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1044: p. 94-108.
13. A. Fernandes de Oliveira Costa, L. Olops Marani, T. Mantello Bianco, et al., *Altered distribution and function of NK-cell subsets lead to impaired tumor surveillance in JAK2V617F myeloproliferative neoplasms*. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 768592.
14. R. L. Levine, M. Wadleigh, J. Cools, et al., *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis*. *Cancer Cell*, 2005. 7(4): p. 387-97.
15. A. J. Bench, H. E. White, L. Foroni, et al., *Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations*. *Br J Haematol*, 2013. 160(1): p. 25-34.
16. F. Passamonti, C. Elena, S. Schnittger, et al., *Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations*. *Blood*, 2011. 117(10): p. 2813-6.
17. K. Nakamura, M. Robertson, G. Liu, et al., *Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin*. *J Clin Invest*, 2001. 107(10): p. 1245-53.

18. W. Sheng, C. Chen, M. Dong, et al., *Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer*. J Cell Physiol, 2014. 229(7): p. 887-97.
19. M. Imai, M. Araki and N. Komatsu, *Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms*. Int J Hematol, 2017. 105(6): p. 743-747.
20. J. T. Ellis, P. Peterson, S. A. Geller, et al., *Studies of the bone marrow in polycythemia vera and the evolution of myelofibrosis and second hematologic malignancies*. Semin Hematol, 1986. 23(2): p. 144-55.
21. V. Najfeld, L. Montella, A. Scalise, et al., *Exploring polycythaemia vera with fluorescence in situ hybridization: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected*. Br J Haematol, 2002. 119(2): p. 558-66.
22. S. M. Gribble, A. G. Reid, A. J. Bench, et al., *Molecular cytogenetics of polycythaemia vera: lack of occult rearrangements detectable by 20q LSP screening, CGH, and M-FISH*. Leukemia, 2003. 17(7): p. 1419-21.
23. R. Kralovics, Y. Guan and J. T. Prchal, *Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera*. Exp Hematol, 2002. 30(3): p. 229-36.
24. F. Perner, C. Perner, T. Ernst, et al., *Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation*. Cells, 2019. 8(8).
25. N. Alghasham, Y. Alnouri, H. Abalkhail, et al., *Detection of mutations in JAK2 exons 12-15 by Sanger sequencing*. Int J Lab Hematol, 2016. 38(1): p. 34-41.
26. A. Berger, *Th1 and Th2 responses: what are they?* Bmj, 2000. 321(7258): p. 424.
27. E. I. Buchbinder and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition*. Am J Clin Oncol, 2016. 39(1): p. 98-106.
28. J. Seita and I. L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. 2(6): p. 640-53.
29. B. Pot, B. Foligne, C. Daniel, et al., *Understanding immunomodulatory effects of probiotics*. Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 2013. 77: p. 75-90.
30. J. El Hokayem, H. N. Cukier and D. M. Dykxhoorn, *Blood Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Benefits, Challenges and the Road Ahead*. J Alzheimers Dis Parkinsonism, 2016. 6(5).
31. M. L. Cooper, J. Choi, K. Staser, et al., *An "off-the-shelf" fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies*. Leukemia, 2018. 32(9): p. 1970-1983.
32. N. T. Xuan, E. Shumilina, E. Gulbins, et al., *Triggering of dendritic cell apoptosis by xanthohumol*. Mol Nutr Food Res, 2010. 54 Suppl 2: p. S214-24.
33. K. McArthur and B. T. Kile, *Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities?* Trends Cell Biol, 2018. 28(6): p. 475-493.
34. S. Kolnik, K. Corry, K. Hildahl, et al., *Vitamin E Decreases Cytotoxicity and Mitigates Inflammatory and Oxidative Stress Responses in a Ferret Organotypic Brain Slice Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia*. Dev Neurosci, 2022.
35. C. B. Leibrock, J. Voelkl, O. M. Kuro, et al., *1,25(OH)2D3 dependent overt hyperactivity phenotype in klotho-hypomorphic mice*. Sci Rep, 2016. 6: p. 24879.

36. L. P. Andrews, A. E. Marciscano, C. G. Drake, et al., *LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target*. Immunol Rev, 2017. 276(1): p. 80-96.
37. T. Kitamura, B. Z. Qian and J. W. Pollard, *Immune cell promotion of metastasis*. Nat Rev Immunol, 2015. 15(2): p. 73-86.
38. R. Hehlmann, A. Hochhaus and M. Baccarani, *Chronic myeloid leukaemia*. Lancet, 2007. 370(9584): p. 342-50.
39. Y. Matsumura, H. Aizawa, T. Shiraki-Iida, et al., *Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 242(3): p. 626-30.
40. Y. Kato, E. Arakawa, S. Kinoshita, et al., *Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 267(2): p. 597-602.
41. M. Kuro-o, Y. Matsumura, H. Aizawa, et al., *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing*. Nature, 1997. 390(6655): p. 45-51.
42. T. O. Carpenter, K. L. Insogna, J. H. Zhang, et al., *Circulating levels of soluble klotho and FGF23 in X-linked hypophosphatemia: circadian variance, effects of treatment, and relationship to parathyroid status*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. 95(11): p. E352-7.
43. L. Abramovitz, T. Rubinek, H. Ligumsky, et al., *KLI internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2011. 17(13): p. 4254-66.
44. Y. Yamazaki, A. Imura, I. Urakawa, et al., *Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 398(3): p. 513-8.
45. T. Siahianidou, M. Garatzioti, C. Lazaropoulou, et al., *Plasma soluble α -klotho protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters*. Eur J Endocrinol, 2012. 167(3): p. 433-40.
46. H. L. Wang, Q. Xu, Z. Wang, et al., *A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population*. Clin Chim Acta, 2010. 411(5-6): p. 386-90.
47. Y. Wang and Z. Sun, *Antiaging gene Klotho regulates endothelin-1 levels and endothelin receptor subtype B expression in kidneys of spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 2014. 32(8): p. 1629-36; discussion 1636.
48. X. Zhou, K. Chen, H. Lei, et al., *Klotho gene deficiency causes salt-sensitive hypertension via monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine receptor 2-mediated inflammation*. J Am Soc Nephrol, 2015. 26(1): p. 121-32.
49. Y. Wang and Z. Sun, *Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage*. Hypertension, 2009. 54(4): p. 810-7.
50. N. Koh, T. Fujimori, S. Nishiguchi, et al., *Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 280(4): p. 1015-20.
51. Y. Lin, M. Kuro-o and Z. Sun, *Genetic deficiency of anti-aging gene klotho exacerbates early nephropathy in STZ-induced diabetes in male mice*. Endocrinology, 2013. 154(10): p. 3855-63.

52. Y. Lin and Z. Sun, *Antiaging gene Klotho enhances glucose-induced insulin secretion by up-regulating plasma membrane levels of TRPV2 in MIN6 β -cells*. *Endocrinology*, 2012. 153(7): p. 3029-39.
53. Y. Agata, A. Kawasaki, H. Nishimura, et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. *Int Immunol*, 1996. 8(5): p. 765-72.
54. M. E. Keir, M. J. Butte, G. J. Freeman, et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 677-704.
55. H. Nishimura and T. Honjo, *PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance*. *Trends Immunol*, 2001. 22(5): p. 265-8.
56. J. M. Chemnitz, R. V. Parry, K. E. Nichols, et al., *SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation*. *J Immunol*, 2004. 173(2): p. 945-54.
57. E. A. Tivol, F. Borriello, A. N. Schweitzer, et al., *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4*. *Immunity*, 1995. 3(5): p. 541-7.
58. L. M. Francisco, V. H. Salinas, K. E. Brown, et al., *PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2009. 206(13): p. 3015-29.
59. H. Y. Cho, S. W. Lee, S. K. Seo, et al., *Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN- α -induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1779(12): p. 811-9.
60. M. E. Turnis, L. P. Andrews and D. A. Vignali, *Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy*. *Eur J Immunol*, 2015. 45(7): p. 1892-905.
61. F. Triebel, S. Jitsukawa, E. Baixeras, et al., *LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4*. *J Exp Med*, 1990. 171(5): p. 1393-405.
62. C. J. Workman, D. S. Rice, K. J. Dugger, et al., *Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3)*. *Eur J Immunol*, 2002. 32(8): p. 2255-63.
63. J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1813(5): p. 878-88.
64. E. L. Tsalik, L. B. Jaggars, S. W. Glickman, et al., *Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis*. *J Emerg Med*, 2012. 43(1): p. 97-106.
65. E. Berbari, T. Mabry, G. Tsaras, et al., *Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis*. *J Bone Joint Surg Am*, 2010. 92(11): p. 2102-9.
66. C. Gabay, *Interleukin-6 and chronic inflammation*. *Arthritis Res Ther*, 2006. 8 Suppl 2(Suppl 2): p. S3.
67. J. S. Smolen, A. Beaulieu, A. Rubbert-Roth, et al., *Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial*. *Lancet*, 2008. 371(9617): p. 987-97.
68. B. B. Aggarwal, S. Shishodia, S. K. Sandur, et al., *Inflammation and cancer: how hot is the link?* *Biochem Pharmacol*, 2006. 72(11): p. 1605-21.

69. A. M. Tsimberidou, E. Estey, S. Wen, et al., *The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes*. *Cancer*, 2008. 113(7): p. 1605-13.
70. S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* *Free Radic Biol Med*, 2010. 49(11): p. 1603-16.
71. B. Sanchez-Correa, J. M. Bergua, C. Campos, et al., *Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels*. *Cytokine*, 2013. 61(3): p. 885-91.
72. A. Aguayo, H. Kantarjian, T. Manshouri, et al., *Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2000. 96(6): p. 2240-5.
73. D. H. Wyllie, K. C. Sogaard, K. Holland, et al., *Identification of 34 novel proinflammatory proteins in a genome-wide macrophage functional screen*. *PLoS One*, 2012. 7(7): p. e42388.
74. C. A. Dinarello, *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. *Blood*, 1996. 87(6): p. 2095-147.
75. M. G. Netea, C. A. Nold-Petry, M. F. Nold, et al., *Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages*. *Blood*, 2009. 113(10): p. 2324-35.
76. G. C. Bagby, Jr., *Interleukin-1 and hematopoiesis*. *Blood Rev*, 1989. 3(3): p. 152-61.
77. D. Burger, N. Molnarfi, L. Gruaz, et al., *Differential induction of IL-1beta and TNF by CD40 ligand or cellular contact with stimulated T cells depends on the maturation stage of human monocytes*. *J Immunol*, 2004. 173(2): p. 1292-7.
78. A. S. Freedman, G. Freeman, J. Whitman, et al., *Pre-exposure of human B cells to recombinant IL-1 enhances subsequent proliferation*. *J Immunol*, 1988. 141(10): p. 3398-404.
79. C. A. Dinarello, *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 519-50.
80. K. Ezaki, M. Tsuzuki, I. Katsuta, et al., *Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and acute leukemia: in vitro proliferative response to IL-1 beta, IL-1 beta content of leukemic cells and treatment outcome*. *Leuk Res*, 1995. 19(1): p. 35-41.
81. C. L. Langrish, B. S. McKenzie, N. J. Wilson, et al., *IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity*. *Immunol Rev*, 2004. 202: p. 96-105.
82. B. W. Yin, A. Dnistrian and K. O. Lloyd, *Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene*. *Int J Cancer*, 2002. 98(5): p. 737-40.
83. K. S. Suh, S. W. Park, A. Castro, et al., *Ovarian cancer biomarkers for molecular biosensors and translational medicine*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010. 10(8): p. 1069-83.
84. D. P. Bender, J. I. Sorosky, R. E. Buller, et al., *Serum CA 125 is an independent prognostic factor in cervical adenocarcinoma*. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. 189(1): p. 113-7.
85. A. Kornberg, N. Rahimi-Levene, R. Yona, et al., *Enhanced generation of monocyte tissue factor and increased plasma prothrombin fragment1+2 levels in patients with polycythemia vera: mechanism of activation of blood coagulation*. *Am J Hematol*, 1997. 56(1): p. 5-11.

86. F. Rueda, A. Remacha, F. Martí, et al., *Different lymphocyte activity in patients with polycythaemia vera versus secondary polycythaemia and healthy blood donors*. *Acta Haematol*, 1990. 83(1): p. 31-4.
87. N. Sarodaya, J. Karapurkar, K. S. Kim, et al., *The Role of Deubiquitinating Enzymes in Hematopoiesis and Hematological Malignancies*. *Cancers (Basel)*, 2020. 12(5).
88. M. M. Nakagawa, K. Thummar, J. Mandelbaum, et al., *Lack of the ubiquitin-editing enzyme A20 results in loss of hematopoietic stem cell quiescence*. *J Exp Med*, 2015. 212(2): p. 203-16.
89. M. M. Nakagawa, H. Davis and C. V. Rathinam, *A20 deficiency in multipotent progenitors perturbs quiescence of hematopoietic stem cells*. *Stem Cell Res*, 2018. 33: p. 199-205.
90. A. Nagamachi, Y. Nakata, T. Ueda, et al., *Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function*. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e87425.
91. M. Tesio, Y. Tang, K. Müdder, et al., *Hematopoietic stem cell quiescence and function are controlled by the CYLD-TRAF2-p38MAPK pathway*. *J Exp Med*, 2015. 212(4): p. 525-38.
92. S. A. Wickström, K. C. Masoumi, S. Khochbin, et al., *CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin*. *The EMBO Journal*, 2010. 29(1): p. 131-144.
93. J. Gao, L. Huo, X. Sun, et al., *The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration*. *J Biol Chem*, 2008. 283(14): p. 8802-9.
94. J. Cai, J. Wei, V. Schrott, et al., *Induction of deubiquitinating enzyme USP50 during erythropoiesis and its potential role in the regulation of Ku70 stability*. *J Investig Med*, 2018. 66(1): p. 1-6.
95. N. Hovelmeyer, S. Reissig, N. T. Xuan, et al., *A20 deficiency in B cells enhances B-cell proliferation and results in the development of autoantibodies*. *Eur J Immunol*, 2011. 41(3): p. 595-601.
96. A. Martens and G. van Loo, *A20 at the Crossroads of Cell Death, Inflammation, and Autoimmunity*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020. 12(1).
97. T. T. Lu, M. Onizawa, G. E. Hammer, et al., *Dimerization and ubiquitin mediated recruitment of A20, a complex deubiquitinating enzyme*. *Immunity*, 2013. 38(5): p. 896-905.
98. V. Kirkin, D. G. McEwan, I. Novak, et al., *A role for ubiquitin in selective autophagy*. *Mol Cell*, 2009. 34(3): p. 259-69.
99. L. Zhu, L. Wang, X. Wang, et al., *Characteristics of A20 gene polymorphisms and clinical significance in patients with rheumatoid arthritis*. *J Transl Med*, 2015. 13: p. 215.
100. K. Honma, S. Tsuzuki, M. Nakagawa, et al., *TNFAIP3 is the target gene of chromosome band 6q23.3-q24.1 loss in ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. 47(1): p. 1-7.
101. M. Lork, K. Verhelst and R. Beyaert, *CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF- κ B signaling and cell death: so similar, yet so different*. *Cell Death Differ*, 2017. 24(7): p. 1172-1183.
102. V. Baud and M. Karin, *Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. 8(1): p. 33-40.

103. S. G. Hymowitz and I. E. Wertz, *A20: from ubiquitin editing to tumour suppression*. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10(5): p. 332-41.
104. M. Duwel, V. Welteke, A. Oeckinghaus, et al., *A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains*. *J Immunol*, 2009. 182(12): p. 7718-28.
105. J. E. Hutti, B. E. Turk, J. M. Asara, et al., *IkappaB kinase beta phosphorylates the K63 deubiquitinase A20 to cause feedback inhibition of the NF-kappaB pathway*. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(21): p. 7451-61.
106. G. Evangelatos, G. E. Fragoulis, V. Koulouri, et al., *MicroRNAs in rheumatoid arthritis: From pathogenesis to clinical impact*. *Autoimmun Rev*, 2019. 18(11): p. 102391.
107. A. V. Churov, E. K. Oleinik and M. Knip, *MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential*. *Autoimmun Rev*, 2015. 14(11): p. 1029-37.
108. M. P. Gantier, H. J. Stunden, C. E. McCoy, et al., *A miR-19 regulon that controls NF-kB signaling*. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(16): p. 8048-58.
109. A. van Nieuwenhuijze, J. Dooley, S. Humblet-Baron, et al., *Defective germinal center B-cell response and reduced arthritic pathology in microRNA-29a-deficient mice*. *Cell Mol Life Sci*, 2017. 74(11): p. 2095-2106.
110. D. Li, L. Wang, Y. Fan, et al., *Down-regulation of A20 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus*. *J Clin Immunol*, 2012. 32(6): p. 1287-91.
111. L. Catrysse, L. Vereecke, R. Beyaert, et al., *A20 in inflammation and autoimmunity*. *Trends Immunol*, 2014. 35(1): p. 22-31.
112. Z. Jin, Y. Li, R. Pitti, et al., *Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling*. *Cell*, 2009. 137(4): p. 721-35.
113. S. Li, H. Zheng, A. P. Mao, et al., *Regulation of virus-triggered signaling by OTUB1- and OTUB2-mediated deubiquitination of TRAF3 and TRAF6*. *J Biol Chem*, 2010. 285(7): p. 4291-7.
114. L. Fagerberg, B. M. Hallström, P. Oksvold, et al., *Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics*. *Mol Cell Proteomics*, 2014. 13(2): p. 397-406.
115. L. Soares, C. Seroogy, H. Skrenta, et al., *Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL*. *Nat Immunol*, 2004. 5(1): p. 45-54.
116. M. Saldana, K. VanderVorst, A. L. Berg, et al., *Otubain 1: a non-canonical deubiquitinase with an emerging role in cancer*. *Endocrine-related cancer*, 2019. 26(1): p. R1-R14.
117. B. Schwanhäusser, D. Busse, N. Li, et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. *Nature*, 2011. 473(7347): p. 337-42.
118. S. Nakada, I. Tai, S. Panier, et al., *Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1*. *Nature*, 2010. 466(7309): p. 941-6.
119. M. E. Sowa, E. J. Bennett, S. P. Gygi, et al., *Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape*. *Cell*, 2009. 138(2): p. 389-403.
120. M. Hao, X. Weng, Y. Wang, et al., *Targeting CXCR7 improves the efficacy of breast cancer patients with tamoxifen therapy*. *Biochem Pharmacol*, 2018. 147: p. 128-140.

121. X. Sun, G. Cheng, M. Hao, et al., *CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression*. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. 29(4): p. 709-22.
122. Y. Yu, H. Li, B. Xue, et al., *SDF-1/CXCR7 axis enhances ovarian cancer cell invasion by MMP-9 expression through p38 MAPK pathway*. *DNA Cell Biol*, 2014. 33(8): p. 543-9.
123. Y. C. Juang, M. C. Landry, M. Sanches, et al., *OTUB1 co-opts Lys48-linked ubiquitin recognition to suppress E2 enzyme function*. *Mol Cell*, 2012. 45(3): p. 384-97.
124. R. Wiener, X. Zhang, T. Wang, et al., *The mechanism of OTUB1-mediated inhibition of ubiquitination*. *Nature*, 2012. 483(7391): p. 618-22.
125. C. Cammann, A. Rath, U. Reichl, et al., *Early changes in the metabolic profile of activated CD8(+) T cells*. *BMC Cell Biol*, 2016. 17(1): p. 28.
126. N. T. Xuan, D. M. Trung, N. N. Minh, et al., *Regulation of p38MAPK-mediated dendritic cell functions by the deubiquitylase otubain 1*. *HLA*, 2019. 93(6): p. 462-470.
127. V. Stanisić, A. Malovannaya, J. Qin, et al., *OTU Domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) deubiquitinates estrogen receptor (ER) alpha and affects ERalpha transcriptional activity*. *J Biol Chem*, 2009. 284(24): p. 16135-45.
128. M. Alvarez-Fernández and R. H. Medema, *Novel functions of FoxM1: from molecular mechanisms to cancer therapy*. *Front Oncol*, 2013. 3: p. 30.
129. R. L. Lin and L. J. Zhao, *Mechanistic basis and clinical relevance of the role of transforming growth factor- β in cancer*. *Cancer Biol Med*, 2015. 12(4): p. 385-93.
130. G. R. Bignell, W. Warren, S. Seal, et al., *Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene*. *Nat Genet*, 2000. 25(2): p. 160-5.
131. C. Hellerbrand, E. Bumes, F. Bataille, et al., *Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas*. *Carcinogenesis*, 2007. 28(1): p. 21-7.
132. M. Arora, D. Kaul, N. Varma, et al., *Cellular proteolytic modification of tumor-suppressor CYLD is critical for the initiation of human T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2015. 54(1): p. 132-138.
133. D. Komander, C. J. Lord, H. Scheel, et al., *The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module*. *Mol Cell*, 2008. 29(4): p. 451-64.
134. W. W. Reiley, M. Zhang, W. Jin, et al., *Regulation of T cell development by the deubiquitinating enzyme CYLD*. *Nat Immunol*, 2006. 7(4): p. 411-7.
135. R. Massoumi, *Ubiquitin chain cleavage: CYLD at work*. *Trends Biochem Sci*, 2010. 35(7): p. 392-9.
136. A. Kovalenko, C. Chable-Bessia, G. Cantarella, et al., *The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination*. *Nature*, 2003. 424(6950): p. 801-5.
137. H. Ke, C. K. Augustine, V. D. Gandham, et al., *CYLD inhibits melanoma growth and progression through suppression of the JNK/AP-1 and β 1-integrin signaling pathways*. *J Invest Dermatol*, 2013. 133(1): p. 221-9.

138. W. W. Reiley, W. Jin, A. J. Lee, et al., *Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses*. J Exp Med, 2007. 204(6): p. 1475-85.
139. L. Espinosa, S. Cathelin, T. D'Altri, et al., *The Notch/Hes1 pathway sustains NF- κ B activation through CYLD repression in T cell leukemia*. Cancer Cell, 2010. 18(3): p. 268-81.
140. R. Massoumi, *CYLD: a deubiquitination enzyme with multiple roles in cancer*. Future Oncol, 2011. 7(2): p. 285-97.
141. D. Komander, *CYLD tidies up dishevelled signaling*. Mol Cell, 2010. 37(5): p. 589-90.
142. Y. Chu, V. Soberon, L. Glockner, et al., *A20 and CYLD do not share significant overlapping functions during B cell development and activation*. J Immunol, 2012. 189(9): p. 4437-43.
143. W. Reiley, M. Zhang, X. Wu, et al., *Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2005. 25(10): p. 3886-95.
144. S. J. Kim, H. J. Jung and C. J. Lim, *Reactive oxygen species-dependent down-regulation of tumor suppressor genes PTEN, USP28, DRAM, TIGAR, and CYLD under oxidative stress*. Biochem Genet, 2013. 51(11-12): p. 901-15.
145. P. W. Blake and J. R. Toro, *Update of cylindromatosis gene (CYLD) mutations in Brooke-Spiegler syndrome: novel insights into the role of deubiquitination in cell signaling*. Hum Mutat, 2009. 30(7): p. 1025-36.
146. T. R. Brummelkamp, S. M. Nijman, A. M. Dirac, et al., *Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB*. Nature, 2003. 424(6950): p. 797-801.
147. H. Jono, J. H. Lim, L. F. Chen, et al., *NF-kappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway*. J Biol Chem, 2004. 279(35): p. 36171-4.
148. H. Ye, X. Liu, M. Lv, et al., *MicroRNA and transcription factor co-regulatory network analysis reveals miR-19 inhibits CYLD in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(12): p. 5201-14.
149. E. W. Harhaj and V. M. Dixit, *Regulation of NF- κ B by deubiquitinases*. Immunol Rev, 2012. 246(1): p. 107-24.
150. K. Hadian, R. A. Griesbach, S. Dornauer, et al., *NF- κ B essential modulator (NEMO) interaction with linear and lys-63 ubiquitin chains contributes to NF- κ B activation*. J Biol Chem, 2011. 286(29): p. 26107-17.
151. L. L. Deng, Y. X. Shao, H. F. Lv, et al., *Over-expressing CYLD augments antitumor activity of TRAIL by inhibiting the NF- κ B survival signaling in lung cancer cells*. Neoplasma, 2012. 59(1): p. 18-29.
152. K. Komatsu, J. Y. Lee, M. Miyata, et al., *Inhibition of PDE4B suppresses inflammation by increasing expression of the deubiquitinase CYLD*. Nat Commun, 2013. 4: p. 1684.
153. F. Stegmeier, M. E. Sowa, G. Nalepa, et al., *The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(21): p. 8869-74.
154. J. Gao, L. Sun, L. Huo, et al., *CYLD regulates angiogenesis by mediating vascular endothelial cell migration*. Blood, 2010. 115(20): p. 4130-7.

155. S. Kuphal, G. Shaw-Hallgren, M. Eberl, et al., *GLII-dependent transcriptional repression of CYLD in basal cell carcinoma*. *Oncogene*, 2011. 30(44): p. 4523-30.
156. T. D'Altri, J. Gonzalez, I. Aifantis, et al., *Hes1 expression and CYLD repression are essential events downstream of Notch1 in T-cell leukemia*. *Cell Cycle*, 2011. 10(7): p. 1031-6.
157. Y. Yang, M. Liu, D. Li, et al., *CYLD regulates spindle orientation by stabilizing astral microtubules and promoting dishevelled-NuMA-dynein/dynactin complex formation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(6): p. 2158-63.
158. Y. Yang, L. Sun, Tala, et al., *CYLD regulates RhoA activity by modulating LARG ubiquitination*. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e55833.
159. D. Komander, *The emerging complexity of protein ubiquitination*. *Biochem Soc Trans*, 2009. 37(Pt 5): p. 937-53.
160. T. N. Masckauchán, C. J. Shawber, Y. Funahashi, et al., *Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells*. *Angiogenesis*, 2005. 8(1): p. 43-51.
161. K. Sundaram, S. Shanmugarajan, D. S. Rao, et al., *Mutant p62P392L stimulation of osteoclast differentiation in Paget's disease of bone*. *Endocrinology*, 2011. 152(11): p. 4180-9.
162. A. Dosemeci, S. Thein, Y. Yang, et al., *CYLD, a deubiquitinase specific for lysine63-linked polyubiquitins, accumulates at the postsynaptic density in an activity-dependent manner*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 430(1): p. 245-9.
163. S. Thein, J. H. Tao-Cheng, Y. Li, et al., *CaMKII mediates recruitment and activation of the deubiquitinase CYLD at the postsynaptic density*. *PLoS One*, 2014. 9(3): p. e91312.
164. T. E. Mevissen, M. K. Hospenthal, P. P. Geurink, et al., *OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis*. *Cell*, 2013. 154(1): p. 169-84.
165. K. Enesa, M. Zakkar, H. Chaudhury, et al., *NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling*. *J Biol Chem*, 2008. 283(11): p. 7036-45.
166. B. Skaug, X. Jiang and Z. J. Chen, *The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways*. *Annu Rev Biochem*, 2009. 78: p. 769-96.
167. T. E. T. Mevissen, Y. Kulathu, M. P. C. Mulder, et al., *Molecular basis of Lys11-polyubiquitin specificity in the deubiquitinase Cezanne*. *Nature*, 2016. 538(7625): p. 402-405.
168. T. Bonacci and M. J. Emanuele, *Impressionist portraits of mitotic exit: APC/C, K11-linked ubiquitin chains and Cezanne*. *Cell Cycle*, 2019. 18(6-7): p. 652-660.
169. J. H. Wang, X. P. Zhong, Y. F. Zhang, et al., *Cezanne predicts progression and adjuvant TACE response in hepatocellular carcinoma*. *Cell Death Dis*, 2017. 8(9): p. e3043.
170. B. Y. Tê, *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học*. 22/4/2015
171. B. Y. Te, *Quyết định 1832/QĐ-BYT 2022 tài liệu Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học*. 2022. Số: 1832/QĐ-BYT.

172. L. C. Bui, *Khảo sát đột biến JAK2V617F trên bệnh nhân đa hồng cầu nguyên phát tại bệnh viện chợ rẫy*. Y học Tp. Hồ Chí Minh, 2013. 17.
173. N. T. X. Do Thi Trang, *Gene expressions involved in immune system control and serum CA125 content in polycythemia vera*. . March 2020.
174. Y. C. Chang, H. C. Lin, Y. H. Chiang, et al., *Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms*. Med Oncol, 2017. 34(5): p. 83.
175. L. A. Anderson and M. F. McMullin, *Epidemiology of MPN: what do we know?* Curr Hematol Malig Rep, 2014. 9(4): p. 340-9.
176. L. M. Scott, W. Tong, R. L. Levine, et al., *JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis*. N Engl J Med, 2007. 356(5): p. 459-68.
177. P. Guglielmelli and A. M. Vannucchi, *Current management strategies for polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Blood Rev, 2020. 42: p. 100714.
178. T. Barbui, J. Thiele, H. Gisslinger, et al., *The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion*. Blood Cancer J, 2018. 8(2): p. 15.
179. F. McCormick, *KRAS as a Therapeutic Target*. Clin Cancer Res, 2015. 21(8): p. 1797-801.
180. P. Fayers, *Approaches to sample size estimation in the design of clinical trials-- a review*. By A. Donner, *Statistics in Medicine*, 3, 199-214 (1984). Stat Med, 1993. 12(17): p. 1643.
181. J. H. Schefe, K. E. Lehmann, I. R. Buschmann, et al., *Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula*. J Mol Med (Berl), 2006. 84(11): p. 901-10.
182. H. V. Đạil, N. T. T. H. , 2,* , Vũ Phương Nhung³, N. T. T. Tâm², et al., *Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện gen ACE2, TMPRSS2 ở niêm mạc ty hầu và mức độ nặng của bệnh Covid 19*. Tạp chí nghiên cứu y học, 2022. 156(8)-2022.
183. I. Adzhubei, D. M. Jordan and S. R. Sunyaev, *Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2*. Curr Protoc Hum Genet, 2013. Chapter 7: p. Unit7.20.
184. P. Aigner, T. Mizutani, J. Horvath, et al., *STAT3beta is a tumor suppressor in acute myeloid leukemia*. 2019. 3(13): p. 1989-2002.
185. C. Schubert, M. Allhoff, S. Tillmann, et al., *Differential roles of STAT1 and STAT2 in the sensitivity of JAK2V617F- vs. BCR-ABL-positive cells to interferon alpha*. J Hematol Oncol, 2019. 12(1): p. 36.
186. V. Gouilleux-Gruart, F. Gouilleux, C. Desaint, et al., *STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients*. Blood, 1996. 87(5): p. 1692-7.
187. A. Wickrema, F. Chen, F. Namin, et al., *Defective expression of the SHP-1 phosphatase in polycythemia vera*. Exp Hematol, 1999. 27(7): p. 1124-32.
188. J. J. Yang, H. Chen, X. Q. Zheng, et al., *Methylated alteration of SHP1 complements mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with myeloproliferative neoplasm*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. 16(6): p. 2219-25.
189. B. Liang, C. Workman, J. Lee, et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. 180(9): p. 5916-26.

190. M. Markiewicz, K. Panneerselvam and N. Marks, *Role of Klotho in migration and proliferation of human dermal microvascular endothelial cells*. *Microvasc Res*, 2016. 107: p. 76-82.
191. D. Thirumal Kumar, E. Mendonca, J. Priyadharshini Christy, et al., *A computational model to predict the structural and functional consequences of missense mutations in O(6)-methylguanine DNA methyltransferase*. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2019. 115: p. 351-369.
192. S. Nakken, I. Alseth and T. Rognes, *Computational prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes*. *Neuroscience*, 2007. 145(4): p. 1273-9.
193. A. Tefferi and J. W. Vardiman, *Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms*. *Leukemia*, 2008. 22(1): p. 14-22.
194. S. Sano, Y. Wang, Y. Yura, et al., *JAK2 (V617F) -Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Pathological Remodeling in Murine Heart Failure*. *JACC Basic Transl Sci*, 2019. 4(6): p. 684-697.
195. X. Jian, E. Boerwinkle and X. Liu, *In silico tools for splicing defect prediction: a survey from the viewpoint of end users*. *Genet Med*, 2014. 16(7): p. 497-503.
196. K. Ohno, J. I. Takeda and A. Masuda, *Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018. 9(1).
197. W. B. Zhao, Y. Li, X. Liu, et al., *Involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells in the pathogenesis of polycythaemia vera*. *Chin Med J (Engl)*, 2008. 121(18): p. 1781-6.
198. N. T. Xuan, X. Wang, G. Nishanth, et al., *A20 expression in dendritic cells protects mice from LPS-induced mortality*. *Eur J Immunol*, 2015. 45(3): p. 818-28.
199. E. Pourcelot, C. Trocme, J. Mondet, et al., *Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications*. *Exp Hematol*, 2014. 42(5): p. 360-8.
200. R. Salgia, D. Harpole, J. E. Herndon, 2nd, et al., *Role of serum tumor markers CA 125 and CEA in non-small cell lung cancer*. *Anticancer Res*, 2001. 21(2B): p. 1241-6.
201. O. Bairey and M. Shaklai, *Serum CA 125 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Clin Lab Haematol*, 2005. 27(1): p. 57-60.
202. I. Dilek, H. Ayakta, C. Demir, et al., *CA 125 levels in patients with non-Hodgkin lymphoma and other hematologic malignancies*. *Clin Lab Haematol*, 2005. 27(1): p. 51-5.
203. K. Partheen, B. Kristjansdottir and K. Sundfeldt, *Evaluation of ovarian cancer biomarkers HE4 and CA-125 in women presenting with a suspicious cystic ovarian mass*. *J Gynecol Oncol*, 2011. 22(4): p. 244-52.
204. K. T. B. Thao Tran Thi Phuong, Tong Hoang Van, Xuan NT, *Nghiên cứu nồng độ kháng nguyên CA125 ở bệnh nhân ung thư bạch cầu*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 26/06/2020. 62 (9).
205. F. Mulas, X. Wang, S. Song, et al., *The deubiquitinase OTUB1 augments NF- κ B-dependent immune responses in dendritic cells in infection and inflammation by stabilizing UBC13*. *Cell Mol Immunol*, 2020.

206. B. Edelmann, N. Gupta, T. M. Schnoeder, et al., *JAK2-V617F promotes venous thrombosis through beta1/beta2 integrin activation*. J Clin Invest, 2018. 128(10): p. 4359-4371.
207. C. James, V. Ugo, J. P. Le Couedic, et al., *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera*. Nature, 2005. 434(7037): p. 1144-8.
208. A. V. Jones and N. C. Cross, *Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms*. Ther Adv Hematol, 2013. 4(4): p. 237-53.
209. M. Krasilnikov, V. N. Ivanov, J. Dong, et al., *ERK and PI3K negatively regulate STAT-transcriptional activities in human melanoma cells: implications towards sensitization to apoptosis*. Oncogene, 2003. 22(26): p. 4092-101.
210. P. Dell'Albani, M. A. Kahn, R. Cole, et al., *Oligodendroglial survival factors, PDGF-AA and CNTF, activate similar JAK/STAT signaling pathways*. J Neurosci Res, 1998. 54(2): p. 191-205.
211. A. Tefferi, J. J. Strand, T. L. Lasho, et al., *Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera*. Leukemia, 2007. 21(9): p. 2074-5.
212. A. Tefferi and T. Barbui, *Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management*. Am J Hematol, 2019. 94(1): p. 133-143.
213. R. L. Levine, A. Pardanani, A. Tefferi, et al., *Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(9): p. 673-83.
214. A. Tefferi, *Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances*. Am J Hematol, 2016. 91(1): p. 50-8.
215. M. Arora, D. Kaul and N. Varma, *Functional nature of a novel mutant CYLD observed in pediatric lymphoblastic B-cell leukemia*. Pediatr Blood Cancer, 2015. 62(6): p. 1066-9.
216. W. Wu, H. Zhu, Y. Fu, et al., *Clinical significance of down-regulated cylindromatosis gene in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2014. 55(3): p. 588-94.
217. C. Philipp, J. Edelmann, A. Buhler, et al., *Mutation analysis of the TNFAIP3 (A20) tumor suppressor gene in CLL*. Int J Cancer, 2011. 128(7): p. 1747-50.
218. P. Johansson, A. Bergmann, S. Rahmann, et al., *Recurrent alterations of TNFAIP3 (A20) in T-cell large granular lymphocytic leukemia*. Int J Cancer, 2016. 138(1): p. 121-4.
219. Q. Zhou, H. Wang, D. M. Schwartz, et al., *Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease*. Nat Genet, 2016. 48(1): p. 67-73.
220. J. H. Wang, W. Wei, Z. X. Guo, et al., *Decreased Cezanne expression is associated with the progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma*. J Transl Med, 2015. 13: p. 41.
221. G. Nishanth, M. Deckert, K. Wex, et al., *CYLD enhances severe listeriosis by impairing IL-6/STAT3-dependent fibrin production*. PLoS Pathog, 2013. 9(6): p. e1003455.
222. R. H. Schabowsky, S. Madireddi, R. Sharma, et al., *Targeting CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T-cells for the augmentation of cancer immunotherapy*. Curr Opin Investig Drugs, 2007. 8(12): p. 1002-8.

223. J. Cerny, H. Yu, M. Ramanathan, et al., *Expression of CD25 independently predicts early treatment failure of acute myeloid leukaemia (AML)*. Br J Haematol, 2013. 160(2): p. 262-6.
224. K. Blatt, I. Menzl, G. Eisenwort, et al., *Phenotyping and Target Expression Profiling of CD34(+)/CD38(-) and CD34(+)/CD38(+) Stem- and Progenitor cells in Acute Lymphoblastic Leukemia*. Neoplasia, 2018. 20(6): p. 632-642.
225. H. C. Kwaan and J. Wang, *Hyperviscosity in polycythemia vera and other red cell abnormalities*. Semin Thromb Hemost, 2003. 29(5): p. 451-8.
226. M. Gianni, M. Terao, I. Fortino, et al., *Stat1 is induced and activated by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells*. Blood, 1997. 89(3): p. 1001-12.
227. B. Kovacic, D. Stoiber, R. Moriggl, et al., *STAT1 acts as a tumor promoter for leukemia development*. Cancer Cell, 2006. 10(1): p. 77-87.
228. H. A. Bruns and M. H. Kaplan, *The role of constitutively active Stat6 in leukemia and lymphoma*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. 57(3): p. 245-53.
229. B. H. Li, X. Z. Yang, P. D. Li, et al., *IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 369(2): p. 554-60.
230. J. Z. Wu, T. Tian, Y. Huang, et al., *Serum carbohydrate antigen 125 concentration as a superior predictor for serosal effusion at diagnosis and a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma*. Cancer Biomark, 2016. 17(2): p. 205-12.
231. U. Lorenz, *SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels*. Immunol Rev, 2009. 228(1): p. 342-59.
232. T. Oka, M. Ouchida, M. Koyama, et al., *Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas*. Cancer Res, 2002. 62(22): p. 6390-4.
233. C. S. Chim, T. K. Fung, W. C. Cheung, et al., *SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway*. Blood, 2004. 103(12): p. 4630-5.
234. R. J. Chan, Y. Li, M. N. Hass, et al., *Shp-2 heterozygous hematopoietic stem cells have deficient repopulating ability due to diminished self-renewal*. Exp Hematol, 2006. 34(9): p. 1230-9.
235. M. Dance, A. Montagner, J. P. Salles, et al., *The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway*. Cell Signal, 2008. 20(3): p. 453-9.
236. M. Tajan, A. de Rocca Serra, P. Valet, et al., *SHP2 sails from physiology to pathology*. Eur J Med Genet, 2015. 58(10): p. 509-25.
237. P. N. Duy, N. T. Thuy, B. K. Trang, et al., *Regulation of NF- κ B- and STAT1-mediated plasmacytoid dendritic cell functions by A20*. PLoS One, 2019. 14(9): p. e0222697.
238. W. Luczyński, A. Stasiak-Barmuta, E. Iłendo, et al., *CD40 stimulation induces differentiation of acute lymphoblastic leukemia cells into dendritic cells*. Acta Biochim Pol, 2006. 53(2): p. 377-82.
239. J. C. Fischer, V. Otten, M. Kober, et al., *A20 Restrains Thymic Regulatory T Cell Development*. J Immunol, 2017. 199(7): p. 2356-2365.
240. M. Kato, M. Sanada, I. Kato, et al., *Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas*. Nature, 2009. 459(7247): p. 712-6.

241. N. Shembade and E. W. Harhaj, *Regulation of NF- κ B signaling by the A20 deubiquitinase*. Cell Mol Immunol, 2012. 9(2): p. 123-30.
242. L. Chen, L. Lei, T. Li, et al., *A20 alleviates the vascular remodeling induced by homocysteine*. Am J Transl Res, 2018. 10(12): p. 3991-4003.
243. S. L. Sague, C. Tato, E. Puré, et al., *The regulation and activation of CD44 by natural killer (NK) cells and its role in the production of IFN-gamma*. J Interferon Cytokine Res, 2004. 24(5): p. 301-9.
244. X. Zhou, J. Yu, X. Cheng, et al., *The deubiquitinase Otub1 controls the activation of CD8(+) T cells and NK cells by regulating IL-15-mediated priming*. Nat Immunol, 2019. 20(7): p. 879-889.
245. M. Saldana, K. VanderVorst, A. L. Berg, et al., *Otubain 1: a non-canonical deubiquitinase with an emerging role in cancer*. Endocr Relat Cancer, 2019. 26(1): p. R1-r14.
246. E. H. Kim and M. Suresh, *Role of PI3K/Akt signaling in memory CD8 T cell differentiation*. Front Immunol, 2013. 4: p. 20.
247. L. Bai, H. Fang, S. Xia, et al., *STAT1 activation represses IL-22 gene expression and psoriasis pathogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. 501(2): p. 563-569.
248. J. E. Durbin, R. Hackenmiller, M. C. Simon, et al., *Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease*. Cell, 1996. 84(3): p. 443-50.
249. C. K. Lee, D. T. Rao, R. Gertner, et al., *Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function*. J Immunol, 2000. 165(7): p. 3571-7.
250. T. J. Mitchell and S. John, *Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas*. Immunology, 2005. 114(3): p. 301-12.
251. V. Calo, M. Migliavacca, V. Bazan, et al., *STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis*. J Cell Physiol, 2003. 197(2): p. 157-68.

Phụ lục tài liệu

PHỤ LỤC I: Danh sách bệnh nhân

Bảng 3.11. Danh sách bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

TT	HỌ VÀ TÊN	NĂM SINH	MÃ SỐ	TÊN BỆNH
1	Trần Anh Q.	1993	17057708	THCVC
2	Hoàng Thị U.	1965	170068865	THCVC
3	Nguyễn Văn T.	1958	6004597	THCVC
4	Nguyễn Đức T.	1970	16034158	THCVC
5	Tạ Thị H.	1968	9003079	THCVC
6	Phạm Thị N.	1949	6001555	THCVC
7	Nguyễn Thị Đ.	1950	13008213	THCVC
8	Nguyễn Văn T.	1953	14038160	THCVC
9	Tăng Thị N.	1976	15001463	THCVC
10	Vũ Thị L.	1948	14035126	THCVC
11	Vũ Thị M.	1958	12000243	THCVC
12	Lê Hồng C.	1953	13002402	THCVC
13	Dương Thị L.	1957	15008207	THCVC
14	Trịnh Quang B.	1953	14035516	THCVC
15	Hoàng Văn T.	1957	16037753	THCVC
16	Nguyễn Thị M.	1956	16018009	THCVC
17	Hoàng Thị T.	1972	15024808	THCVC
18	Võ Anh T.	1973	12010299	THCVC
19	Phạm Tân H.	1952	17007626	THCVC
20	Trần Văn T.	1939	16025316	THCVC
21	Khuất Văn B.	1949	14005996	THCVC
22	Lê Hồng M.	1956	1500701	THCVC
23	Ngô Thị L.	1964	18015435	THCVC
24	Nguyễn Thị Kh.	1954	18008092	THCVC
25	Trần Thị Th.	1956	11007274	THCVC

26	Nguyễn Thị B.	1950	18004772	THCVC
27	Bùi Trần S.	1935	10003738	THCVC
28	Đỗ Ngọc M.	1959	15015070	THCVC
29	Nguyễn Duy Ng.	1940	9004571	THCVC
30	Nguyễn Thị K.	1954	16016562	THCVC
31	Vũ Ngọc A.	1957	12040500	THCVC
32	Dương Văn Th.	1956	14036211	THCVC
33	Nguyễn Ngọc Th.	1977	17054352	THCVC
34	Hoàng Đức M.	1959	14036435	THCVC
35	Dương Văn Ch.	1963	10002818	THCVC
36	Vũ Thị Y.	1953	17008538	THCVC
37	Nguyễn Cao Tr.	1984	15089761	THCVC
38	Trần Thị L.	1938	6003199	THCVC
39	Trình Tiến Nh.	1958	14034527	THCVC
40	Phạm Thị Ng.	1905	18001767	THCVC
41	Hoàng Nghĩa Đ.	1971	15023596	THCVC
42	Bùi Gia Th.	1945	17020137	THCVC
43	Lê Thị Ch.	1955	16040358	THCVC
44	Nguyễn Thị Th.	1953	14052980	THCVC
45	Phạm Thị N.	1949	06001555	THCVC
46	Nguyễn Văn Tr.	1977	16017610	THCVC
47	Nguyễn Thị L.	1953	18002711	THCVC
48	Trịnh Thị H.	1976	14031548	THCVC
49	Trần Đức Th.	1931	06001708	THCVC
50	Vũ Văn Kh.	1964	17039989	THCVC
51	Nguyễn Việt Nh.	1940	14050196	THCVC
52	Đặng Văn T.	1990	16007911	THCVC
53	Trần Hải L.	1937	08004315	THCVC
54	Nguyễn Gia C.	1944	12014695	THCVC

55	Nguyễn Tiến Th.	1953	17013848	THCVC
56	Hoàng Văn D.	1959	16002672	THCVC
57	Vàng Thị Nh.	1943	17005203	THCVC
58	Hà Vũ T.	1964	12009406	THCVC
59	Nguyễn Đình H.	1965	17005129	THCVC
60	Tổng Thị Ch.	1972	14035890	THCVC
61	Trần Văn C.	1960	13003696	THCVC
62	Đặng Anh T.	1962	15031714	THCVC
63	Phùng Thị Anh Th.	1957	15017372	THCVC
64	Nguyễn Văn T.	1935	16013673	THCVC
65	Nguyễn Thị Kh.	1954	18008092	THCVC
66	Lê Duy B.	1958	17031315	THCVC
67	Hoàng Thị L.	1958	17020768	THCVC
68	Nguyễn Thị V.	1937	13003167	THCVC
69	Đặng Ngọc M.	1959	15015070	THCVC
70	Lê Văn S.	1957	14006474	THCVC
71	Nguyễn Việt H.	1965	10000049	THCVC
72	Nguyễn Việt Kh.	1964	12013501	THCVC
73	Nguyễn Thị Nh.	1982	17066338	THCVC
74	Nguyễn Hữu T.	1959	18000672	THCVC
75	Lê Văn L.	1960	16030991	THCVC
76	Bùi Thị X.	1953	13010100	THCVC
77	Cao Thị Th.	1947	15013806	THCVC

Bảng 3.12. Danh sách người khỏe

STT	Họ và tên	Giới tính	Năm sinh	Kí hiệu
1	Đặng Thị Thu H.	Nữ	1970	DK103-212
2	Vũ Văn Đ.	Nam	1995	DK103-213
3	Nguyễn Thị B.	Nữ	1955	DK103-214

4	Bùi Quý M.	Nam	1979	DK103-215
5	Nguyễn Thị L.	Nữ	1962	DK103-216
6	Vũ Thăng L.	Nam	1981	DK103-216
7	Nguyễn Thị H.	Nữ	1965	DK103-218
8	Nguyễn Ngọc Th.	Nam	1982	DK103-219
9	Đỗ Thị Hải H.	Nữ	1971	DK103-220
10	Đào Thị H.	Nữ	1966	DK103-221
11	Nguyễn Hồng V.	Nữ	1978	DK103-222
12	Vũ Minh Đ.	Nam	1972	DK103-223
13	Phạm Thị Th.	Nữ	1973	DK103-224
14	Phạm Thị X.	Nữ	1980	DK103-225
15	Vũ Văn Ph.	Nam	1969	DK103-226
16	Lương Văn N.	Nam	1996	DK103-227
17	Lê Đình T.	Nam	1965	DK103-228
18	Trần Thị M.	Nữ	1982	DK103-229
19	Nguyễn Thị Th.	Nữ	1971	DK103-230
20	Nguyễn Hồng Đ.	Nữ	1966	DK103-231
21	Hoàng Văn N.	Nam	1978	DK103-232
22	Nguyễn Thị Ch.	Nữ	1972	DK103-2234
23	Nguyễn Thị H.	Nữ	1973	DK103-235
24	Phạm Văn Th.	Nam	1980	DK103-236
25	Phạm Thị Tuyết A.	Nữ	1955	DK103-237
26	Nguyễn Thị D.	Nữ	1979	DK103-238
27	Phạm Văn B.	Nam	1962	DK103-238
28	Phạm Văn Ch.	Nam	1981	DK103-239
29	Đặng Thị D.	Nữ	1965	DK103-240
30	Trương Thị H.	Nữ	1982	DK103-241
31	Hoàng Văn K.	Nam	1971	DK103-242
32	Nguyễn Văn V.	Nam	1966	DK103-243

33	Mai Quý Ch.	Nam	1956	DK103-244
34	Nguyễn Thụy Ch.	Nữ	1964	DK103-245
35	Đặng Thị H.	Nữ	1973	DK103-246
36	Trần Thị Mỹ L.	Nữ	1988	DK103-247
37	Nguyễn Văn Ch.	Nam	1980	DK103-248
38	Phạm Mai H.	Nữ	1974	DK103-249
39	Trần Thị Quế A.	Nữ	1968	DK103-250
40	Lê Văn S.	Nam	1970	DK103-251
41	Phùng Thị X.	Nữ	1972	DK103-252
42	Lưu Thùy D.	Nữ	1967	DK103-253
43	Trịnh Thị Ng.	Nữ	1991	DK103-254
44	Đỗ Văn Ch.	Nam	1969	DK103-255
45	Phạm Thị L.	Nữ	1979	DK103-256
46	Nguyễn Thị H.	Nữ	1965	DK103-257
47	Trần Văn L.	Nam	1976	DK103-258
48	Hoàng Ngọc M.	Nữ	1992	DK103-259
49	Lê Văn M.	Nam	1978	DK103-260
50	Đinh Hải A.	Nam	1977	DK103-261
51	Nguyễn Văn Th.	Nam	1981	DK103-262
52	Trần Thị M.	Nữ	1965	DK103-263
53	Trần Văn H.	Nam	1982	DK103-264
54	Mỹ Thị Lan A.	Nữ	1971	DK103-265
55	Tạ Thị Th.	Nữ	1966	DK103-266