

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

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 942 02 01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. Nguyễn Thị Xuân

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân

Phản biện 1: GS. TS. Nguyễn Duy Bắc

Phản biện 2: PGS.TS. Trần Huy Thịnh

Phản biện 3: PGS.TS. Trịnh Hồng Thái

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi 09 giờ 00', ngày 07 tháng 03 năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Bệnh tăng hồng cầu vô căn (THCVC) hay bệnh đa hồng cầu là một trong những bệnh tăng sinh tủy ác tính (Myeloproliferative neoplasms - MPNs) không xảy ra hiện tượng trao đổi đoạn 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*.

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.

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. 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.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

1. Xác định được 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 được 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.

3. Các nội dung nghiên cứu chính 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 (*Kltho*, *LAG3*, *CTLA4* và *PDI*) và gen tín hiệu phân tử liên quan *SHP-1*, *SHP-2*, *IκB-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*, *IκB-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.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1 Giới thiệu về 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. 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.

1.2 Tế bào đơn nhân máu ngoại vi

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.

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

Protein *A20* hay còn gọi là TNFAIP3 là protein được mã hóa bởi gen *A20* và có vai trò như một chất điều hòa ngược phân tử NF-κB. 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. Bất hoạt hoặc xóa gen *A20* có liên quan đến một số bệnh ác tính, dẫn đến tăng sinh tế bào trong bệnh bạch cầu mãn tính dòng tế bào Lympho T, u lympho tế bào B trung thất nguyên phát và u lympho Hodgkin cổ điển.

Protein *Otubain-1* là một protein khối u bù đắp trứng gần đây được xác định như một deubiquitinating enzyme (DUBs) bằng cách tách chuỗi ubiquitin từ phân tử TRAFs. *Otubain-1* đóng vai trò quan trọng trong

sự khởi đầu và phát triển ung thư. 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.

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 khảm. Ngoài ra, nó còn liên quan đến các khối u lành tính thường gặp ở cổ hoặc nhiều vị trí khác. Protein CYLD là một DUB thuộc họ protein USP có chức năng ức chế khối u ở bệnh ung thư đại tràng, phổi, khối u ác tính và đa u tủy. *CYLD* đã được nghiên cứu trên bệnh bạch cầu lympho T cấp tính.

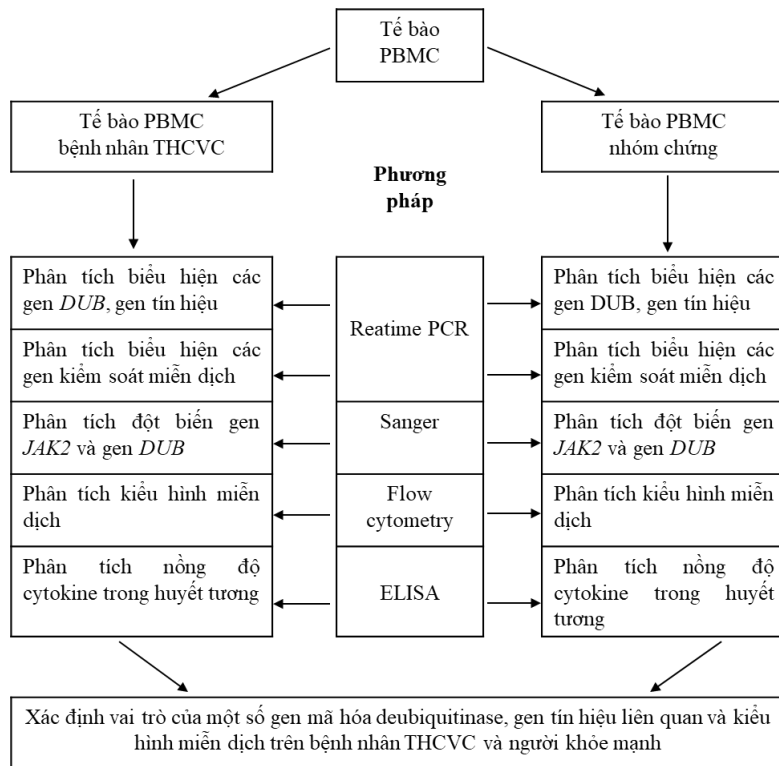
Protein Cezanne là một DUB có trình tự tương đồng với A20, cũng giống như A20, Cezanne có vai trò điều hòa ngược con đường tín hiệu NF- κ B. Việc kích hoạt yếu tố phiên mã NF- κ B bởi các cytokine như TNF- α dựa vào sự thay đổi ở khắp nơi của các protein tương tác với thụ thể bao gồm RIP1, dẫn đến kích hoạt các kinase xuôi dòng. 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.

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

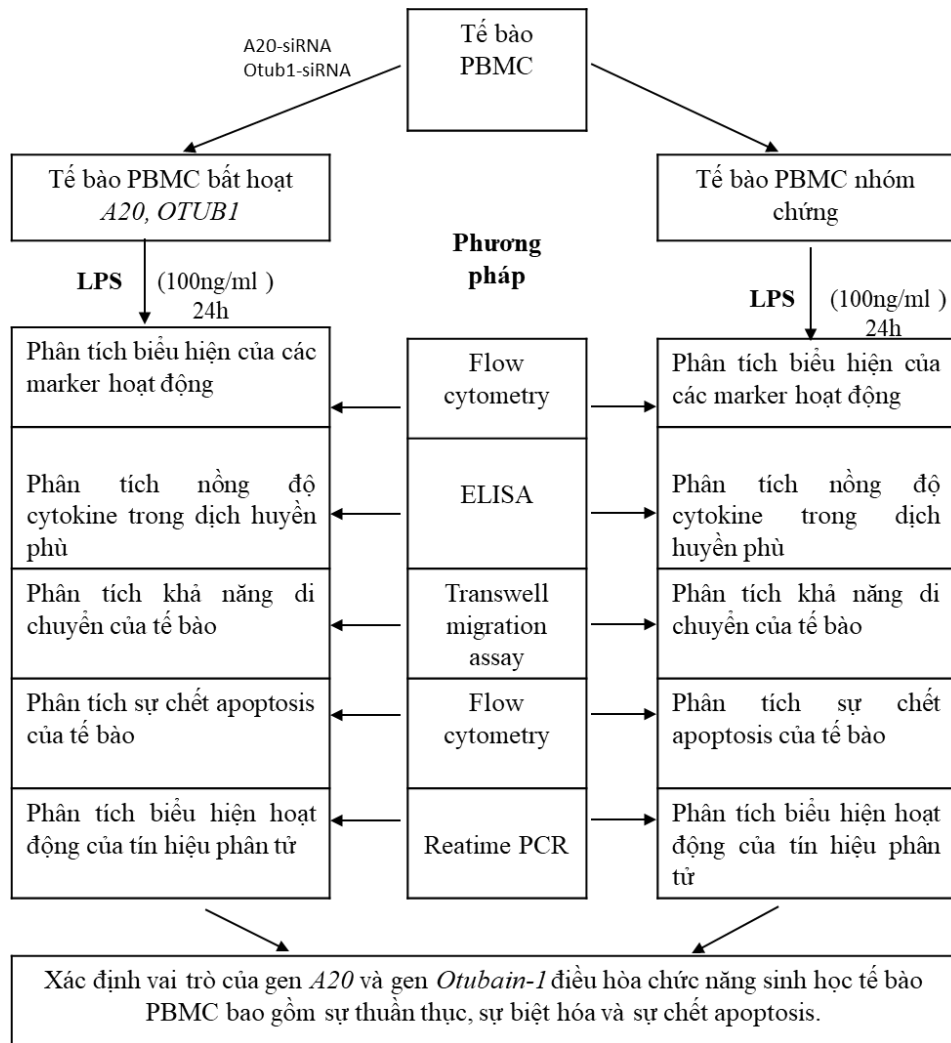
2.1 Vật liệu nghiên cứu

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 độ tuổi trung bình là 58.7. PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của các tình nguyện viên với thể tích mỗi mẫu là 150 ml.

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

2.3.1.1 Tách huyết tương

2.3.1.2 Tách chiết DNA và RNA

2.3.1.3 Khuếch đại gen (PCR)

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

2.3.1.5 Tổng hợp cDNA

2.3.1.6 Real-Time PCR

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

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

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

2.3.1.10 Đếm tế bào dòng chảy

2.3.1.11 Phương pháp ELISA phân tích nồng độ cytokine

2.3.1.12 Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh

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

Kết quả xét nghiệm sinh hóa máu chỉ ra tỷ lệ bệnh nhân THVCV có chỉ số axit uric, bilirubin gián tiếp, protein toàn phần, globulin và LDH cao hơn người khỏe mạnh (Bảng 3.1). Nồng độ các chỉ số sinh học này

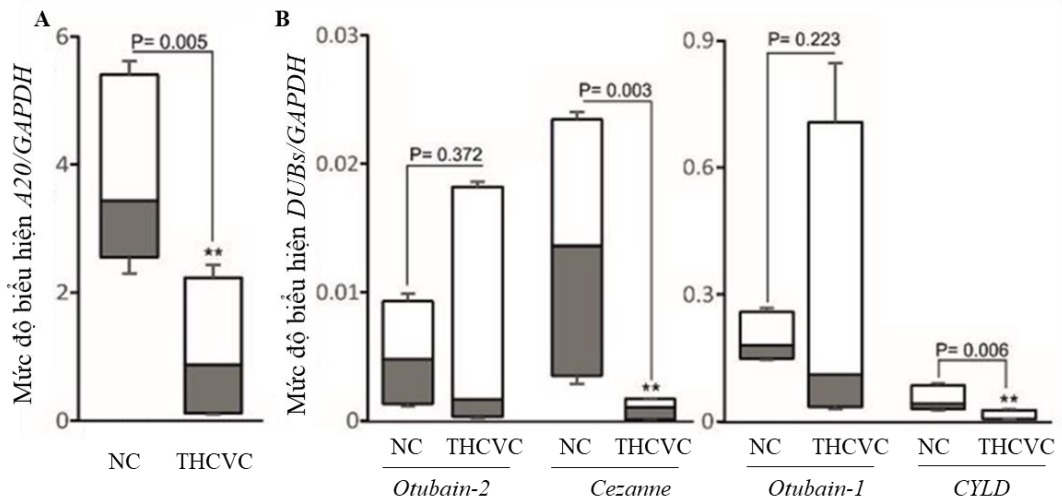
tăng cao chỉ ra mức độ ảnh hưởng cao của bệnh đến sự tổn thương các cơ quan thận, gan và một số cơ quan khác. Nồng độ LDH tăng cao dẫn đến tăng nồng độ lactat trong máu và tổn thương mô. Ngoài ra, các chỉ số hóa sinh khác như ure, glucose, ferritin, AST và ALT cũng có một số bệnh nhân có các chỉ số này cao hơn bình thường.

Bảng 3.1: 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 biểu hiện một số gen deubiquitinase trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

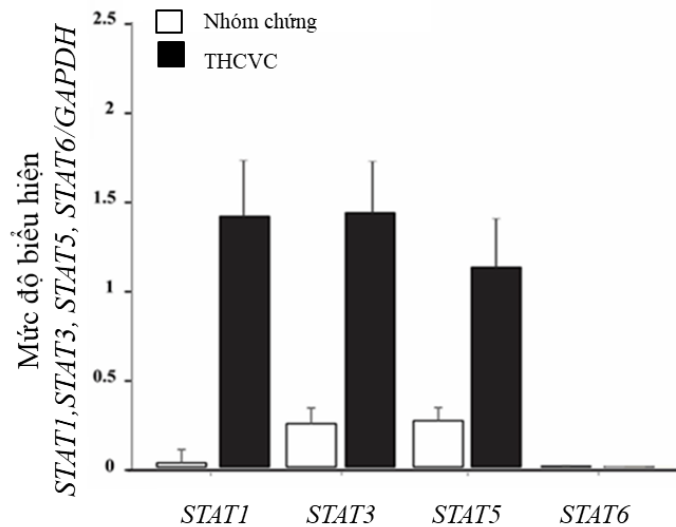
Nghiên cứu đã chỉ ra rằng mức độ biểu hiện mRNA của *A20*, *Cezanne* và *CYLD* giảm đáng kể ở bệnh nhân THCVC so với nhóm đối chứng (Hình 3.1A), tuy nhiên, không có sự khác biệt trong biểu hiện phiên mã của các gen DUBs khác bao gồm *Otubain-1* và *Otubain-2* giữa nhóm bệnh nhân và nhóm chứng đã được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



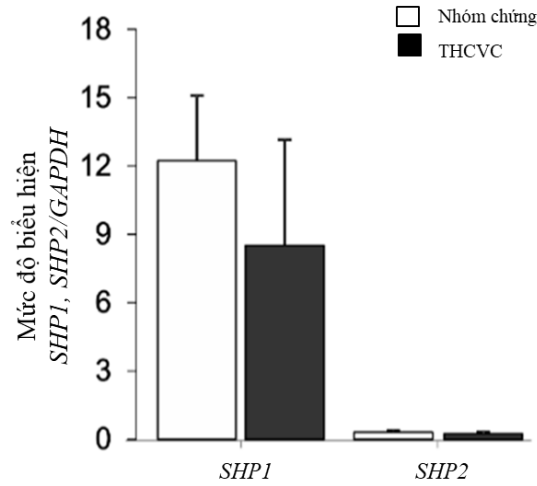
Hình 3.1. Mức độ biểu hiện gen của một số gen DUB ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

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

Mức độ biểu hiện các gen liên quan đến tín hiệu phân tử STAT bao gồm các gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* đều có biểu hiện tăng cao ở bệnh nhân THCVC so với mẫu đối chứng phản ánh rằng, gen *STAT* đặc biệt quan trọng trong điều hòa quá trình gây bệnh THCVC. Đây là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra sự tăng biểu hiện của 3 gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* trên bệnh nhân THCVC.



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

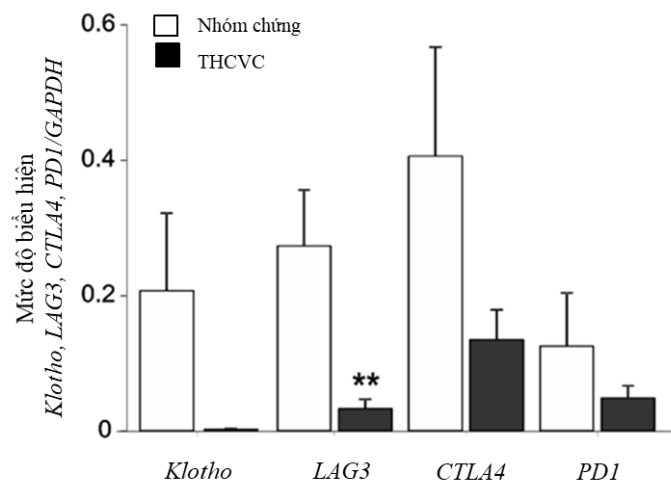


Hình 3.3. Biểu hiện gen *SHP1* và *SHP2* trên bệnh nhân THCVC

Bên cạnh các gen kiểm soát miễn dịch, nhóm gen *SH2* domain containing protein tyrosine phosphatase (*SHP*) cũng đóng góp vai trò quan trọng trực tiếp điều hòa các quá trình sinh lý tế bào. Phân tích biểu hiện gen *SHP-1* và *SHP-2* liên quan đến hoạt động của tín hiệu tyrosine phosphatase cho thấy rằng biểu hiện của gen *SHP-2* không thay đổi so với người khỏe, mặt khác *SHP1* có biểu hiện giảm hơn so với mẫu đối chứng. Điều này cho thấy rằng, biểu hiện của bệnh THCVC so với bệnh bạch cầu gần như khác biệt về đột biến một số gen chức năng và biểu hiện của một số gen liên quan đến hoạt động của tế bào miễn dịch.

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

Kết quả kiểm tra mức độ biểu hiện một số gen liên quan đến điều hòa hoạt động tế bào T bao gồm 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*.



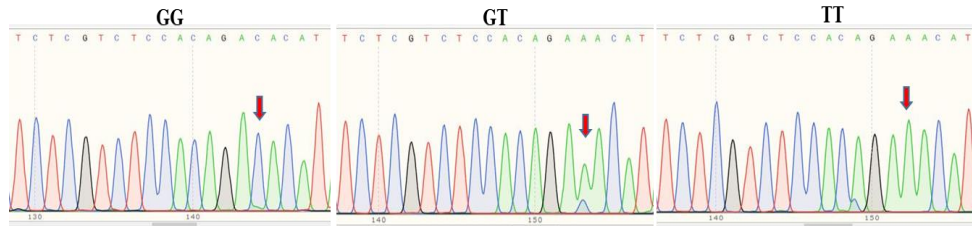
Hình 3.4 Biểu hiện gen *Klotho*, *LAG3*, *CTLA4*, *PD1* trên bệnh nhân THCVC

3.1.5 Phân tích đột biến *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, chúng tôi đã khảo sát tần số kiểu gen của đột biến này để xác định mối liên hệ giữa các đột biến ở gen *JAK2*. Chúng tôi quan sát thấy rằng 51/77 (66,23%) trường hợp THCVC không được điều trị dương tính với đột biến *JAK2*^{V617F} (Hình 3.5). Đột biến *JAK2*^{V617F} xảy ra do 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, dị hợp GT hay đồng hợp TT mà không gây ra nhầm lẫn (Bảng 3.2; 3.3).



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

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 (p)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (p)	HWE quần thể (p)
$JAK2/rs77375493$	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 p
$rs77375493$	$JAK2$	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, PhD-SNP, Polyphen-2, SIFT, SNAP 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 Janus kinase 2 (Hình 3.6.).

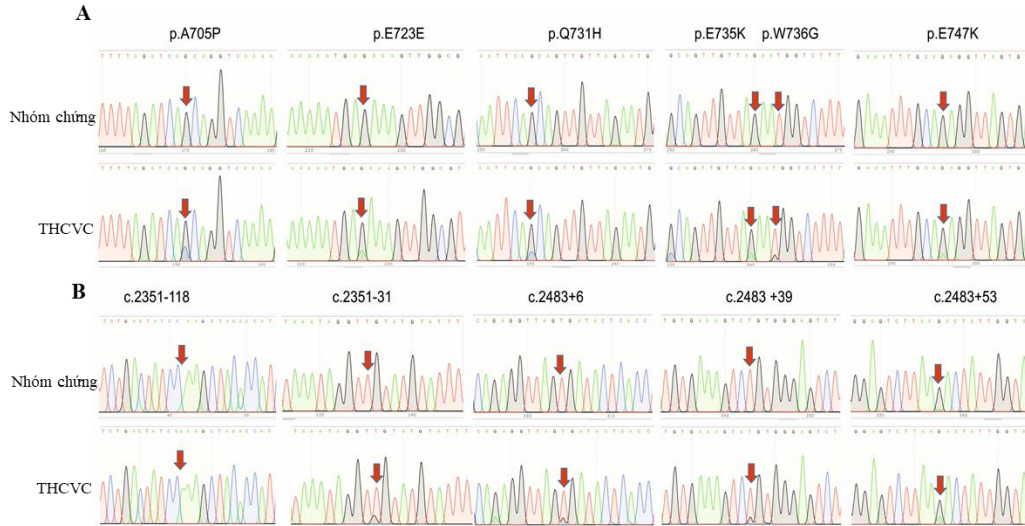
Species	JAK2 V617									
<i>Homo sapiens (Human)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	D
<i>Monodelphis domestica (Gray short-tailed opossum)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Rattus norvegicus (Rat)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Myotis lucifugus (Little brown bat)</i>	V	L	N	Y	G	V	C	V	C	E
<i>Meleagris gallopavo (Wild turkey)</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

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

Trình tự gen *CYLD* xác định được 6 thay đổi nucleotide ở exon 15 (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 (nsSNP), gây ra những thay đổi trong gốc axit amin, và một SNP p.E723E còn lại (c.2411 G> A) là đột biến im lặng. Năm thay đổi nucleotide bên trong, 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 được tìm thấy (Hình 3.7 B).



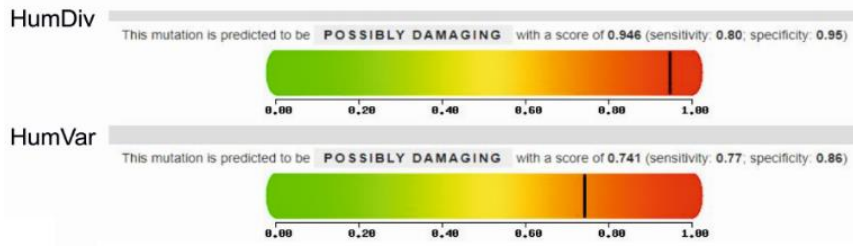
Hình 3.7. Các điểm đa hình của gen *CYLD* ở bệnh nhân THCVC và nhóm chứng.

Trong số 11 SNP, sự phân bố kiểu gen của tất cả ngoại trừ 2 SNP p.E747K và c.2483+53 G> A đều phù hợp với cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0,05$). Tần số alen phụ (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 (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 [230]. 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. Nghiên cứu cho thấy rằng, chỉ có SNP c.2483+6 T>G được dự đoán là SNP thay đổi vị trí cắt (Bảng 3.6 A). Bên cạnh đó, phần mềm dự đoán MaxEntScan thông qua phân tích điểm của MaxENT, MDD, MM và WMM chỉ ra rằng chỉ số các loại trên của SNP c.2483+6 T>G thấp hơn nhóm đối chứng (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				
pos	Wt.Seq (9bases)	SD-Score	Ri	CV	Mt.Seq (9bases)	SD-Score	Ri	CV	Δ SD-Score	Δ Ri	Δ CV	Prediction
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*), quỳ 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).

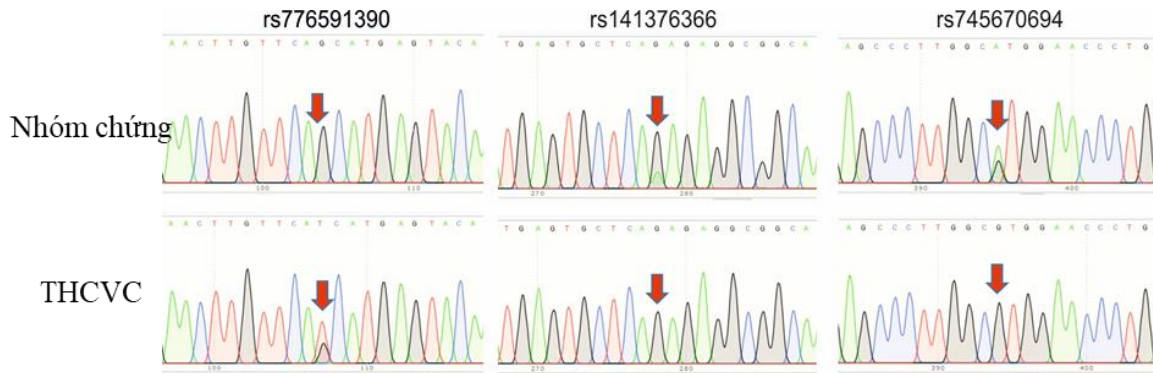
Species	p.W 736											
<i>Homo sapiens (Human)</i>	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Rattus norvegicus (Rat)</i>	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Monodelphis domestica (Gray short-tailed opossum)</i>	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Sarcophilus harrisii (Tasmanian devil)</i>	Q	L	L	E	W	S	F	I	N	S	N	
<i>Ornithorhynchus anatinus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

Hình 3.9. So sánh trình tự amino acid tại vị trí p.W736 trong protein CYLD

Giữa các loài khác nhau được đánh dấu bằng ô đậm nét liền.

3.1.7 Phân tích đột biến gen A20 trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn và người khỏe

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 A20 ở BN THCVC và nhóm chứng

Bảng 3.7. Sự phân bố kiểu gen của các SNP trên gen *CYLD* 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%)	

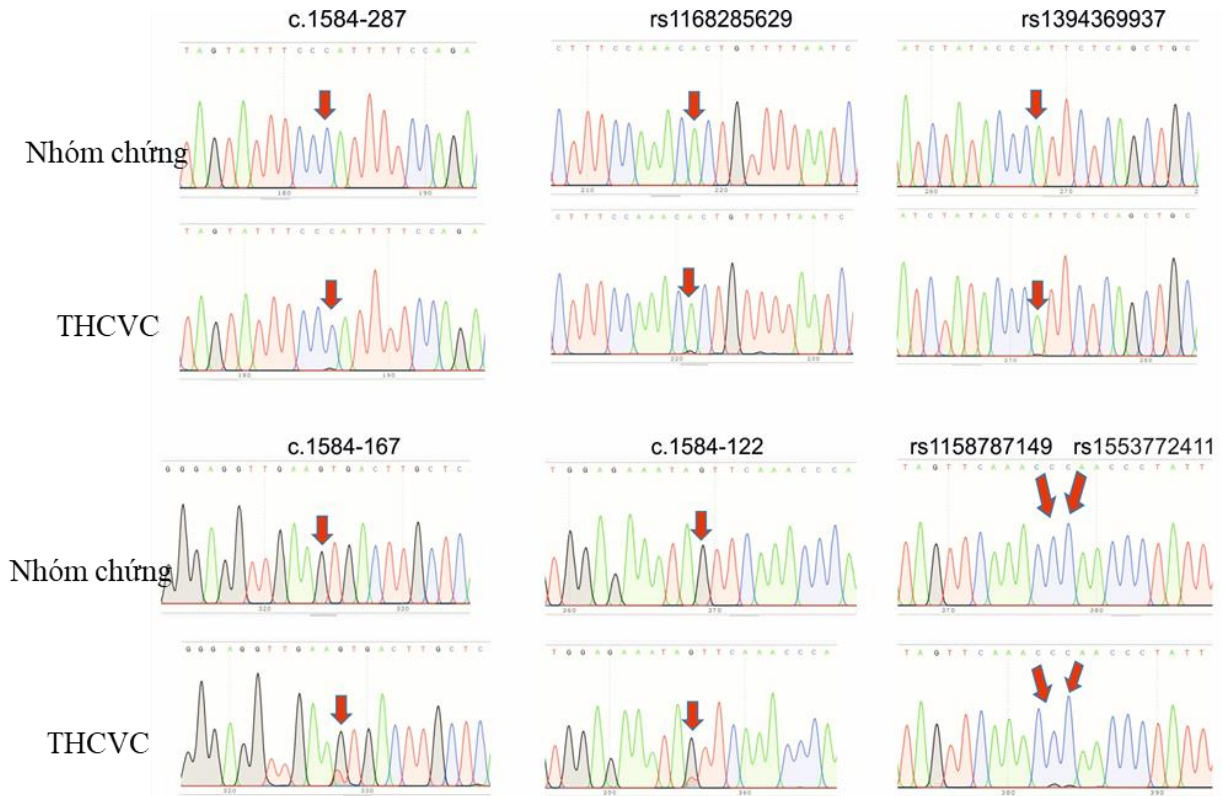
Bảng 3.8. So sánh tần số kiểu gen của các gen A20 giữa bệnh nhân THCVC và nhóm chứng

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

Kết quả cho thấy 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 và người khỏe

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

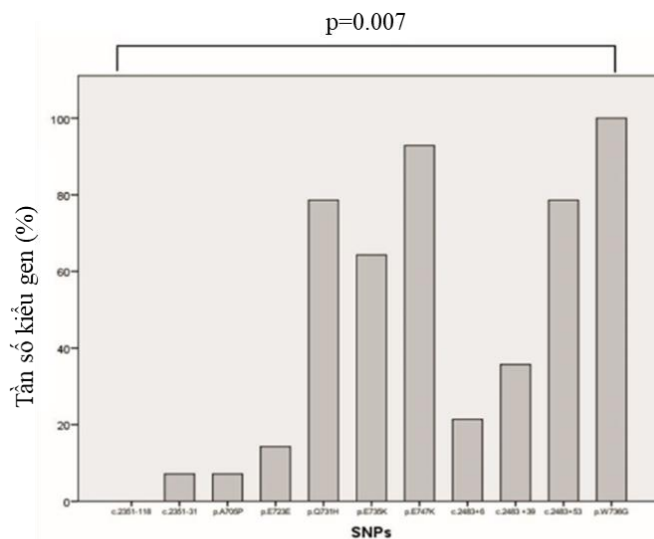
Phân tích các biến thể trên gen *Cezanne* cho thấy, 7 trong số 77 (9,09%) bệnh nhân THCVC mang ít nhất 2 SNP trong gen *Cezanne*. Ngoài ra, để xác định mối liên quan giữa các đột biến trong gen *CYLD* và *Cezanne*, chúng tôi cũng quan sát thấy các mẫu THCVC mang biến thể p.W736G và/hoặc c.2483+6 trong 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	Cezanne	CC	55 (100%)	71 (92.21%)	0.007⁽¹⁾
		CG	0 (0%)	6 (7.79%)	
rs1168285629	Cezanne	AA	53 (96.36%)	70 (90.91%)	0.251 ⁽¹⁾
		AG	2 (3.64%)	7 (9.09%)	
rs1394369937	Cezanne	AA	55 (100%)	73 (94.81%)	0.059 ⁽¹⁾
		AG	0 (0%)	4 (5.19%)	
c.1584-167	Cezanne	GG	55 (100%)	75 (97.4%)	0.246 ⁽¹⁾
		GT	0 (0%)	2 (2.60%)	
c.1584-122	Cezanne	GG	54 (98.18%)	73 (94.81%)	0.445 ⁽¹⁾
		GT	1 (1.82%)	4 (5.19%)	
rs1158787149	Cezanne	CC	55 (100%)	73 (94.81%)	0.059 ⁽¹⁾
		CG	0 (0%)	4 (5.19%)	
rs1553772411	Cezanne	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).

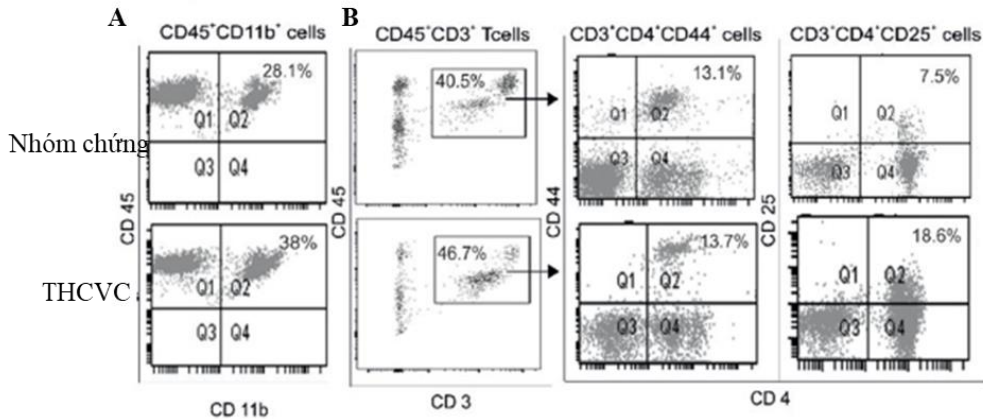


Hình 3.12. Mối liên hệ giữa SNP W736G và 9 SNP khác trong gen *CYLD* trên bệnh nhân THCVC

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

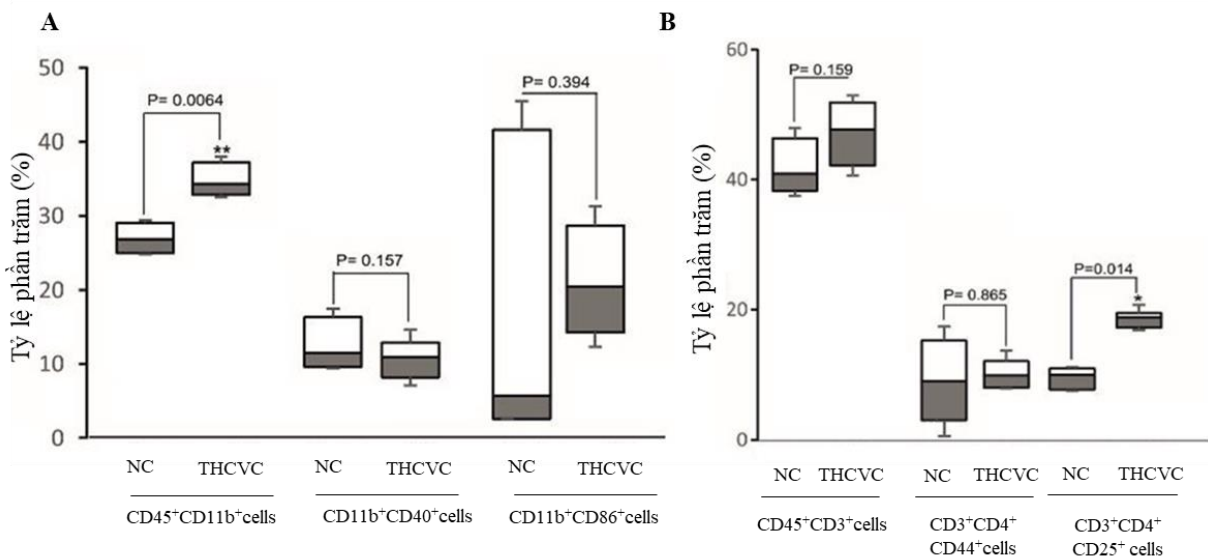
Trong kết quả này, các tế bào CD45⁺ được coi là tế bào bạch cầu đã được kiểm tra trong tất cả các thí nghiệm. Phân tích tế bào dòng chảy cho thấy tỷ lệ tế bào CD11b⁺ tăng lên trong tuần hoàn máu của bệnh

nhân THCVC (Hình 3.13 A, 3.14A). Sự hoạt hóa của tế bào T CD3⁺CD4⁺ đã được tăng cường trong bệnh nhân THCVC (Hình 3.13A). Số lượng tế bào CD3⁺CD4⁺CD44⁺ dường như không tăng ở bệnh nhân THCVC và mẫu chứng (Hình 3.13 B, 3.14 B).



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

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).

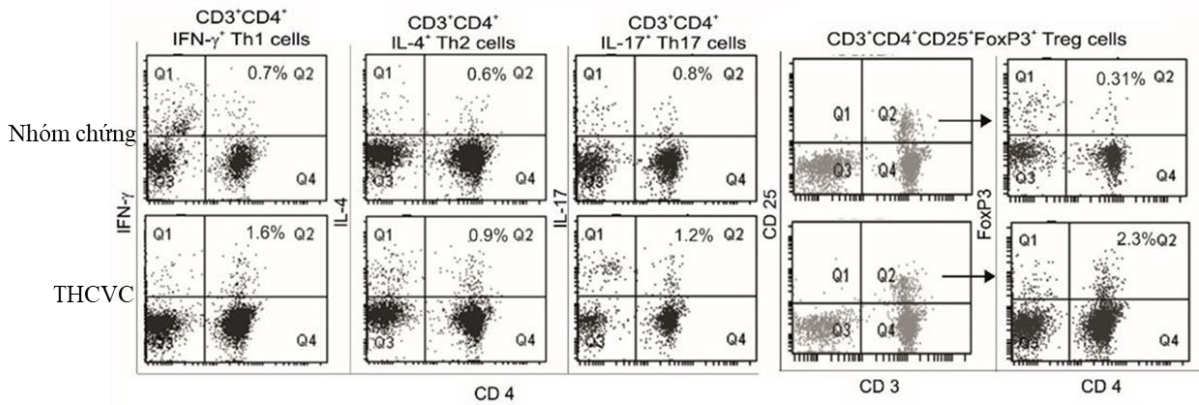


Hình 3.14. Biểu đồ biểu hiện về tỷ lệ phần trăm các tế bào trên bệnh nhân THCVC so với mẫu đối chứng

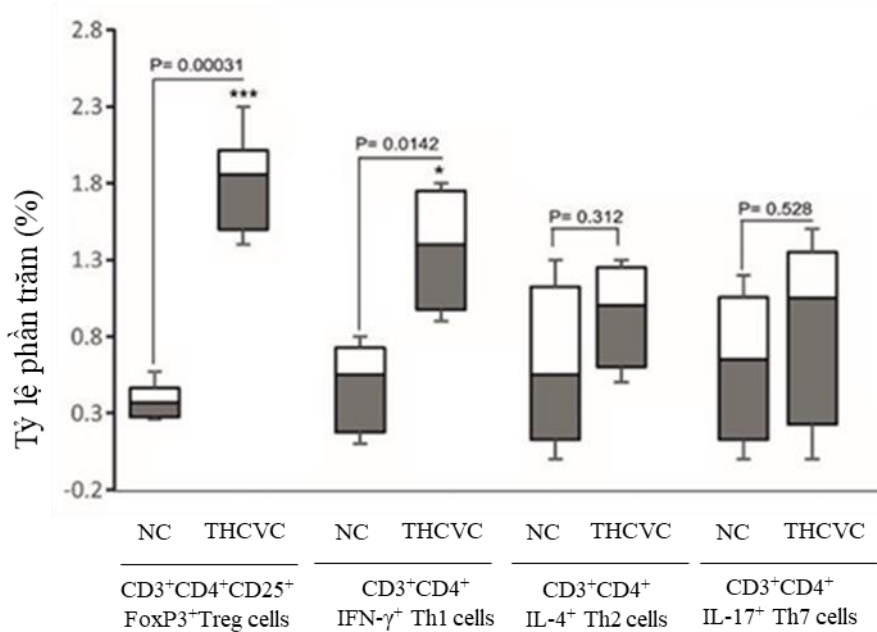
Tiếp theo, phân tích sự xâm nhập của tế bào T hoạt hóa vào tuần hoàn máu cho thấy, các tế bào biểu hiện CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg- tế bào T điều hòa) và CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1) được huy động vào hệ tuần hoàn cao hơn đáng kể so với mẫu đối chứng. Số lượng tế bào CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1) và CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 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, 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.



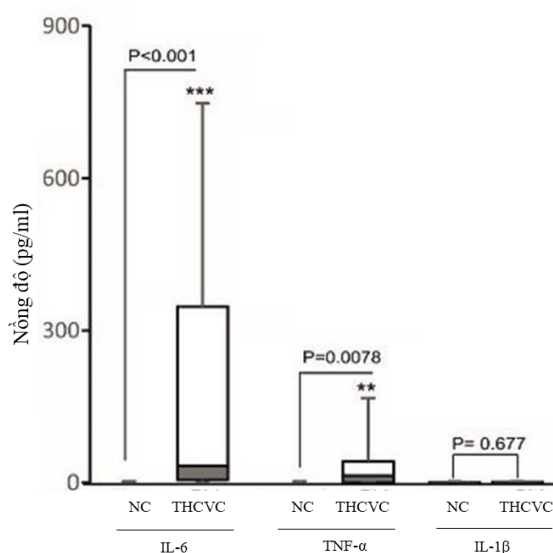
Hình 3.15 Hình dot blot biểu hiện khả năng tiết của các loại tế bào T trên bệnh nhân THCVC.



Hình 3.16. Biểu hiện một số tế bào miễn dịch trên bệnh nhân THCVC so với mẫu đối chứng

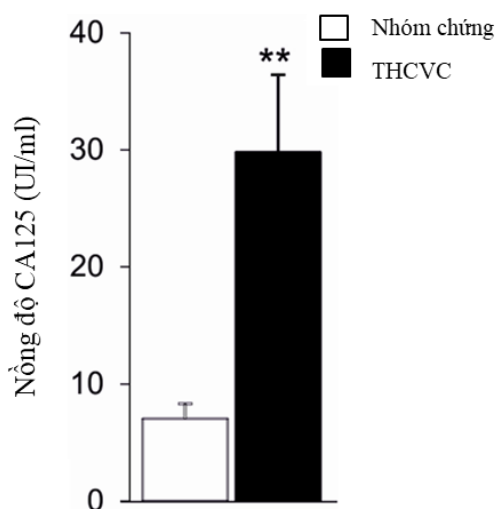
3.1.10 Sự tiết cytokine và kháng nguyên ung thư trên bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn

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. Hai protein này cũng được gọi là chất ức chế phản ứng viêm. 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 thanh của bệnh nhân THCVC có thể liên quan đến mức độ biểu hiện hai gen trên. Tương tự như một nghiên cứu gần đây, chúng tôi 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 thanh (Hình 3.17).



Hình 3.17. Kết quả đo nồng độ IL-6, TNF- α , IL-1 β bằng phương pháp ELISA.

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, 35UI/mL.

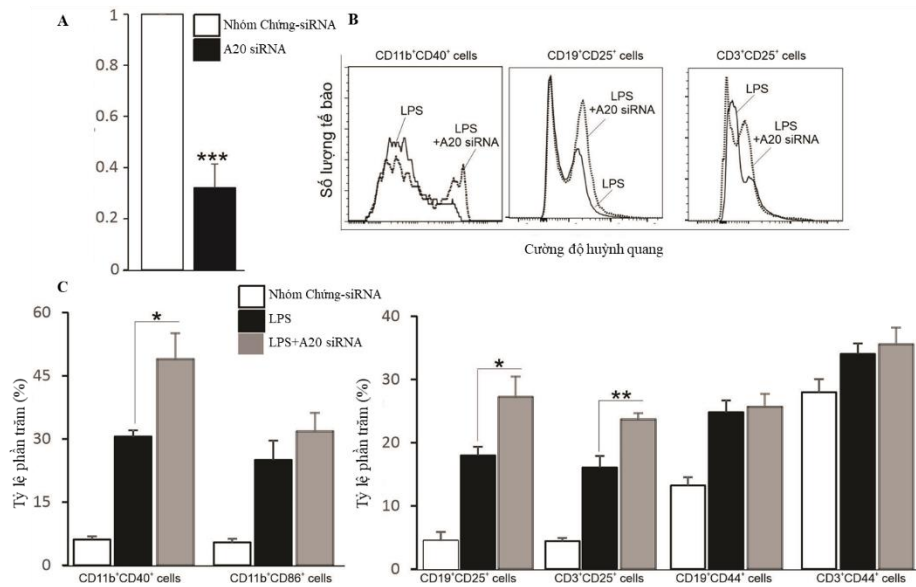


Hình 3.18. Kết quả đo nồng độ CA125 bằng phương pháp ELISA.

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

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

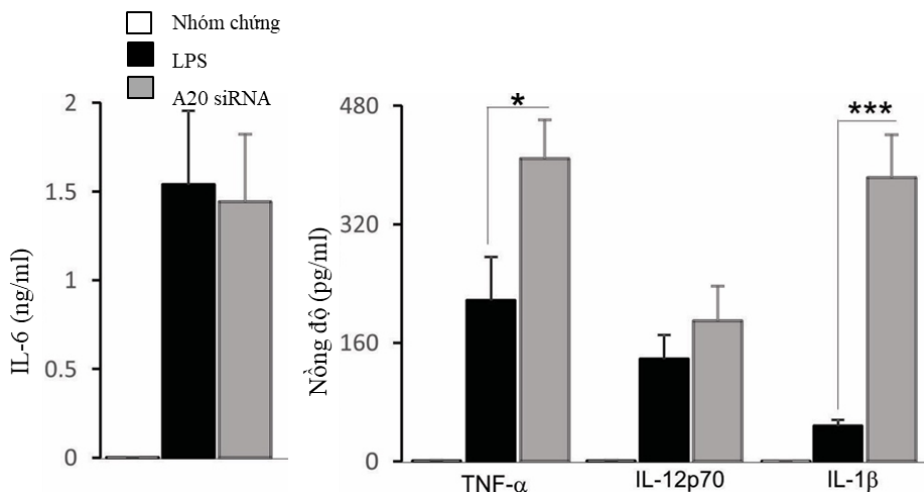
Các loại tế bào dương tính với CD45⁺ trong quần thể tế bào PBMC được phân tích về tỷ lệ phần trăm và sự hoạt hóa. Đầu tiên, kết quả của việc bất hoạt A20 đã được kiểm tra bằng kỹ thuật Real-time PCR sau khi xử lý tế bào PBMC với siRNA. Kết quả chỉ ra rằng mức độ biểu hiện gen A20 đã bị giảm rõ rệt sau khi sử dụng siRNA A20 (Hình 3.19A). 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 3.19B-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 3.19B-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 3.19. Kiểu hình miễn dịch của PBMCs bất hoạt gen A20

3.2.2 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 3.20.

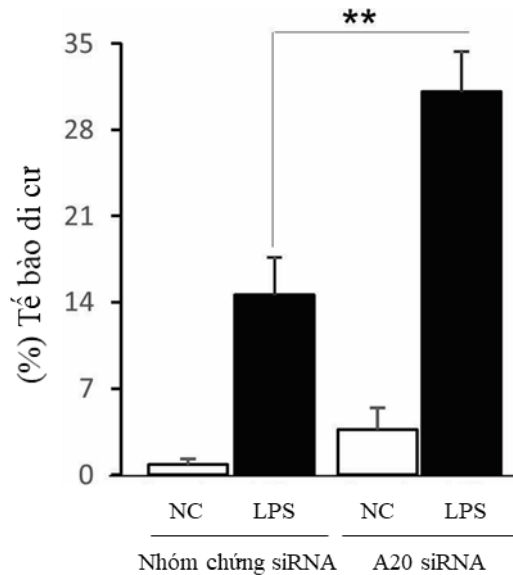


Hình 3.20. Kết quả giải phóng các cytokine từ PBMCs bất hoạt gen A20.

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.

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

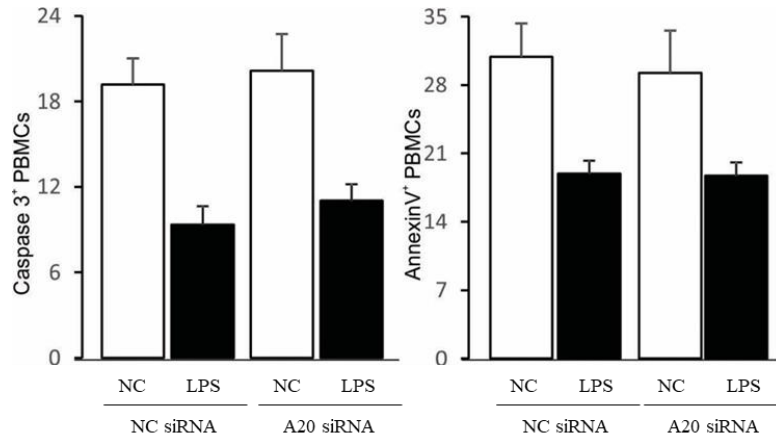
Ngoài việc điều hòa các phản ứng miễn dịch bằng cách tiết ra các cytokine khác nhau, sự di chuyển của tế bào cũng là một dấu hiệu chức năng của các PBMC được kích hoạt. Tương tự như tác dụng ức chế của A20 đối với sự trưởng thành chức năng của PBMC, sự di chuyển của tế bào này tăng lên đáng kể khi được bất hoạt gen A20 (Hình 3.21).



Hình 3.21. Sự di chuyển của tế bào PBMC khi được bất hoạt gen A20.

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

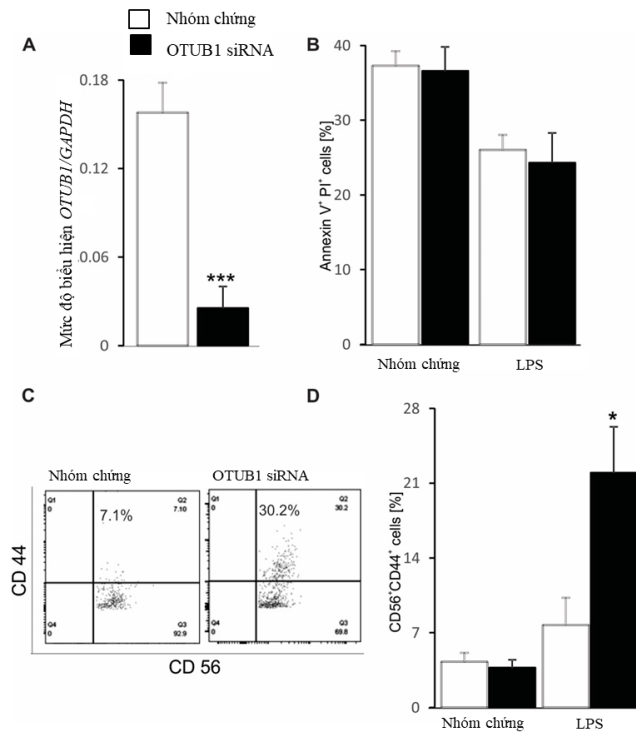
Cùng với hoạt động chức năng tiết các cytokine của tế bào PBMC thì quá trình apoptosis đóng vai trò đặc biệt quan trọng. Nó quy định nhiều yếu tố trong cân bằng nội môi miễn dịch, đồng thời kiểm soát sự khởi đầu, chấm dứt, cường độ và thời gian các phản ứng miễn dịch. Các marker sinh học liên quan đến 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 3.22. Phân tích khả năng sống sót của PBMCs dưới sự ảnh hưởng của A20.

3.2.5 Otubain-1 trong việc 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 lý 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 3.23A).

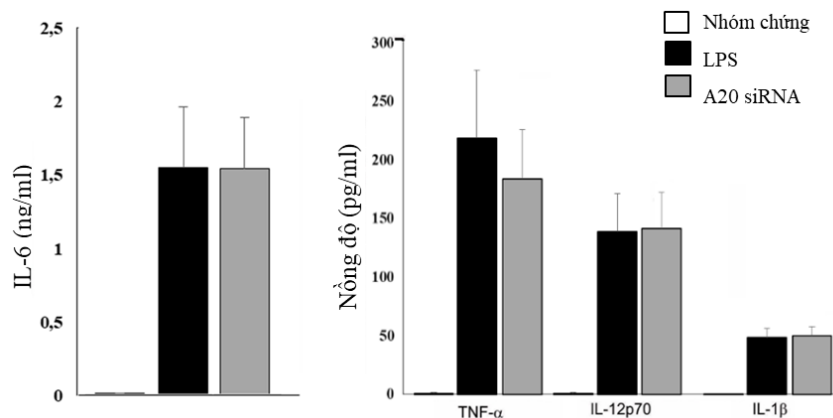


Hình 3.23. Ảnh hưởng của Otubain-1 đến sự kích hoạt và apoptosis của PBMCs

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 phosphoryl hóa phosphatidylserine (PS) với môi trường ngoại bào. Như được hiển thị trong Hình 3.23B, 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.

3.2.6 *Otubain-1* trong việc 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 3.24. Kết quả giải phóng các cytokine từ PBMCs bất hoạt *Otubain-1*

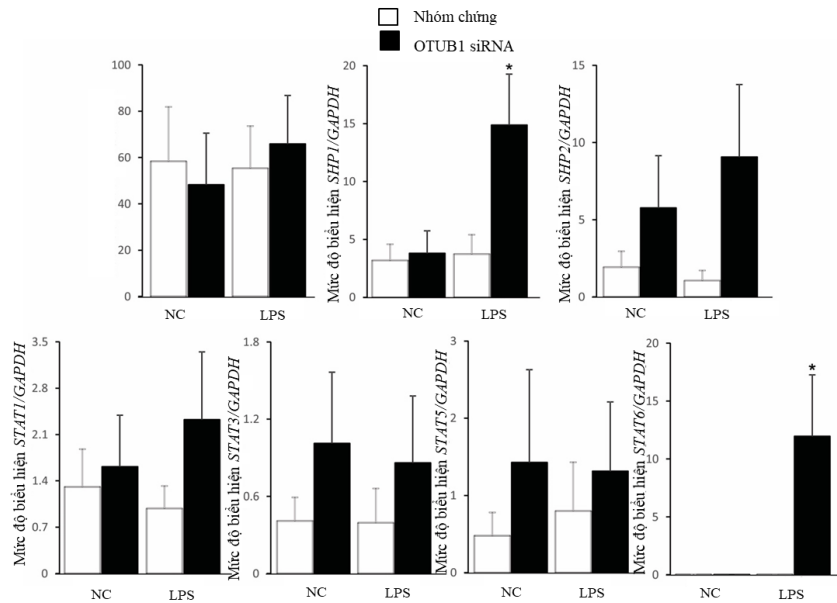
Kết quả được minh họa trong Hình 3.24 chỉ ra rằng, sau khi xử lý tế bào PBMC với LPS, khả năng sản xuất các cytokine gây viêm IL6, TNF- α , IL-12p70 và IL-1 β tăng lên. Tuy nhiên, sự giải phóng các cytokine này không thay đổi so với mẫu đối chứng khi không có sự hiện diện của gen *Otubain-1*. Kết quả 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.

3.2.7 *Otubain-1* đến 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*, *IκB-α*, *STAT1*, *STAT3* và *STAT5* không thay đổi khi bất hoạt gen *Otubain-1* (Hình 3.25).

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 chứng sau khi được kích thích bằng LPS (Hình 3.25), 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 3.25. Ảnh hưởng của *Otubain-1* đến con đường tín hiệu trong PBMCs

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

Sự hiện diện của đột biến *JAK2*^{V617F} ở bệnh nhân THCVC được tiến hành để xác định mối liên hệ 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 chỉ ra rằng sự hiện diện của đột biến này trong ≥ 90% trường hợp THCVC.

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. 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 *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 *Cezanne* có liên quan đến tiên lượng xấu trong ung thư biểu mô tế bào gan. 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 mang bởi 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.

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*. 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 và bệnh nhân CML. 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, 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.

4.2 Thảo luận về vai trò gen *A20* điều hòa chức năng tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Đến nay, protein A20 đã được nghiên cứu tham gia vào ức chế kích hoạt 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. Ngoài sự hiện diện của các TBT, T và B, PBMCs còn bao gồm các loại tế bào khác như tế bào tiền thân dòng tủy, tế bào NK và bạch cầu đơn nhân. Hơn nữa, sự liên kết giữa số lượng tế bào và biểu hiện kích hoạt của chúng cần được phân tích sâu hơn để xác định vai trò chức năng của từng loại tế bào trong quần thể PBMC. Do đó, chúng tôi đã quan sát thấy rằng biểu hiện giảm *A20* trên PBMC dẫn đến tăng biểu hiện của CD25 trên các tế bào B và T và lượng CD40 cao hơn trên các tế bào tiền thân dòng tủy cũng như tăng cường giải phóng các cytokine gây viêm của TNF- α và IL-1 β .

Tóm lại, nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng *A20* giảm dẫn đến tăng kích hoạt một phần tế bào tiền thân dòng tủy, B và T, giải phóng TNF- α và IL-1 β từ tế bào PBMC. Tuy nhiên, quá trình apoptosis của PBMC là độc lập với sự hiện diện của *A20* trong PBMC. Mức độ biểu hiện *A20* có thể điều hòa phản ứng miễn dịch trong bệnh tự miễn và ung thư.

4.3 Thảo luận về 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. 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.

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.

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*.

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).

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. (2021) *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, 19(3):p433-440, ISSN: 1811-4989.